

## Agaricus blazei Mycelial Liquid Culture Extract Containing Eritadenine Improves Benign Prostatic Hyperplasia-related Biochemical Markers in RWPE-1 Cells through Anti-inflammatory and Anti-oxidative Actions

Yeong Lae Ha<sup>1\*</sup>, Yun-Gu Moon<sup>2</sup>, Na-Hyun Kim<sup>2</sup>, Jeong Doo Heo<sup>2</sup>, Min Jung Cho<sup>1</sup>, Ye Ra Kim<sup>1</sup>, Young Suk Kim<sup>1</sup> and Jeong OK Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Antianging Institute, HK Biotech., Co., Ltd., Jinju 52840, Korea

<sup>2</sup>Gyeongnam Biological Resource Research Group, Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology, Jinju 52834, Korea

Received September 10, 2018 / Revised October 14, 2018 / Accepted October 19, 2018

*Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract (ABMLCE) promoted the production of testosterone (TS) in TM-3 mouse Leydig testis cells. Now, we report that ABMLCE containing eritadenine (EA) as a minor constituent (15.3 mg/100 g) reduced 5 $\alpha$ -reductase 2 (5 $\alpha$ -R2) enzyme activity and dihydrotestosterone (DHT) content which are key constituents for the benign prostatic hyperplasia (BPH) inductions. RWPE-1 prostate cells were grown in a Keratinocyte serum-free medium (K-SFM) containing ABMLCE (0~50 ppm), EA (0~10 ppm), and finasteride (FS 10  $\mu$ M: a positive control) in a 24-well plate for 24 hr. Supernatants collected from cell-cultured media were used for the assay of 5 $\alpha$ -R2, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme activities, and for TS, DHT, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) contents by their assay kits. The 5 $\alpha$ -R2 activity and DHT content were proportionally reduced ( $p < 0.05$ ) to concentrations of ABMLCE. The SOD and CAT enzyme activities were significantly ( $p < 0.05$ ) elevated concomitant with ABMLCE concentrations, while COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  showed reverse results ( $p < 0.05$ ). Similarly, the effects of EA were similar to those of ABMLCE. Efficacies of ABMLCE 50 ppm and EA 10 ppm in 5 $\alpha$ -R2 and DHT reduction were similar to those of 10  $\mu$ M FS. These results suggest that ABMLCE and EA reduced 5 $\alpha$ -R2 and DHT through their anti-inflammatory and anti-oxidative actions. This implies that ABMLCE containing EA could be a beneficial material in the cure of BPH in humans.

**Key words** : *Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract, benign prostatic hyperplasia, eritadenine, 5 $\alpha$ -reductase 2, RWPE-1 cell

### 서 론

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill, AB)은  $\beta$ -D-glucan, polyphenol, eritadenine (EA) 등과 같은 수많은 2차대사산물을 함유하고 있어, 항암성, 항산화성, 면역성 등의 기능성이 뛰어난 약용버섯이다[3, 8-10, 14, 17, 37]. 이와 같은 효능을 갖는 AB자실체 생산은 오랜 생육기간을 요하고, 배지조성이나 배양조건 등이 까다롭기 때문에, AB자실체를 생산하는 대신 화학적 성분이나 기능성이 유사한 AB균사체를 액체배양하여 활용하고 있다[5, 7]. AB균사체 액체배양 추출물(*Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract: ABMLCE)은 항산화효과, 면역증강

효과, testosterone (TS) 생성 촉진효과 등의 기능성이 보고되었다[2, 5, 12, 16, 29]. AB 및 ABMLCE의 수많은 이차대사산물 중 EA는 지방간 및 혈중 콜레스테롤 개선효과[30], angiotensin converting enzyme (ACE) 효소활성 저해효과[1]와 mouse TM3 고환세포에서 TS 생성촉진 효과[13, 16]가 있다고 보고되었다.

전립선비대증(Benign prostatic hyperplasia: BPH)의 주원인은 노화, 산화스트레스 및 염증반응 등이 있으며[4, 6, 23, 33], BPH는 전립선 조직내의 dihydrotestosterone (DHT)에 의해 유발된다[31]. 고환의 Leydig cell에서 합성된 TS가 전립선 조직으로 유입되어 5 $\alpha$ -reductase 2 (5 $\alpha$ -R2)의 작용에 의해 DHT로 전환된다. 이 DHT는 전립선세포내의 androgen receptor (AR)와 결합하여 전립선세포를 증식시켜 BPH를 유발한다[11, 21]. 노화 및 산화스트레스에 의해 생성되는 free radical을 소거하는 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)와 다양한 항산화물질이 BPH를 완화시키고, cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해제 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 등의 염증성 cytokine 생성 억제제가 BPH 생성을 억제한다고 보고되었다[4, 6, 24, 27, 28].

