

Effects of Corni Fructus on Testosterone-induced Benign Prostatic Hyperplasia in Sprague Dawley Rats

Da He Kwon^{1,2}, Hyun Hwangbo^{1,2}, Eun Ok Choi^{1,2}, Min Yeong Kim^{1,2}, Seon Yeong Ji^{1,2}, Kyung-II Kim³, No-Jin Park³, Sung Ok Kim⁴, Su-Hyun Hong^{1,2}, Cheo Park⁵, Hye-Jin Hwang⁶, Ji-Suk Jeong^{3,7} and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Anti-Aging Research Center, Donggeui University, Busan 47340, Korea

²Department of Biochemistry, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

³Gurye Sansooyu Farming Association Corporation, Gurye-gun 57602, Korea

⁴Department of Food Science and Biotechnology, College of Engineering, Kyungsung University, Busan 48434, Korea

⁵Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Donggeui University, Busan 47340, Korea

⁶Department of Food and Nutrition, College of Nursing, Healthcare Sciences & Human Ecology, Donggeui University, Busan 47340, Korea

⁷Gurye-gun Agricultural Center and Gurye Wildflower Institute, Gurye-gun 57660, Korea

Received June 27, 2018 / Revised August 1, 2018 / Accepted August 5, 2018

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is characterized by prostatic hypertrophy mainly in the elderly. Corni Fructus is reportedly effective in the prevention and treatment of various diseases, but its efficacy on BPH has not been previously studied. In the present study, we investigated whether or not a Corni Fructus water extract (CF) could prevent testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. To induce BPH, castrated rats were subcutaneously injected with testosterone propionate (TP). CF was administered daily by oral gavage, along with the TP injections, and finasteride, a selective inhibitor of 5 α -reductase type 2, was used as a positive control. The results show that CF significantly reduces prostate weight and histopathologic changes while also decreasing levels of serum dihydrotestosterone, similar to the finasteride-treated group. CF also suppresses TP-induced 5 α -reductase expression and concentration in prostate tissue and serum, respectively. Furthermore, CF markedly inhibited TP-induced expression of the androgen receptor (AR) and the steroid receptor coactivator 1, an AR coactivator, which was associated with a decrease in prostate-specific antigen levels in both serum and prostate tissue. In conclusion, the results of this study indicate that CF weakens BPH status by inactivation of 5 α -reductase and AR.

Key words : Androgen receptor, benign prostatic hypertrophy, Corni Fructus, prostate specific antigen, 5 α -reductase

서론

전립선 비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)은 노년 기 비뇨기 계통에 가장 흔한 증상의 하나로서, 요도를 둘러싼 전립선 주위의 평활근과 상피세포의 과다 증식에 의한 전립선 비악성비대(non-malignant enlargement)를 특징으로 한다[1, 35]. 전립선 비대증의 병인은 아직 명확하지 않지만, 노화와 관련된 androgen의 변화가 중요한 요인 중 하나로 간주된다[10, 29, 41]. Androgen 중에서 가장 중요한 dihydrotestosterone (DHT)는 스테로이드 대사에 관여하는 효소인 5 α -reduc-

tase에 의해 testosterone으로부터 전환되며 testosterone 보다 높은 친화력으로 androgen receptor (AR)와 상호 작용한다[24, 34]. 따라서 testosterone 농도 감소에 따른 DHT의 과도한 생산은 전립선 상피세포와 간질세포의 증식을 유도하여 전립선 비대증의 발달을 촉진한다[3, 4]. 또한 전립선 비대증 환자에서 비슷한 연령의 정상인과 비교하여 혈청 내 prostate-specific antigen (PSA)의 농도가 매우 증가되어 있어 PSA는 전립선 비대증 진단에 널리 사용되는데, PSA의 생산 역시 DHT가 AR에 결합됨으로써 촉진된다[3, 11, 12].

현재까지 전립선 비대증 치료를 위해 전립선 경요도 절제술(transurethral resection)이 가장 일반적으로 시행되고 있지만, 출혈, 요도 협착 및 요실금과 같은 많은 합병증을 유발할 수 있어 제한적으로 시행되고 있다[33, 37]. 이러한 외과적 수술의 대안으로 전립선 비대증 치료를 위해 처방되고 있는 약물로는 (a)1-adrenoceptor antagonist (α -blocker)와 5 α -reductase 저해제(5ARI)로 대별된다. 그러나 α -blocker는 확대된 전립선의 크기를 직접 줄일 수는 없으며 기립성 저혈압(orthostatic hypo-

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tension), 비축혈(nasal congestion), 무력감, 성기능 장애, 현기증 및 두통과 같은 부작용을 나타낸다. 5ARI 또한 발기 및 사지 장애와 성욕 감퇴를 포함한 생식기관에 다양한 부작용이 보고되고 있어[19, 38], 최근에는 전립선 비대증 환자에게 보다 효과적이고 안전한 치료 전략으로 천연물의 활용에 대한 관심이 증가되고 있다.

산수유(山茱萸)로 통칭되는 산수유 나무(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)의 열매(Corni Fructus)는 오래 전부터 강장제와 혈액 순환 활성제를 포함한 광범위한 질병의 예방과 치료에 사용되어 왔다. 최근 연구들에 의하면 산수유는 항염증, 항산화, 면역 증강, 항종양, 항 당뇨병성 신병증, 항고혈당증, 간 보호 및 항폐혈증 효과와 같은 유의한 약리 작용을 갖는 것으로 보고되고 있다[8, 13-17, 32, 36]. 또한 산수유에는 다양한 배당체(glycoside), 탄닌(tannin) 및 polyphenol을 비롯한 많은 기능성 화합물이 존재하며 그들의 작용 기작에 관한 활발한 연구가 진행되고 있으나[20, 25, 42] 전립선 비대증에 대한 효능에 관한 자료는 여전히 미비하다. 따라서 본 연구에서는 거세 동물모델에서 testosterone propionate (TP)에 의하여 유도된 전립선 비대증에 미치는 산수유 열수추출물의 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

산수유 추출물의 제조

본 연구에 사용된 산수유는 전라남도 구례지역에서 수확된 것으로서 구례산수유영농조합법인으로부터 공급 받았다. 산수유 추출물은 산수유를 추출용 액에 담아 8 배수의 증류수를 가하여 2시간 동안 가열하였다. 추출물은 감압농축(N-21NS, Eyela, Tokyo Rikakikai, Japan) 후 동결건조(FDU-2100, Eyela, Tokyo, Japan)하여 분말 형태로 -20℃에서 저장하면서 세포 및 동물실험에 사용하였다.

