

땅콩나물 추출물이 남성갱년기 증상에 미치는 영향

성혜미^{1,2} · 위지향¹ · 정현정¹ · 김윤희³ · 문주명³ · 전우진²

¹(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

²전남대학교 식품영양과학부

³(주)비티씨

Effects of Peanut Sprout (*Arachis hypogaea* L.) Extract on Partial Androgen Deficiency in Aging Males (PADAM)

Heami Sung^{1,2}, Ji-Hyang Wee¹, Hyun Jung Jung¹, Yoon Hee Kim³,
Joo Myeng Moon³, and Woojin Jun²

¹Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

²Division of Food and Nutrition, Chonnam National University

³BTC Corporation Ltd.

ABSTRACT We investigated the effect of peanut sprout extract (PSE) on andropause symptoms. PSE was evaluated for impotency and benign prostatic hyperplasia via phosphodiesterase (PDE) or 5-alpha reductase II inhibition assay. Inhibition of PDE and 5-alpha reductase II activities in PSE was significantly higher than that of the non-treated control. To investigate the effects of testosterone levels by PSE, we performed cell media test using TM3 cells. Production of testosterone in TM3 cells was elevated by PSE. These results indicate that PSE was able to alleviate andropause symptoms.

Key words: peanut sprout, 5-alpha reductase, testosterone, benign prostatic hyperplasia

서 론

남성갱년기는 노화 과정에서 보이는 신체기능의 감소로 남성의 40대 중후반 이후로 점진적으로 나타난다. 갱년기 증상의 원인은 주로 남성호르몬의 감소이며 남성들의 노화에 따른 신체적, 생리적 변화들과 환경 및 사회적인 스트레스이다(1,2). 노화로 인한 증상들은 생식능력, 성욕, 성기능 등의 감소, 인지기능 저하, 기억력 장애 등이 있으며 그중 남성갱년기와 관련된 증상은 전립선 비대증, 전립선암, 성기능 장애 증상과 같은 남성호르몬 질환이 증가하고 있다(2,3). 남성갱년기는 여성과는 달리 나이가 들면서 서서히 호르몬이 감소하며 일정 수준의 호르몬을 분비 및 유지하기 때문에 여성 갱년기처럼 증상이 뚜렷하거나 모든 사람에서 나타나는 것은 아니다. 그래서 남성갱년기를 partial androgen deficiency in aging male(PADAM)이라고 부른다(4).

남성갱년기 증상으로 나타나는 질환 중 전립선 비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)은 남성의 요도를 둘러싸고 있는 전립선이 내분비계의 장애에 의해 비대해지면

서 요도를 압박하여 빈뇨, 잔뇨감, 절박뇨, 지연뇨 등의 불편한 증상을 나타내는 질병으로 일상 활동에 방해가 된다(5). 전립선 비대증의 발생 과정은 testosterone이 혈액 속에서 전립선 조직으로 유입되고 5-alpha reductase의 작용으로 dihydrotestosterone(DHT)으로 전환되어 이것이 전립선 세포 내의 수용체와 결합하여 전립선이 커짐과 동시에 증식된다고 알려져 있다(6). 또한, 전립선의 염증이 BPH를 유발시킨다고 알려져 있다(7). 전립선 염증에 대한 보고로는 전립선 비대 환자 조직에서 tumor necrosis factor(TNF)- α , 염증성 사이토카인 및 nuclear factor(NF)- κ B가 활성화된다는 연구(8), 전립선 비대증 유발 동물에서 염증 인자인 TNF- α , interleukin(IL)-1 β , IL-6, cyclooxygenase-2(COX-2) 및 NF- κ B를 활성화시킨다는 연구가 있다(9). 전립선 비대증의 치료제로 잘 알려진 finasteride, dutasteride는 현재 약물 치료제로 널리 사용되고 있는데 이는 발기부전, 성욕감소 및 사정장애와 같은 부작용을 초래하는 것으로 나타나(10) 부작용이 나타나지 않는 천연물을 이용한 치료제 개발 요구가 높은 상황이다.

남성갱년기의 대표적인 증상인 성기능 장애는 성욕감퇴, 발기기능 장애 및 조루증 등을 포함한 성생활과 관련된 모든 장애를 말하며 이러한 증상은 당뇨병, 고혈압, 심장질환, 고지혈증 및 비만과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(11).

Received 22 July 2016; Accepted 5 September 2016

Corresponding author: Woojin Jun, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
E-mail: wjjun@chonnam.ac.kr, Phone: +82-62-530-1337

12). 전립선 비대증 치료제의 부작용으로도 나타나는 발기 기능 장애는 음경발기 검사를 시행하여 판단하는데 음경의 발기는 중추신경계, 말초신경계 및 평활근 등의 상호작용으로 인해 발생한다. 상호작용의 시작인 산화질소(nitric oxide, NO)는 평활근에서 아세틸콜린의 분비와 음경해면체에서 방출되어 guanylate cyclase 효소를 활성화시킨다. 활성화된 guanylate cyclase가 평활근세포 내의 삼인산 구아노신(GTP)이 환식 일산 구아노신(cGMP)으로 전환되고 cGMP는 Ca^{++} 을 세포 밖으로 내보내 평활근세포를 이완시키는데 이 이완된 평활근세포의 현상을 발기라 부른다. 발기를 발생 및 지속시키는 과정에서 cGMP는 phosphodiesterase(PDE)에 의해 분해되므로 그 활성이 억제되어야 cGMP의 농도가 증가되어 발기능이 향상된다(13). 발기부전 증상을 극복하기 위한 약물로는 finasterid, sildenafil이 대표적으로 사용되고 있으나 이는 소화불량, 두통, 심장마비 유발과 같은 부작용을 초래하는 것으로 나타나(14,15) 천연물을 이용한 치료제가 개발되어야 하는 상황이다.

