

복분자 미숙과 추출물이 전립선암 세포주와 전립선비대 백서모델에 미치는 영향

이수정 · 최혜란 · 이정현 · 권지웅 · 이희권 · 정종태 · 이태범[†]

(재)고창복분자연구소

Effects of Unripe Black Raspberry Extracts on Prostate Cancer Cell Line and Rat Model of Benign Prostatic Hyperplasia

Su Jung Lee, Hye Ran Choi, Jung-Hyun Lee, Ji Wung Kwon, Hee Kwon Lee, Jong Tae Jeong, and Tae-Bum Lee[†]

Gochang Black Raspberry Research Institute, Jeonbuk 585-943, Korea

ABSTRACT Benign prostatic hyperplasia (BPH), which is commonly found in aging men, is characterized by hyperplasia of prostatic stromal and epithelial cells beginning in the periurethral zone of the prostate. The prevalence of BPH increases in an age-dependent manner. Here, we investigated the protective effects of unripe *Rubus occidentalis* extracts (UROE) on BPH development using a prostate cancer cell line and testosterone-induced BPH rat model. Experiments using an established hormone-dependent prostate cancer cell line (LNCaP) showed that UROE treatment significantly decreased expression of androgen-related genes, including androgen receptor (AR), prostate specific antigen (PSA), and 5-alpha reductase 2, but not 5-alpha reductase 1, which was also observed in flutamide-treated cells. Further, AR and PSA gene expression was reduced by UROE treatment under androgen-stimulated conditions using dihydrotestosterone (DHT). BPH animals displayed elevated prostate weights. However, UROE as well as finasteride treatment significantly reduced prostate weights and DHT levels compared to testosterone-induced BPH animals. Histopathological analysis also showed that UROE treatment suppressed testosterone-induced prostatic hyperplasia. Taken together, the results suggest that UROE may effectively inhibit the development of BPH and thus may be a useful agent in BPH treatment.

Key words: benign prostatic hyperplasia, unripe *Rubus occidentalis*, androgen receptor, prostate specific antigen, 5-alpha-reductase 2

서 론

최근 인구의 고령화와 생활의 서구화로 전립선비대증 환자가 증가하는 경향을 보이고 있다. 50대의 50%, 60~70대의 60~80%가 전립선비대증 환자일 만큼 전립선비대증은 고령 남성들에게 흔히 발생하는 질병이다. 전립선 비대는 병리학적으로 40대에서 시작되어 50대 이상 남자에서 가장 흔히 발생하는 질환이다(1). 전립선비대증은 다양한 요소들에 의해 영향을 받으나 아직 그 기전이 명확히 알려진 바가 없으나, 남성호르몬에 의존적으로 특히 전립선 내 dihydrotestosterone(DHT)의 농도가 전립선비대 유발에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다(1).

DHT는 5-알파환원효소 type 1(5-alpha reductase type 1, 5AR1, skin and liver)과 type 2(5AR2, skin/scalp, prostate, and liver) 동종효소를 통해 테스토스테론으로부터 전환되어 생성된다(2,3). 전립선 내에서는 5AR2에 의해

테스토스테론으로부터 DHT로 전환되며, 5AR2는 정상 전립선의 발달과 노년의 전립선 비대에서 중요한 역할을 담당한다(4). DHT는 테스토스테론보다 활성이 5배 정도 높고 또한 전립선 내 DHT의 농도가 테스토스테론의 약 2배 정도 임을 감안하면 DHT의 전립선에 대한 역할은 테스토스테론의 약 10배에 해당한다고 볼 수 있다. 높은 DHT의 농도는 남성호르몬(안드로겐) 수용체인 androgen receptor(AR)와 결합하여 전립선특이항원인 prostate specific antigen(PSA)의 생성을 촉진시킨다. 즉 혈액 내에서 테스토스테론이 과다하게 존재하면 전립선에서 5AR에 의해 DHT를 다량 합성하게 되고 합성된 DHT는 전립선 세포에 있는 AR에 결합하여 전립선 비대를 유발하게 된다고 알려져 있다. 또한 노화가 되면서 남성 호르몬의 분비가 줄어들게 되면 내분비계의 균형을 유지하기 위해 전립선 세포내 AR의 발현이 증가되어 DHT가 더 많은 수용체와 결합함으로써 전립선의 비대가 유발된다(5). 그리고 전립선비대 환자에서는 PSA 수치가 높아져 있다고 알려져 있다. 보통 증가된 DHT, AR 및 PSA 그리고 전립선비대증의 증상은 의약품인 finasteride(5AR2 억제)와 dutasteride(5AR1 및 5AR2 억제) 같

Received 23 December 2013; Accepted 10 March 2014

[†]Corresponding author.

E-mail: tblee01@gbri.re.kr, Phone: +82-63-560-5170

은 5AR 억제제로 치료하는데, 이러한 약물은 테스토스테론이 DHT로 전환되는 것을 억제함으로써 AR과의 결합을 감소시키고 PSA 수치를 감소시킨다고 알려져 있다(6,7). 하지만 의약품의 경우 발기부전, 성기능장애 등 부작용 때문에 식물에서 추출한 천연물질을 이용한 치료제의 개발이 활발히 진행되고 있다.

유럽에서는 식물 추출물들이 전립선비대증 치료제로서 처방될 뿐 아니라 보편적용이 되는 치료 옵션인 반면 미국에서는 건강보조식품으로서 분류되어 처방 없이 구입이 가능하다. 전립선비대증을 치료하는 식물성 천연약제로 saw palmetto(*Serenoa repens*), African pygeum(*Pygeum africanum*), pumpkin(*Cucurbita pepo*) 그리고 stinging nettle root가 알려져 있다(8). 이러한 phytotherapeutic 식물 추출물의 구성성분을 살펴보면 phytosterols, β -sitosterol, delta-5-sterols, delta-7-sterols, campesterol, stigmasterol, lupenone, lupeol, terpenoids, fatty acids, lectins, plant oils, polysaccharides, flavonoids, phytoestrogens, coumestrol, genistein 등으로 구성되어 있다(9). 이러한 구성성분들은 항안드로젠 효과(AR 억제) 및 5AR 억제 효과가 있다고 알려져 있다(8). 특히 β -sitosterol은 가장 풍부한 식이 phytosterol로서 채소, 과일 및 콩 등에 많이 함유되어 있고, 이 성분은 pygeum, 톱아자 등과 같은 전립선에 특이적인 생약에서 중요한 성분으로 생각되고 있다.

