(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0068401
(43) 공개일자 2016년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/48 (2015.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61P 13/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0174078
(22) 출원일자 2014년12월05일
심사청구일자 2014년12월05일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
정주영
대전광역시 유성구 상대남로 26, 트리플시티 아파트 920동 1501호
임순성
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코아파트 105동 302호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

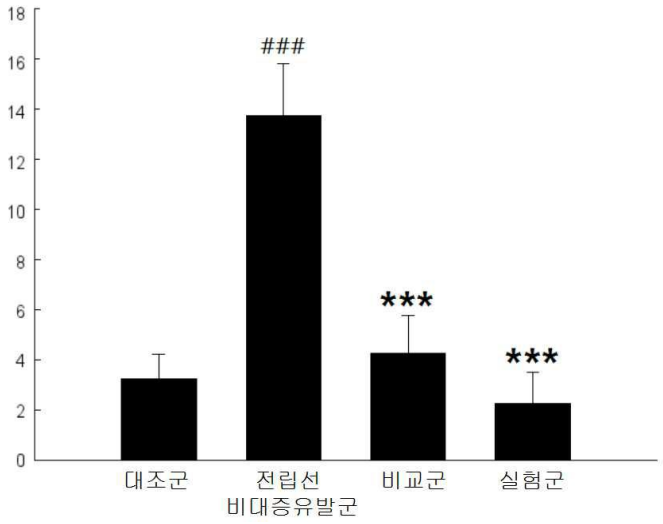
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **천연물 추출물을 포함하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 천연물 소재로서 저혈압과 같은 종래 전립선 비대증 치료제의 부작용이나 약물 내성을 유발하지 않고, 독성이 낮아 장기 투여가 가능한 전립성 비대증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소 전립선의 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김현태

대전광역시 대덕구 동춘당로15번길 98-5, 1층

김영중

대전광역시 서구 월평북로 11, 주공아파트 206동 602호

권신화

경기도 남양주시 호평로 149, 중흥2차 1907-1003

명 세 서

청구범위

청구항 1

소 전립선의 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 가수분해물은

소 전립선에서 지방과 이물질을 제거하여 세척하는 단계;

세척된 소 전립선을 가수분해하는 단계;

상기 가수분해 반응물을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및

상기 상층액을 농축하여 가수분해물을 수득하는 단계;

를 포함하여 수득되는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 가수분해물은 프로테아제를 첨가하여 가수분해된 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 프로테아제는 브로멜라인(Bromelain), 트립신(Tyrpsin), 뉴트라제(Neutrase), 펩신(pepsin), α-카이모트립신(α-chymotrypsin), 파파인(papain), 프로타맥스(Protamex), 플라보자임(Flavourzyme), 알카라제(Alcalase), 판크레아제(Pancrease)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

소 전립선의 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 가수분해물은

소 전립선에서 지방과 이물질을 제거하여 세척하는 단계;

세척된 소 전립선을 가수분해하는 단계;

상기 가수분해 반응물을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및

상기 상층액을 농축하여 가수분해물을 수득하는 단계;

를 포함하여 수득되는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 가수분해물은 프로테아제를 첨가하여 가수분해된 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천연물 소재로서 저혈압과 같은 종래 전립선 비대증 치료제의 부작용이나 약물 내성을 유발하지 않고, 독성이 낮아 장기 투여가 가능한 전립성 비대증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선 비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH)은 성인 남성에게 흔하게 나타나는 질병의 하나로 50세 이상의 남성의 50%, 80세 이상의 남성의 80% 이상이 이환되는 것으로 보고되고 있어 남성 요로 장애 중 가장 높은 빈도를 차지한다. 한국의 전립선 비대증 환자의 수는 2006년 45만9천명 정도에서 2011년 84만2천명으로 83.5%의 증가율을 나타내며 최근 그 발병이 급속히 증가하고 있다.

[0003] 일반적으로 성인의 전립선의 크기는 20g 정도이나, 전립선이 비정상적인 크기로 비대해져 40~400g의 비정상적인 크기로 커지게 되면, 가까이 있는 요로를 압박하여 하루 8회 이상 소변을 보는 빈뇨, 야간 빈뇨, 강하고 갑작스런 요의를 느끼면서 소변이 마려우면 참을 수 없는 절박뇨 등의 방광 저장 증상과 소변을 볼 때 뜸을 들여야 소변이 나오는 지연뇨나 소변의 흐름이 끊기는 단절뇨, 비뇨 시 힘을 주어야 하는 현상 등 방광의 배출 장애 증상이 나타나게 된다. 전립성 비대증을 가진 환자들은 요로폐색이나 기타 합병증이 없으면 외과적 치료를 할 필요는 없으나 80세까지 약 50% 정도는 치료가 필요한 실정이다. 또한 전립성 비대증의 환자 중 일부가 전립선암과 관련되어 있으며, 그 자체가 치명적인 질환은 아니지만 삶의 질을 저하시킨다는 점에서 초고령화 사회로 진입하고 있는 현 사회의 중요한 의료문제로 대두되고 있다.