실험동물

본 실험을 위하여 초기 체중이 340-350 g인 6주령 수컷

Sprague-Dawley 흰쥐(Samtako Bio Korea, Osan, Republic of Korea)를 사용하였다. 동물사육은 pathogen-free room에서 표준 실험실 조건(23±2℃, 상대습도, 70±5%, 12시간의 명암주기)에서 수행하였다. 모든 동물실험은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 인가(Confirmation number: R2017-004)에 따라 수행되었다.

실험 설계 및 처치

Sprague-Dawley 흰쥐를 1주간의 순응 후, 실험동물 본래의 testosterone 영향을 배제하기 위해 Van Coppenolle et al. [40]의 방법에 준하여 거세 후 무작위로 6그룹(거세군, TP 투여군, CF 저농도 투여군, CF 중농도 투여군, CF 고농도 투여군 및 finasteride 투여군, n=6)으로 나누었다(Table 1). 전립선 비대를 유발하기 위해서는 TP (3 mg/kg)를 복강 내 주사로 7주간 0.1 ml 부피로 투여하였고, finasteride (5 mg/kg, Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)는 대조 약물로 사용하였다. 실험 종료 후, 혈액 샘플을 수집하고, 전립선 및 주요 장기들의 무게를 측정하였으며, 전립선은 단백질 발현의 분석 및 조직학적 관찰을 위해 사용하였다.

Hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색에 의한 조직 병리학적 검사

분리한 전립선을 10% formaldehyde 용액에 24시간 동안 고정시킨 후, 조직 샘플을 파라핀 매입 및 절단을 하였다. 절편 조직을 H&E (Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 염색하고, 200X 배율로 광학현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 조직학적 변화를 평가 하였다.

면역조직화학적 분석

5-α-reductase와 AR의 면역조직화학적염색을 위하여, 위에서 얻은 파라핀 절편을 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 농도별 알코올을 이용하여 흡수시킨 후 0.5% triton X-100에 30분간 처리하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 비특이성 결합부위는 PBS와 1:10으로 희석된 normal horse serum을 1시간 처

Table 1. Classification of experiment groups

Groups	Injection	Administration
Castration	Corn oil	Sterilized water
TP	TP (3 mg/kg body weight/day)	Sterilized water
CF-250	TP (3 mg/kg body weight/day)	CF 250 mg/kg body weight/day
CF-500	TP (3 mg/kg body weight/day)	CF 500 mg/kg body weight/day
CF-750	TP (3 mg/kg body weight/day)	CF 750 mg/kg body weight/day
FINA	TP (3 mg/kg body weight/day)	Finasteride (5 mg/kg body weight/day)

Castration, corn oil-injected and PBS-treated rats; TP, TP (3 mg/kg)- and PBS-treated rats; CF-250, TP (3 mg/kg)- and CF (250 mg/kg)-treated rats; CF-500, TP (3 mg/kg)- and CF (500 mg/kg)-treated rats; CF-750, TP (3 mg/kg)- and CF (750 mg/kg)-treated rats; FINA, TP (3 mg/kg)- and finasteride (5 mg/kg)-treated rats. CF, Corni Fructus water extract; TP, testosterone propionate; FINA, finasteride.

리하여 차단시킨 후 5 α -reductase type 2 및 AR 항체를 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체로 donkey anti-goat를 처리하고 diaminobenzidine (DAB peroxidase substrate kit, SK-4100)으로 발색한 후 봉입과정을 거쳐 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

혈청 내 DHT, 5 α -reductase type 2 및 PSA의 정량적 평가

혈청 내의 DHT, 5 α -reductase type 2 및 PSA의 수준은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 의해 측정되었다. 이를 위한 kit는 CUSABIO (Newark, DE, USA)에서 구입하였으며, 제조사의 protocol에 준하여 분석하였으며, 거세군을 상대 값으로 표시하였다.

단백질의 분리 및 Western blot analysis

단백질 발현 조사를 위해 준비된 전립선 조직을 PROPREP lysis buffer (Intron Biotechnology Inc., Sungnam, Republic of Korea)를 이용하여 작은 조각으로 절단하고 균질화하였다. 조직 추출물을 4°C에서 13,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 실험군 당 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하고 polyvinylidene fluoride membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 옮겼다. 단백질이 전이된 membrane을 4°C에서 분석 대상 1차 항체와 2시간 이상 반응시킨 후, 이에 적절한 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated된 2차 항체(Amersham Biosciences, Westborough, MA, USA)와 반응시키고, enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences)를 이용하여 해당 단백질 발현을 검출하였다. 본 연구에 사용된 1차 항체들은 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

혈액 생화학적 분석

채취된 혈액 샘플(5 mL per individual)을 실온에서 30분 동안 방치하여 응고시킨 다음 3,000 g에서 4°C에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN) 및 creatinine의 농도 측정은 해당 분석 kit (Asan Pharm Co., Seoul, Korea)와 Biochemistry Automatic Analyzer (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행하였다.