땅콩은 콩과에 속하는 일년생의 초본식물로 우리나라에서 식용으로 널리 사용되어 왔다(16). 땅콩의 대표적인 기능성 물질로는 항산화, 신경세포 보호 효과, 유방암 세포 성장 억제능, 항비만 활성이 있는 것으로 알려진 resveratrol(17)이 있으며, 심혈관계 질환 예방 및 미백 효능이 있는 지방산 성분들도 함유되어 있다(18). 한편 땅콩은 새싹채소인 땅콩나물로 성장하면서 resveratrol 성분 증가 및 항산화 효과 증가(19), 영양성분 증가(20)에 대해 보고되는 등 가공법 및 추출법을 달리하여 땅콩 및 땅콩나물의 기능성을 증진하기 위한 연구가 계속되고 있다.

이상과 같이 땅콩나물에 대해 여러 가지 생리활성 기능이 보고되고 있으나 땅콩나물의 중요한 기능성 물질인 resveratrol이 효능을 나타내는 전립선 비대 억제에 대한 연구는 이루어진 바가 없다. 또한, 땅콩나물의 높은 항산화 활성은 전립선 비대증 치료제의 부작용으로 알려진 발기부전과 같은 성기능 장애 개선에도 효과를 나타낼 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 땅콩나물 추출물을 대상으로 남성갱년기 관련 증상인 전립선 비대증과 발기부전에 대해 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 PDE 저해 효과, 5- α reductase 저해 효과를 확인하였다. 또한, LNCaP 세포에서 전립선 비대증 유전자 발현, RAW264.7 세포에서의 NO 함량 및 TM3 세포에서 testosterone 함량을 확인하여 땅콩나물이 어떤 형태로 전립선 비대와 발기능에 영향을 미치는지 보다 정확히 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물의 제조

본 연구에서 사용된 땅콩(*Arachis hypogaea* L.)은 항온기 안에서 실온으로 7일 동안 발아시켜 건조된 땅콩나물을 시장에서 구입하여 사용하였다. 땅콩나물의 추출물은 땅콩

나물 시료에 약 20배수의 증류수를 가하여 90°C에서 6시간 동안(COSMOS-660, Kyungseo Mashibe Co., Incheon, Korea) 추출하였다. 추출한 용액은 65°C까지 냉각한 다음 부직포를 사용하여 여과하고 여액을 58°C에서 감압 농축한 후 동결건조기(Ilshin Lab, Seoul, Korea)를 이용하여 건조 후 분말의 무게를 측정하고 이를 -70°C에 냉동 보관하면서 사용하였다.

Resveratrol 함량 분석

Resveratrol 함량 분석은 땅콩나물 추출물 8.3 g에 아세토니트릴 10 mL를 첨가한 후 초음파 진탕기로 15분간 추출하여 얻은 추출액에 QuEChERS extract kit(Agilent, Richardson, TX, USA) 6.5 g을 넣고 혼합하였다. 1.510×g에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 여과한 후 분석액으로 하여 HPLC 분석을 시행하였다. 분석은 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질인 resveratrol(순도: 99.8% 이상)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 10 mg을 취하여 메탄올 50 mL로 용해하여 저장용액으로 사용하였다.

시약

세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, phosphate buffered saline(PBS) 및 antibiotics는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, XTT-phenazine methosulfate(PMS)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. Testosterone EIA kit, Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase assay kit은 Enzo Life Sciences(Lausen, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Operating condition for the analysis of resveratrol

Item	Condition		
Instrument	Agilent Technologies Infinity 1260		
Detector	UV DAD detector (308 nm)		
Column	Poroshell 120 EC-C18 (4.6×50 mm, 2.7 μ m)		
Column temperature	45°C		
Injection volume	5 μ L		
Flow rate	1.0 mL/min		
Run time	20 min		
	A: H ₂ O in 0.1% acetic acid B: Methanol		
	min	A (%)	B (%)
	0	85	15
Mobile phase	10	40	60
	10.5	0	100
	15	0	100
	15.5	85	15
	20	85	15

세포배양

본 실험에 이용한 TM3 세포는 leydig cell로 한국세포주은행(KCLB NO. 21714, Seoul, Korea)에서 구입하였다. RAW264.7 세포는 macrophage cell로 한국세포주은행(KCLB NO. 40071)에서 구입하였다. TM3 및 RAW264.7 세포 배양은 10% FBS와 0.5%(V/V)의 antibiotics(100 U/mL of penicillin A and 100 U/mL of streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다.

PDE 저해 효과 측정

PDE 저해 효과는 cyclic nucleotide phosphodiesterase assay kit을 이용하여 측정하였다. 3,5-cGMP를 기질(20 µL)로 하여 PDE(4 mU/µL) 5 µL와 땅콩나물 추출물 10 µL를 첨가하여 반응시킨 다음 5-nucleotidase 10 µL로 처리하고 혼합하였다. BIOMOL GREEN reagent 100 µL를 처리하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5-GMP는 표준곡선을 사용하여 PDE inhibition(%)으로 나타내었다.

5-Alpha reductase II 활성 측정

5-Alpha reductase II(5AR2) 활성 측정은 human 3-oxo-5-alpha-steroid 4 dehydrogenase 2 ELISA kit (Cusabio, Biotech Co., Ltd., Hubei, China)을 사용하여 측정하였다. Male Sprague Dawley rat(350~400 g)의 전립선을 적출한 후 생리식염수로 1회 세척하고 4배의 phosphate buffer(pH 7.4, Life Technologies, New York, NY, USA)를 넣어 균질화하였다. 전립선의 균질화는 VibraCell (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA)로 실시하였다. 균질액은 4°C, 2,450×g에서 5분간 원심분리(Micro 17 TR, Hanil, Seoul, Korea) 하여 상등액만을 취하여 실험에 사용하였다. 단백질량은 Bradford assay를 이용하여 계산하였다. 상등액 200 µg, 땅콩나물 추출물, testosterone (TCI, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 2 nM 처리하여 1시간 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 반응액은 ELISA kit의 방법에 따라 시험을 시행 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성

