

해금사가 만성 비세균성 전립선염 모델에서 혈액학적 및 세포조직학적 변화에 미치는 영향

이병철 · 김상우 · 안영민 · 두호경 · 안세영
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of *Lygodium japonicum* Treatment on Hematological and Cyto-pathological Alterations in Non-Bacterial Prostatitis Rat Model

Byung-Cheol Lee, Sang-Woo Kim, Young-Min Ahn, Ho-Kyung Doo, Se-Young Ahn
Dept. of Internal medicine, College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea.

ABSTRACT

Objective : Although chronic non-bacterial prostatitis is a common disease, it is very difficult to treat effectively. *Lygodium japonicum* has been traditionally used in treatment of urinary tract inflammation and voiding disturbance. In this study, we investigated the therapeutic effects and action mechanism of *Lygodium japonicum* in the rat model of non-bacterial prostatitis induced by castration and testosterone treatment.

Methods : Five-month-old rats were treated with 17 β -estradiol after castration for induction of experimental non-bacterial prostatitis, which is similar to human chronic prostatitis in histopathological profiles. *Lygodium japonicum* and testosterone were administered as an experimental specimen and a positive control, respectively. The prostates were evaluated by histopathological parameters including the epithelial score and epithelio-stromal ratio for glandular damage, PCNA labeling index for cyto-proliferation and a TUNEL(deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) assay for cell apoptosis.

Results : While prostates of control rats revealed severe acinar gland atrophy and stromal proliferation, the rats treated with *Lygodium japonicum* showed a diminished range of tissue damage. Epithelial score was improved in the *Lygodium japonicum* group over that of the control (P<0.05). The epithelio-stromal ratio was lower in the *Lygodium japonicum* group when compared to that of the control (P<0.05). Although there was no difference in PCNA and TUNEL positive cells of the glandular epithelia, we found an decreased number of PCNA positive cell and concurrent increase of TUNEL positive cells in the stroma of *Lygodium japonicum* treated rats (P<0.01).

Conclusions : These findings suggest that *Lygodium japonicum* may protect the glandular epithelial cells and also inhibit stromal proliferation in association with suppression of cyto-proliferation and stimulation of apoptosis. We concluded that *Lygodium japonicum* could be a useful remedy agents for treating chronic non-bacterial prostatitis.

Key words: chronic non-bacterial prostatitis, *Lygodium japonicum*, PCNA, apoptosis.

1. 서론

전립선염은 성인 남성의 약 50%에서 일생동안 한번은 경험하게 된다고 할 정도로 높은 이환율을 가진 질환으로서, 청장년층에 호발하는 것으로 알려져 있다. 그리고 이러한 전립선염은 크게 급성과

· 교신저자: 안세영 서울특별시 동대문구 회기동 1
경희의료원 부속한방병원 한방 6내과
Tel : 02-958-9153 Fax : 02-958-9158
E-mail : ajhj@unitel.co.kr

만성 및 세균성과 비세균성으로 분류되는데, 이중 만성 비세균성 전립선염이 약 70%이상을 차지하는 것으로 보고되어 있지만 아직까지 정확한 발병 원인조차 밝혀져 있지 않다^{1,2,3,4)}.

만성 비세균성 전립선염은 무증상에서부터 배뇨 자극증상, 하복부동통, 하부요통, 회음부와 외부성기의 동통, 불쾌감 및 발기부전 등 매우 다양한 증상을 나타내며, 대부분의 경우 요검사와 전립선액 배양 검사상 세균이 배양되지 않는 것이 특징이다^{3,4)}.

서양의학적으로 만성 비세균성 전립선염은 아직까지 완전한 치료법이 없고, 보조요법으로서 교감 신경차단제, 근이완제, 새로운 퀴놀론계 항생제나 테트라사이클린 항생제와 항염제 등의 약물치료와 마사지, 좌욕 및 주기적인 성생활을 통한 정액의 배출 등이 시행되고 있으나, 효과적으로 치료하기가 매우 힘들며, 치료 후에도 잦은 재발로 고통을 받아 정신과적 문제까지 야기하는 것으로 알려져 있다^{5,6,7)}.

전립선염은 동양의학적으로 蠱病, 尿濁 및 淋病 등의 범주에 속하며, 그 원인으로는 邪氣入肝, 肝經濕熱, 肝經鬱結, 房勞過多, 陰精內敗 및 強忍交接 등으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 치료에 있어서는 淸熱消腫하거나 瀉肝涼血한다²⁾. 그러나 만성 비세균성 전립선염은 세균성 전립선염과는 달리 그 임상증상이 매우 다양하고 비특이적이어서 辨證施治가 어렵고, 치료에 있어서도 약물이 잘 흡수되지 못하는 전립선의 특징으로 인해 동양의학적 접근이 어렵다고 할 수 있다⁸⁾.

현재까지 만성 비세균성 전립선염에 대한 동양의학적 임상 연구가 있었으나, 정확한 효능판정 및 작용기전을 밝히기 위한 실험적 연구는 부족한 실정이다.

해금사 (*Lygodium japonicum*)는 해금사과 (*Schizaeaceae*)에 속한 다년생 草本인 실고사리의 抱子를 건조한 것으로 淸利濕熱, 通淋止痛 등의 효능을 가지고 있어, 동양의학적으로 전립선염에 해당하는 淋病 등의 치료에 응용할 수 있으며⁹⁾, 또한

최근 실험실 및 임상연구를 통해 배뇨장애, 요로감염 및 요로결석 등의 비뇨기 질환에 효능이 있는 것으로 보고되어 있다^{10,11)}.