통계 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준 오차(standard errors of the mean, SEM)로 제시하였다. 통계적 유의성은 Dunnett's test에 의한 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였다. 이를 위해 SPSS

(Statistical Package for the Social Sciences) 통계 분석 소프트웨어(버전 19.0, IBM, NY, USA)를 사용하였으며, 0.05 이하의 p 값을 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

전립선 무게에 미치는 영향 산수유 추출물의 영향

거세 후 TP에 의하여 유도된 전립선 비대에 미치는 산수유 추출물의 영향을 조사하기 위하여 전립선 무게 변화를 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 거세에 따른 전립선의 무게는 현저하게 줄었지만, TP가 투여된 실험동물에서는 전립선 비대증이 성공적으로 유도되었음을 알 수 있었다. 그러나 산수유 추출물 투여군에서는 투여 농도 의존적으로 전립선 중량이 유의적으로 감소되었으며, 최고 투여 농도(750 mg/kg)에서는 대조 약물로 사용한 finasteride 처리군(5 mg/ml)과 유사한 경향성을 보여주었다.

전립선의 구조적 변화에 미치는 산수유 추출물의 영향

전립선 조직의 변화에 미치는 산수유 추출물의 영향을 조사하기 위하여 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2A에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이, 거세에 따른 위축된 전립선 조직이 TP 처리군에서는 세포증식 및 폴립형성(polyp formation)에 의한 세포질과 lumen 영역의 감소와 같은 전형적인 전립선 비대에서 나타나는 조직학적 변화 [1]가 관찰되었다. 그러나, 이러한 병리적인 현상이 산수유 추출물 처리군에서는 처리 농도 의존적으로 감소되는 경향성을 보여주었고, finasteride 처리군에서도 이러한 병리적 변화가 관찰되지 않았다.

혈청 내 DHT 수준에 미치는 산수유 추출물의 영향

산수유 추출물의 전립선 비대 차단 효과가 DHT 농도 변화와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 혈청 내 DHT의 농도

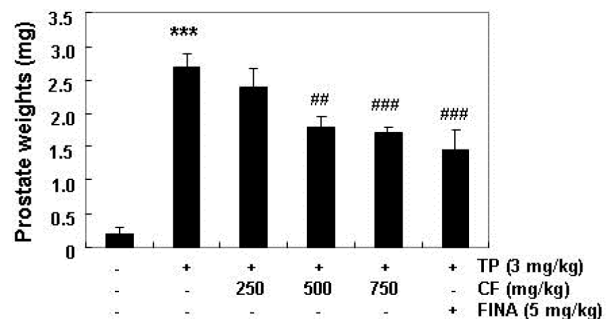


Fig. 1. Effects of CF administration on prostate weights in TP-induced BPH rats. Changes in the prostate total weight were assessed. The data shown represent the mean \pm SEM of six rats per group (*** p <0.001 vs. castration group; ** p <0.005, *** p <0.001 vs. TP group).

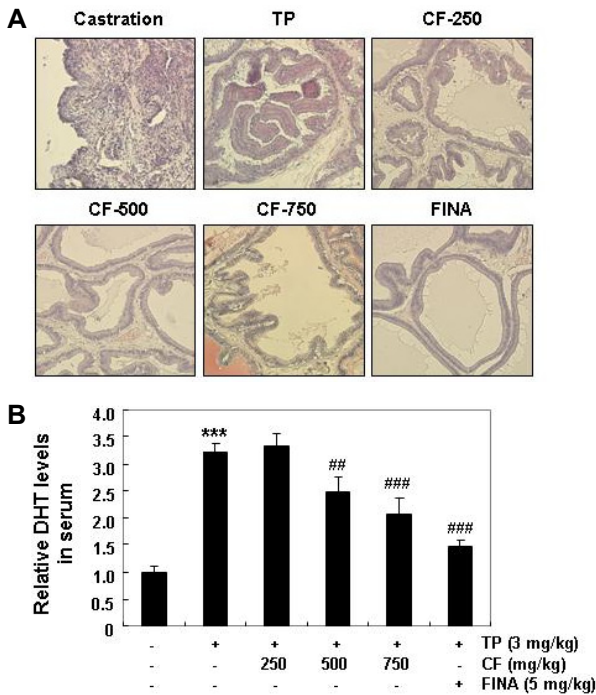


Fig. 2. Effects of CF administration on the histological changes in the prostate tissues and DHT in serum of TP-induced BPH rats. (A) Representative photomicrographs of the H&E-stained prostate tissues are presented (magnification, 200X). (B) The serum concentrations of DHT were examined by ELISA. The data shown represent the mean \pm SEM of six rats per group (** p <0.001 vs. castration group; ** p <0.005, *** p <0.001 vs. TP group).

를 조사한 결과, TP 처리에 의한 전립선 비대 유발 실험 동물의 혈청 내 DHT의 농도는 거세군에 비하여 현저히 높은 수준으로 증가되어 있었다(Fig. 2B). 비록 finasteride 처리군에 비하여는 다소 높지만, 산수유 추출물이 투여된 실험동물들에서는 유의적인 감소 현상을 관찰할 수 있었다.

5 α -reductase type 2의 활성에 미치는 산수유 추출물의 영향

산수유 추출물 testosterone를 DHT로 전환시키는데 핵심적으로 관여하는 5 α -reductase type 2의 활성[3, 4]에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이, TP에 의하여 전립선 비대증이 유발된 그룹에서 5 α -reductase type 2의 혈청 내 수준이 거세군에 비하여 유의적인 증가를 보였으나, 산수유 추출물 투여 농도 의존적으로 감소하였으며, finasteride 처리군에서도 전립선 비대증 유발군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다. 또한 Fig. 3B 및 Fig. 3C의 면역조직화 관찰과 immunoblotting 결과에서 알 수 있듯이, 전립선 비대증이 유발된 조직의 5 α -reductase type 2의 발현 수준이 혈청학적 검사와 일치하게 finasteride 및 산수유 추출물 투여에 의해 현저하게 감소되었다.