[0004] 전립선 비대증의 발병원인은 명확하게 밝혀지지는 않았으나, 노화에 따른 남성 호르몬의 변화에 기인하는 것으로 그중 테스토스테론(testosterone)과 디하이드로테스토스테론(DHT, dihydrotestosterone)이 가장 중요한 연관이 있는 것으로 여겨지고 있다. 즉, 혈액 내에 테스토스테론이 과다하게 존재하면 전립선 조직에 존재하는 5-알파 환원효소에 의해 DHT가 다량 합성되게 된다. DHT는 테스토스테론에 비해 전립선의 기질세포(stromal cell)과 상피세포(epithelial cell)의 세포분열을 활발하게 하여 결국 전립선 비대로 발전하게 된다.

[0005] 이와 더불어 테스토스테론과 DHT는 전립선에서 유사한 비율로 동일한 남성호르몬 수용체와 결합하지만, DHT-남성호르몬 수용체 복합체가 테스토스테론-남성호르몬 수용체 복합체보다 더 안정적이기 때문에 전립선 내의 대부분 남성호르몬 수용체는 테스토스테론보다 디하이드로테스토스테론과 결합한 상태로 존재하게 된다. DHT는 테스토스테론과 달리 나이가 들어도 양이 크게 감소하지 않아 내분비계 균형을 유지하기 위해 전립선 세포의 안드로겐 수용체(α1-adrenergic receptor)가 증가하게 되며 결국 전립선의 증식을 유도하는 다른 성장인자들을 지속적으로 자극하여 전립선비대가 발생하게 된다.

[0006] 전립선 비대증의 치료방법은 초기에는 거의 수술을 수행하였으나, 80년대 후반부터는 약물 투여방법으로 급속도로 변화하고 있다. 이제까지 개발된 전립선 비대증의 치료제는 크게 5-알파 환원효소 저해제(5-α reductase inhibitor)와 알파1-아드레날린수용체 저해제(α1-adrenergic receptor inhibitor) 두 종류로 나눌 수 있다.

[0007] 5-알파 환원효소 저해제는 테스토스테론이 DHT로 변환하는 것을 억제하며 수반되는 질병의 진행을 지연하는 장

점이 있으나, 즉각적인 효과를 나타내기 어려워 질환이 호전되기까지는 적어도 2개월~1년 정도 치료가 필요하다. 또한 부작용으로 발기부전, 성욕감퇴 , 사정장애 및 남자의 유방 이상비대 등이 있게 되며, 복용중단 후 3개월이 지나면 치료 전 수준으로 돌아가게 되는 문제가 있다.

[0008] 알파1-아드레날린수용체 저해제는 전립선과 방광경부에 많이 발현되는 알파1-아드레날린수용체를 차단하여 전립선의 평활근을 이완시켜 배뇨와 관련된 증상을 즉각적인 완화시키는 효과가 있다. 그러나 환자의 약 15%에서 실신, 어지러움, 기립성 저혈압의 부작용을 경험하며, 노령 환자들은 일반적으로 심혈관계의 기능이 약함을 고려하면 잠재적으로 심각한 부작용을 초래할 위험성이 있다.

[0009] 이러한 종래 의약품의 부작용으로 인하여 노화 관련 질환의 예방 및 치료를 위해 자연식품에서 그 해법을 찾으려는 시도들이 있어왔다. 예를 들면, 홍삼추출물의 감식초 반응 혼합물(등록특허 제1420270호), 발효 동백오일(등록특허 제1452320호), 복분자 추출물(등록특허 제1439859호), 해삼추출물(등록특허 제1401740호) 등을 이용한 전립선 비대증 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다.