한편 우리나라를 비롯한 동양권 국가에서는 남성의 전립선 및 배뇨 질환을 치료하기 위해 오래 전부터 자연친화적인 생약제제를 사용해 왔었다. 가장 대표적인 것이 복분자이며, 이외에도 산수유, 토사자 등이 있다. 한의서에 기록된 약리 효과를 보면, 이들 천연약제가 인체에 안전하면서도 약효가 다른 생약에 비해 뛰어나며, 간 기능을 강화하여 시력을 증진시키고 기운을 돋우는 효과 외에도 성기능을 높여주고 소변의 배설을 쉽게 해주어 천연 자연강장제 외에 남성의 전립선 및 배뇨기능에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(10). 복분자는 한국에서 널리 재배되는 식물로 flavonoids (flavonols and flavanols), tannins(proanthocyanidins, ellagitannins and gallotannins), stilbenoids(resveratrol), phenolic acids와 lignans, triterpenoids와 같은 다양한 phytochemicals을 함유하고 있다(11,12). 최대 생산지인 고창을 비롯한 전국적으로 재배되고 있는 복분자(*Rubus occidentalis*)는 다양한 폴리페놀을 함유하고 있어 항산화, 항염증, 항암 효과가 있다고 알려져 있다(13). 본 연구는 전립선암세포주인 LNCaP 세포주와 테스토스테론으로 유도된 전립선비대 백서모델에서 복분자 미숙과 추출물의 전립선비대 억제 효과를 확인해 보고자 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포 배양

전립선암세포주인 LNCaP 세포를 10% fetal bovine se-

rum(PAA, Toronto, ON, Canada)과 항생제(penicillin/streptomycin, Lonza, Walkersville, MD, USA)를 함유한 RPMI1640(Welgene, Daegu, Korea) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 시험에 사용되는 세포는 배양접시에 세포가 60~70% 되었을 때 복분자 추출물을 48시간 동안 처리한 후, 다음의 실험을 진행하였다.

복분자 추출물 제조

본 실험에 사용된 복분자 에탄올 추출물은 미숙과 또는 완숙과 10 kg당 10 L의 에탄올(25, 50, 75% EtOH)로 환류 냉각장치를 사용하여 80°C에서 2시간 2회 반복 추출, 여과, 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결건조 하였으며, 물 추출물은 동량의 증류수로 100°C에서 2시간 2회 반복 추출, 여과한 후 감압 농축하여 동결건조 과정을 거쳐 제조하였다.

세포 독성실험

LNCaP 세포를 96 well plate에 well당 4×10^4 cells/mL의 농도로 분주한 후 24시간 동안 배양하고, 복분자 미숙과 추출물을 처리한 뒤 48시간 뒤에 methyl thiazolyl diphenyl tetrazolium(MTT) assay를 시행하였다(14). MTT assay에는 cell viability assay kit(EZ-Cytox, Dogen, Seoul, Korea)를 이용하였다. 모든 well에 MTT 용액 10 μ L를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양한 뒤 흡광도 측정을 위해 1분 정도 부드럽게 shaking을 한 후 microplate reader(Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리 및 real-time RT-PCR 기법

총 RNA의 추출: RNA 추출은 total RNA extraction reagent인 Tri-reagent(RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan)를 이용하였다. Tri-reagent 1 mL를 세포에 넣고 15초 동안 vortex한 뒤 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. Chloroform 200 μ L를 넣고 20초간 vortex한 후 원심분리 하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 분리된 상층액에 차가운 isopropanol 동량을 넣고 상온에서 10분 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 RNA 침전물을 획득하였다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후 침전물을 수 분간 실온에서 건조시켜 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC) water에 녹였다. RNA 농도(1 OD=40 μ g/mL)는 DU^R730 spectrophotometer(Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

역전사-실시간 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR): First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U/ μ L RNasin(Invitrogen), 1 mM each dNTP, oligo(dT)₂₀ 100 ng과 MMLV reverse transcriptase(Invitrogen) 200 U가 함유된 20 μ L의 용액에서 총 RNA

2 µg으로부터 합성하였다. 실시간 PCR은 Fast Start DNA Master SYBR Green I kit(Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0에서 증폭하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1, 2와 같으며 유전자의 정량분석은 Light Cycler Software 4.0(Roche)을 이용하였다.

Western blot

LNCaP 세포는 100 mm dish에 2×10⁶/mL의 농도로 희석하여 분주하고, 복분자 미숙과 추출물을 48시간 동안 처리하였다. 양성대조군으로 AR 억제제인 flutamide를 사용하였다. 복분자 미숙과 추출물과 양성대조군을 처리한 지 48시간 뒤에 차가운 PBS로 dish를 washing하고 lysis buffer를 dish에 뿌린 후 스크래퍼를 이용해 세포를 획득하였다. 단백질 추출을 위해 30분 동안 5분에 한 번씩 vortex mixing을 시행하였다. 이후 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리를 하여 상층액을 획득하였다. 획득된 상층액은 Bradford 정량법을 이용해 단백질 정량을 시행하였고, SDS-PAGE gel에 loading 하였다. 이후 PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 단백질을 transfer (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad) 시킨 후, 5% blocking buffer(skim milk, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용해 blocking 과정을 거쳤다. 이후 1×TBS-T로 washing 후 5% blocking buffer에 primary antibody(AR: BD Pharmingen, San Jose, CA, USA, β-actin: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 희석하여 4°C에서 overnight 시켰다. 다음날 1×TBS-T로 blot을 washing 한 뒤, 2차 antibody를 4°C에서 1시간 반응시켰다. 이후 1×TBS-T로 washing 후 ECL

Western Blotting Substrate(Promega Corp., Madison, WI, USA)로 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

전립선비대 동물 모델

실험동물 및 사육 조건: 본 연구에서 사용한 실험동물은 생후 10주령의 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 상태인 수컷 Sprague Dawley(SD) rats를 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 1주일간의 적응기간을 거친 뒤 플라스틱 케이지에 2마리씩 사육하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(Purina, Seoul, Korea)와 필터 및 자외선 살균기로 여과 살균된 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물 사육실은 아침 8시부터 저녁 8시까지 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 사육실의 온도는 22±2°C, 50±5% 습도를 유지하였다.