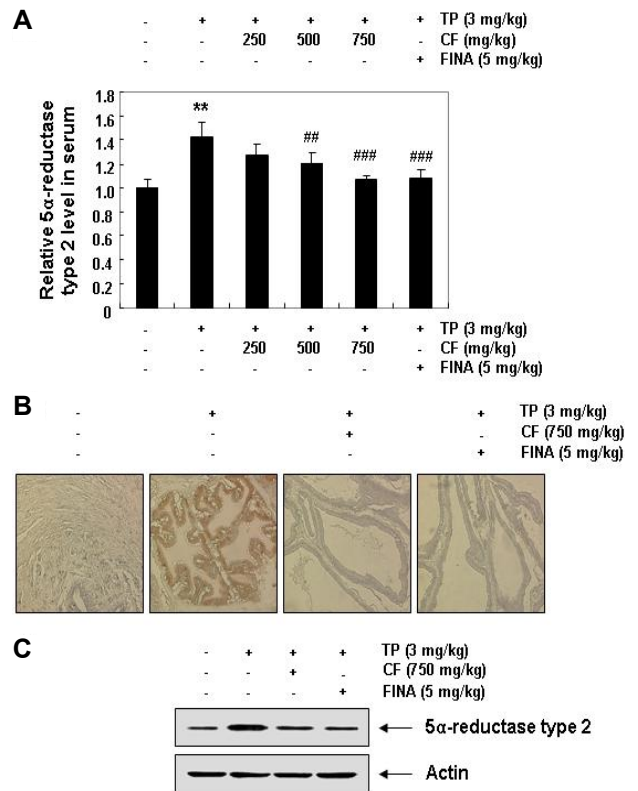


Fig. 3. Effects of CF administration on 5 α -reductase type 2 in TP-induced BPH rats. (A) The serum concentrations of 5 α -reductase type 2 were examined by ELISA. The data shown represent the mean \pm SEM of six rats per group (** p <0.001 vs. Control group; * p <0.01, ** p <0.005, *** p <0.001 vs. TP group). (B) Representative photomicrographs of prostate tissues immunostained with an anti-5 α -reductase type 2 are presented (magnification, 200X). (C) The expression levels of 5 α -reductase type 2 in prostate tissues were determined by Western blotting. The experiment was repeated three times among different experimental groups, and all the results were similar. Actin was used as an internal control.

AR 및 세포증식 바이오 마커의 발현에 미치는 산수유 추출물의 영향

이상에서 관찰된 산수유 추출물의 DHT 및 5 α -reductase type 2 활성 저해 효능이 AR의 발현 수준 변화와의 연관성을 조사한 결과, TP에 의한 전립선 비대증 유발군에서 AR 발현이 증가되었으나 finasteride 투여군과 마찬가지로 산수유 추출물 투여군에서는 거의 대조군 수준으로 유지되었다(Fig. 4A, Fig. 4B). 또한 전립선 비대 유발 동물에서 증가된 AR의 co-activator인 steroid receptor co-activator 1 (SRC1) 발현뿐만 아니라 대표적인 세포증식 평가 단백질인 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 세포증식 양성조절인자인 cyclin들(cyclin A, cyclin B1 및 cyclin E)의 발현 변화에서도 이와 유사한 경향성을 보였다(Fig. 4B).

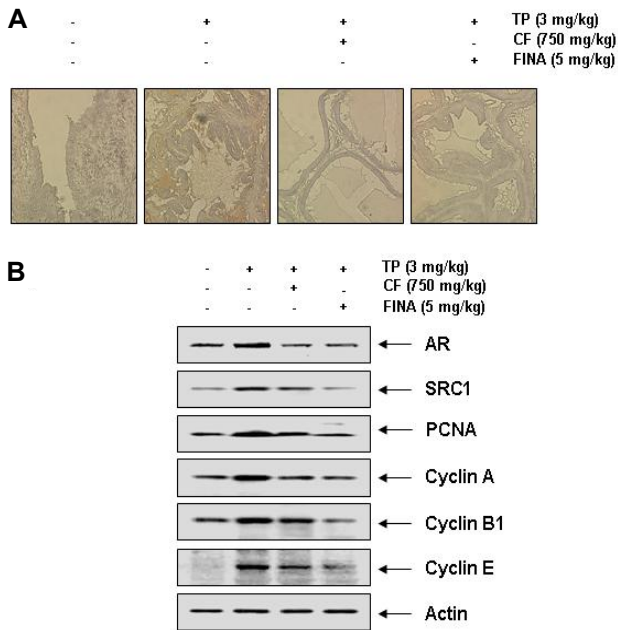


Fig. 4. Effects of CF administration on the expression of AR, SRC1, PCNA and cyclins in TP-induced BPH rats. (A) Representative photomicrographs of prostate tissues immunostained with an anti-AR are presented (magnification, 200X). (B) The expression levels of AR, SRC1, PCNA, cyclin A, cyclin B1 and cyclin E were determined by Western blotting. The experiment was repeated three times among different experimental groups, and the similar results were obtained. Actin was used as an internal control.