[0010] 이와 같이 많은 전립성 비대증에 효과를 나타내는 다양한 약물이 개발되고 있으나 많은 부작용을 나타내고 있고 그 효능에 한계가 있어, 부작용이나 약물 내성을 유발하지 않고, 치료효과가 우수한 새로운 치료제의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 등록특허 제1420270호

(특허문헌 0002) 등록특허 제1452320호

(특허문헌 0003) 등록특허 제1439859호

(특허문헌 0004) 등록특허 제1401740호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제를 해결하기 위하여, 전립선 비대증의 예방 및 치료에 효과적인 새로운 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한 본 발명은 식품 유래로 독성이 없고 인체에 대한 안정성이 확보되어 부작용이나 약물내성이 없어 안전하게 사용할 수 있는 전립선 비대증의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 소 전립선의 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 소 전립선의 가수분해물은 가수분해 반응 후 상등액과 잔사를 포함한 전체로서 사용하여도 무방하나, 하기 단계에 의해 농축된 가수분해물로서 사용하는 것이 유효성분의 함유량을 높인다는 측면에서 바람직하다. 이에 상기 가수분해물은 소 전립선에서 지방과 이물질을 제거하여 세척하는 단계; 세척된 소 전립선을 가수분해하는 단계; 상기 가수분해 반응물을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및 상기 상층액을 농축하여 가수분해물을 수득하는 단계;를 포함하여 농축된 형태로 제조할 수 있다.

[0016] 이때 가수분해가 빠르고 효과적으로 진행될 수 있도록, 소 전립선을 잘게 잘라서 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 소 전립선을 마쇄한 후 가수분해하는 것이 좋다. 그러나, 이는 가수분해 시간을 단축하기 위한 것으로 필수적인 것은 아니다.

[0017] 상기 가수분해는 통상의 열처리나 효소처리에 의해 이루어질 수 있다. 즉, 소 전립선을 고온에서 열처리하여 가수분해할 수 있으며, 열처리 시간을 단축하기 위하여 오토크레이브에서 가압하여 열처리하여도 무방하다.

[0018] 또는 보다 온화한 조건에서 빠르게 반응하기 위하여 프로테아제를 첨가하여 가수분해할 수도 있다. 프로테아제로는 하기 실시예에서는 브로멜라인을 사용하였으나 이에 한정되는 것은 아니며, 트립신(Tyrpsin), 뉴트라제(Neutrase), 펩신(pepsin), α-카이모트립신(α-chymotrypsin), 파파인(papain), 프로타맥스(Protamex), 플라보자임(Flavourzyme), 알카라제(Alcalase), 판크레아제(Pancrease)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것을 사용하여도 무방하다. 각 프로테아제에 의한 처리 조건은 각 효소에 최적인 조건을 사용할 수 있음은 당연하다.

[0019] 확인을 위하여 하기 실시예에 의해 제조된 가수분해물과, 열처리에 의해 제조된 가수분해물 및 상기 기재의 다른 프로테아제를 사용하여 제조한 가수분해물을 HPLC(Agilent technologies(Germany) 1100; column : ZOBAX SB-C18 4.6 ×150mm at 30℃; Eluent : 선형 그라디에이션 5% B (t=0) → 50% B (t=15min) → 100% B (t=23min), A=0.1%(V/V) trifluofoacetic acid in water, B=methanol (B); flow rate : 0.7ml/min, detector : 280nm UV detector)로 분석한 결과, 모두 브로멜라인에 의한 가수분해물과 유사한 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

[0020] 상기 소 전립선의 가수분해물을 유효성분으로 하는 조성물은 전립선 비대증 유발 동물모델에서 전립선비대증 유발군에 비해 전립선의 무게/체중이 유의하게 감소하였으며, H&E 염색 후 광학현미경을 이용하여 관측한 결과 전립선 비대증 유발군에서 관측되는 포상선의 위축이나, 상피세포 두께 증가가 완화되어 포상선은 위축없이 둥근 형태를 유지하였으며 상피세포의 두께가 눈에 띄게 감소하였다.

[0021] 또한 면역조직화학염색법에 의한 5-알파 환원효소와 전립선 비대증 랫드 모델에서 세포증식 마커인 PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen) 발현 변화를 확인한 결과, 5-알파 환원효소와 PCNA의 발현이 전립선비대증 유발군에서는 크게 증가한 것에 비하여 본 조성물 투여군인 실험군에서는 정상수준의 발현을 나타내어 본 발명의 조성물이 전립선 비대증의 예방 및 치료에 효율적임을 확인할 수 있었다.

