

## 울금 추출물의 5-Alpha Reductase II 활성 저해 효과

- 연구노트 -

김종연<sup>1</sup> · 이정윤<sup>1</sup> · 윤호근<sup>2</sup> · 김용재<sup>3,4</sup> · 전우진<sup>3</sup> · 황권택<sup>5</sup> · 차민석<sup>6</sup> · 이유현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>수원대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>연세대학교 의과대학  
<sup>3</sup>전남대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>한국인스팜 중앙연구소  
<sup>5</sup>남부대학교 식품영양학과, <sup>6</sup>(주)산들촌 중앙연구소

### Inhibitory Effect of *Curcuma longa* L. Extracts on 5-Alpha Reductase II Activity

Jong Yeon Kim<sup>1</sup>, Jeong Yoon Lee<sup>1</sup>, Ho-Geun Yoon<sup>2</sup>, Yungjae Kim<sup>3,4</sup>, Woojin Jun<sup>3</sup>,  
Kwon Tack Hwang<sup>5</sup>, Min Seok Cha<sup>6</sup>, and Yoo-Hyun Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 550-757, Korea

<sup>4</sup>Korea INS Pharm Inc., Jeonnam 519-882, Korea

<sup>5</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-824, Korea

<sup>6</sup>SDC R&D Center, Jeonnam 517-803, Korea

**ABSTRACT** 5-Alpha reductase II, which converts testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT), is a crucial enzyme II in benign prostatic hyperplasia. Inhibitory effects of *Curcuma longa* L. (CL) extracts on 5-alpha reductase II activity were investigated in rat prostate tissue homogenates as well as LNCaP cells expressing human 5-alpha reductase II. Hot water extract (CL-HW) of *Curcuma longa* L. significantly inhibited 5-alpha reductase activity by over 80% at a concentration of 100 µg/mL, whereas 20% ethanol extracts (CL-E20) of *Curcuma longa* L. exhibited significant inhibitory activity from 50 µg/mL. These results indicated that *Curcuma longa* L. is a potent 5-alpha reductase II inhibitor for benign prostatic hyperplasia treatment.

**Key words:** *Curcuma longa* L., benign prostate hyperplasia, 5-alpha reductase II, dihydrotestosterone

## 서 론

양성전립선비대(benign prostatic hyperplasia)는 남성에 있어서 가장 흔한 양성 증식성 장애(benign proliferative disorder) 중 하나로 40대 이후 남성의 80% 이상이 한 번쯤은 영향을 받는다고 알려져 있다(1,2). 하부요로 증상(lower urinary tract symptoms)은 전립선비대로 발생하는 대표적인 장애로 빈뇨, 잔뇨감, 절박뇨, 지연뇨 등의 불편한 증상을 경험하게 된다(3).

전립선비대의 정확한 원인은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 남성호르몬인 안드로젠이 중요한 요인으로 관여한다고 알려져 있다. Prostatic androgen인 dihydrotestosterone(DHT)은 testosterone(T)의 대사산물로 5-alpha reductase에 의해 전환된다(4). DHT는 핵에서 안드로젠 수용체와 결합하여 androgen effect를 유도하는데(5) T보다 높

은 친화성으로 결합하므로 보다 활성형 호르몬으로 작용하게 되며, 전립선비대인 경우 혈액 중 DHT 수준이 높게 측정된다(6). 이 같은 전환을 담당하는 5-alpha reductase는 사람에게는 type I, type II 두 종류가 존재하는데 이 중 type II는 주로 전립선조직에서 발견된다(1). 현재 전립선비대 치료제로 사용되고 있는 finasteride는 5-alpha reductase II (SRD5A2)의 저해제로서 T로부터 DHT로의 전환을 억제하는 기전을 갖고 있으며(5), 이러한 활성을 지닌 천연물의 탐색은 전립선건강을 위한 건강기능식품이나 잠재적인 치료제의 소재가 될 수 있을 것이다.