PSA의 생성에 미치는 산수유 추출물의 영향

PSA 수준에 미치는 산수유 추출물의 영향을 조사하였으며, Fig. 5A에 나타낸 바와 같이, TP 처리에 의한 전립선 비대 유발군의 혈청 내 PSA의 양이 크게 증가되었음을 확인하였다. 그러나, finasteride 처리군과 유사하게, 산수유 추출물 투여군에서는 PSA의 수준이 현저하게 저하되었으며, 전립선 조직을

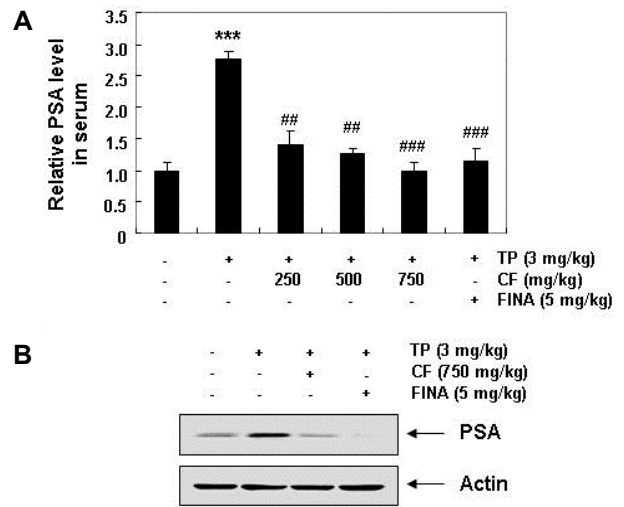


Fig. 5. Effects of CF administration on PSA in TP-induced BPH rats. (A) The serum concentrations of PSA were examined by ELISA. The data shown represent the mean \pm SEM of six rats per group ($***p < 0.001$ vs. Control group; $**p < 0.01$, $*p < 0.005$, $***p < 0.001$ vs. TP). (B) The expression levels of PSA in prostate tissues were determined by Western blotting. The experiment was repeated three times among different experimental groups, and all the results were similar. Actin was used as an internal control.

대상으로 한 PSA 단백질 발현 변화에서도 이와 유사하게 나타났다(Fig. 5B).

산수유 추출물의 독성 평가

산수유 추출물의 독성을 평가하기 위해 주요 기관의 무게와 혈청 호르몬의 수준을 조사하였다. Table 2에서 볼 수 있듯이 폐, 심장, 비장, 간, 신장과 같은 생체 기관의 상대적 무게는 전립선 비대가 유발된 실험동물과 산수유 추출물 및 finasteride 처리군에서 대조군에 비하여 급격한 차이는 없었다. 그

Table 2. Effects of CF treatment on the several organ weights of TP-induced BHP rats

Group	No. of animals	Organ weights (g)					
		Thymus	Lung	Heart	Spleen	Liver	Kidney
Castration	6	0.61 \pm 0.09	1.70 \pm 0.15	1.24 \pm 0.12	0.89 \pm 0.22	12.38 \pm 1.32	2.51 \pm 0.24
TP	6	0.08 \pm 0.03	1.78 \pm 0.17	1.26 \pm 0.09	0.84 \pm 0.22	12.31 \pm 1.16	3.36 \pm 0.20
CF-250	6	0.08 \pm 0.02	1.74 \pm 0.16	1.28 \pm 0.07	0.82 \pm 0.02	12.06 \pm 0.70	3.26 \pm 0.22
CF-500	6	0.07 \pm 0.03	1.63 \pm 0.18	1.35 \pm 0.10	0.69 \pm 0.18	11.69 \pm 2.03	3.32 \pm 0.17
CF-750	6	0.06 \pm 0.03	2.03 \pm 0.84	1.30 \pm 0.05	0.76 \pm 0.17	11.12 \pm 1.51	3.31 \pm 0.54
FINA	6	0.18 \pm 0.07	1.63 \pm 0.24	1.19 \pm 0.10	0.78 \pm 0.14	10.66 \pm 1.10	3.42 \pm 0.12

Values are represented as the mean \pm SD of six rats.

Castration, corn oil-injected and PBS-treated rats; TP, TP (3 mg/kg)- and PBS-treated rats; CF-250, TP (3 mg/kg)- and CF (250 mg/kg)-treated rats; CF-500, TP (3 mg/kg)- and CF (500 mg/kg)-treated rats; CF-750, TP (3 mg/kg)- and CF (750 mg/kg)-treated rats; FINA, TP (3 mg/kg)- and finasteride (5 mg/kg)-treated rats. CF, Corni Fructus water extract; TP, testosterone propionate; FINA, finasteride.

Table 3. Effects of CF treatment on the serum biochemical parameters for the liver and kidney functions of TP-induced BHP rats

	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Castration	34.4±5.2	143.9±55.9	15.6±1.6	0.5±0.1
TP	41.9±5.9	157.3±33.8	21.2±6.8	0.4±0.1
CF-250	38.9±3.1	138.6±25.5	16.4±2.8	0.4±0.1
CF-500	37.9±8.2	157.1±38.6	19.3±1.9	0.5±0.3
CF-750	37.5±4.7	141.5±29.0	18.6±2.1	0.3±0.4
FINA	35.0±7.1	136.2±31.5	16.1±2.8	0.3±0.2

Values are represented as the mean ± SD of six rats.

Castration, corn oil-injected and PBS-treated rats; TP, TP (3 mg/kg)- and PBS-treated rats; CF-250, TP (3 mg/kg)- and CF (250 mg/kg)-treated rats; CF-500, TP (3 mg/kg)- and CF (500 mg/kg)-treated rats; CF-750, TP (3 mg/kg)- and CF (750 mg/kg)-treated rats; FINA, TP (3 mg/kg)- and finasteride (5 mg/kg)-treated rats. CF, Corni Fructus water extract; TP, testosterone propionate; FINA, finasteride.

리고 Table 2에 요약된 바와 같이, 간 및 신장 기능에 대한 혈청 생화학적 변수에 상응하는 ALT, AST, BUN 및 creatinine의 양도 모든 실험군에서 크게 다르지 않았다.