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-762-9307, Fax : +82-55-762-9407

E-mail : bestintheworld1080@gmail.com

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.

BPH는 5 $\alpha$ R 억제제(전립선 크기를 줄이는 물질)와  $\alpha$ -차단제(전립선 요도를 확대하여 배뇨를 도와주는 물질)로 치료한다[20]. 5 $\alpha$ R은 5 $\alpha$ -R1형과 5 $\alpha$ -R2형이 존재하는데, 전립선에는 주로 5 $\alpha$ -R2형이 존재한다[20]. BPH 치료제로 사용되는 합성 finasteride (FS, 5 $\alpha$ -R2 억제제)와 dutasteride (5 $\alpha$ -R1과 5 $\alpha$ -R2 억제제)의 장기 복용은 발기부전, 성욕감소 등의 부작용을 유발한다고 보고되었다[26]. 따라서 이러한 부작용이 없는 천연물 유래 5 $\alpha$ -R2 억제제를 이용하여 BPH 치료제를 개발하려는 노력이 시도되어 왔다[21, 31, 32, 35]. 그러나 아직 버섯이나 버섯균사체 배양추출물의 5 $\alpha$ -R2 효소활성 억제와 이를 활용한 BPH 개선 소재 개발에 관한 연구논문은 보고된 적이 거의 없다[15]. 특히 ABMLCE와 5 $\alpha$ -R2 효소활성 억제 관계를 연구하여 BPH를 개선하는 연구는 보고된 적이 없다.

본 연구에서는 EA를 함유한 ABMLCE의 RWPE-1 전립선 세포에서 BPH와 관련된 biochemical marker 개선효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### ABMLCE 조제 및 EA 함량 측정

AB균사체를 삼각플라스크[500 ml; 배지(탈지대두분 1.5%, 황백당 0.5% MgSO<sub>4</sub> 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01%) 200 ml 함유]에서 7일간 배양(25°C, 200 rpm; Lab Tech LSI-3016R, Namyangju, Korea)하고, 고압추출(121°C, 15 min)하였다. 이 추출물을 원심분리(4°C, 7,000 rpm, 20 min; Labgene 1580R, Seoul, Korea)하여 상등액을 회수하여 진공농축(<65°C, Brix 45; Rotavapor R-300, Buchi, Flawil, Switzerland)하여 ABMLCE 원액 시료를 조제하였다. 이 ABMLCE 원액 시료를 70% ethanol 침전물과 상등액으로 분획하여 각각 ABMLCE 상등액 시료와 ABMLCE 침전물 시료로 사용하였다.

시료의 EA 함량 측정은 Moon 등의 reversed-phase HPLC system으로 external standard 방법으로 측정하였다[25]. EA 표준물질은 Santa Cruz Biotech (Dallas, TX)로부터 구입하였다.

### RWPE-1 세포배양 및 시료처리

RWPE-1 전립선세포(ATCC CRL-11609, -140°C에 보관 중인 1 ml stock: 10% DMSO +90% FBS)를 water bath (40°C)에서 thawing하였다. 이 세포를 1% penicillin/streptomycin (1% P/S, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 함유한 Keratinocyte-serum free medium (K-SFM; Gibco Life Science, Waltham, MA) 3 ml를 첨가하여 원심분리(1,500 rpm, 1 min)하여 세포를 회수하였다. 이들 세포를 15 ml K-SFM 배지가 함유된 culture dish (10 cm, i.d.)에 옮겨 5% CO<sub>2</sub> incubator (37°C, Thermo Fisher scientific)에서 배양하였다.

배양 2일 후 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate-buf-

fered saline (D-PBS buffer; Gibco) 5 ml로 swirling하여 세척하고 0.05% Trypsin-0.02% EDTA (Gibco) 1 ml를 가하고 10 분간 배양하였다. K-SFM 3 ml를 가하여 swirling하고 원심분리(1,500 rpm × 1 min)하여 세포를 회수 하였다. 회수된 세포를 K-SFM (1% P/S) 배양액으로 희석(1×10<sup>5</sup> cells/100  $\mu$ l)하여 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l 첨가하고 24 hr (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 여기에 Control [K-SFM (1% P/S) 200  $\mu$ l] 및 시료[K-SFM (1% P/S) 150  $\mu$ l + sample 50  $\mu$ l]를 처리하고 다시 24 hr (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 배양하였다. 배양물은 회수하여 biochemical markers 측정용 시료로 사용하였다. 시료는 ABMLCE (0, 10, 50, 10 ppm)와 EA (0, 1, 5, 10 ppm)이었다.