울금(turmeric, *Curcuma longa* L.)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하고 항염증(6), 항암(7), 항산화(8), 항비만(9), 항균(10) 등 다양한 활성을 가지고 있으며, 그 성분으로는 curcumin이 가장 널리 알려져 있다(11). 본 연구에서는 rat의 전립선조직을 효소원으로 하여 울금의 냉수, 열수, 20% 및 80% 에탄올 추출물이 5-alpha reductase의 활성에 미치는 영향을 검토하고, 이 중 활성이 높은 추출물을 선정하여 5-alpha reductase를 농도별로 억제하는 것을 밝힘으로써 전립선건강을 위한 건강기능식품 및 치료제 개발의 소재

Received 2 October 2013; Accepted 22 January 2014

\*Corresponding author.

E-mail: creamut@suwon.ac.kr, Phone: +82-31-229-8194

를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에서 사용한 울금은 2011년 하늘땅바다(Jindo, Korea)로부터 감별과정을 거친 후 적합품을 선별하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지, 혈청, 항생제 등은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 rat 및 human 5-alpha reductase activity ELISA kit는 Cusabio(Wuhan, China) 제품을 사용하였다. Total RNA extraction kit는 Intron(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였고 Lipofectamine 2000 transfection reagent는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 실험재료의 추출

울금은 적합품을 칭량하여 건조하여 추출기에서 각각 해당 용매를 넣고 다음과 같이 추출하였다. 냉수추출물(CL-CW)은 울금 800 g에 32 L의 정제수를 넣고 실온에서 5시간, 20%(CL-E20) 및 80%(CL-E80) 에탄올 추출물은 각각 510 g의 울금을 넣고 10배의 용매를 넣어서 95°C에서 4시간, 열수추출물(CL-HW)은 역시 10배의 정제수를 넣고 100°C에서 4시간 동안 추출하였다. 각 추출물을 여과한 후 45°C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축하고, 처음과 동일한 수준의 3차 증류수를 넣고 같은 조건으로 2차 농축하여 동결건조(PVTFD10R, 일신랩, Dongduchun, Korea)한 후 사용하였다. 본 추출로 얻어진 울금의 냉수추출의 수율은 132.26 g(16.5%), 열수추출 46.66 g(9.1%), 20% 에탄올 추출 42.42 g(8.3%) 그리고 80% 에탄올 추출은 29.10 g(8.5%)이었다.

### LNCaP 세포에서 SRD5A2의 발현

인간 전립선암 세포주인 LNCaP(ATCC, Manassas, VA, USA)는 RPMI1640 배지에서 10% FBS, 1% antibiotics/antimycotics를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 습윤한 incubator에서 배양되었다. Human 5-alpha reductase II 활성 측정을 위하여 SRD5A2 gene(DNASU plasmid Repository, Tempe, AZ, USA)을 구입하여 primer 5'-GCATGGATCCATGCAGGTTTCAGTGCCAGCA-3' 및 5'-GCATGGATCCTTAAAGATGAATGGAATAA-3'를 이용하여 PCR을 증폭시켜 pGL5-Flag vector(Promega, Madison, WI, USA)에 cloning 하고 LNCaP 세포에 transfection 하였다. 세포 추출 전 10% charcoal-stripped FBS를 첨가한 RPMI1640 배지로 교환한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 본 연구에 사용된 reverse transcriptase PCR의 primer는 다음과 같다. SRD5A2는 forward 5'-GGC CTC TTC TGC GTA CAT TA-3', reverse 5'-CAC CCA AGC TAA ACC GTA TG-3'를 사용하였으며, GAPDH는 for-

ward 5'-ATG TTC GTC ATG GGT GTG AAC-3', reverse 5'-GCA TGG ACT GTG GTC ATG AGT-3'를 사용하여 denaturation 94°C, annealing 58°C, extension 72°C로 40 cycle로 수행하여 2% agarose gel에 전개하여 결과를 확인하였다.