전립선비대증 유발 및 복분자 미숙과 추출물 투여: 생후 10주령의 수컷 백서를 정상대조군, 전립선비대 유발군으로 나누고 testosterone propionate(Samil Pharmaceutical Company, Seoul, Korea)를 3 mg/kg으로 6주간 매일 피하 주사를 시행하여 전립선비대증을 유발하였다. 복분자 미숙과 추출물 투여군은 복분자 저용량 급이군(150 mg/kg), 중용량 급이군(300 mg/kg), 고용량 급이군(600 mg/kg)을 6주간 경구 투여하였고, 양성대조군은 전립선비대 개선에 사용되는 약물인 finasteride(TCI, Tokyo, Japan)를 1 mg/kg으로 복분자 미숙과 추출물과 동일하게 6주간 경구 투여하였다.

전립선 조직의 적출과 병리학적 검사

피하주사와 경구 투여를 6주간 시행하고 마취기를 이용

Table 1. PCR primers for real-time RT-PCR

| Gene | Amplicon (bp) | Primer |
|---------------------------------|---------------|----------------------------------|
| Androgen receptor (AR) | 168 | S 5'-CCTGGCTTCCGCAACTTACAC-3' |
| | | AS 5'-GGACTTGTGCATGCGGTACTCA-3' |
| Prostate specific antigen (PSA) | 161 | S 5'-ACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAA-3' |
| | | AS 5'-CCCCAGAATCACCCGAGCAG-3' |
| 5α-Reductase type 1 (SRD5A1) | 158 | S 5'-TGGTTAACGGGCATGTTGATAAA-3' |
| | | AS 5'-GCATAGCCACACCACTC-3' |
| 5α-Reductase type 2 (SRD5A2) | 315 | S 5'-CATACGGTTTAGCTTGGGTGT-3' |
| | | AS 5'-GCTTCCGAGATTTGGGGTAG-3' |
| β-Actin | 157 | S 5'-CACTGTGCCATCTACG-3' |
| | | AS 5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3' |

Table 2. Real-time RT-PCR conditions

| Gene | Hot start | Denaturation | Annealing | Extension |
|---------------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|
| Androgen receptor (AR) | | | 65°C, 10 sec | |
| Prostate specific antigen (PSA) | | | 65°C, 10 sec | |
| 5α-Reductasetype 1 (SRD5A1) | 95°C | 95°C | 60°C, 10 sec | 72°C, 15 sec |
| 5α-Reductasetype 2 (SRD5A2) | 10 min | 15 sec | 60°C, 10 sec | |
| β-Actin | | | 60°C, 10 sec | |

하여 마취시킨 뒤 수술대 위에서 하복부 종결개를 시행하였다. 전립선을 분리할 때에는 요도와 방광, 정낭선이 파열되지 않도록 최대한 둔성 분리하였고, 전립선이 파열되어 선액이 빠져나가지 않도록 분리하여 전립선의 크기와 무게를 측정하였다. 조직의 병리학적 변화를 관찰하기 위해 전립선 조직을 10% 중성포르말린에 24시간 이상 고정하였다. 개체당 각각 종단면(longitudinal section)으로 정중면(median plane)이 나오도록 트리밍(trimming)하였고, 파라핀 포매 후, 4 µm 두께로 절편하여 H&E stain(Sigma-Aldrich)을 시행하였다. 이후 광학 현미경(Nikon Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan)으로 전립선 상피세포의 두께(epithelial thickness)와 전립선 소포(acina) 면적의 변화를 관찰하고(15,16), image analyzer(Focus Technology, Hamburg, Germany)를 이용하여 상피세포의 두께와 소포의 면적을 측정하였다.

DHT 측정

백서로부터 획득된 혈액에 EDTA를 처리하여 4°C, 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 뒤 혈장(blood plasma)을 분리하여 DHT(dihydrotestosterone ELISA kit, ALPCO, Salem, NH, USA)의 농도를 측정하였다.

통계 분석

각 개체의 전립선 상피세포의 두께와 소포의 면적은 개체당 각각 10번의 다른 부위를 임의로 측정하여 얻은 값의 평균±표준오차(mean±SE)로 나타내었다. 실험결과는 SPSS 12.0K(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test를 통해 분석하였고, $P < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

전립선암 세포주에서 복분자 미숙과 추출물의 안드로겐 관련 유전자 억제 효과

세포독성: LNCaP 세포에서 복분자 미숙과의 물과 에탄올 농도별 추출물의 세포독성실험을 실시한 결과, 모든 추출물의 50 µg/mL 농도에서 80% 이상의 생존율을 보였다(data not shown).