TM3 및 RAW264.7 세포에 대한 땅콩나물 추출물의 세포독성은 XTT assay(21)로 측정하였다. TM3 세포는 48 well plate에 5×10⁴ cell/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 추출물을 0~400 µg/mL 농도로 2일 동안 처리하였다. RAW264.7 세포는 48 well plate에 5×10⁴ cell/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 추출물을 0~400 µg/mL 농도로 4일 동안 처리하였다. TM3 및 RAW264.7 세포는 추출물 처리 후 배지를 제거 및 PBS로 세척하고 XTT-PMS 용액(1 mg XTT-10 µg

PMS/mL) 250 µL를 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실시간 종합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction)

RAW264.7 세포에서 염증 유전자 발현 측정은 종합효소 연쇄반응을 사용하여 측정하였다. RAW264.7 세포는 1×10⁴ cells/well에 분주하여 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 0.5 µg/mL lipopolysaccharide(LPS)와 추출물(추출물 처리 농도 12.5, 25, 50 µg/mL)이 함유된 배양액을 분주하고 4일 동안 배양하였다. 배양액 제거 후 각 dish에 1 mL의 PBS 용액을 넣어 세척하고 TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 0.2 mL를 넣어 RNA를 추출하였다. 추출한 1 µg의 RNA에 reverse transcriptase master mix kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 혼합하여 42°C에서 50분, 70°C에서 15분씩 반응시켜 cDNA를 제조하였다. 제조한 cDNA 100 ng에 Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen)을 이용하여 염증 관련 유전자인 IL-1β, COX-2, IL-6 및 inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 실시간 종합효소 연쇄반응 기기로 확인하였다. 실험에 사용한 primer의 sequence는 IL-1β(S-5'TTCGACACATGGGATAACGA-3'AS-5'TCTTTCAACACGCAGGACAG-3'), COX-2(S-5'TGCTGTGGAGCTGTATCCTG-3'AS-5'CGGGAAGAAGTTCC-3'AS-5'TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3), iNOS(S-5'CTCACTGGGACTGCACAGAA-3'AS-5'GCTTGTCTCTGGGTCTCTG-3)와 같다.

NO 함량 및 측정

RAW264.7 세포를 48 wells plate에 1×10⁴ cells/well의 세포를 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 0.5 µg/mL LPS와 추출물이 함유된 배양액을 분주하고 3일 동안 배양하였다. NO의 양을 측정하기 위하여 배양액 50 µL와 Griess reagent[1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in water] 50 µL를 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 함량은 NaNO₂ 표준곡선을 사용하여 측정하였다.

TM3 세포에서 세포보호능 및 testosterone 함량 측정

TM3 세포보호능 측정(21)은 과산화수소로 TM3 세포에 산화적 스트레스를 주어 추출물의 보호 효과를 측정하였다. TM3 세포는 48 wells plate에 1×10⁵ cells/well의 세포를 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 추출물이 용해된 serum이 3% 함유된 배지 0.5 mL를 분주하고 24시간 배양하였다. 배양액 제거 후 0.3 mM의 과산화수소와 추출물 및 resveratrol이 함유된 배양액을 분주하고 24시간

동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 각 well에 0.125 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of MEM without phenol red)을 첨가하고 2시간 동안 반응 후 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TM3 세포 내 testosterone 함량은 TM3 세포 배양액으로 측정하였다. TM3 세포는 48 wells plate에 1×10^5 cells/well의 세포를 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 추출물 및 resveratrol이 용해된 배지 0.5 mL를 분주하고 3일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지는 assay kit을 사용하여 testosterone 함량을 측정하였다. 배지 100 μ L를 goat anti-mouse IgG microtiter plate에 옮긴 다음 testosterone EIA antibody 50 μ L를 첨가하여 1시간 배양하고 conjugate 50 μ L를 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 washing solution으로 세척하였다. 각각에 pNpp substrate solution 200 μ L를 첨가하여 1시간 동안 반응한 후 stop solution 50 μ L를 넣어 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 testosterone 표준 곡선을 이용하여 함량을 계산하였다.

통계처리

본 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며 실험군 간 결과 비교 및 유의성 검정은 Student's *t*-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리 한 후 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

땅콩나물 추출물의 resveratrol 함량

땅콩나물을 열수로 추출하였을 때 얻어지는 분말의 수율은 약 32.6%이며 땅콩나물 추출물 분말에는 resveratrol이 7.16 μ g/g으로 확인되었다(Fig. 1). Kang 등(20)에 의하면 땅콩의 품종별 resveratrol 함량은 1.1~1.4 μ g/g으로 함유되어 있다고 하였는데, 본 연구에서 사용한 땅콩나물 추출물은 땅콩을 일정 기간 발아시킨 땅콩나물을 사용했기 때문에 resveratrol 함량이 발아과정에서 증가하여 땅콩보다 높은 함량을 보인 것으로 판단된다.

땅콩나물 추출물의 PDE 활성 억제 효과

음경이 발기할 때 cGMP는 혈관을 확장시키는 역할을 하는데 이것은 PDE에 의해 분해된다. 따라서 PDE의 활성을 억제하여 cGMP의 농도가 증가해야 발기능이 향상된다고 알려져 있다(13,14). 이에 땅콩나물 추출물의 PDE 억제능을 측정하였으며 positive control로 resveratrol을 사용하여 활성을 비교해 보았다. 땅콩나물 추출물을 각각 1.5, 3, 6, 12.5, 25 μ g/mL 처리하였을 때 PDE의 저해율이 4.1%, 12.8%, 30.3%, 71.1%, 124.8%로 농도 의존적으로 증가하