### 5-Alpha reductase 활성의 측정

Male Sprague Dawley rat(350~400 g)의 전립선을 적출하고 생리식염수로 1회 세척하고 4배의 phosphate buffer(pH 7.4, Life Technologies, New York, NY, USA)를 넣어 균질화하였다. 균질화 과정은 Ultra-Turrax Diperser(T10 basic, IKA, Guangzhou, China)로 실시하였다. 균질액은 다시 4°C, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리(Sorvall<sup>®</sup> Biofuge stratos, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany) 하여 상등액만을 취하여 실험에 사용하였다. LNCaP 세포의 경우, transfection 시행 후 안정화한 뒤 24시간 동안 charcoal stripped FBS를 처리하고 세포를 수거하여 상기와 같이 균질화하였다. 실험은 Bradford assay를 이용한 단백질 양을 근거로 200 µg 기준으로 실시하였으며, 5-alpha reductase II 활성 측정은 래트의 전립선균질액을 사용한 경우, rat 5-alpha reductase II ELISA kit(Cusabio)의 매뉴얼을 따랐다. 간단하게 설명하자면 200 µg의 균질액과 울금의 다양한 용매추출물을 30분 동안 실온에서 반응시키고, testosterone(TCI, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 2 nM 처리하여 1시간 동안 37°C incubator(J-IL4, Jisico, Seoul, Korea)에서 반응시켰다. 양성대조군인 finasteride(TCI, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)는 사전실험을 통하여 5 µM로 사용되었다. 전립선세포주인 LNCaP를 사용한 경우, human 5-alpha reductase II ELISA kit(Cusabio)를 사용하였으며 처리과정은 동일하였다. Microplate spectrophotometer(Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 그 측정값을 Curve expert 1.3을 통해 수치를 산출하며 testosterone균을 100%로 하여 백분율로 표기하였다.

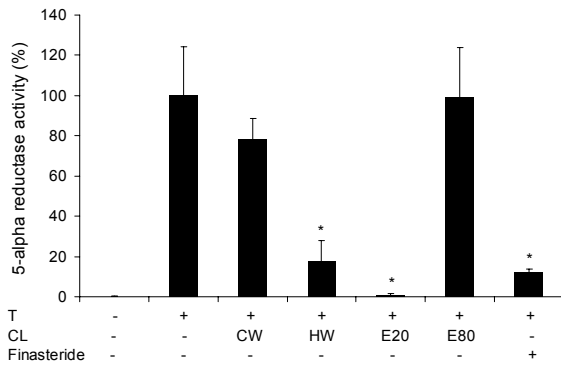
### 통계분석

본 연구에서는 최소 3반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 Student t-test를 사용하여 검정하였다. 통계검정은 SigmaStat(version 3.5, Systat Software Inc., San Francisco, CA, USA)를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

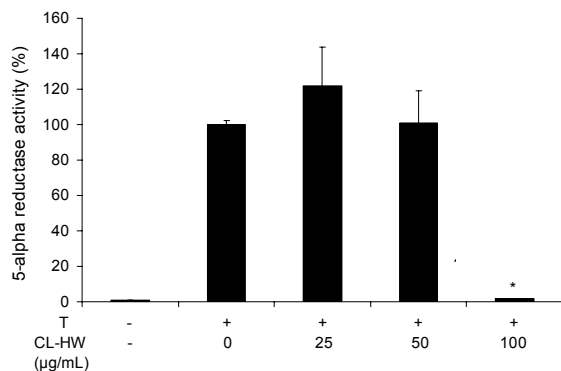
### 울금추출물의 rat 5-alpha reductase 저해

Rat의 전립선조직을 효소원으로 하여 5-alpha reductase II의 활성을 검토하기 위하여 male rat(몸무게 350~

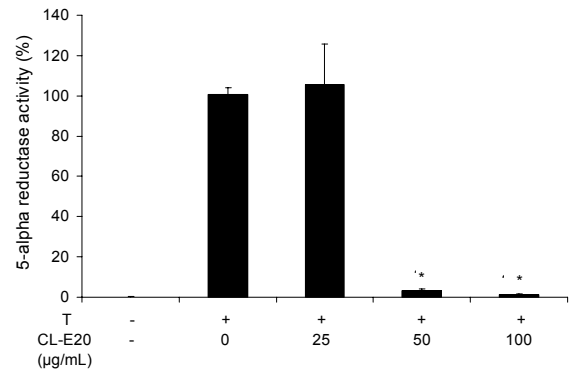


**Fig. 1.** 5-Alpha reductase II activity in prostate tissue homogenate. Prostate tissue was homogenated and then centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. Supernatant was incubated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *Curcuma longa* extracts for 30 min. Results represent the mean values with SD of three independent experiments. T, testosterone; CL-CW, *Curcuma longa* cold water extract; CL-HW, *Curcuma longa* hot water extract; CL-E20, *Curcuma longa* ethanol 20% extract; CL-E80, *Curcuma longa* ethanol 80% extract. \* $P < 0.05$  is assessed as significant differences between the testosterone group and CL treated groups.