### Cell viability 측정

시료처리에 의한 cell viability는 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Japan)의 분석 manual에 따라 측정하였다. 상기에서 배양한 RWPE-1 세포(1×10<sup>5</sup>)가 함유된 96 well plate의 well에 Control 처리(DMEM 100  $\mu$ l) 및 시료 처리(DMEM 75  $\mu$ l + sample 25  $\mu$ l)를 하고 다시 24 hr 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator; Thermo Fisher Scientific)하였다. 배양한 각 well에 CCK-8 시약 10  $\mu$ l를 첨가하고 2 hr 더 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator; Thermo Fisher Scientific)하였다. 생성된 DCF fluorescence를 490 nm (Synergy H1 Multi reader; BioTek, St. Louis, MO)에서 측정하여 cell viability를 계산하였다. 시료는 ABMLCE (0, 5, 10, 50, 250 ppm)와 EA (0, 1, 5, 10 ppm)였다.

Cell viability (%) = (Sample abs - Blank abs)/(Control abs - Blank abs) × 100

### 5 $\alpha$ -R2 및 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-4 (HSD3B4) 효소활성 assay

시료를 처리한 RWPE-1 cell로부터 얻은 K-SFM (1% P/S) 배양물의 5 $\alpha$ -R2 효소 및 HSD3B4 활성은 5 $\alpha$ -R2 assay kit (MyBioSource, San Diego, CA) 및 HSD3B4 assay kit (MyBioSource)로 분석하였다. 각 assay kit의 well에 100  $\mu$ l 시료를 첨가하고 제조사의 manual에 따라 분석하여 450 nm에서 흡광도(Synergy H1 Multi reader)를 측정하였다. 각 효소활성은 external standard curve로부터 계산하였다.

### TS 및 DHT 함량 assay

시료를 RWPE-1 cell에 처리하여 얻은 K-SFM (1% P/S) 배양액의 TS 및 DHT 함량은 TS assay kit (BioVision Inc., Mountain View, CA) 및 DHT assay kit (BioVision Inc.)로 분석하였다. TS 및 DHT assay kit의 well에 시료 100  $\mu$ l 첨가하고 제조사의 manual에 따라 분석하여 450 nm에서 흡광도(Synergy H1 Multi reader)를 측정하였다. TS 및 DHT 함량은 external standard curve로부터 계산하였다.

**SOD, CAT, TNF-α 및 IL-1β assay**

시료를 처리한 RWPE-1 cell로부터 얻은 K-SFM (1% P/S) 배양물 시료 100 μl에 대한 SOD, CAT, TNF-α 및 IL-1 β 측정은 각각의 assay kit (BioVision Inc.)를 사용하여 제조사의 manual에 준하여 분석하여 450 nm에서 흡광도(Synergy H1 Multi reader)를 측정하였다. SOD와 CAT 효소활성 및 TNF-α 와 IL-1 β 함량은 external standard curve로부터 계산하였다.

**통계처리**

Data는 Mean±SD로 나타내었으며, GraphPad Prism (version 5.01, GraphPad Software, Inc., CA)을 이용하여 one-way ANOVA로 분석한다. Mean간의 유의성 검증은 Tukey's w test로 검증하였고, 유의성은 p<0.05 이상으로 나타내었다.

**결 과**

**ABMLCE의 BPH 관련 biochemical marker 개선**

Table 1은 ABMLCE (원액, 상등액, 침전물)의 RWPE-1 세포에 대한 생존율을 나타내고 있다. ABMLCE 분획물을 배양배지에 0, 10, 50, 250 ppm 되게 처리하고 24 hr 배양한 다음 CCK-8로 세포 생존율을 조사하였다. 원액, 상등액 및 침전물은 농도 의존적으로 세포생존율을 감소시켰다. 원액 50 ppm 처리는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았지만, 상등액과 침전물 50 ppm 처리는 세포생존율을 Control 처리에 비해 유의적으로 각각 91.4%, 93.4%로 감소시켰다(p<0.05). 또한, 원액, 상등액 및 침전물 50 ppm 처리 농도에서의 세포생존율을 비교할 때, 원액에 비해 상등액과 침전물이 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰다(p<0.05). 따라서 세 분획 중 ABMLCE 원액

50 ppm 농도가 RWPE-1 세포 생존율에 가장 우수한 효과를 보였다.