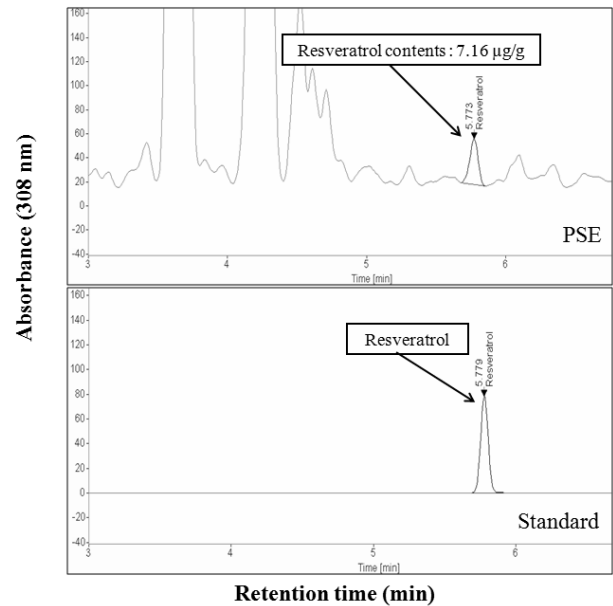


Fig. 1. HPLC chromatograms of peanut sprout (*Arachis hypogaea* L.) extract. Standard: standard of resveratrol, PSE: peanut sprout extract.

였다(Fig. 2). PDE 활성을 50% 저해하는 땅콩나물 추출물의 inhibition concentration(IC₅₀) 값은 9.3 μ g/mL 농도로 확인되었으며 resveratrol의 IC₅₀ 값은 23 ng/mL로 확인되었다. 이런 결과는 resveratrol이 PDE의 활성을 억제시켜 NO의 방출 증가 및 cGMP를 활성화시켜 발기능을 증가시킨다는 Fukuhara 등(22)의 연구와도 일치한다. 따라서 땅콩나물 추출물에 포함된 resveratrol 물질의 PDE 억제능 효과 때문에 땅콩나물의 PDE 억제능을 증가시킨 것으로 판단된다.

TM3 세포에서 세포보호능 및 testosterone 함량

땅콩나물 추출물이 산화적 스트레스에 대한 방어 효과와 testosterone 생산이 저하되어 나타나는 증상을 완화할 수 있는지를 알아보기 위해 TM3 세포에서 과산화수소에 대한

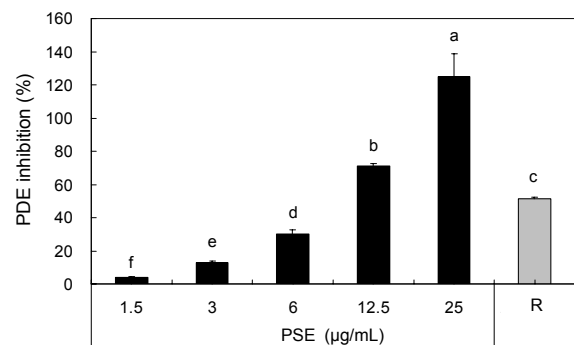


Fig. 2. Phosphodiesterase (PDE) inhibition of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract. PSE: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract, R: resveratrol 23 ng/mL. Data are presented as the mean±SD. Different letters show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

세포보호능과 testosterone 함량에 어떤 영향을 미치는지 평가하였다. TM3 세포에서 땅콩나물 추출물의 세포 독성을 확인한 결과(Fig. 3A) 200 µg/mL 농도부터 독성을 보여 독성을 보이지 않는 농도인 100 µg/mL 이하로 시험을 시행하였다. TM3 세포에 0.3 mM 과산화수소를 처리하여 산화적 스트레스를 유도시킨 후 땅콩나물 추출물의 세포보호능을 측정하였다(Fig. 3B). 땅콩나물 추출물의 처리 농도는 5, 10, 25, 50 µg/mL로 처리하였으며 resveratrol은 50 ng/mL로 처리하였다. 그 결과 과산화수소만 처리한 군은 무처리군(100%)보다 세포생존율(55%)이 유의적으로 감소하였다. 반면 땅콩나물 추출물 5 µg/mL(76%), 10 µg/mL(82%), 25 µg/mL(87%), 50 µg/mL(88%) 처리군에서는 과산화수소만 처리한 군에 비해 유의적으로 높은 세포보호능을 나타내었다. 또한, 5, 10, 25 µg/mL 처리군에서는 과산화수소만 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 세포보호능을 유의적으로 증가시켰으며 resveratrol 50 ng/mL 처리군과 유사한 세포보호능이 있는 것으로 나타났다.

TM3 세포 내 testosterone 함량은 TM3 세포에 땅콩나물 추출물을 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도 및 resveratrol 50 ng/mL 농도로 처리하고 3일 동안 배양시킨 후 세포에서 배양액에 분비된 testosterone 함량을 측정하였다(Fig. 3C). 그 결과 배양액만 처리한 무처리군에서 testosterone 함량은 90 pg/mL인 반면에 땅콩나물 추출물 5 µg/mL(138 pg/mL), 10 µg/mL(328 pg/mL), 25 µg/mL(376 pg/mL), 50 µg/mL(474 pg/mL) 처리군에서는 무처리군에 비해 유의적으로 testosterone 함량이 증가하였으며 모든 농도 처리군에서 농도 의존적으로 testosterone 함량이 유의적으로 증

가하였다. 또한, 25 µg/mL(376 pg/mL) 처리군에서는 resveratrol 50 ng/mL(361 pg/mL) 처리군과 유사한 testosterone 함량을 보였다.

TM3 세포는 고환의 간질에서 콜레스테롤을 testosterone으로 합성하는 세포로 활성산소의 자극에 의해 testosterone 감소 및 세포생존율이 감소한다. 이런 testosterone 및 세포생존율 감소는 발기능 저하로 이어진다(23,24). 땅콩나물 추출물 및 resveratrol은 과산화수소에 의한 TM3 세포의 산화적 스트레스에 대해 세포 내 호르몬의 합성을 증가시키기 때문에 세포 내 testosterone 함량을 증가시키는 결과가 나타났다고 판단된다. 이런 결과는 산화적 스트레스로 유도된 세포 손상 및 testosterone 수치 감소가 추출물 처리 시에 개선(21,24)되었으며 추출물 및 resveratrol이 고환 내 세포의 산화적 스트레스를 억제시켜 세포 내 호르몬 합성이 증가된다(25)는 연구와 일치한다. 따라서 땅콩나물 추출물에 포함된 resveratrol 물질이 세포의 산화적 스트레스를 감소시킨 것으로 생각되며 finasteride를 복용했을 때 나타나는 발기부전과 같은 부작용과 testosterone 함량 감소로 나타나는 증상을 완화할 수 있을 것이라 판단된다.