그러므로 본 연구는 고환절제술 및 17 β -estradiol 투여로 유발된 만성 비세균성 전립선염 모델 쥐^{12,13)}에 해금사를 투여하고 혈액학적 변화 및 조직병리학적 형태와 세포증식 및 세포자사(apoptosis)의 변화를 분석함으로써 해금사의 약리학적인 효능을 검증하고 이에 대한 임상학적인 치료의 근거를 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험약재의 추출

본 실험에 사용한 해금사(*Lygodium japonicum*)는 경희의료원 약제과에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 총량 200g의 해금사를 1,500ml의 증류수에 넣어 4시간동안 가열추출하고 여과한 여액을 Rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조시켰다. 동결 건조된 각 약제의 1차 추출물 1g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95°C 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였고, 이들 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 이 상층액을 직경 0.2 μ m의 필터에 통과시켜 여과 멸균하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 해금사의 최종 수거율은 60%였다.

2. 만성 비세균성 전립선염의 유발

5개월 된 수컷 Wistar rat (중양실험동물, Korea)을 구입하여 실온에서 cage에서 40-70%의 습도를 유지하며 12시간씩 낮과 밤이 교대되는 환경으로 실험 전 1주일간 사육하여 적응기를 거쳤으며, 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 적응기간을 마친 후 ether 마취하에 rat의 음낭피부를 절개한 후 고환 상위부위의 정관(vas deferense), 혈관, 및 신경조직을 봉합사로 묶은 후 고환과 부

고환을 절제하였다. 고환절제 후 음낭피부를 봉합하고, 1일간의 회복기를 거치게 하였다. 고환절제술 2일째부터 17 β -estradiol (Sigma, USA)을 sesame oil로 희석하여 30일 동안 0.25mg/2ml/kg 용량으로 실험동물의 등에 피하주사하여 만성 비세균성 전립선염을 유발하였다^{12,13)}.

3. 실험군의 배정 및 약재의 투여

본 연구의 실험군은 각 군당 6마리씩 정상군 (Normal group), 대조군 (Control group), 해금사 1.2g 투여군 (Lygodium 1.2 group), 해금사 2.4g 투여군 (Lygodium 2.4 group), 테스토스테론투여군 (testosterone group)의 5군으로 나누어 진행하였다.

정상 대조군은 sham-castration으로 음낭을 절개하여 고환부분을 확인한 후 어떠한 조직의 절제나

결박없이 그대로 봉합하고, 연구기간동안 어떤 약물도 투여하지 않았다. 대조군의 rat에게는 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하였고 17일째부터 생리식염수 5ml/kg만을 경구 투여하였다. 해금사 투여군은 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하면서 17일째부터 해금사를 생리식염수에 현탁하여 1.2g/kg (해금사 1.2g 투여군) 및 2.4g/kg (해금사 2.4g 투여군)의 용량으로 zonde를 이용하여 1일 1회 경구로 주입하였다. 양성 대조군은 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하면서 17일째부터 Testosterone을 corn oil에 2.5mg/2ml의 농도로 2.5mg/kg의 용량으로 피하 주사하였다 (Table I).

Table I. Structure of the Experiment^a

Group	No. of animals	Inflammatory agent	Treatment
Normal	6	No-treatment	No-treatment
Control	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Saline (p.o.)
Lygodium 1.2	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Lygodii 1.2g/kg(p.o.)
Lygodium 2.4	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Lygodii 2.4g/kg(p.o.)
Testosterone	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Testosterone 2.5mg/kg(s.c.)

^aEach parenthesis represents the route of administration. s.c.,subcutaneous injection; p.o.,oral administration

4. 혈액학적 분석

실험 시작 31일째에 rat의 심장에서 채혈하여 백혈구 (white blood cell), 적혈구(red blood cell), 혈색소 (hemoglobin), 적혈구 용적 (hematocrit)과 혈소판 (platelete) 등의 일반 혈액학 분석과 GOT, GPT, γ -GT, 요소질소 (BUN), 및 creatinine 등의 생화학적 분석을 시행하였다.

5. 전립선 무게와 조직병리학적 평가

마지막 투약 다음날 체중 측정과 채혈 후 rat를 희생시켜 전립선을 수술로 절제하여 그 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 각 전립선을 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정한 후 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올에 차례로 담가 탈수시킨 후 파라핀 블록을 만들었다. 이후 microtome을 이용하여 4 μ m의 두께로 각 전립선조직을 관상으로 절편한 다음 gelatin coated slide에 부착시켰다. 작성된 조직절편들은 조직염색을 위하여 xylene에 담가 파라핀을

제거하고, 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올, 증류수에 차례로 담가 재수화 (rehydration)시켰다. 재수화된 조직을 Hematoxyline-Eosin (HE)으로 염색하여 광학현미경하에서 조직학적으로 평가하였다.

6. 세포증식과 세포자연사 (apoptosis)에 대한 면역조직화학

세포 증식과 세포자연사 (apoptosis)에 대한 분석은 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labelling (TUNEL)으로 각각 염색하여 관찰하였다. PCNA 염색은 PCNA staining kit(ZYMED Laboratories, South San Francisco, CA)를 사용하였고, TUNEL 염색은 ApoTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Intervene, New York, NY)를 사용하였다.

1) PCNA 염색

조직절편에 blocking solution을 조직위에 떨어뜨려 20분간 반응시키고, 다시 PCNA primary antibody solution을 떨어뜨려 1시간 반응시킨 후 0.05M phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 3차례 세척하였다. 이후 streptavidin - peroxidase solution을 떨어뜨려 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3차례 세척후 DAB chromogen이 포함된 용액을 떨어뜨려 5분간 반응시킨 후 hematoxylin 용액을 떨어뜨려 대조염색하였다. 이후 조직을 PBS와 증류수에 각각 담가 세척 및 탈수한 후 Histmount를 이용하여 coverglass로 덮어 광학현미경으로 관찰하였다.

2) TUNEL 염색

4 μ m의 두께로 절편된 파라핀 조직을 상기 방법으로 재수화시킨 후 100mg/ml proteinase K solution을 조직에 떨어뜨려 20분간 반응시킨 후 PBS용액으로 3차례로 세척하였다. Enzyme solution과 label solution을 각각 1:9의 비율로 혼합한 용액을 떨어뜨려 humidified chamber에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨 다음 PBS로 3차례로

세척하였다. 세척 후 건조된 조직에 coverter-POD 용액 50 μ l을 떨어뜨려 다시 humidified chamber에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척 후 DAB substrate 50 μ l를 첨가하여 염색하였다. 이후 조직을 PBS와 증류수에 각각 담가 세척 한 후 Histmount를 이용하여 coverglass로 덮어 광학현미경하에서 관찰하였다.