400 g)의 전립선을 적출하여 균질화한 후 사용하였다. 울금의 냉수, 열수, 20% 에탄올 및 80% 에탄올 추출물과 rat 전립선균질액을 20분 동안 incubation 한 후 ELISA assay를 시행한 결과는 Fig. 1과 같다. 각 추출물의 농도는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 실시하였다. 울금 80% 에탄올추출물의 경우는 testosterone만 처리한 군과 비슷하였으나, 열수 및 20% 에탄올추출물은 유의적으로 5-alpha reductase의 활성이 감소함을 볼 수 있었다. 네 종류의 추출물 중 가장 5-alpha reductase 활성을 저해한다고 생각되는 울금의 열수추출물과 20% 에탄올 추출물을 선정하여 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도별로 측정된 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 울금의 열수추출물의 경우에는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리군에서 90% 이상의 유의



**Fig. 2.** Effect of CL-HW on 5-alpha reductase II activity in prostate tissue homogenate. Prostate tissue was homogenated and then centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. Supernatant was incubated with various concentrated CL-HW for 30 min. T, testosterone; CL-HW, *Curcuma longa* hot water extract. Results represent the mean values with SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$  is assessed as significant differences between the testosterone group and CL-HW treated groups.



**Fig. 3.** Effect of CL-E20 on 5-alpha reductase II activity in prostate tissue homogenate. Prostate tissue was homogenated and then centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. Supernatant was incubated with various concentrated CL-HW for 30 min. Results represent the mean values with SD of three independent experiments. T, testosterone; CL-E20, *Curcuma longa* ethanol 20% extract. \* $P < 0.05$  is assessed as significant differences between the testosterone group and CL-E20 treated groups.

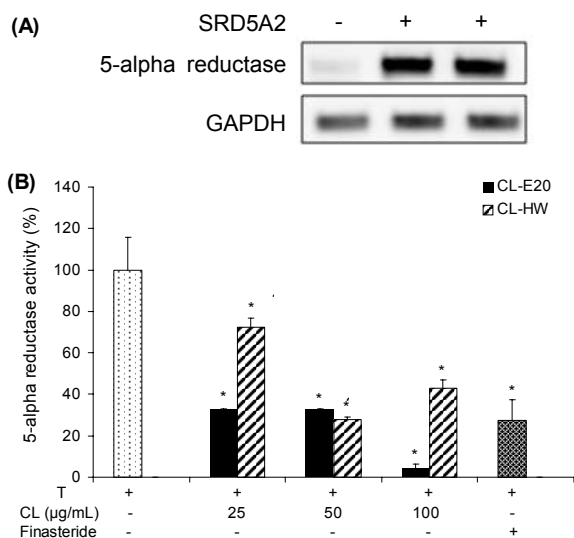
적인 저해를 보였다(Fig. 2). 울금 20% 에탄올 추출물의 경우 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때는 positive control인 finasteride(5  $\mu\text{M}$ )와 동등한 수준의 저해율을 보였다(Fig. 3).

#### 울금 추출물의 human 5-alpha reductase II의 저해효과

Rat의 5-alpha reductase II에서 뿐만 아니라, human 5-reductase alpha II에 대한 울금 열수 및 20% 에탄올추출물의 저해효과를 보기 위하여 인간 전립선암세포인 LNCaP 세포에 SRD5A2를 발현시키고 균질화하여 실험에 사용하였다. LNCaP 세포는 transfection을 시행하고 안정화한 후 24시간 동안 charcoal stripped FBS를 첨가한 배지를 처리한 후 세포를 수거하여 세포를 수거하여 rat 전립선과 동일한 조건으로 균질화하고 울금추출물을 처리하였다. LNCaP에서의 5-alpha reductase II의 발현을 PCR로 확인한 결과는 Fig. 4A와 같다. Transfection 하지 않은 LNCaP cell에서는 5-alpha reductase의 mRNA가 거의 발현되지 않지만, transfection을 시행한 경우 뚜렷하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

상기에서 제작된 5-alpha reductase II 과발현 LNCaP를 이용하여 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 human 5-alpha reductase II 활성을 측정하였다(Fig. 4B). 울금의 열수추출물 처리군에서는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의적으로 감소하였으며, 울금 20% 에탄올추출물의 결과는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 다소 상승하였으나 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 농도의존적으로 감소하였다. 본 결과는 rat의 5-alpha reductase II에서의 경향과 같았다.