땅콩나물 추출물의 5AR2 저해 효과

5AR2는 주로 전립선에 분포하여 활성을 보이며 정상적인 전립선에서도 분포하고 있으나 전립선 비대의 경우 비대해진 부위에서 과발현을 보이며 남성호르몬인 testosterone을 활성형 DHT로 전환시켜 전립선 비대를 유발한다(6). 따라서 본 연구에서는 전립선 비대증을 유발시키는 효소인 5AR2 억제능을 측정하여 땅콩나물 추출물의 전립선 비대증

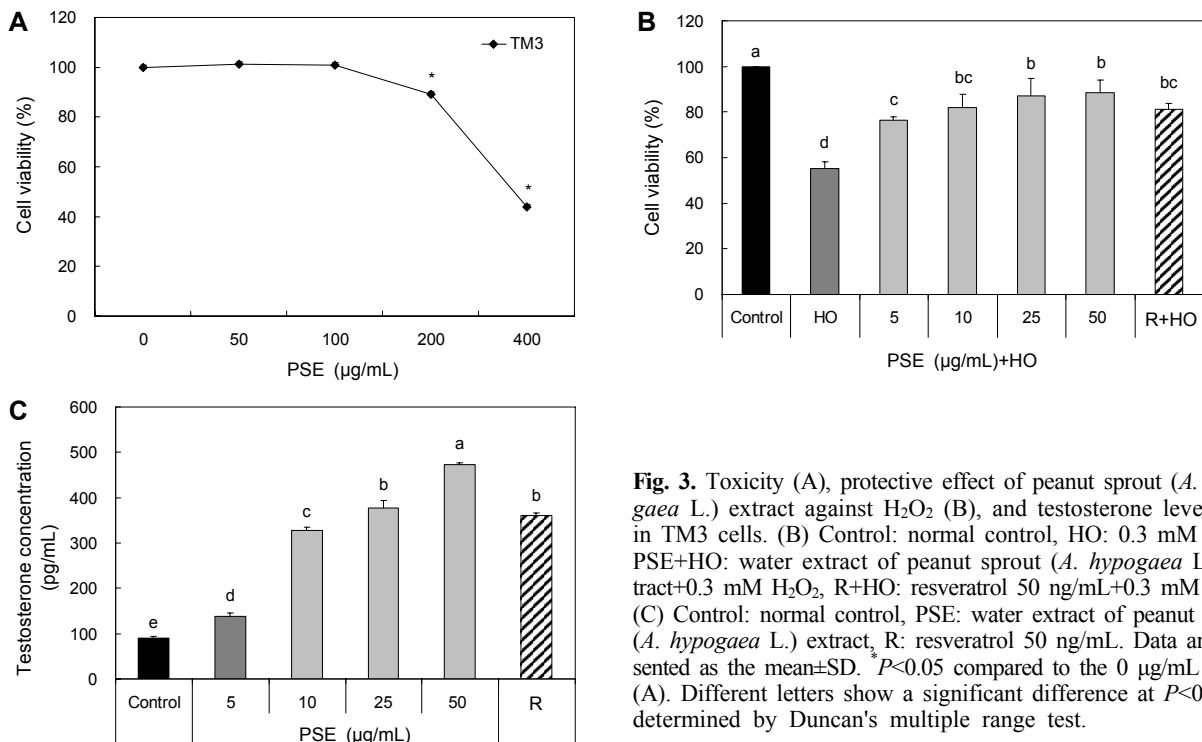


Fig. 3. Toxicity (A), protective effect of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract against H₂O₂ (B), and testosterone levels (C) in TM3 cells. (B) Control: normal control, HO: 0.3 mM H₂O₂, PSE+HO: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract+0.3 mM H₂O₂, R+HO: resveratrol 50 ng/mL+0.3 mM H₂O₂. (C) Control: normal control, PSE: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract, R: resveratrol 50 ng/mL. Data are presented as the mean±SD. *P<0.05 compared to the 0 µg/mL group (A). Different letters show a significant difference at P<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

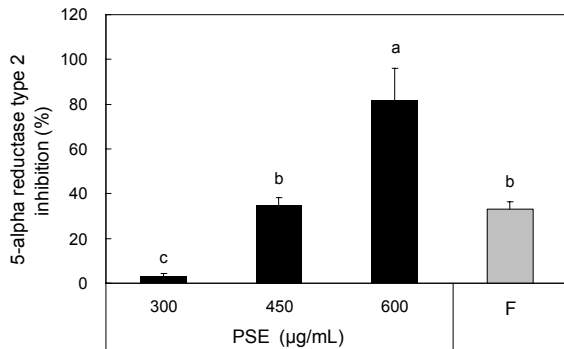


Fig. 4. 5-Alpha reductase II inhibition of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract. PSE: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract, F: finasteride 3 µg/mL. Data are presented as the mean±SD. Different letters show a significant difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

개선 효능을 평가하였다.

땅콩나물 추출물의 5AR2 저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 땅콩나물 추출물을 각각 300, 450, 600 µg/mL 처리하였을 때의 저해율이 3%, 35%, 82%로 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, 450 µg/mL 처리하였을 때는 positive control인 finasteride 3 µg/mL(33%)와 유의적으로 동등한 수준의 저해율을 보였다. 여러 연구에서 전립선 비대 유발 유전자인 5AR2의 발현을 억제하여 testosterone이 DHT로 전환되는 것을 억제하여 전립선 비대 억제 효과 나타났으며 세포 내 반응성 산소종(reactive oxygen species)과 염증 인자를 억제하여 전립선 비대 억제 효과가 증가하였다고 보고(26,27)한 것을 종합해 볼 때 땅콩나물 추출물은 5A2를 저해하였기 때문에 testosterone이 DHT로 전환되는 것을 억제하여 전립선 비대 억제 효과를 나타냈다고 판단된다. 또한, 땅콩나물 추출물에서 전립선 비대증과 염증에 대한 영향을 알아보고자 항염증능을 확인하였다.