고찰

최근 증가하고 있는 전립선 비대증 치료제의 부작용을 극복하기 위해 천연물 이용에 대한 관심이 높아지고 있다. 전립선 비대증의 발병과 진행은 전립선 기능 조절과 관련된 호르몬의 활동을 변화시킬 뿐 만 아니라 염증과 산화적 스트레스도 중요한 역할을 한다[6, 21]. 따라서 항염증 및 항산화 특성을 지닌 천연물은 전립선 비대증의 예방과 치료에 유용하게 적용할 가능성이 매우 높다. 본 연구에서는 전통적인 의약 자원으로 부터 전립선 비대증 치료에 적용 가능한 천연물 탐색의 일환으로, 강력한 항염증 및 항산화 효능이 잘 알려진 산수유 [13-17, 20, 32, 42] 추출물에 대한 효능을 평가하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 산수유 추출물은 TP로 유도된 전립선 비대 및 조직 병리학적 변화를 크게 감소시켰다. 이러한 감소는 전립선 조직에서의 5 α -reductase 발현 및 혈청 내의 이 효소의 농도 억제와 관련이 있었다. 또한 산수유 추출물은 전립선 비대 유발 실험동물 혈청에서 DHT의 양을 현저하게 차단시켰으며 AR의 발현과 PSA 생성을 억제하였다.

전립선 비대증의 정확한 발병 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만 5 α -reductase는 testosterone으로부터 DHT 생합성에 있어 중요한 효소이기 때문에 전립선 비대증의 주요 표적으로 인식되고 있다[24, 34]. 현재 알려진 3가지 5 α -reductase 동종 효소 중 type 1 및 2가 임상적으로 중요한 역할을 하지만, 전립선 간질과 상피의 핵막에 위치한 type 2는 type 1 보다 전립선 비대증과 관련된 DHT 생성에 더 관여한다[18, 39]. 비록 testosterone과 DHT 모두 남성 생식기관의 발달에 중요한 역할을 하지만 DHT는 testosterone 보다 AR에 대한 훨씬 높은 친화도를 가진다. AR에 대한 DHT의 높은 친화성은 testosterone 보다는 전립선 상피세포 및 간질세포의 증식을 촉진시키

는데 필요한 AR 의존 성장인자의 전사활성을 더욱 강력하게 자극 할 수 있다[3, 4]. 이 과정은 AR이 핵으로의 전이를 통한 androgen response elements (AREs)의 DNA 서열에 결합하는 특정 AR co-activator의 동원을 필요로 한다[26, 30]. 본 연구의 결과에 의하면, 산수유 추출물은 전립선 비대증 실험동물에서 5 α -reductase type 2의 혈청 내 수준을 유의적으로 저해하였으며, 전립선 조직에서도 5 α -reductase type 2의 발현이 억제되었다. 이는 AR 및 AR co-activator의 하나인 SRC1의 발현 감소와 연관성이 있었다. 이러한 현상은 5 α -reductase 2 isoenzyme의 선택적 저해제[4, 38]인 finasteride 처리군에서도 유사하게 관찰되었다. 한편 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 진핵세포에서 DNA polymerase δ 에 대한 processivity factor로 작용하며 복제에 필수적인 DNA clamp로서 세포증식 양성조절인자인 cyclin [22, 27]과 함께 세포증식을 평가하는 수단으로 광범위하게 사용되며[5, 9], 정상인에 비하여 전립선 비대증 환자의 전립선 조직에서 이들의 발현은 증가되어 있다[7, 23]. 이들 인자들의 발현 증가는 해당 조직에서 세포의 증식이 광범위하게 촉진되고 있음을 의미하는 것이며, 본 연구의 결과에서 제시된 전립선 비대군에서 증가된 PCNA, cyclin A, cyclin B1 및 cyclin E의 발현이 산수유 추출물 투여군에서는 감소현상을 보였다. 따라서 이상의 결과는 증가된 전립선 무게 및 전립선 비대 유발 실험동물의 전립선 조직학적 변화에 대한 산수유 추출물의 억제 효과가 5 α -reductase type 2 및 AR 활성의 감소로 인한 전립선 상피세포 및 간질세포의 과도한 증식 억제로 인한 것임을 시사하여 준다.

한편 PSA는 전립선에서 발현되는 대표적인 androgen 반응 유전자(androgen-responsive gene) 중 하나이다[1, 12]. 비록 소량의 PSA가 일반적으로 건강한 남성의 혈액에서도 검출되지만 증가된 PSA 수준은 전립선암의 진행을 나타내는 지표로 널리 사용된다[11, 12]. 그러나 DHT 활성이 높은 전립선 비대증 환자에서 DHT는 AR에 결합하여 PSA의 promoter 부위에서 ARE와 상호 작용하여 PSA의 전사활성을 향상시킨다[28, 30]. PSA 수준은 전립선암 환자뿐만 아니라 전립선 비대증

환자의 혈청에서도 증가하며[2, 31], PSA 수치의 감소는 전립선 비대증의 치료 지표로서 적용이 가능하다. 따라서, 전립선 비대증 유발 실험동물에서 산수유 추출물 처리에 의해 PSA 수준이 감소할 수 있는지를 조사하였으며, 혈청 내 PSA의 양과 전립선 비대증 실험동물 전립선 조직에서의 PSA의 발현이 산수유 추출물 급여군에서 유의하게 억제되었다. 이러한 결과는 산수유 추출물에 의해 전립선 세포에서의 AR 신호전달체계 약화에 기인한 것이라 판단된다. 부가적으로 전립선 비대증에 대한 산수유 추출물의 효능과 관련된 독성 여부를 조사하기 위하여 주요 기관의 무게를 비교한 결과, 실험군들에 따른 폐, 심장, 비장, 간 및 신장의 무게에는 유의한 변화가 없었다. 또한, 산수유 추출물을 투여한 실험동물의 ALT, AST, BUN 및 creatinine의 혈청 농도에서도 대조군과 유의한 차이가 없어 산수유 추출물의 안전성이 확인되었다.