[0022] 본 발명의 소 전립선 가수분해물를 함유한 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0023] 본 발명의 조성물은 치료용 약제로 이용하기 위해서 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 전립선 비대증의 치료 및 예방제로 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg·일~10g/kg·일이다. 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0024] 또한, 본 발명은 소 전립선 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증의 예방용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 소 전립선 가수분해물은 본 발명의 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0025] 이상과 같이 본 발명의 조성물에 의하면 5-알파 환원효소에 대한 억제효과와 전립선 세포증식 마커인 PCNA의 발현 저해 효과가 우수하여 전립선 비대증의 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0026] 또한 본 발명의 조성물은 천연식품 유래의 조성물로서, 인체에 대한 안정성이 확보되어 있어 독성이나 부작용에 대한 우려없이 안전하게 사용할 수 있으며, 약물 내성을 유발하지 않아 전립선 비대증의 치료에 더욱 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 각 실험동물군별 체중과 전립선 무게 및 그 비율을 나타낸 그래프.

도 2는 H&E 염색한 전립전 절편의 광학현미경 이미지.

도 3은 각 실험동물군 별 전립선 상피세포 두께 그래프.

도 4는 5-알파 환원효소에 대해 면역조직화학염색한 전립선 절편의 광학현미경 이미지.

도 5는 PCNA에 대해 면역조직화학염색한 전립선 절편의 광학현미경 이미지.

도 6은 각 실험동물군별 100셀 당 PCNA 양성 셀의 수를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0029] **실시예**

[0030] **실시예 1 : 소 전립선 가수분해물의 분리 및 수득**

[0031] 도축장에서 적출된 전립선의 기름을 제거하고 마쇄하였다. 전립선의 마쇄물 2,562g에 5배량의 chloroform/methanol (3:2) 혼합액을 가하고 암소에서 24시간 방치시킨 후 여과하였다. 여과 후 잔사를 동결건조하여 분말을 조제하였다.

[0032] 동결 건조된 전립선 분말에 단백질 분해효소인 브로멜라인(Bromelain from pineapple stem, Sigma Aldridch, MO, USA)를 전립선 분말에 대해 2%(w/w)의 농도로 첨가하고 10배량의 3차 증류수를 가한 후 pH 7.4, 43℃의 조건에서 15시간 동안 가수분해시켰다.

[0033] 가수분해가 완료되면 5,000rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액에 최종농도가 50%가 되도록 차가운 ethanol을 가하고, -40℃에서 24시간 방치하였다. 이후 10,000rpm에서 20분간 다시 원심분리하고, 상층액을 감압 농축하여 총 30.5g (1차 : 3.5g, 2차 : 27g)의 가수분해 산물을 수득하였다.

[0034] **실시예 2: 소 전립선 가수분해물의 전립선 비대 억제 효과 평가**

[0035] 1) 실험동물의 준비

[0036] 6주령의 수컷 Sprague-Dawely 랫트를 오리엔트바이오(Korea)에서 입수하여 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였다. 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 (20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 명암주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하며 랫트용 Polycarbonate 사육 상자에 6마리씩 4그룹으로 총 24마리를 수용하여 사육하였다. 사료(오리엔트바이오, korea)와 음수는 자유 급이하였다. 본 실험에 사용된 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) 85-23]에 준하여 취급 하였다.

[0037] 순화과정을 거친 실험동물은 군당 6마리씩 하기 표 1에 기재된 바와 같이 4그룹으로 구분하였다. 즉, 정상대조군과 테스토스테론에 의해 전립선 비대증을 유발시킨 전립선비대증 유발군, 테스토스테론과 함께 전립선 비대증 치료제인 Finasteride(F1293, Sigma-Aldrich, MO, USA)를 투여한 비교군 및 테스토스테론과 함께 실시예 1에서 제조한 소 전립선의 가수분해물을 투여한 실험군으로 구분하였다.

[0038] 정상 대조군을 제외한 각 실험동물군은 전립선 비대증을 유발시키기 위하여 Testosterone(Testosterone Propionate; TCI, Japan) 3mg/kg을 kg 당 1ml의 농도로 Corn Oil에 녹여 27gauge의 Needle이 부착된 1ml Syringe를 사용하여 매일 1회씩 28일간 피하 투여(Subcutaneous Injection, SC)하였다. 정상대조군에서는 Testosterone 대신 Corn Oil만 동일한 방법으로 주입하였다.

[0039] 소 전립선 가수분해물의 효과를 확인하기 위하여 실험군에 실시예 1에서 제조한 가수분해물 180mg/kg을 kg 당 5ml의 농도로 PBS에 녹여 테스토스테론 또는 Corn Oil 투여 시작일부터 매일 1회씩 28일간 금속제 Zonde가 부착된 3ml Syringe를 이용하여 강제 경구 투여(Per Oral, PO)하였다. 비교군에는 종래의 전립선 치료제와의 비교를 위하여 Finasteride 10mg/kg을 kg 당 5ml의 농도로 PBS에 녹여 소 전립선 가수분해물 대신 동일한 방법에 의해 경구투여 하였으며, 정상대조군 및 전립선 비대증 유발군에는 PBS만을 투여하였다.