항염증 효과

전립선 비대 시에 COX-2, TGF- α , IL 등의 염증성 사이토카인이 증가(28,29)한다고 알려져 있다. RAW264.7 세포는 염증 반응 시에 NO, TNF- α 및 IL-1 β 등의 염증성 사이토카인을 분비한다. TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인이 inducible NOS(iNOS)를 지속해서 다량 생성시키고 이렇게 생성된 iNOS로 인해 세포 내에서 NO가 합성(30)된다. 따라서 본 연구에서는 RAW264.7 세포에서 LPS로 염증반응을 유도한 후 땅콩나물 추출물을 처리하여 땅콩나물 추출물의 NO 생성 억제능을 평가하였다. 또한, NO 생성과 염증 매개물질 및 전립선 비대의 상관성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에서 LPS를 처리하여 염증을 유발시킨 후 땅콩나물 추출물이 염증유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

RAW264.7 세포에서 땅콩나물 추출물의 세포 독성을 시행한 결과(Fig. 5A) 100 µg/mL 농도부터 독성을 보여 독성을 보이지 않는 농도인 50 µg/mL 이하로 시험을 시행하였다. NO 생성 억제능을 측정하기 위해 땅콩나물 추출물의 농도는 12.5, 25, 50 µg/mL로 처리하였으며 resveratrol은 20 ng/mL로 처리하였다. 실험 결과(Fig. 5B) LPS만 처리한 군(NO 함량 35 µg/mL)은 아무것도 처리하지 않은 control 군(NO 함량 12 µg/mL)에 비하여 NO 함량이 약 3배 증가하여 유의적인 차이를 보였다. 반면 땅콩나물 추출물 25 µg/mL(NO 함량 28 µg/mL), 50 µg/mL(NO 함량 25 µg/mL) 처리군에서는 LPS만 처리한 군에 비해 NO 생성을 유의적으로 억제시켰으며 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 땅콩나물 추출물 50 µg/mL(NO 함량 25 µg/mL) 처리군은 positive control인 resveratrol 20 ng/mL(NO 함량 24 µg/mL) 처리군과 유의적인 차이 없이 NO 생성을 억제하였다. 따라서 NO 생성과 관련된 유전자 발현도의 상관관계를 확인하였다.

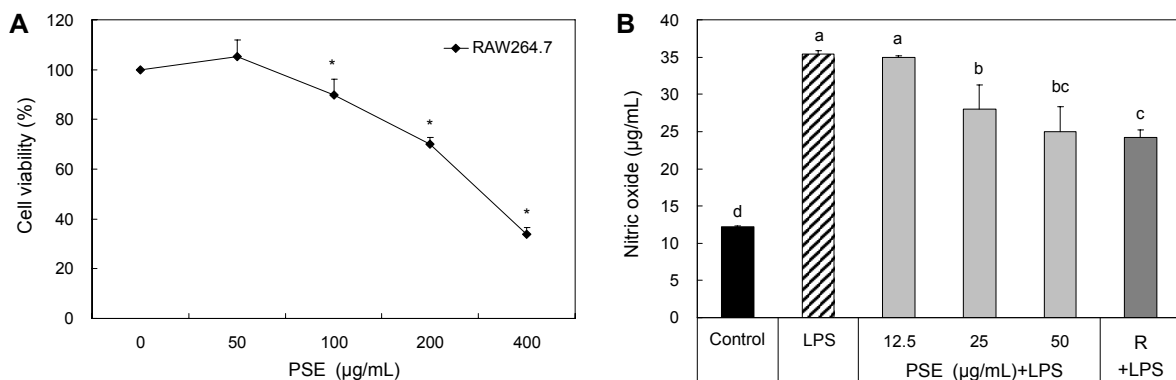


Fig. 5. Toxicity (A) and effect of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract on the nitric oxide production (B) by RAW264.7 cells. Control: normal control, LPS: lipopolysaccharide 0.5 µg/mL, PSE: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract+lipopolysaccharide 0.5 µg/mL, R: resveratrol 20 ng/mL+lipopolysaccharide 0.5 µg/mL. Data are presented as the mean±SD. * $P<0.05$ compared to the 0 µg/mL group (A). Different letters show a significant difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