결론적으로, 산수유 추출물은 전립선의 과도한 증식과 조직 손상을 억제하는 능력이 입증된 바와 같이, 거세군 실험동물 모델에서 TP 유도성 전립선 비대증에 탁월한 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 효과는 적어도 5 α -reductase 및 AR 발현의 저해에 의한 혈청 DHT 및 PSA 수준의 감소에 따른 전립선의 과도한 증식억제 차단에 인한 것이었다. 비록 산수유 추출물에 함유된 생리활성 물질의 탐색과 이들에 대한 추가적인 연구가 수행되어야겠지만, 산수유 추출물은 전립선 비대증의 발달 및 진행을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 동의대학교 교내연구비(201802790001) 및 농림축산식품부의 식품기능성평가지원사업(한국식품연구원/G0090200-09)에 의해 연구되었음.

References

- Aaron, L., Franco, O. E. and Hayward, S. W. 2016. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. North. Am.* **43**, 279-288.
- Al-Khalil, S., Boothe, D., Durdin, T., Sunkara, S., Watkins, P., Yang, S., Haynes, A. and de Riese, W. 2016. Interactions between benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer in large prostates: a retrospective data review. *Int. Urol. Nephrol.* **48**, 91-97.
- Andriole, G., Bruchovsky, N., Chung, L. W., Matsumoto, A. M., Rittmaster, R., Roehrborn, C., Russell, D. and Tindall, D. 2004. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5 α -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **172**, 1399-1403.
- Azzouni, F. and Mohler, J. 2012. Role of 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic diseases. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **15**, 222-230.
- Boehm, E. M., Gildenberg, M. S. and Washington, M. T. 2016. The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *Enzymes* **39**, 231-254.
- Bostanci, Y., Kazzazi, A., Momtahan, S., Laze, J. and Djavan, B. 2013. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Curr. Opin. Urol.* **23**, 5-10.
- Botticelli, A. R., Criscuolo, M., Martinelli, A. M., Botticelli, L., Filoni, A. and Migaldi, M. 1993. Proliferating cell nuclear antigen/cyclin in incidental carcinoma of the prostate. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **423**, 365-368.
- Chang, J. S., Chiang, L. C., Hsu, F. F. and Lin, C. C. 2004. Chemoprevention against hepatocellular carcinoma of *Cornus officinalis* in vitro. *Am. J. Chin. Med.* **32**, 717-725.
- Choe, K. N. and Moldovan, G. L. 2017. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication Fork. *Mol. Cell* **65**, 380-392.
- Cornu, J. N., Ahyai, S., Bachmann, A., de la Rosette, J., Gillig, P., Gratzke, C., McVary, K., Novara, G., Woo, H. and Madersbacher, S. 2015. A systematic review and meta-analysis of functional outcomes and complications following transurethral procedures for lower urinary tract symptoms resulting from benign prostatic obstruction: An update. *Eur. Urol.* **67**, 1066-1096.
- Gharaee-Kermani, M. and Macoska, J. A. 2013. Promising molecular targets and biomarkers for male BPH and LUTS. *Curr. Urol. Rep.* **14**, 628-637.
- Ho, C. K. and Habib, F. K. 2011. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat. Rev. Urol.* **8**, 29-41.
- Huang, J., Zhang, Y., Dong, L., Gao, Q., Yin, L., Quan, H., Chen, R., Fu, X. and Lin, D. 2018. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *J. Ethnopharmacol.* **213**, 280-301.
- Hwang, K. A., Hwang, Y. J. and Song, J. 2016. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 196.
- Jeong, E. J., Kim, T. B., Yang, H., Kang, S. Y., Kim, S. Y., Sung, S. H. and Kim, Y. C. 2012. Neuroprotective iridoid glycosides from *Cornus officinalis* fruits against glutamate-induced toxicity in HT22 hippocampal cells. *Phytomedicine* **19**, 317-321.
- Jiang, W. L., Chen, X. G., Zhu, H. B., Hou, J. and Tian, J. W. 2009. Cornuside attenuates apoptosis and ameliorates mitochondrial energy metabolism in rat cortical neurons. *Pharmacology* **84**, 162-170.
- Kang, D. G., Moon, M. K., Lee, A. S., Kwon, T. O., Kim, J. S. and Lee, H. S. 2007. Cornuside suppresses cytokine-induced proinflammatory and adhesion molecules in the human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1796-1799.
- Keam, S. J. and Scott, L. J. 2008. Dutasteride: a review of its use in the management of prostate disorders. *Drugs* **68**, 463-485.
- Lepor, H. 2016. Alpha-blockers for the treatment of benign

- prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. North. Am.* **43**, 311-323.
20. Ma, W., Wang, K. J., Cheng, C. S., Yan, G. Q., Lu, W. L., Ge, J. F., Cheng, Y. X. and Li, N. 2014. Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *J. Ethnopharmacol.* **153**, 840-845.
 21. Minciullo, P. L., Inferrera, A., Navarra, M., Calapai, G., Magno, C. and Gangemi, S. 2015. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Urol. Int.* **94**, 249-254.
 22. Nakayama, Y. and Yamaguchi, N. 2013. Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **305**, 303-337.
 23. Nemoto, R., Kawamura, H., Miyakawa, I., Uchida, K., Hattori, K., Koiso, K. and Harada, M. 1993. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in human prostate adenocarcinoma. *J. Urol.* **149**, 165-169.
 24. Nicholson, T. M. and Ricke, W. A. 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation* **82**, 184-199.
 25. Park, J. Y., Han, A. R., Kil, Y. S., Kang, U., Kim, S. H., Nam, S. J. and Seo, E. K. 2016. A new secoiridoid glycoside from the fruits of *Cornus officinalis* (Cornaceae). *Nat. Prod. Res.* **30**, 1504-1510.
 26. Pihlajamaa, P., Sahu, B. and Jänne, O. A. 2015. Determinants of receptor- and tissue-specific actions in androgen signaling. *Endocr. Rev.* **36**, 357-384.
 27. Pomerantz, Y. and Dekel, N. 2013. Molecular participants in regulation of the meiotic cell cycle in mammalian oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* **25**, 484-494.
 28. Prins, G. S. 2000. Molecular biology of the androgen receptor. *Mayo Clin. Proc.* **75**, S32-35.
 29. Pyo, J. S. and Cho, W. J. 2017. Systematic review and meta-analysis of prostatic artery embolisation for lower urinary tract symptoms related to benign prostatic hyperplasia. *Clin. Radiol.* **72**, 16-22.
 30. Robins, D. M. 2005. Androgen receptor and molecular mechanisms of male-specific gene expression. *Novartis Found. Symp.* **268**, 42-52.
 31. Romero Otero, J., Garcia Gomez, B., Campos Juanatey, F. and Toujier, K. A. 2014. Prostate cancer biomarkers: an update. *Urol. Oncol.* **32**, 252-260.
 32. Seo, J. Y., Pyo, E., Park, J., Kim, J. S., Sung, S. H. and Oh, W. K. 2017. Nrf2-mediated HO-1 induction and antineuroinflammatory activities of halleridone. *J. Med. Food* **20**, 1091-1099.
 33. Smith, R. D. and Patel, A. 2011. Transurethral resection of the prostate revisited and updated. *Curr. Opin. Urol.* **21**, 36-41.
 34. Steers, W. D. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* **58**, S17-24.
 35. Strand, D. W., Costa, D. N., Francis, F., Ricke, W. A. and Roehrborn, C. G. 2017. Targeting phenotypic heterogeneity in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* **96**, 49-61.
 36. Telang, N. T., Li, G., Sepkovic, D. W., Bradlow, H. L. and Wong, G. Y. 2012. Anti-proliferative effects of Chinese herb *Cornus officinalis* in a cell culture model for estrogen receptor-positive clinical breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **5**, 22-28.
 37. Thorner, D. A. and Weiss, J. P. 2009. Benign prostatic hyperplasia: symptoms, symptom scores, and outcome measures. *Urol. Clin. North. Am.* **36**, 417-429.
 38. Traish, A. M., Melcangi, R. C., Bortolato, M., Garcia-Segura, L. M. and Zitzmann, M. 2015. Adverse effects of 5alpha-reductase inhibitors: What do we know, don't know, and need to know? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **16**, 177-198.
 39. Traish, A. M. 2012. 5alpha-reductases in human physiology: an unfolding story. *Endocr. Pract.* **18**, 965-975.
 40. Van Coppenolle, F., Le Bourhis, X., Carpentier, F., Delaby, G., Cousse, H., Raynaud, J. P., Dupouy, J. P. and Prevarskaya, N. 2000. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate* **43**, 49-58.
 41. Vignozzi, L., Rastrelli, G., Corona, G., Gacci, M., Forti, G. and Maggi, M. 2014. Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease? *J. Endocrinol. Invest.* **37**, 313-322.
 42. Yoon, J. H., Youn, K., Ho, C. T., Karwe, M. V., Jeong, W. S. and Jun, M. 2014. p-Coumaric acid and ursolic acid from Corni fructus attenuated beta-amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF-kappaB signaling pathway in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 4911-4916.

초록 : Sprague Dawley 흰쥐에서 테스토스테론에 의하여 유발된 전립선 비대증에 미치는 산수유 추출물의 영향

권다혜^{1,2} · 황보현^{1,2} · 최은옥^{1,2} · 김민영^{1,2} · 지선영^{1,2} · 김경일³ · 박노진³ · 김성옥⁴ · 홍수현^{1,2} · 박철⁵ · 황혜진⁶ · 정지숙^{3,7} · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³구례산수유영농조합법인, ⁴경성대학교 식품응용공학부, ⁵동의대학교 분자생물학과, ⁶동의대학교 식품영양학과, ⁷구례야생화학연구소)

노년기 비뇨기 계통에 가장 흔한 증상의 하나인 전립선 비대증은 요도를 둘러싼 전립선의 주위의 평활근과 상피세포의 과다 증식에 의한 것이다. 산수유는 강력한 항산화 효과로 인하여 다양한 질병의 예방 및 치료에 효과적이라고 보고되었지만 전립선 비대증에 대한 효능은 아직 알려지지 않았다. 본 연구에서는 산수유 열수 추출물이 testosterone에 의하여 유도되는 전립선 비대증에 미치는 영향을 조사하였다. 실험동물 내재성 testosterone의 영향을 배제하기 위해 거세를 하였으며, 전립선 비대증을 유도하기 위해, testosterone propionate (TP)를 피하 주사하였다. 산수유 추출물은 TP 주입과 함께 매일 경구 투여하였고, 5 α -reductase type 2의 선택적 억제제인 finasteride를 양성 대조군으로 사용하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 산수유 추출물 투여군에서는 finasteride 처리군에서와 마찬가지로 혈청 내 dihydrotestosterone 농도가 억제되었으며 전립선 무게 증가와 조직병리학적 변화가 유의하게 감소되었다. 산수유 추출물은 또한 전립선 조직 및 혈청에서 각각 TP에 의해 증가된 5 α -reductase type 2의 발현 및 농도를 유의적으로 억제하였다. 아울러 산수유 추출물은 TP에 의하여 유도된 AR, AR의 co-activator 및 세포증식 마커 단백질들의 발현 증가뿐 만 아니라 prostate-specific antigen의 수치와 발현도 감소시켰다. 결론적으로 산수유 추출물은 전립선 비대증억제를 위한 식의약 소재로서의 개발 가능성이 매우 높음을 의미한다.