복분자 미숙과 추출물의 안드로겐 관련(전립선비대) 유전자 억제 효과

LNCaP 세포주에서 복분자 미숙과 추출물이 안드로겐 관련 유전자(AR, PSA, 5AR1, 5AR2)에 미치는 영향을 확인해본 결과, 미숙과 추출물 중 50% 에탄올 추출물이 안드로겐 관련 유전자에 대해 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1). 미숙과 50% 에탄올 추출물은 AR mRNA뿐만 아니라 PSA 및 5AR2 mRNA의 발현을 억제하였다(Fig. 1A~C). 그러나 미숙과 50% 에탄올 추출물은 5AR1 mRNA의 발현을 변화시

키지 못하였다(Fig. 1D). 추가적인 전립선비대 억제 효과를 조사하기 위하여 복분자 미숙과 중에서 AR, PSA, 5AR2의 억제 효과가 가장 뛰어난 미숙과 50% 에탄올 추출물을 선택하여 실험을 진행하였다. 미숙과 50% 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 50 µg/mL의 농도에서 AR, PSA 및 5AR2 mRNA의 발현이 억제되었고(Fig. 2A~C), 양성대조군인 flutamide(10 µg/mL) 처리 시 미숙과 50% 에탄올 추출물 50 µg/mL를 처리했을 때와 비슷한 억제 효과를 보였다. 그러나 미숙과 50% 에탄올 추출물 50 µg/mL와 flutamide의 처리는 5AR1의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2D). 또한 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물의 처리는 AR 단백질 발현을 눈에 띄게 억제하였고 flutamide는 AR의 단백질 발현을 완전히 억제하였다(Fig. 3).

전립선비대가 유발되는 과정에서 테스토스테론은 5AR에 의해 DHT로 전환되고, 이렇게 생성된 DHT는 핵 내 존재하는 AR과 결합하여 PSA mRNA의 발현을 증가시키게 된다. 따라서 전립선비대 모델을 유도하기 위해서 LNCaP 세포에 50 nM의 DHT를 처리한 후 AR과 PSA mRNA를 확인하였다. 그 결과 DHT 처리에 의해 AR mRNA의 변화는 없었지만 PSA mRNA의 발현은 1.8배 증가되었다. 또한 DHT 처리 그룹과 비교하여 미숙과 50% 에탄올 추출물 처리에 의해 AR 및 PSA mRNA의 발현이 감소되는 효과를 보였다(Fig. 4). 양성대조군인 flutamide는 전립선암 치료제로서 AR 억제제로 알려져 있지만(17), 본 연구에서는 전립선암 세포주에서 복분자 처리에 의해 AR뿐만 아니라 PSA mRNA도 억제함을 확인할 수 있었다.

복분자는 플라보노이드를 포함한 폴리페놀을 풍부하게 함유하고 있고 총 폴리페놀 함량은 완속과에 비해 미숙과가 2배 이상 높으며, 총 플라보노이드 함량 또한 미숙과가 완속과보다 높다고 보고되고 있다(18,19). 게다가 myricetin, quercetin, kaempferol 및 genistein 등 다양한 폴리페놀성분이 5AR을 활성 억제를 한다는 연구 결과가 존재한다(20). 또한 Ren 등(21)과 Siddiqui 등(22)도 녹차의 폴리페놀 성분인 EGCG 성분이 전립선암 세포주에서 AR 단백질 발현을 억제한다고 보고하였다.

동물모델에서 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물의 전립선비대 억제 효과

전립선 무게 변화: 정상대조군의 전립선 무게는 100 ± 5.95 mg이었고, 전립선비대 유발군인 테스토스테론 투여군의 전립선 무게는 256.5 ± 14.1 mg으로 통계학적으로 유의하게 증가되었으며, 이는 테스토스테론이 전립선비대를 유도하였음을 보여주고 있다. 테스토스테론의 피하주사와 finasteride를 경구 투여한 양성대조군의 전립선 무게는 178.4 ± 13.6 mg으로 측정되었고, 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물 저용량 급이군, 중용량 급이군, 고용량 급이군의 전립선 무게는 각각 224.8 ± 9.3 , 182.1 ± 13.1 , 192.1 ± 10 mg으로 측정되었다. 이는 전립선비대 유발군과 비교하였을

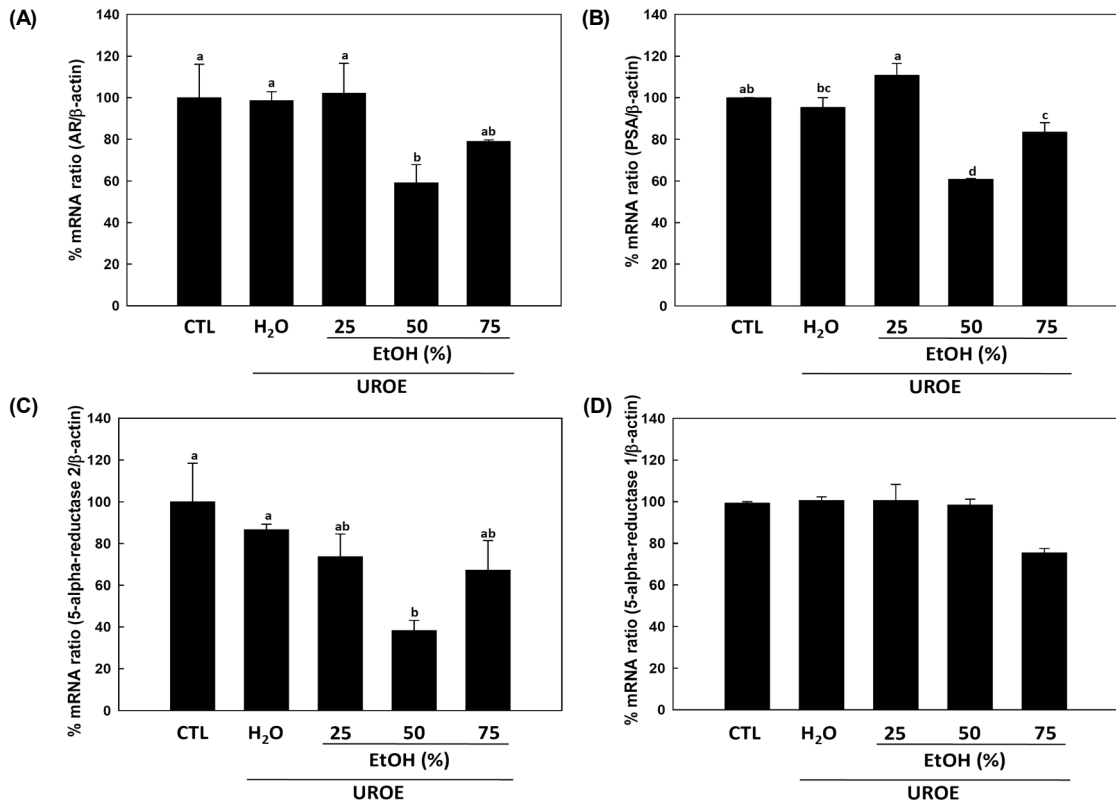


Fig. 1. Effect of various *Rubus occidentalis* extracts on expression of AR, PSA, 5AR2, and 5AR1 mRNA in LNCaP prostate cancer cell line. CTL, control; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=3). ^{a-d}Means indicates significant differences between groups at P<0.05 by Duncan's multiple comparison test.