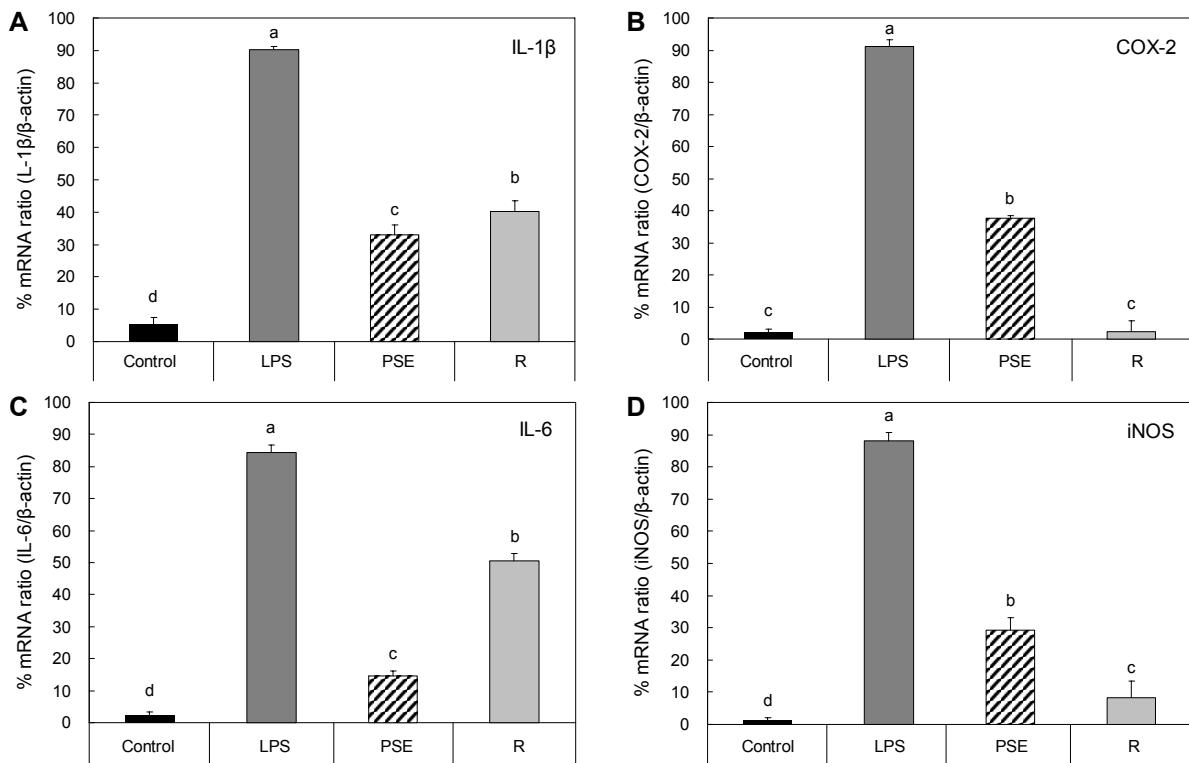


Fig. 6. Effect of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract on expression of IL-1 β , COX-2, IL-6, and iNOS mRNA (B) in RAW264.7 cells. Control: normal control, LPS: lipopolysaccharide 0.5 μ g/mL, PSE: water extract of peanut sprout (*A. hypogaea* L.) extract 50 μ g/mL+lipopolysaccharide 0.5 μ g/mL, R: resveratrol 20 ng/mL+lipopolysaccharide 0.5 μ g/mL. Data are presented as the mean \pm SD. Different letters show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

땅콩나물 추출물이 항염증 유전자에 미치는 영향

땅콩나물 추출물이 RAW264.7 세포에서 염증 유발 관련 유전자인 IL-1 β , COX-2, IL-6 및 iNOS에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 땅콩나물 추출물 12.5, 25 μ g/mL 처리군(그림 표기 안함)은 control군과 유의적인 차이가 없었으나 50 μ g/mL 처리군은 control군보다 IL-1 β , COX-2, IL-6 및 iNOS의 발현을 보이며 억제하였다. 특히 땅콩나물 추출물 처리군은 positive control인 resveratrol에 비해 IL-1 β 및 IL-6 유전자의 발현을 현저하게 억제시켰다. 이러한 결과를 통해 땅콩나물 추출물이 LPS에 의한 염증 유전자 증가를 감소시켜 NO의 생성 억제능을 보이는 것으로 확인된다.

염증성 cytokine은 활성산소종의 내독소 자극에 의해 대식세포와 과도하게 반응하여 증가한다. 증가한 염증성 cytokine인 IL-1, IL-6, TNF- α 등은 산화적 스트레스를 유발하며 염증을 일으킨다(31). 전립선에서 염증은 cytokine의 생성 및 증가를 유발하여 전립선 비대로 진행된다(32). 땅콩나물 추출물 및 resveratrol은 NO 생성 억제 효과 및 염증성 cytokine 감소 효과를 통해 항염증능을 확인하였다. 이런 결과는 Djoko 등(33)의 연구와 일치하는데 LPS 유도된 NO 함량의 증가는 resveratrol 처리 시에 개선되었으며 resveratrol이 대식 세포의 cytokine 증가를 감소시켜 NO 함량이 감소한다고 보고하였다. 또한, 염증은 전립선 비대 시

에 전립선 조직에서 염증 인자들을 동반하며 증가하는데 전립선 비대 유도 동물에서 울금(9,27) 추출물 투여 시 염증성 사이토카인이 감소하고 전립선 비대가 완화되었다고 알려져 있다. 이런 연구 결과들에서 항염증 효과가 전립선 비대 유발 및 발전을 억제할 수 있다고 보고한 것을 종합해 볼 때 땅콩나물 추출물에 있는 resveratrol 물질의 염증성 사이토카인 감소 및 NO 생성 억제 효과 때문에 전립선 비대 감소 효과가 나타났다고 판단된다.

요 약

본 연구는 땅콩나물 열수 추출물이 남성 갱년기 관련 증상인 전립선 비대증과 발기부전에 대해 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 phosphodiesterase(PDE) 저해 효과, 5- α reductase 활성 억제능, RAW264.7 세포에서 NO 함량 측정 및 TM3 세포에서 testosterone 함량을 측정하였다. 땅콩나물 추출물은 높은 PDE 저해능을 확인되었다. 또한, 5AR2 활성을 억제하였다. 전립선 비대와 관련된 염증에 대한 영향으로 RAW264.7 세포에서 lipopolysaccharide에 대한 NO 함량 억제능을 확인한 결과 땅콩나물 열수 추출물에 의해 NO 생성이 억제되었고 염증 인자가 감소하는 것으로 나타났다. TM3 세포에서 과산화수소로 유도된 산화적 손상에서는 땅콩나물 추출물 처리 시에 높은 세포보호능을