3) PCNA와 TUNEL의 평가

표본에서 현미경상으로 상피세포와 결합조직세포 5000개씩을 카운트하여 이중 염색된 세포의 숫자를 환산하여 세포증식과 apoptosis 정도를 파악하였다.

7. 상피 계수 (epithelial score)와 상피/결합조직 면적 비율 (epithelio- stromal ratio)

선(腺)조직의 손상정도에 대한 평가는 상피 세포 (epithelial cell)의 형태에 따라 점수를 매겨 시행하였다. 각각의 상피 세포의 형태가 원주형 세포 (columnar cell)일 경우 2점을, 입방형 세포 (cuboidal cell)의 경우 1점, 편평양 세포 (squamous-like cell)의 경우 0점을 매겼으며, 각 표본 당 20개씩의 선조직 (gland)내에 존재하는 상피세포를 조사하여 평가하였다.

결합조직 증식을 평가하기 위해서 표본의 전 영역과 분비선영역의 현미경 사진을 이용하여 상피 세포와 결합조직 면적 비율 (epithelio-stromal ratio)을 계산하였다.

8. 통계 분석

모든 실험은 두 번 반복하였다. 통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package (ver 2.00, Graphpad software inc., San Diego, USA)를 이용하여 실험군과 대조군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 사후 검증하였으며, 정상군과 대조군 사이의 비교에는 Mann-Whitney U test를 시행하였다.

해금사가 만성 비세균성 전립선염 모델에서 혈액학적 및 세포조직학적 변화에 미치는 영향

각각의 수치는 평균 ± 표준편차 (mean ± S.D.)로 표시하였으며, 양방 검정 유의도 (Two-tailed p value)는 p값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 결 과

1. 해금사에 의한 체중과 전립선 무게의 변화

고환절제술 및 30일간의 17 β-estradiol 투여와 해금사의 투여가 체중 및 전립선 무게에 미치는 영향을 관찰한 결과, 체중은 정상군의 412.2±48.8g에 비해 대조군은 336.0±30.6g으로 체중감소가 현저하게 나타났다 (P<0.01) (Table 2).

Table II. Common blood count of each experimental group.

Group	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT
Normal	8.1±1.6	8.2±0.3	15.3±0.4	45.3±1.2	721.2±63.9
Control	5.9±1.4 [#]	7.2±0.3 ^{###}	13.2±0.5 ^{###}	39.1±1.4 ^{###}	816.7±48.4
L 1.2	7.3±1.4	7.4±0.4	13.6±0.5	40.6±1.4	829.5±48.6
L 2.4	7.6±1.2	7.0±0.3	12.7±0.6	38.0±1.5	786.2±88.5
TS	7.1±1.3	7.0±0.4	13.1±0.5	40.1±1.9	795.8±139.0

[#], ^{###} Significantly different from the normal group (**P<0.01, ^{###} P<0.001.)

실험군에서의 연구 종료 후 체중감소는 대조군에 비해 해금사 1.2g, 해금사 2.4g 투여군에서는 큰 차

이가 없었으나, testosterone 투여군에서는 365.8±9.3g으로 유의한 증가를 보였다(P<0.05)(Fig. 1).

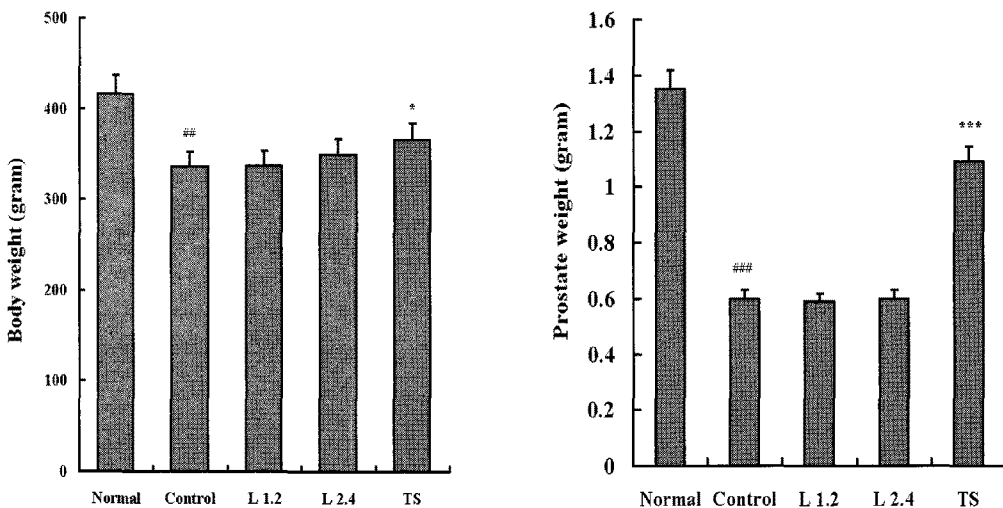


Fig. 1. Prostate weight of each experimental group. Each column represents the mean±SD. [#], ^{##},

^{###} Significantly different from the normal group ([#]P<0.01, ^{##} P<0.001.)

^{*}, ^{***} Significantly different from the control group (^{*}P<0.05, ^{***} P<0.001.)

연구 종료 시점에서의 전립선 역시 대조군은 $0.60 \pm 0.1g$ 으로 정상군의 $1.35 \pm 0.2g$ 에 비해 현저하게 위축되었으며 ($P < 0.001$), 해금사 1.2g, 해금사 2.4g 투여군에서 대조군에 비해 전립선 무게의 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

2. 해금사에 의한 일반 혈액학적 분석의 변화

해금사의 투여가 혈구의 변화에 미치는 영향을 알아보기 시행한 일반 혈액학 분석에서 연구 종료 시점에서 정상군에 비해 고환 절제술 및 17β -estradiol 투여한 대조군에서 백혈구와 적혈구, 혈색소 및 적혈구 수치가 모두 현저하게 감소되었다. 해금사 1.2g, 해금사 2.4g과 Testosterone의 투여로 대조군에 비해 모두 항목에서 개선 효과를 나타내

었으나, 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다 (Table II).