표 1

	투여 물질 및 용량(/kg)	
	P.O.	S.C
정상대조군	PBS(5ml)	Corn Oil(1ml)
전립선비대증 유발군	PBS(5ml)	Testosterone(3mg)/Corn Oil(1ml)
비교군	Finasteride(10mg)/PBS(5ml)	Testosterone(3mg)/Corn Oil(1ml)
실험군	소 전립선 가수분해물 (180mg)/PBS(5ml)	Testosterone(3mg)/Corn Oil(1ml)

[0040]

[0041] 2) 체중 및 전립선의 중량 분석

[0042] 모든 실험 동물에 대해 약물 투여 28일 후 사료 섭취에 따른 체중의 영향을 최소화하기 위해 18시간 정도 절식시키고 투여 29일차에 체중을 측정한 후 희생하여 전립선을 적출하였다. 적출한 전립선은 주변의 지방 및 이물질을 깨끗이 제거한 후 무게를 측정하였다.

[0043] 하기 표 2는 각 실험동물군별 29일차의 체중과 전립선의 무게 체중 당 전립선의 무게의 평균값을 나타내며, 도 1은 각 실험동물군별 측정치를 그래프로 나타낸 것이다. 하기 표 2에서 R은 정상대조군의 체중 당 전립선무게를 100으로 하였을 때의 각 실험동물군의 체중 당 전립선무게의 비를 나타낸 것이다.

표 2

	체중(g)	전립선무게(g)	전립선무게/체중	R
정상대조군	402±12	0.7795±0.2435	0.1922±0.054	100
전립선비대증 유발군	379.5±3.5	1.532±0.023	0.4036±0.002	210
비교군	392.5±8.5	1.4475±0.0015	0.3689±0.008	192
실험군	395±2.8	1.494±0.149	0.3828±0.064	199

[0044]

[0045] 실험 기간 동안 각 실험동물 군 간 식이섭취량의 변화는 관찰되지 않았다. 표 2 및 도 1에서 확인할 수 있듯이, 전립선 비대증 유발군은 정상대조군에 비해 단위 체중 당 전립선의 무게가 2.1배 증가하여 테스토스테론에 의해 전립선 비대증이 효과적으로 유도됨을 확인할 수 있었다. 비교군과 실험군에서는 단위 체중 당 전립선의 무게가 전립선 비대증 유발군에 비해 낮아짐을 확인하였다.

[0046] 3) 전립선 병리 조직 검사

[0047] 병리조직학 검사를 위하여 2)에서 적출한 전립선을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정하였다. 고정된 전립선은 개체 당 각각 종단면으로 정중면이 나오도록 트리밍(trimming)하였으며, 이때 트리밍된 부위들은 서로 다른 개체들 간에 동일한 부위가 될 수 있도록 하였다. 트리밍된 부위들은 통상의 방법을 사용하여 파라핀 포매하여 절편을 얻었다.

[0048] 파라핀 절편을 헤마톡시린(hematoxylin, Sigma-Aldrich MHS-16) 및 에오신(eosin, Sigma-Aldrich HT110-1-32) 염색하고, 봉입제로 Canadabalsm(Sigma-Aldrich, MO, USA), Xylene(Samchun chemical, Korea)을 1:3(v/v)으로 희석하여 커버슬라이드를 영구 봉입에 사용하였다. 제작된 커버슬라이드을 사용하여 조직의 변화를 광학현미경으로 관찰하고, 그 이미지를 도 2에 도시하였다. 또한 도 2의 이미지에서의 전립선 상피세포의 임의의 10곳을 지정하여 Basal Lamina로부터 Apical Membrane까지의 두께를 측정하여 표 3와 도 3에 나타내었다. 도 2으로부터 정상대조군에 비해 전립선비대증 유발군에서는 포상선(acinar grand)이 위축되고, 상피세포의 두께가 전체적으로 두꺼워진 것을 볼 수 있었다. 비교군과 실험군에서는 정상대조군과 마찬가지로 포상선이 위축없이 둥근형태를 유지하였으며, 전립선비대증 유발군에 비하여 상피세포의 두께가 눈에 띄게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 표 3 및 도 3에서 전립선비대증 유발군은 정상대조군에 비해 전립선의 상피세포 두께가 1.92배로 크게 증가하였으나, 비교군과 실험군에서는 전립선비대증 유발군의 75% 수준으로 감소하였다. 비교군과 실험군의 전립선 상피세포의 두께는 전립선비대증 유발군에 대해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p<0.001$).