보였으며, 땅콩나물 추출물에 의해 testosterone 함량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 땅콩나물 열수 추출물은 5AR2 억제 활성을 증대시키고 항염증 효과가 전립선 비대증의 유발을 억제시킬 수 있다는 선행연구로 볼 때 땅콩나물 추출물은 전립선 비대 유발에 직접 관계된 효소와 유전자를 제어함과 동시에 항염증 효능을 가짐으로써 전립선 비대 증상 개선에 매우 효과적일 것으로 판단된다. 또한, 땅콩나물 추출물은 PDE 활성을 저해함으로써 발기부전 증상을 완화시키고 고환 내 세포의 산화적 스트레스를 완화하며, testosterone과 같은 호르몬 합성을 증가시켜 전립선 비대증 외에 발기부전 및 호르몬 저하로 인해 발생하는 남성갱년기 증상에도 효과를 보일 것으로 기대된다. 이상의 결과로 볼 때 땅콩나물 열수 추출물은 전립선 비대를 비롯한 남성갱년기 증상을 완화시키는 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2014년도 융복합기술 개발사업(과제번호: S2175443)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Han KL, Chung YK, Lee JO. 2002. A study on the relationship between stress and climacteric symptoms of midlife men. *J Korean Community Health Nurs* 19: 513-522.
- Kim JJ. 2004. PADAM (partial androgen deficiency in the aging male) and hormone replacement therapy. *Kor J Androl* 22: 45-51.
- Behre HM, Baus S, Kliesch S, Keck C, Simoni M, Nieschlag E. 1995. Potential of testosterone buccinate for male contraception: endocrine differences between responders and non-responders. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2394-2403.
- Ahn TY. 2005. Diagnosis and treatment of andropause. *Korean J Med* 68: 123-127.
- Hwang EC, Oh SH, Oh BS, Lee JS, Park SH, Kang TW, Kwon DD, Park K, Ryu SB. 2004. Voiding pattern in patients with benign prostatic hyperplasia. *Korean J Urol Oncol* 2: 166-170.
- Sun J, Xiang H, Yang LL, Chen JB. 2011. A review on steroidal 5 α -reductase inhibitors for treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr Med Chem* 18: 3576-3589.
- Bostanci Y, Kazzazi A, Momtahn S, Laze J, Djavan B. 2013. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Curr Opin Urol* 23: 5-10.
- Nuñez C, Cansino JR, Bethencourt F, Pérez-Utrilla M, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. 2008. TNF/IL-1/NIK/NF- κ B transduction pathway: a comparative study in normal and pathological human prostate (benign hyperplasia and carcinoma). *Histopathology* 53: 166-176.
- Lee JY, Kim YJ, Jun WJ, Lee YH. 2015. Effect of hot water extract from *Curcuma long* L. on inflammatory mediators in prostate tissue of BPH-induced rats. *J East Asian Soc Diet Life* 25: 809-812.
- Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML. 2011. Adverse side effects of 5 α -reductase inhibitors therapy: persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J Sex Med* 8: 872-884.
- Jung WS. 2008. Pharmacological management of male sexual dysfunction. *J Korean Med Assoc* 51: 770-778.
- Hyun JS. 2005. Obesity and erectile dysfunction. *Korean J Androl* 23: 55-60.
- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 843-850.
- Parsons JK, Schenk JM, Arnold KB, Messer K, Till C, Thompson IM, Kristal AR. 2012. Finasteride reduces the risk of incident clinical benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 62: 234-241.
- Boyce EG, Umland EM. 2001. Sildenafil citrate: a therapeutic update. *Clin Ther* 23: 2-23.
- Lee SE, Park CH, Bang JK, Seong NS, Chung TY. 2004. Comparison on antioxidant potential of several peanut varieties. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 941-945.
- Frémont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66: 663-673.
- Shin EC. 2013. Relationships between fatty acids and tocopherols of conventional and genetically modified peanut cultivars grown in the United States. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1618-1628.
- Kang HI, Kim JY, Kwon SJ, Park KW, Kang JS, Seo KI. 2010. Antioxidative effects of peanut sprout extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 941-946.
- Kang HI, Kim JY, Park KW, Kang JS, Choi MR, Moon KD, Seo KI. 2010. Resveratrol content and nutritional components in peanut sprouts. *Korean J Food Preserv* 17: 384-390.
- Noh YH, Kim DH, Kim JY, Park J, Kim OH, Han D, Kim WY, Kim SS, Lee MY, Heo SH, Kim M, Lee WB, Jeong Y, Myung SC. 2012. Improvement of andropause symptoms by dandelion and rooibos extract complex CRS-10 in aging male. *Nutr Res Pract* 6: 505-512.
- Fukuhara S, Tsujimura A, Okuda H, Yamamoto K, Takao T, Miyagawa Y, Nonomura N, Okuyama A. 2011. Vardenafil and resveratrol synergistically enhance the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in corpus cavernosal smooth muscle cells and its therapeutic potential for erectile dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rat: preliminary findings. *J Sex Med* 3: 1061-1071.
- Chen L, Zhao Y, Zhang Y. 2012. Progress on the research of stem Leydig cell line in the testis of rodents. *Wei Sheng Yan Jiu* 41: 158-162.
- Jang YS, Jeong JM. 2009. Effect of phyto-extract fermented mixture (MP119) on the sexual functions and on the toxicities of cadmium. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1724-1731.
- Banu SK, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh JA, Burghardt RC. 2016. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol Appl Pharmacol* 303: 65-78.
- Hirano Y, Kondo R, Sakai K. 2002. 5 α -Reductase inhibitory compounds produced by polymerization of resveratrol with horseradish peroxidase. *J Wood Sci* 48: 64-68.
- Kim JY, Lee JY, Yoon HG, Kim Y, Jun W, Hwang KT, Cha MS, Lee YH. 2014. Inhibitory effect of *Curcuma longa*

- L. extracts on 5-alpha reductase II activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 318-322.
28. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. 2011. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol* 60: 106-117.
 29. Elberry AA, Mufti ST, Al-Maghrabi JA, Abdel-Sattar EA, Ashour OM, Ghareib SA, Mosli HA. 2011. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*) on experimentally-induced atypical prostatic hyperplasia in rats. *J Inflamm* 8: 40.
 30. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-κB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells* 23: 398-404.
 31. Vilhardt F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 17-21.
 32. Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Laverny G, Gacci M, Crescioli C, Maggi M, Adorini L. 2009. Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol* 182: 4056-4064.
 33. Djoko B, Chiou RY, Shee JJ, Liu YW. 2007. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 55: 2376-2383.