간기능 및 신기능에 미치는 영향을 알아보기 시행한 생화학 분석 결과 정상군에 비해 대조군에서 GPT의 현저한 상승이 관찰되었고, GOT, γ -GT 등의 항목에서는 정도의 상승이 관찰되었으나, 통계학적 유의성은 없었다. 해금사 1.2g과 해금사 2.4g의 투여군에서는 비록 유의성은 관찰되지 않았으나, 대조군에 비해 GOT, GPT, γ -GT 등의 항목에서 개선 효과를 나타내었다 (Table III). 또한 신기능을 반영하는 BUN과 creatine 항목에서는 정상군, 대조군, 해금사 1.2g, 해금사 2.4g 투여군 및 testosterone 투여군 모두에서 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table III).

Table III. Blood chemistry of each experimental group.

Group	GOT	GPT	γ -GT	BUN	Cr
Normal	117.0 \pm 22.2	45.0 \pm 3.2	1.0 \pm 0.0	21.3 \pm 1.9	0.6 \pm 0.1
Control	165.0 \pm 59.4	70.0 \pm 17.3 [‡]	1.5 \pm 0.4	20.4 \pm 2.6	0.7 \pm 0.1
L 1.2	141.3 \pm 25.7	74.3 \pm 9.8	1.2 \pm 0.4	19.5 \pm 2.2	0.6 \pm 0.1
L 2.4	109.0 \pm 18.3	59.3 \pm 5.8	1.3 \pm 0.3	23.1 \pm 1.9	0.7 \pm 0.1
TS	98.8 \pm 29.7 [*]	56.0 \pm 33.4	1.2 \pm 0.5	22.9 \pm 1.6	0.7 \pm 0.1

[‡]Significantly different from the normal group ($P < 0.05$.)

3. 해금사에 의한 전립선 조직병리학적 변화

해금사 투여가 전립선의 조직학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행한 H&E 염색 표본의 광학 현미경 관찰에서 정상군은 다른 군에 비해 전립선의 크기가 크며, 선포 세포 (acinar gland)가 둥근 형태로 위축없이 잘 유지하고 있고, 도관상피 세포 (duct epithelial cell) 역시 원주형의 형태로 정상 세포핵과 분비선들이 정상 형태를 유지하고 있었으며, 결합 조직의 증식이나 섬유화 역

시 관찰되지 않았다.

고환 절제술과 17β -estradiol를 투여한 대조군에서는 선포 세포가 선형에서 타원형의 형태로 불규칙하게 분포되어 있고, 도관 세포 역시 편평세포의 형태로 위축되어 있었으며, 결합조직은 심한 세포증식과 임파구 및 단핵구의 침윤과 함께 여러 부위에서 섬유화성 변성이 관찰되었다.

해금사 투여군에서는 대조군에 비해 선포세포는 보다 둥근 형태로 약간의 위축이 관찰되었고, 도관

세포는 입방형의 형태로 세포핵과 분비선들의 형태 및 공간이 대조군에 비해 정상형태로 유지되어 있었으며, 결합 조직은 경도의 증식과 함께 임파구, 단핵구의 침윤이 감소되었고, 섬유화 변성 역시 대조군에 비해 감소된 양상을 보였다. 이러한 양상은 해금사 1.2g 투여군보다 2.4g 투여군에서 더 뚜렷하

게 관찰되었다.

Testosterone 투여군에서는 선포세포는 둥근 형태로 정상군과 유사한 형태를 보였고, 도관세포는 원주모양으로 잘 유지되어 있었으며, 결합 조직은 경도의 증식과 섬유화가 해금사 2.4g 투여군과 유사한 정도로 관찰되었다 (Fig. 2).