표 3

		정상대조군	전립선비대증 유발군	비교군	실험군
개체별 상피세포 두께	1	18.182	27.273	23.599	20.064
	2	12.299	32.620	22.985	23.578
	3	12.834	28.342	20.321	21.925
	4	11.765	29.412	20.856	21.438
	5	16.578	27.273	20.321	21.925
	6	13.369	25.064	24.064	22.995
	7	17.647	29.412	25.134	21.39
	8	18.182	29.947	22.460	20.856
	9	14.973	26.203	17.641	19.786
	10	14.439	28.342	17.063	21.390
평균		15.027	28.389	21.444	21.535
표준편차		2.476	2.128	2.689	1.171
표준오차		0.783	0.673	0.850	0.370

[0049]

[0050] 5-알파 환원효소의 면역조직화학염색을 위하여, 위에서 얻은 파라핀 절편을 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거하고 농도별 알코올을 이용하여 함수시킨 후 0.5% 트리톤 X-100에 30분간 처리하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 비 특이성 결합부위는 PBS와 1:10으로 희석된 말 혈청(Normal horse serum)을 1시간 처리하여 차단시킨 후 5α-reductase type 2(1:100; Santacruz, USA)를 4°C에서 하루동안 처리하였다. 이후 2차 항체로 Donkey Anti-Goat(1:200; Santa-cruz, sc-2020)을 처리하고 디아미노벤지딘(DAB peroxidase substrate kit, SK-4100, USA)으로 발색한 후 봉입과정을 거쳐 광학현미경을 이용하여 관찰하였으며 그 결과를 도 4에 도시하였다. 도 4에서 정상대조군에 비해 전립선비대증 유발군은 적갈색으로 염색된 5-알파 환원효소 type 2 양성 셀이 증가한 것을 확인할 수 있다. 비교군 및 실험군에서는 적갈색으로 염색된 5α-reductase type 2 양성 셀 수준이 정상대조군 수준으로 감소하였다.

[0051] 각 실험동물군에서 5-알파 환원효소와 더불어 전립선 비대증 마우스 모델에서 세포증식 마커인 PCNA 발현의 변화를 면역조직화학염색법에 의해 확인하였다. 실험방법은 1차 항체로 PCNA (1:300, Abcam, UK)를, 2차 항체로 Goat Anti-Mouse (1:200; Abcam, UK)를 사용한 것을 제외하고는 5-알파 환원효소의 면역조직화학염색 방법과 동일하였다. 도 5는 PCNA의 면역조직화학염색 광학 현미경 이미지로 정상대조군에 비해 전립선비대증 유발군은 적갈색으로 염색된 PCNA 양성 셀이 증가한 것을 확인할 수 있다. 하기 표 4과 도 6은 각 실험동물군에서 100 셀 당 PCNA 양성 셀의 수를 카운트하여 나타낸 것이다. 표 4 및 도 6에서 전립선비대증 유발군은 정상대조군에 비해 PCNA 양성 셀의 수가 4배 이상으로 크게 증가하였으나, 비교군에서는 전립선비대증 유발군의 1/3 수준으로 감소하였으며, 실험군에서는 정상군에 비해서도 다소 낮은 수준으로 감소하였다. 비교군과 실험군의 PCNA 양성 셀의 수는 전립선비대증 유발군에 대해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p<0.001$).