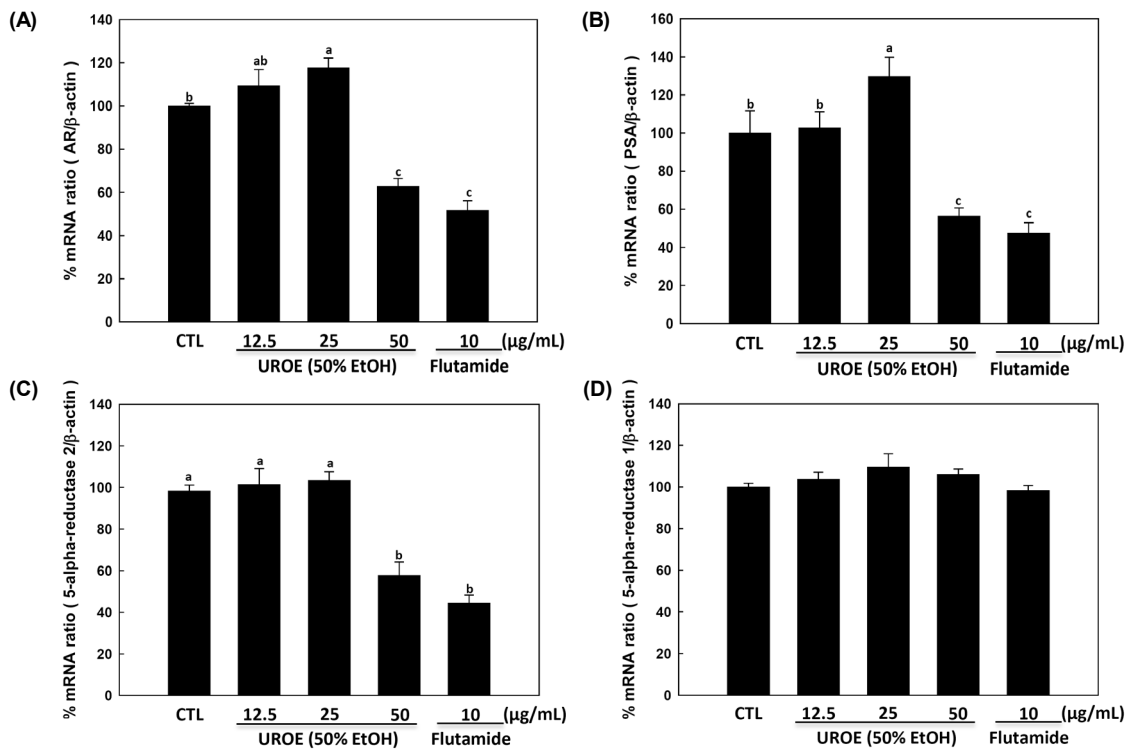


Fig. 2. Effect of *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) on expression of AR, PSA, 5AR2, and 5AR1 mRNA in LNCaP prostate cancer cell line. CTL, control; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=3). ^{a-c}Means indicates significant differences between groups at P<0.05 by Duncan's multiple comparison test.

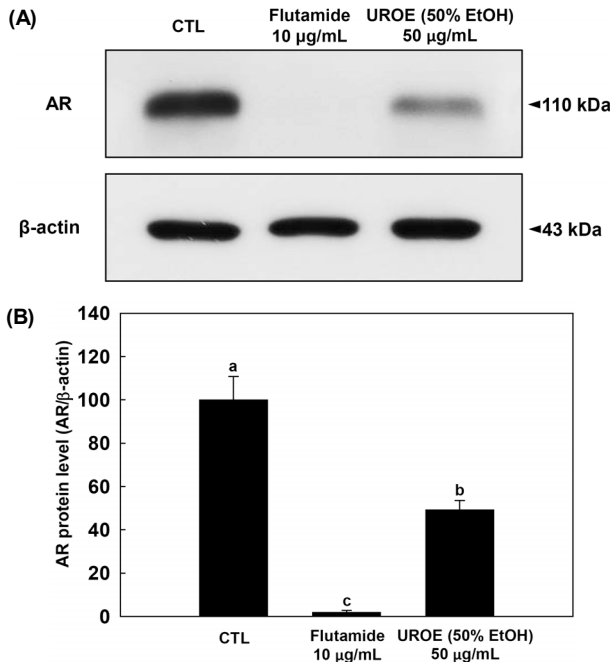


Fig. 3. Effects of flutamide and unripe *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) on expression of AR protein in LNCaP prostate cancer cell line. CTL, control; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=3). ^{a-c}Means indicates significant differences between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

때 중용량 및 고용량 급이군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으나 두 그룹 간 차이는 없었다(Fig. 5)($P<0.05$).