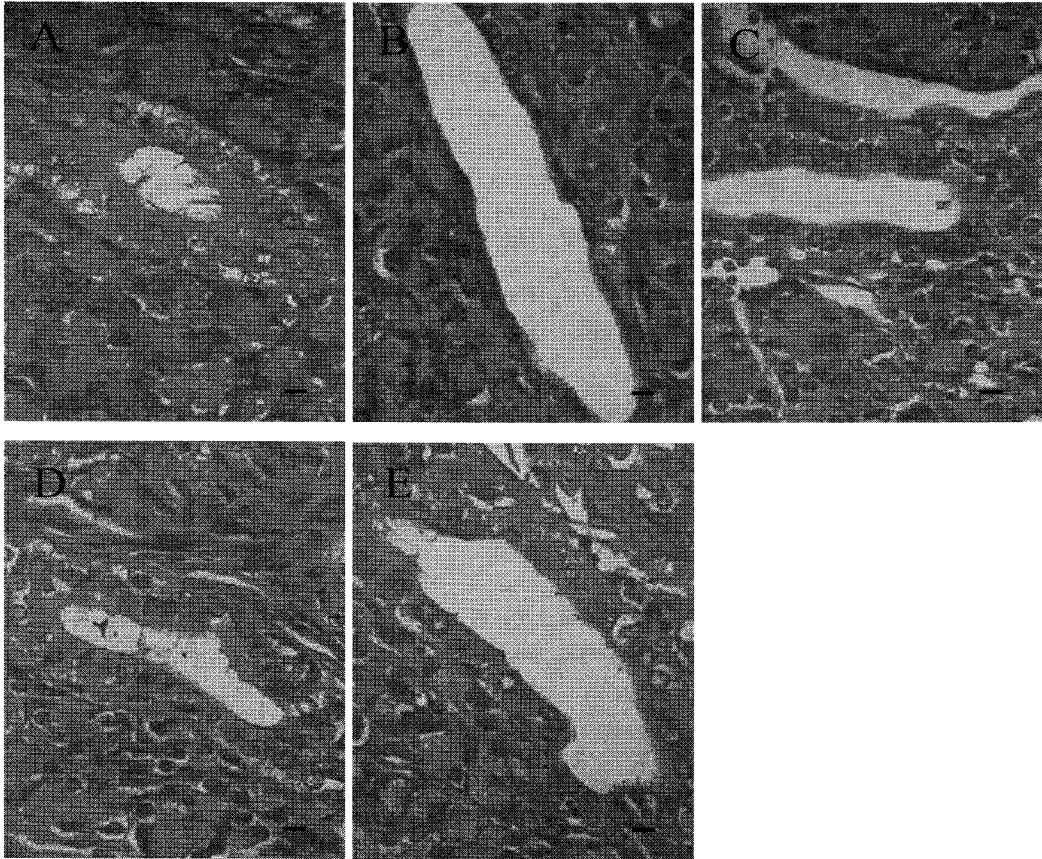


Fig. 2. Morphological profiles of the prostate tissues from the rats with non-bacterial prostatitis experimentally induced by castration and 17 β -estradiol treatment. (A) Normal prostate: Duct cells were long columnar in shape and fibrous tissues were poorly developed in the surrounding stroma. (B) Control group: Duct cells were flattened to low cuboidal or squamous type. The stroma showed a severe infiltration of lymphocyte and monocyte and remarkable fibrosis. (C) Lygodium 1.2 group: Duct cells demonstrated a typical cuboidal feature and the mild proliferation of the acinar cells were seen in the periductal area. A few lymphocytes, monocytes and fibroblasts were infiltrated in the stroma of the tissue. (D) Lygodium 2.4 group: Duct cells were recovered to high cuboidal profile. (E) Testosterone group: Duct cells showed cuboidal appearance and fibrous tissues were poorly developed in the stroma. $\times 400$. The bar indicates 20 μm .

4. 해금사에 의한 전립선 세포증식의 변화

해금사 투여가 전립선 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시행한 PCNA 면역 화학 염색 후 광학현미경 관찰에서 정상군에 비해 대조군의 결합 조직에서의 현저한 PCNA 양성 세포 증가가 관찰되었으나 ($P < 0.01$), 선포 세포 및 도관세포에서는 두 군 사이의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 해금사 투여군에서는 대조군에 비해 결합 조직

에서의 PCNA 양성 세포의 발현이 억제되었으며, 이러한 양상은 해금사 2.4g 투여군에서 더욱 현저하게 관찰되었다 (Lygodium 1.2, $P < 0.05$; Lygodium 2.4, $P < 0.01$). Testosterone 투여군에서는 선포 세포와 결합 조직에서의 세포증식이 대조군에 비해 PCNA 양성 세포의 관찰이 적었으나, 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

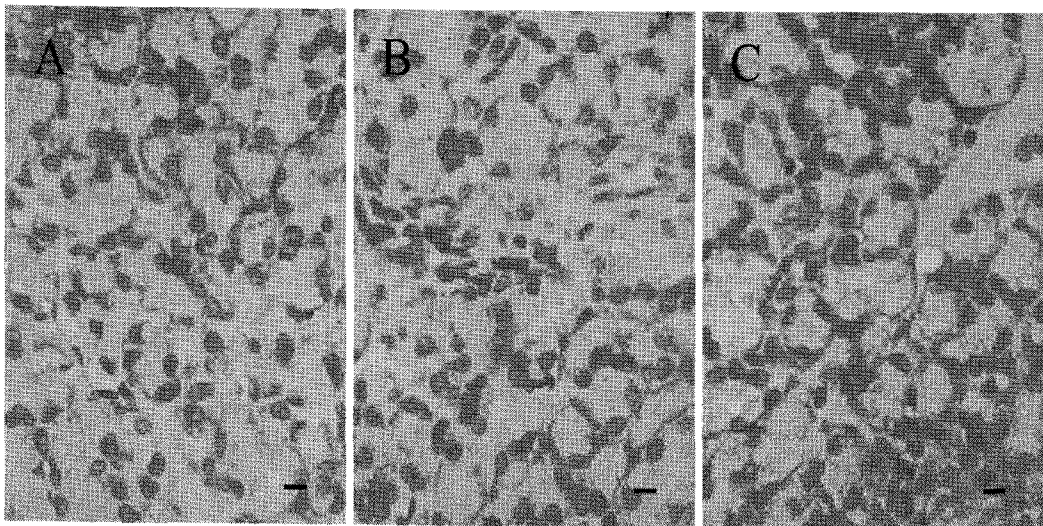


Fig. 3. Prostate tissues stained with PCNA for determination of proliferating cells. (A) Normal group: Few or no PCNA positive cells were in the stromal tissue of the normal group (A), while, a marked increase of PCNA positive cells were seen in the control group (B). In contrast, the PCNA positive cells decreased in the rats treated with 2.4 Lygodium (C) comparing with the control group. $\times 400$ The bar indicates 20 μm .

5. 해금사에 의한 전립선 세포의 세포자연사 (apoptosis) 변화

해금사 투여가 전립선 세포의 세포 자연사 (apoptosis)에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시행한 TUNNEL 면역 화학 염색검사 후 광학현미경 관찰에서 정상군에서는 TUNEL 양성 세포가 거의 관찰되지 않았으며, 대조군에서도 정상군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 해금사 투여군에서

는 대조군에 비해 결합 조직에서의 TUNEL 양성 세포의 수가 증가하였으며, 이러한 증가는 해금사 2.4g 투여군에서 보다 뚜렷하였다. (Lygodium 1.2, $P < 0.05$; Lygodium 2.4, $P < 0.001$). Testosterone 투여군에서는 결합 조직 및 선포 세포, 도관세포 모두에서 TUNEL 양성 세포수가 정상군과 비슷하였다 (Fig. 4).