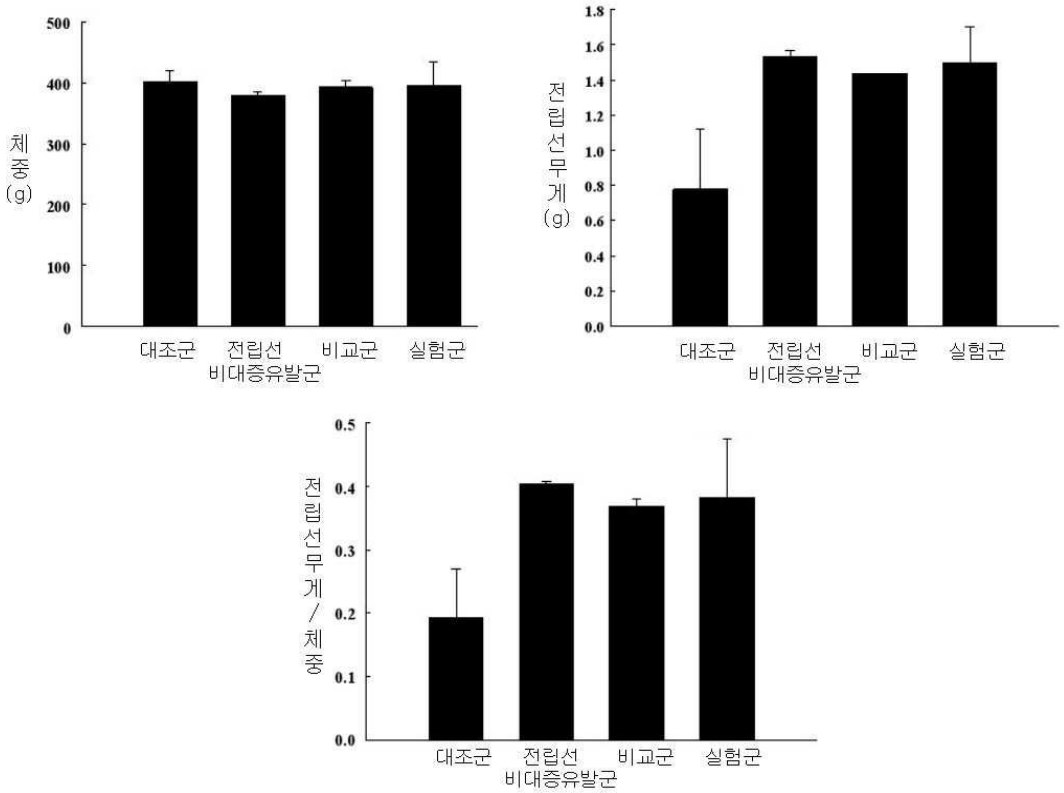
표 4

[0052]

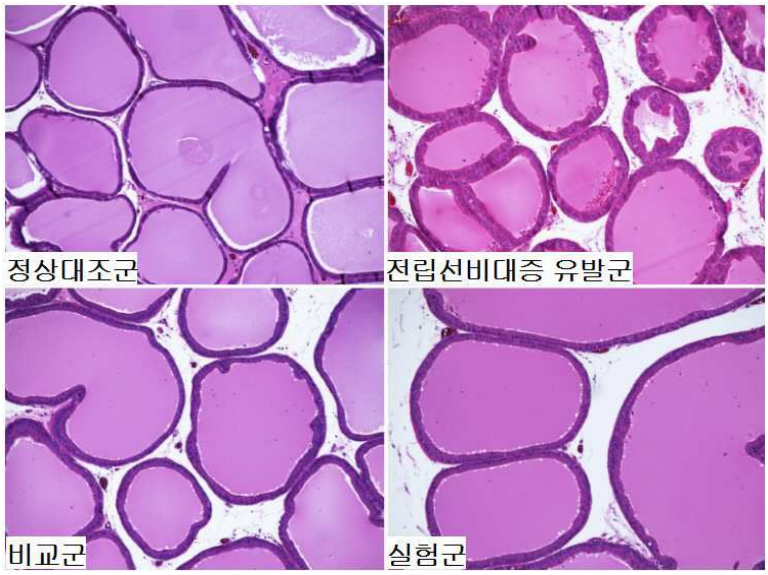
	개체별 PCNA 양성셀/100셀				평균	표준편차	표준오차
	1	2	3	4			
정상대조군	4	3	4	2	3.25	0.96	0.48
전립선비대증 유발군	14	16	11	14	13.75	2.06	1.03
비교군	5	3	3	6	4.25	1.50	0.75
실험군	2	2	1	4	2.25	1.26	0.63