Kim 등(23)은 전립선비대 동물모델을 이용하여 복분자, 산수유 및 토사자 복합 추출물의 전립선비대 개선 효과를 확인한 결과, 복합추출물에 의해 전립선 무게가 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

전립선의 조직병리학적 변화

전립선비대는 전립선 소포(acina)의 상피세포가 두꺼워

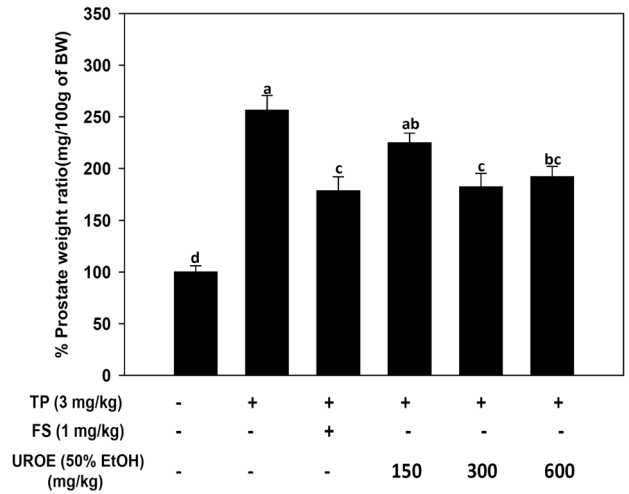


Fig. 5. Effects of unripe *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) on prostate weight ratio in BPH-induced rat model by testosterone for 6 weeks. Data are plotted as mean±SE (n=6). TP, testosterone propionate; FS, finasteride; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=6). ^{a-d}Means indicates significant differences between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

지며, 전립선 소포의 면적이 증가하는 병리학적 변화를 나타낸다(15,16). 전립선 조직의 병리학적 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 정상 대조군의 상피세포 두께의 평균값은 14.8±3.19 μm이었고, 테스토스테론 투여군의 평균값은 72.0±7.18 μm로 유의하게 크기가 증가된 것을 확인할 수 있었다($P<0.05$). 양성 대조군인 finasteride 투여군의 상피세포 두께의 평균값은 37.0±5.59 μm로 테스토스테론 투여군과 비교하여 현저한 감소를 보였고, 복분자 미숙과 추출물 저용량 급이군은 38.2±4.02 μm, 중용량 급이군은 37.7±3.98 μm, 고용량 급이군은 26.7±2.80 μm로 측정되었다. 세 그룹 모두 테스토스테론 투여군과 비교하여 상피세포의 두께가 유의하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 6A, 6C)($P<0.05$).

정상 대조군의 소포 면적의 평균값은 1,756.2±460.79

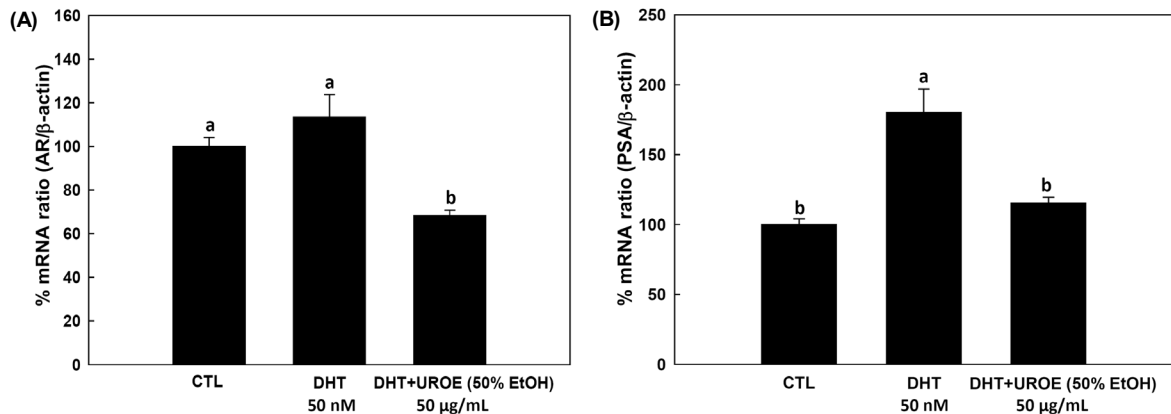


Fig. 4. Effects of unripe *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) on DHT-induced mRNA of AR and PSA. CTL, control; DHT, dihydrotestosterone; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=3). ^{a,b}Means indicates significant differences between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