전립선비대의 치료에서 널리 사용되는 finasteride는 5-alpha reductase II inhibitor로 T에서 DHT로 전환을 저해함으로써 하부요로증상, 전립선 크기 등을 감소시킨다(12). 천연물에서 5-alpha reductase II inhibitor의 탐색은 다수



**Fig. 4.** Effect of *Curcuma longa* extracts on 5-alpha reductase II activity in human 5-alpha reductase overexpressed LNCaP cells. (A) The 5-alpha reductase expression was measured by RT-PCR. (B) The 5-alpha reductase II overexpressed cell extracts were incubated with CL-HW and CL-E20 for 30 min. Finasteride conc. was 5 µM. T, testosterone; CL-E20, *Curcuma longa* ethanol 20% extract; CL-HW, *Curcuma longa* hot water extract. Results represent the mean values with SD of three independent experiments. \**P*<0.05 is assessed as significant differences between the testosterone group and CL or finasteride treated groups.

의 전립선비대증상 경험자들의 전립선건강유지 및 부작용이 적은 치료제 개발을 위하여 진행되고 있다. 그 예로 cocoa bean의 cocoa polyphenolic extract(13), fluted pumpkin seed(*Telfairia occidentalis* Hook f.)(14), Red Maca (*Lepidium myenii*)(15) 등에서의 *in vivo* 실험의 결과로 5-alpha reductase II의 저해 활성이 보고되고 있다. 본 연구에서 사용된 울금의 열수 및 20% 에탄올추출물의 경우 rat의 전립선조직에서뿐만 아니라 human 5-alpha reductase가 발현된 전립선세포주에서 실험한 결과, 양성대조군으로 사용된 finasteride(5 µM) 수준의 높은 저해를 보이고 있다. 본 연구에서 활성을 보인 울금 열수 및 20% 에탄올추출물은 다양한 효과가 있다고 알려진 curcumin을 다량 포함하고 있지 않기 때문에 다른 활성물질이 존재할 것이라고 생각된다. 그동안 전립선비대 연구에서 효과가 있다고 알려진 단일 물질로는 여러 식물에 존재하고 있는 pentacyclic triterpenoid의 하나인 ursolic acid(4)가 있으며, 녹차의 주요 성분인 epigallocatechin gallate(EGCG)는 5-alpha reductase의 저해능이 있다고 보고되었다(16). 전립선비대 연구는 대부분 *in vivo*에서 진행되며 전립선 크기의 감소와 혈중 DHT의 감소 등 명확한 결과를 확인할 수 있으나(13-15), 활성물질의 연구 혹은 탐색 등의 *in vitro* system을 사용하는 경우는 아직 드문 실정이다(6,17). 본 연구에서 5-alpha reductase II의 활성을 저해하는 울금 열수 및 20% 에탄올추출물을 대상으로 *in vivo* 실험을 진행하고 *in vitro*