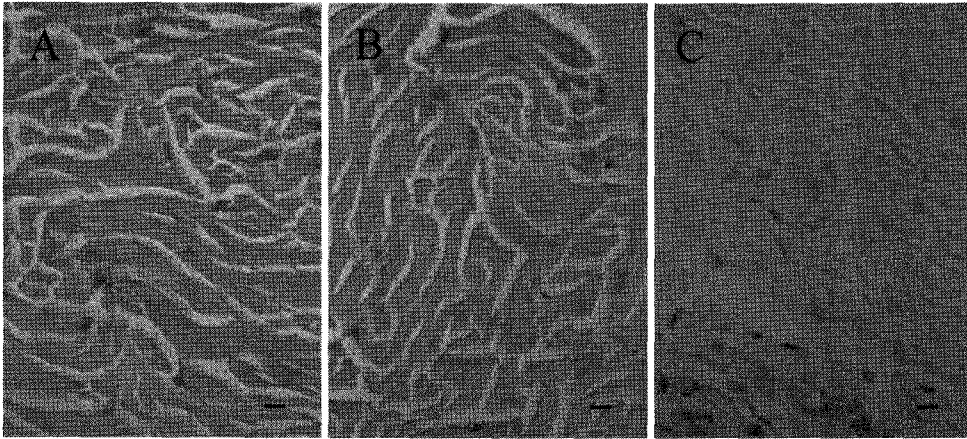


Fig. 4. TUNEL analysis for determination of apoptosis in the prostate. (A) Normal group: Few or no TUNEL positive cells were seen in the stromal tissue of the normal group (A), and the control group (B). In contrast, the TUNEL positive cells were increased in Lygodium 2.4 group (C) comparing with the normal and control groups. $\times 400$ The bar indicates 20 μm .

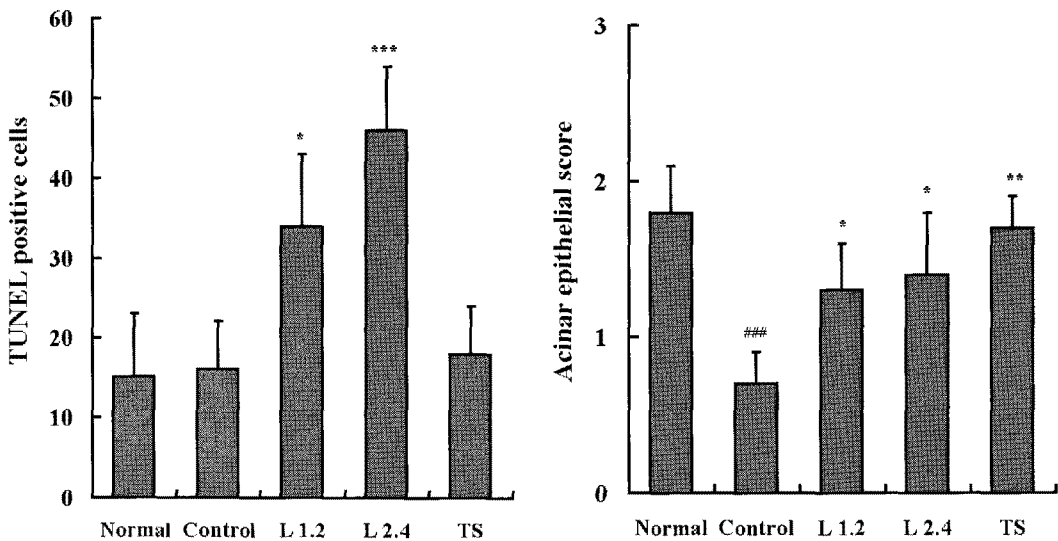


Fig. 5. Effects of *Lygodium japonicum* on acinar epithelial score and stromal ratio of the prostate. ### Significantly different from the normal group (### $P < 0.001$). *, ** Significantly different from the control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.)

6. 해금사에 의한 상피계수(epithelial score) 및 결합조직 면적 비율(stromal area ratio)의 변화

황백이 선포 상피세포의 선(腺)조직 손상정도에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 상피계수 분

석상 대조군에서는 정상군에 비해 현저한 상피계수의 감소가 관찰되었다. 해금사 투여군에서는 상피 계수가 해금사 투여군 1.2g에서는 1.3 ± 0.3 으로 ($P < 0.05$), 해금사 2.4g 투여군에서는 1.4 ± 0.4 으로 대조군의 0.7 ± 0.2 에 비해 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). Testosterone 투여군은 상피 계수가 1.0 ± 0.2 으로 유의하게 증가하였다 ($P < 0.01$) (Fig. 5).

전립선 결합조직 증식 평가를 위해, 결합조직과 결합조직을 제외한 선포 조직 간의 비율을 계산한 결과, 정상군에서는 결합조직 면적 비율이 $35 \pm 8\%$ 로 나타난 반면 대조군에서는 $65 \pm 12\%$ ($P < 0.001$)로 결합조직 면적 비율이 유의성 있게 증가하였다. 해금사 1.2g 투여군에서는 결합조직 면적 비율이 $51 \pm 11\%$ 로, 해금사 2.4g 투여군에서는 $48 \pm 12\%$ 로 결합조직 증식이 현저하게 억제되었으며 ($P < 0.05$), testosterone 투여군에서는 결합조직 면적 비율이 $40 \pm 9\%$ 로 감소하였다 ($P < 0.01$) (Fig. 5).

IV. 고 찰

해금사는 해금사과(실고사리과: Schizaeaceae)에 속한 다년생 草本인 실고사리(Lygodium japonicum)의 抱子를 건조한 것으로, 性은 寒 無毒하고, 味는 甘하여 淸利濕熱, 通淋止痛 등의 효능을 가지고 있어, 주로 熱淋, 砂淋, 石淋, 血淋, 膏淋, 尿道澀痛 등의 치료에 응용된다^{9,10}. 해금사를 구성하는 주요 성분으로는 (1)-cis-transabscisic acid와 palmitic, stearic, oleic, linoleic, (1)-8-hydroxyhexadecanoic acids 등의 fatty acids로 구성되어 있으며, 배뇨장애, 신염, 요로감염, 요로결석 등의 질환에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다^{9,10}.