도면

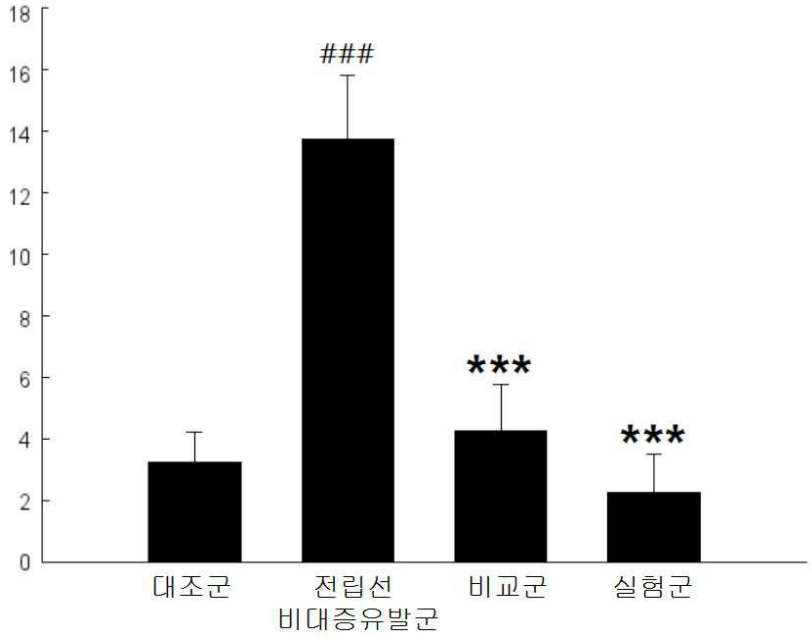
도면1



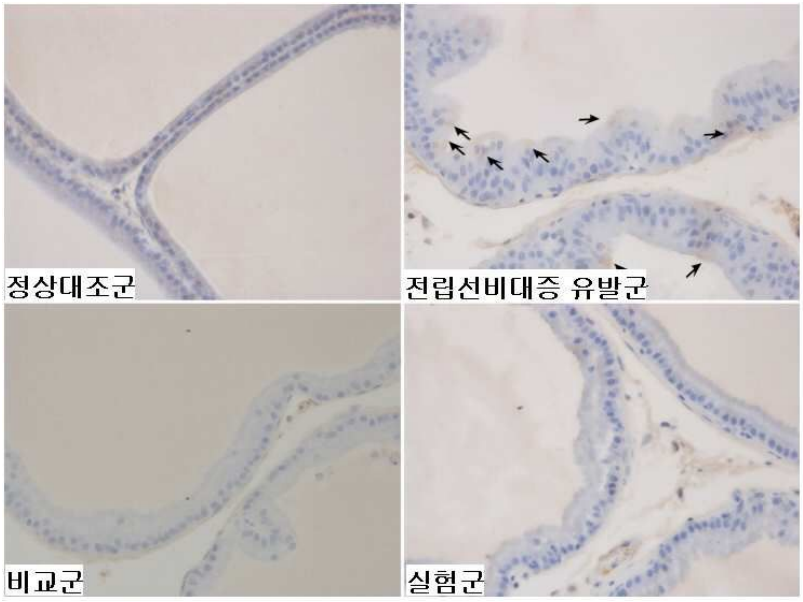
도면2


정상대조군
전립선비대증 유발군
비교군
실험군

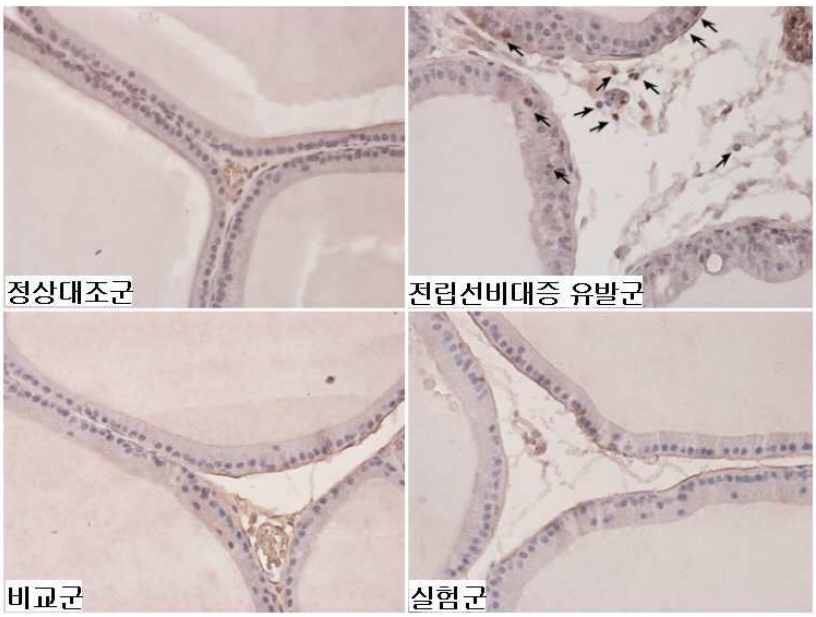
도면3


18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
###
***
***
대조군
전립선
비대증유발군
비교군
실험군

도면4



도면5



도면6