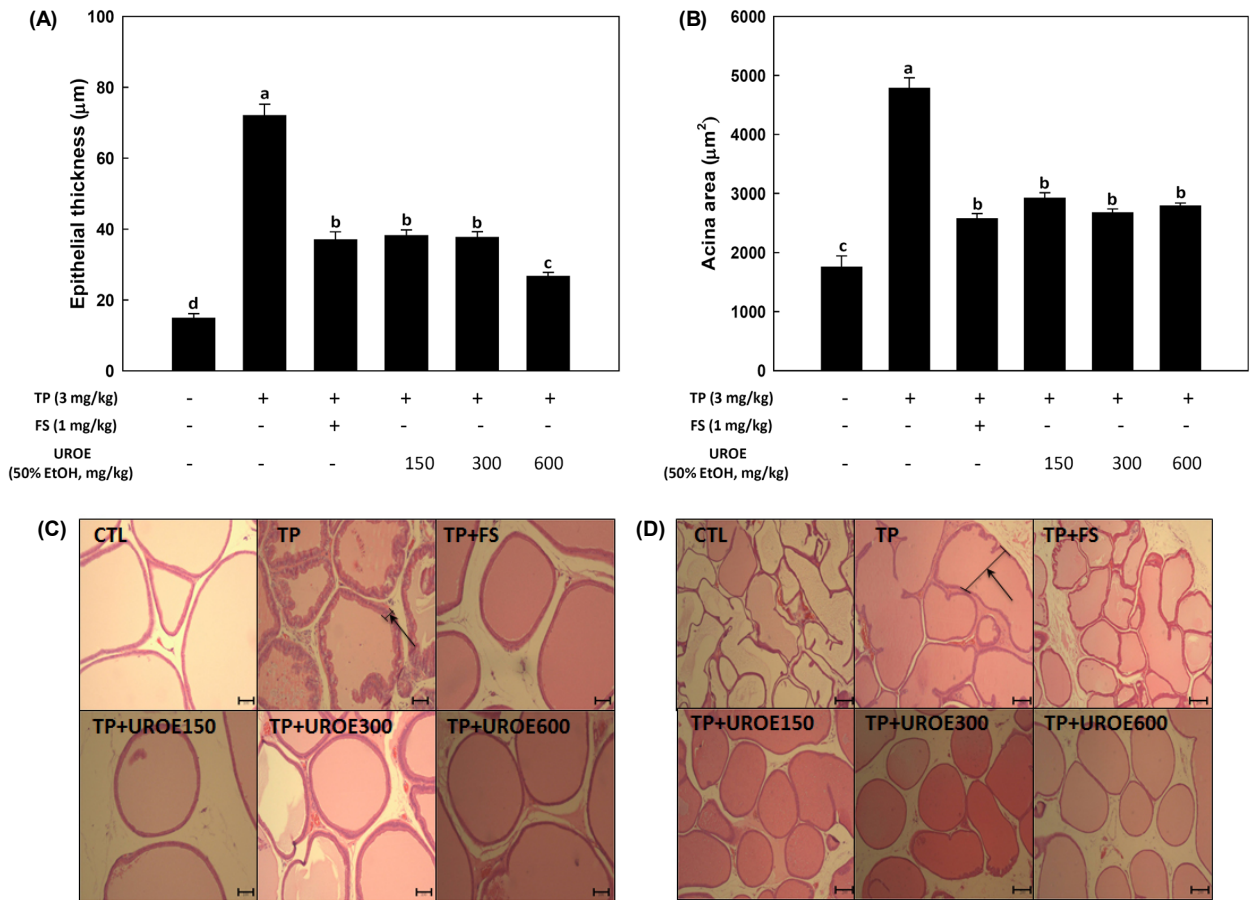


Fig. 6. Effects of unripe *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) on prostate epithelial thickness (A, C) and acina area (B, D) in BPH-induced rat model by testosterone for 6 weeks. Histological examination of prostate tissues were fixed, sectioned at 4 µm thickness and stained with H&E solution. Arrow: epithelial thickness and acina area. Scale bar=100 µM. CTL, control; TP, testosterone propionate; FS, finasteride; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean±SE (n=6). ^{a-d}Means indicates significant differences between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

µm²였다. 반면 테스토스테론 투여군의 소포 면적의 평균값은 4,783.8±388.96 µm²로 소포의 면적이 2.7배 증가되었고($P<0.05$), 양성 대조군인 finasteride 투여군은 2,577.2±212.16 µm²로 테스토스테론 투여군과 비교하여 소포 면적이 눈에 띄게 감소하였다. 복분자 미숙과 추출물 저용량 급이군은 2,919.5±222.26 µm², 중용량 급이군은 2,677.8±153.13 µm², 고용량 급이군은 2,794.3±114.83 µm²로 테스토스테론 투여군과 비교했을 때 유의한 감소 효과를 확인할 수 있었고 복분자 추출물 그룹 간의 차이는 보이지 않았다(Fig. 6B, 6D)($P<0.05$). 복분자를 주성분으로 산수유, 토사자를 배합한 생약제제를 이용하여 전립선비대 유발 쥐에서 효능을 확인한 결과, 전립선비대 유발군에서는 전립선 상피세포가 불규칙하게 배열되어 gland 및 간질세포가 과대하게 발달되어 있었으나 복합추출물을 투여한 군에서는 전립선의 증식과 gland의 발달이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(23).

혈청에서 DHT의 변화

테스토스테론 투여군 90.7±1.4 ng/mL와 비교하였을 때, 복분자 미숙과 추출물 저용량, 중용량, 고용량 급이군에서는 각각 79.4±5.1, 65.7±6.8, 63.4±4.5 ng/mL로 중용량과 고용량 급이군에서 혈청 DHT의 유의적인 감소 효과를 나타내었다. 양성 대조군인 finasteride군에서도 54.9±8.9 ng/mL로 테스토스테론 투여군에 비해 혈청 DHT의 양이 눈에 띄게 감소된 것을 확인하였다(Fig. 7)($P<0.05$). 지금까지 보고된 연구 결과에 의하면 전립선암이나 전립선비대증의 발생에는 DHT 농도가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1). Finasteride는 주로 5AR의 활성 억제를 통해 전립선과 혈청에서의 테스토스테론으로부터 DHT로의 전환을 감소시키는 약물로 알려져 있다(24).

복분자 미숙과에 다량 함유된 폴리페놀 성분이 DHT의 합성을 돕는 5AR을 억제시킨다는 보고(20)와 본 연구 결과를 토대로 복분자 미숙과 추출물이 DHT 농도를 낮추는 기작에 대해서 복분자 성분에 의해 테스토스테론으로부터 DHT를 생성하는 효소인 5AR의 활성이 억제되어 혈중 DHT

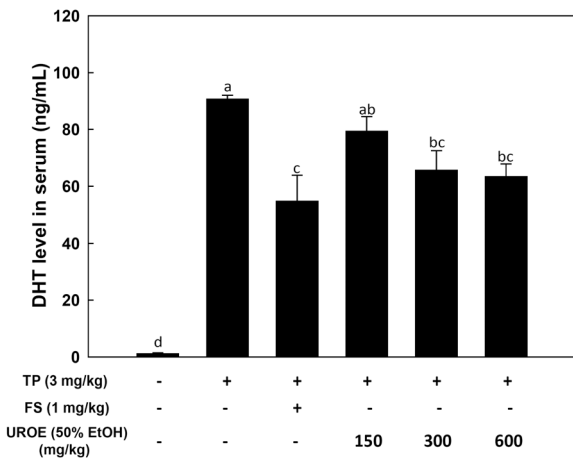


Fig. 7. DHT levels in the plasma after unripe *Rubus occidentalis* extract (50% EtOH) treatment in the rat model of BPH using testosterone. TP, testosterone propionate; FS, finasteride; UROE, unripe *Rubus occidentalis* extract. Data shown in graphs are the mean \pm SE (n=6). ^{a-d}Means indicates significant differences between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