만성 비세균성 전립선염의 병리기전 및 약물의 유효성을 검증하기 위한 실험동물로는 고령의 Wistar rat에게 외부에서 17β -estardiol의 투여와 고환 절제술을 시행한 모델을 응용하는데, 이러한

모델의 100%에서 비세균성 전립선염을 일으키는 것으로 보고되고 있으며, 자발적 비세균성 전립선염과 매우 유사한 조직병리학적 변화가 발생하는 것으로 알려져 있다^{12,13,14}. 따라서 본 연구에서 이용한 비세균성 전립선염 모델 역시 조직 병리학적으로 선 조직과 선 상피세포의 위축과 이형성 및 결합조직의 증식과 섬유화 등은 인간의 비세균성 전립선염의 형태와 유사하여 해금사의 전립선염에 대한 치료효과 및 작용기전 등을 관찰하기에 유용한 모델이라고 할 수 있다¹⁵.

본 연구에서 고환절제술 및 17β -estardiol의 투여한 대조군에서 PCNA 양성 세포의 결합조직부위 상승은 결합 조직의 세포분열과 세포증식이 활발히 일어났음을 의미하며, 해금사의 투여로 인한 결합 조직 부위에서의 PCNA 양성 세포의 발현 감소는 세포분열 및 증식을 억제하였다는 것을 의미한다. 또한 testosterone 투여군에서 나타난 PCNA 양성세포수가 대조군에 비해 큰 차이가 없다는 결과는 해금사의 결합조직 증식 억제 작용이 testosterone의 작용과는 다른 세포주기의 조절, 특히 cyclin의 조절 기전에 의해 이루어졌다는 것을 의미하며, 향후 이러한 세포주기 및 cyclin 관련인자의 연구가 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 고환절제술 및 17β -estardiol의 투여로 유발된 비세균성 전립선염에서 나타나는 결합 조직의 과다 증식을 억제하기 위한 apoptosis 기전에 대한 TUNEL 분석에서 대조군 및 정상군에서는 TUNEL 양성 세포의 수가 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 대조군에서 과다한 세포의 증식에도 불구하고 apoptosis 기전이 제대로 작동하지 않아 결국 세포수 조절에 실패하였고, 이로 인해 결합조직 세포의 병리적 증식이 발생된 것으로 생각된다. 반면 해금사 투여로 인한 TUNEL 양성 세포의 결합 조직에서의 증가는 해금사가 apoptosis 기전을 촉진한다는 것을 의미한다. 또한 Testosterone 투여군에서 나타난 TUNEL 양성세포수가 대조군 및 정상군에 비해 큰 차이가 없다는

것은 앞서 PCNA 분석에서 나타난 결과와 연계하여 고려할 때 해금사의 결합조직 증식 억제 작용이 testosterone의 작용과는 다른 세포주기의 조절 및 apoptosis 조절 기전에 의해 이루어졌다는 것을 의미한다.

전립선 상피-결합조직 면적 비율 지수 (epithelio-stromal ratio)는 전립선 상피세포에 대한 결합조직의 면적 비율을 정량화한 수치로서, 정상 전립선 조직에서는 그 지수가 40%의 근조직 (smooth muscle)과 20%의 과립형 상피세포의 비율로 구성되어 있다. 그러나 전립선 비대 및 만성 전립선염과 같은 비후성 질환에서는 근 조직의 비율이 전체의 60%로 증가하게 된다. 이러한 근조직을 포함한 결합조직의 비율 증가는 전립선을 구성하는 다른 조직, 특히 전립선 선포세포, 선포 상피세포 등의 구조물의 위축을 유발하여 정상 전립선 기능에 장애를 초래하게 된다¹⁶⁾.

본 연구에서 고환절제술 및 17β -estadiol의 투여는 심각한 상피-결합조직 면적 비율의 증가를 초래하여, 인간에서의 전립선염과 유사한 병태를 나타내었다. 이러한 결합조직 면적 비율의 증가는 해금사의 투여로 감소하였는데, 이는 해금사가 앞선 전립선 선포 상피세포의 보호작용과 더불어 결합조직의 증식 억제 작용을 동시에 가진다는 것을 의미한다. 따라서 해금사는 기능적으로 전립선의 분비기능을 유지시킬 수 있으며, 동시에 구조적으로도 결합조직의 과다 증식을 억제하는 기능을 가져 전립선염에서 나타나는 조직의 병리적 손상을 억제하는 효능을 가졌다고 할 수 있다.

전립선 상피계수 (epithelial score)는 전립선 분비선의 손상정도를 의미하는데^{12,17)}, 본 연구에서 해금사는 대조군에 비해 현저한 상피 계수의 상승 효과를 나타내어, 전립선 분비조직에 대한 기능 및 형태적 보호작용을 나타내었다. 그러나 본 연구에서 또한 나타난 해금사의 투여가 대조군에 비하여 전립선 무게에 별다른 영향을 미치지 않았다는 결과와 전립선의 무게는 잔존 분비액의 양에 의해

결정된다는 점을 고려할 때 비록 해금사가 전립선 선포 상피세포의 기능과 형태를 유지 보호해주는 작용은 있으나 전립선액 분비 감소를 개선시켜주는 못한다는 것을 의미한다.