system에서 활성물질을 탐색한다면, 전립선건강 건강기능 식품 및 치료제로 개발될 수 있는 효과적인 소재발굴의 기초 자료가 될 것이라고 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 울금(*Curcuma longa* L.)의 다양한 추출물을 대상으로 5-alpha reductase의 활성 저해 정도를 측정하였다. 5-Alpha reductase는 T에서 활성형 남성호르몬인 DHT로 전환을 담당하며, 전립선비대에서는 혈액에서 DHT 농도가 높다. Rat의 전립선조직 균질액과 5-alpha reductase를 과발현시킨 LNCaP 세포 균질액을 대상으로 측정된 결과, 100 µg/mL의 농도에서 울금의 열수추출물(CL-HW)과 20% 에탄올추출물(CL-E20)이 5-alpha reductase 활성을 효과적으로 저해하였다. 특히 CL-HW는 100 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 유의적 억제효과를 보였으며, CL-E20은 50 µg/mL의 농도부터 80% 이상의 감소효과를 보였다. 이 같은 결과에서 CL-HW 및 CL-E20은 5-alpha reductase의 억제활성이 있으며, 이는 전립선비대 치료소재로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 제안한다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 기술사업화지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Pais P. 2010. Potency of a novel saw palmetto ethanol extract, SPET-085, for inhibition of 5alpha-reductase II. *Adv Ther* 27: 555-563.
- Kim YN, Kim MS, Chun SS, Choi JH. 2013. Effect of *Phellius linteus* water extract on benign prostatic hyperplasia. *Nutr Res Pract* 7: 172-177.
- Sun J, Xiang H, Yang LL, Chen JB. 2011. A review on steroidal 5α-reductase inhibitors for treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr Med Chem* 18: 3576-3589.
- Shin IS, Lee MY, Jung DY, Seo CS, Ha HK, Shin HK. 2012. Ursolic acid reduces prostate size and dihydrotestosterone level in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Food Chem Toxicol* 50: 884-888.
- Chaudhary UB, Turner JS. 2010. Finasteride. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6: 873-881.
- Wang X, Liao J, Yin D, Zhan F, Dai S, Xie G, Sang X. 2010. Establishment of a novel model for studying the effects of extracts of Chinese herb medicine on human type II 5alpha-reductase *in vitro*. *Yakugaku Zasshi* 130: 1207-1214.
- Chandrasekaran CV, Sundarajan K, Edwin JR, Gururaja GM, Mundkinajeddu D, Agarwal A. 2013. Immune-stimulatory and anti-inflammatory activities of *Curcuma longa* extract and its polysaccharide fraction. *Pharmacognosy Res* 5: 71-79.
- Ramkissoon JS, Mahomoodally MF, Ahmed N, Subratty AH. 2012. Relationship between total phenolic content, anti-

- oxidant potential, and antiglycation abilities of common culinary herbs and spices. *J Med Food* 15: 1116-1123.
9. Ho JN, Jang JY, Yoon HG, Kim Y, Kim S, Jun W, Lee J. 2012. Anti-obesity effect of a standardised ethanol extract from *Curcuma longa* L. fermented with *Aspergillus oryzae* in ob/ob mice and primary mouse adipocytes. *J Sci Food Agric* 2: 1833-1840.
  10. Stefanska B. 2012. Curcumin ameliorates hepatic fibrosis in type 2 diabetes mellitus-insights into its mechanisms of action. *Br J Pharmacol* 166: 2209-2211.
  11. Um MY, Hwang KH, Ahn J, Ha TY. 2013. Curcumin attenuates diet-induced hepatic steatosis by activating AMP-activated protein kinase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 113: 152-157.
  12. Kang DI, Chung JI. 2013. Current status of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors in prostate disease management. *Korean J Urol* 54: 213-219.
  13. Bisson JF, Hidalgo S, Rozan P, Messaoudi M. 2007. Therapeutic effect of ACTICOA powder, a cocoa polyphenolic extract, on experimentally induced prostate hyperplasia in Wistar-Unilever rats. *J Med Food* 10: 628-635.
  14. Ejike CE, Ezeanyika LU. 2010. Inhibition of the experimental induction of benign prostatic hyperplasia: a possible role for fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook f.) seeds. *Urol Int* 87: 218-224.
  15. Gasco M, Villegas L, Yucra S, Rubio J, Gonzales GF. 2007. Dose-response effect of Red Maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomedicine* 4: 460-464.
  16. Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Q, Liao S. 2002. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 $\alpha$ -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol* 63: 1165-1176.
  17. Jang S, Lee Y, Hwang SL, Lee MH, Park SJ, Lee IH, Kang S, Roh SS, Seo YJ, Park JK, Lee JH, Kim CD. 2007. Establishment of type II 5 $\alpha$ -reductase over-expressing cell line as an inhibitor screening model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 107: 245-252.