농도가 낮아지는 것을 가정할 수 있다. 결과적으로 복분자 미숙과에는 5AR을 저해하는 성분이 존재하는 것으로 추정된다. 또한 Bisson 등(25)은 cocoa의 폴리페놀 성분이 혈청 내의 DHT의 level과 전립선비대를 감소시킨다고 보고하였고, 녹차의 폴리페놀 성분인 EGCG 성분이 athymic nude mice 혈청에서 PSA level을 낮춘다는 연구 결과가 보고된 바 있다. 그 외에 복분자는 triterpenoid 화합물을 많이 함유하고 있다고 알려져 있는데(12), triterpenoid 화합물 중의 하나인 ursolic acid가 전립선비대 동물모델에서 혈청 DHT와 테스토스테론의 level을 감소시킨다고 보고되었다(15). 복분자는 폴리페놀 이외에 전립선비대 개선에 좋다고 알려진 무기질(아연, 마그네슘, 셀레늄 등), 비타민, 아미노산 등이 많이 함유되어 있다(26). 이러한 선행 연구내용과 본 연구 결과들을 종합해 볼 때 복분자의 주성분인 폴리페놀 성분과 무기질 및 미네랄 등 다양한 생리활성 물질들이 복합적으로 작용하여 전립선비대 개선 효과를 나타내는 것으로 생각되어진다.

요 약

본 연구는 전립선암세포주인 LNCaP 세포주와 테스토스테론으로 유도된 전립선비대 백서모델에서 복분자 추출물의 전립선비대 억제 효과를 조사하였다. 첫째, 전립선암 세포주(LNCaP)에서 복분자 미숙과 추출물의 안드로겐 관련 전립선비대 유전자 억제 효과를 조사한 결과 미숙과 50% 에탄올 추출물은 안드로겐 수용체(AR)뿐만 아니라 전립선특이항원(PSA)과 5-알파 환원 효소 type 2(5AR2)의 발현을 가장 높게 억제하였다. 또한 LNCaP 세포에 DHT로 안드로겐 관련 유전자를 유도한 후 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물을 처리한 결과 AR과 PSA mRNA의 발현이 억제됨을 확인하

였다. 둘째, 테스토스테론을 이용하여 전립선비대를 유도한 동물모델에서 복분자 미숙과 50% 에탄올 추출물을 6주간 투여한 후 전립선비대 개선 효과를 조사한 결과, 전립선비대 유발군에 복분자 미숙과 추출물을 투여한 군에서 전립선 무게, 전립선 소포의 상피세포 두께 및 면적이 감소함을 확인할 수 있었고, 전립선비대 유발 호르몬인 DHT level이 감소함을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Carson C 3rd, Rittmaster R. 2003. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61: 2-7.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. 1993. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92: 903-910.
- Asada Y, Sonoda T, Ojio M, Kurata S, Sato T, Ezaki T, Takayasu S. 2001. 5alpha-reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2875-2880.
- Steers WD. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 58: 17-24.
- Nixon P. 1997. New clinical trial of medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Drug Benefit Trends* 9: 44-45.
- Lazier CB, Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Rittmaster RS. 2004. Dutasteride, the dual 5alpha-reductase inhibitor, inhibits androgen action and promotes cell death in the LNCaP prostate cancer cell line. *Prostate* 58: 130-144.
- Angwafor F 3rd, Anderson ML. 2008. An open label, dose response study to determine the effect of a dietary supplement on dihydrotestosterone, testosterone and estradiol levels in healthy males. *J Int Soc Sports Nutr* 5: 12.
- Dreikorn K. 2005. Complementary and alternative medicine in urology. *BJU Int* 96: 1177-1184.
- Fagelman E, Lowe FC. 2002. Herbal medications in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). *Urol Clin North Am* 29: 23-29.
- Ahn DK. 1998. *Illustrated book of Korea medicinal herbs*. Kyohak Publishing Co, Seoul, Korea. p 946-947.
- Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Beliveau R. 2007. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Res* 27: 937-948.
- Seeram NP. 2008. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J Agric Food Chem* 56: 630-635.
- Jeong J, Jung H, Lee S, Lee H, Hwang KT, Kim T. 2010. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem* 123: 338-344.
- Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. 1998. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett* 41: 323-332.
- 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.
- Babinski MA, Chagas MA, Costa WS, Sampaio FJ. 2003. Prostatic epithelial and luminal area in the transition zone acini: morphometric analysis in normal and hyperplastic hu-

- man prostate. *BJU Int* 92: 592-596.
17. Scheinfeld NA. 2008. review of hormonal therapy for female pattern (androgenic) alopecia. *Dermatol Online J* 14: 1.
 18. Kim JM, Shin MS. 2011. Characteristics of *Rubus coreanus* Miq. fruits at different ripening stages. *Korean J Food Sci Technol* 43: 341-347.
 19. Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR, Song JY. 2011. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19: 325-333.
 20. Richard A, Hiipakka RA, Zhong HZ, Dai W, Dai Q, Liao S. 2002. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol* 63: 1165-1176.
 21. Ren F, Zhang S, Mitchell SH, Butler R, Young CY. 2000. Tea polyphenols down-regulate the expression of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Oncogene* 19: 1924-1932.
 22. Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H. 2011. Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *FASEB J* 25: 1198-1207.
 23. Kim SD, Lee BH, Sohn DW, Cho YH, Lee SM, Kim JO, Lim SW. 2008. The effect of herbal formulation KH-305 mainly consisted of *Rubus coreanus* on benign prostatic hyperplasia-induced rat. *Kor J Pharmacogn* 39: 80-85.
 24. Peters DH, Sorkin EM. 1993. Finasteride. A review of its potential in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drugs* 46: 177-208.
 25. 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.
 26. Aleksandra K, Katarina S, Gordana Z, Teodora J, Zorica J, Nebojsa M, Ivan S. 2011. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chem* 125: 1412-1417.