또한 이러한 보호효과가 testosterone 투여군과 유사한 결과를 나타냈음에도 불구하고 testosterone 투여로 인한 전립선액의 정상적 분비 효과에는 미치지 못한 점으로 볼 때 해금사는 이러한 testosterone과는 다른 기전으로 작용하는 것으로 사료된다. 이를 설명할 수 있는 가설로는 최근 해금사가 5 α -reductase를 차단작용을 나타낸다는 보고를 들 수 있다¹⁸⁾. 이러한 5 α -reductase 차단작용은 testosterone이 5 α -dihydrotestosterone (DHT)으로 전환하는 것을 억제하고, 5 α -dihydrotestosterone (DHT)이 androgen receptor와 결합하는 것을 차단하게 된다. 여기에서 5 α -reductase는 type II 5 α -reductase isozyme으로 전립선, 정낭, 부고환, 모낭, 및 간조직에 주로 존재하며 체내 순환되는 DHT의 2/3가 이것에 의해 전환된다. 이런 과정에 의해 합성된 과량의 DHT는 Androgen에 의한 탈모증과 전립선 비대증을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 따라서, type II 5 α -reductase를 저해하면 혈장과 세포내의 DHT 농도가 현저하게 감소하고, prostate-specific antigen(PSA)의 농도를 낮아져, 세포의 testosterone의 농도를 높이는 작용을 나타내 탈모와 전립선 비대증에 효과적으로 응용될 수 있다¹⁸⁾.

본 연구에서 나타난 해금사의 전립선 선조직의 보호작용과 결합조직의 증식억제 작용이 testosterone 투여군과 유사한 효능을 나타낸 점도 이러한 해금사가 가지고 있는 5 α -reductase 억제로 인한 전립선 세포내의 testosterone 농도의 상승이 관여했을 것으로 여겨진다. 그러나 본 연구에서의 사용한 동물모델이 고환 절제술과 17β -estadiol의 투여로 testosterone의 작용이 거의 차단된 상태를 고려할 때 이러한 5 α -reductase 억제작용이 주된 기전은 아닐 것으로 사료된다. 따라서 해금사가

나타낸 비세균성 전립선염에서의 선 조직의 보호와 결합 조직의 보호작용은 앞서 언급한 세포증식 억제와 apoptosis의 활성화 및 5 α -reductase 억제 등에 의한 복합적인 결과로 여겨지며, 이에 대한 향후 연구가 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 kg당 2.4g까지의 과량의 해금사의 투여가 간기능과 신기능에 별다른 악영향을 미치지 않았으며, 특히 대조군에 비해 경도의 개선 효과를 나타내어, 해금사의 과량 투여가 간독성 및 신독성을 유발하지 않는 것으로 생각된다. 이것은 전립선의 혈류역학적 구조상 약물 치료농도에 도달하기 위해서는 고용량의 약물 투여가 요구된다는 점을 고려할 때 해금사의 임상적 응용에 있어 그 안전성을 확인했다는 의의가 있다고 할 수 있다.

해금사가 고령의 Wistar rat에 고환 절제술과 17 β -estradiol의 투여로 유발된 비세균성 전립선염에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 연구에서 해금사는 전립선의 선조직의 보호작용과 결합조직의 증식억제 작용을 가지는 것으로 나타났으며, 이러한 작용에 관여하는 기전으로 PCNA의 억제와 apoptosis의 활성화 및 5 α -reductase 억제작용 등이 관여하는 것으로 사료된다. 또한 고용량의 해금사 투여로 간신독성을 유발하지 않아, 향후 임상 응용에 있어 그 안전성을 확보하였다.

참고문헌

1. 대한비뇨기과학회. 비뇨기과학. 서울: 고려의학. 156-160
2. 두호경. 東醫腎系學. 서울: 東洋醫學研究院. 1056-1059.
3. Liang CZ, Zhang XJ, Hao ZY, Yang S, Wang DB, Shi HQ, Liu C. An epidemiological study of patients with chronic prostatitis. BJU Int. 2004;94:568-570.
4. Pontari MA, Ruggieri MR. Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. J Urol. 2004;172:839-845.
5. Andriole VT. Use of quinolones in treatment of prostatitis and lower urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:342-350.
6. Barbalias GA, Nikiforidis G, Liatsikos EN. Alpha-blockers for the treatment of chronic prostatitis in combination with antibiotics. J Urol. 1998;159:883-887.
7. Turner JA, Ciol MA, Von Korff M, Berger R. Prognosis of patients with new prostatitis/pelvic pain syndrome episodes. J Urol. 2004;172:538-541.
8. Green DR, Fitzparick JM, Scardino PT. Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer. Semin Surg Oncol 1995;11:9.
9. 본초학교실. 본초학. 서울: 영림사. 318-319.
10. Li S., Bencao-gangmu. ed. by Miyashita S., Orient Publishing Co. Ltd., Osaka. 1992. 579-580.
11. Tang S., Jingshizhenglei-beiji-bencao. Toyoigaku-Zenponsousho. Vol. 32, ed. by Tou K., Orient Publishing Co. Ltd., Osaka. 1992. 264-265.
12. Kamijo T, Sato S, Kitamura T. Effect of cernitin pollen-extract on experimental nonbacterial prostatitis in rats. Prostate. 2001;49:122-131.
13. Naslund MJ, Strandberg JD, Coffey DS. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. J Urol 1988;140:1049-1053.
14. Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, Austin-ritchie T, Miller-Graziano C, Menon

- M. Lubner-Narod J. 17β -Estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. *J Urol* 1996;156:1838-1842.
15. Lundgren R, Holmquist B, Hesselvik M, Muntzig J. Treatment of prostatitis in the rat. *The Prostate* 1984;5:277-284.
16. Scattoni V, Raber M, Montorsi F, Da Pozzo L, Brausi M, Calori G, Freschi M, Rigatti P. Percent of free serum prostate-specific antigen and histological findings in patients undergoing open prostatectomy for benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol*. 1999;36:621-630
17. Ponniah S, Arah I, Alexander RB. PSA is a candidate self-antigen in autoimmune chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Prostate*. 2000;44:49-54.
18. Matsuda H, Yamazaki M, Naruo S, Asanuma Y, Kubo M. Anti-androgenic and hair growth promoting activities of *Lygodii spora* (spore of *Lygodium japonicum*) I. Active constituents inhibiting testosterone 5 α -reductase. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:622-626.
19. De Rose AF, Gallo F, Giglio M, Carmignani G. Role of mepartricin in category III chronic nonbacterial prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a randomized prospective placebo-controlled trial. *Urology*. 2004;63: 13-16.