Table 2는 ABMLCE 원액, 상등액, 침전물(0, 10, 50 ppm)의 RWPE-1 세포에 대한 5α-R2 효소활성 억제를 나타내고 있다. 세 분획물은 농도 의존적으로 5α-R2의 활성을 억제하였다, 원액, 상등액 및 침전물 50 ppm 농도 처리는 5α-R2의 활성을 Control 처리에 비해 각각 52.8%, 55.9%, 52.1%로 감소시켰다(p<0.05). 따라서 이후 BPH 개선 연구에서는 RWPE-1 세포 생존율에 영향 가장 우수한 효과를 보였고(Table 1), 5α-R2의 활성을 효율적으로 억제(Table 2)한 ABMLCE 원액(이후 ABMLCE) 50 ppm 이하의 농도를 사용하였다.

RWPE-1 전립선세포에 ABMLCE 시료 처리와 FS (positive control) 처리는 BPH 유발 핵심 효소인 5α-R2 효소활성과 핵심 물질인 DHT 함량을 감소시켰고, TS 함량과 HSD3B4 효소활성을 증가시켰다(Fig. 1). 5α-R2 효소활성은 ABMLCE 시료 50 ppm 처리에서 Control 처리(30.5 pg/ml)에 비해 유의적으로 감소(15.8 pg/ml, p<0.05)(C) 되었는데, 이 감소율은 FS 10 μM 처리의 효과(13.5 pg/ml)와 유사하였다. ABMLCE는 5α-R2 효소활성 억제와 더불어 DHT 함량을 유의적으로 감소(p<0.05)시켜, FS 효과와 유사하였다. 마찬가지로 ABMLCE 50 ppm 처리는 Control 처리에 비해 TS 함량은 유의적으로 증가시켰지만(p<0.05), HSD3B4 효소활성에는 영향을 미치지 못하였다.

ABMLCE 시료 처리는 RWPE-1 전립선세포의 항산화 효소인 SOD와 CAT 활성을 증가시켰고, 염증 관련 COX-2 효소활성과 TNF-α 및 IL-1β 함량을 감소시켰다(Fig. 2). SOD 효소활성은 ABMLCE 처리 농도에 따라 유의성 있게 증가 되어 50 ppm 처리 효과는 FS 처리와 유사하였다. CAT 효소활성도

Table 1. Relative survival rate of RWPE-1 cells treated with ABMLCE fractions

Concentration <sup>1)</sup> (ppm)	Hot water extract	70% ethanol soluble fraction	70% ethanol insoluble fraction
0	100±0.5 <sup>2)a</sup>	100±0.5 <sup>b</sup>	100±0.5 <sup>a</sup>
10	98.0±2.3 <sup>a</sup>	110.5±1.4 <sup>a</sup>	96.2±2.1 <sup>b</sup>
50	97.1±1.3 <sup>aA</sup>	91.4±0.7 <sup>cB</sup>	93.4±1.6 <sup>bB</sup>
250	87.2±1.9 <sup>b</sup>	79.2±5.2 <sup>d</sup>	70.6±0.4 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Concentration of ABMLCE fraction in a well of the 24-well plate (200 μl volume) grown RWPE-1 prostate cells.

<sup>2)</sup>Means (n=3) with different small superscript letters of same column and large superscript letters of same row represent significantly difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 2. Relative 5α-R2 enzyme activity of RWPE-1 cells treated with ABMLCE fractions

Concentration <sup>1)</sup> (ppm)	Hot water extract	70% ethanol soluble fraction	70% ethanol insoluble fraction
0	100±0.4 <sup>2)a</sup>	100±0.4 <sup>a</sup>	100±0.4 <sup>a</sup>
10	54.6±0.5 <sup>b</sup>	61.7±2.1 <sup>b</sup>	60.2±2.5 <sup>b</sup>
50	52.8±1.5 <sup>bA</sup>	59.9±0.9 <sup>bA</sup>	52.1±0.6 <sup>bA</sup>

<sup>1)</sup>Concentration of ABMLCE fraction in a well of the 24-well plate (200 μl volume) grown RWPE-1 prostate cells.

<sup>2)</sup>Means (n=3) with different small superscript letters of same column and large superscript letters of same row represent significantly difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

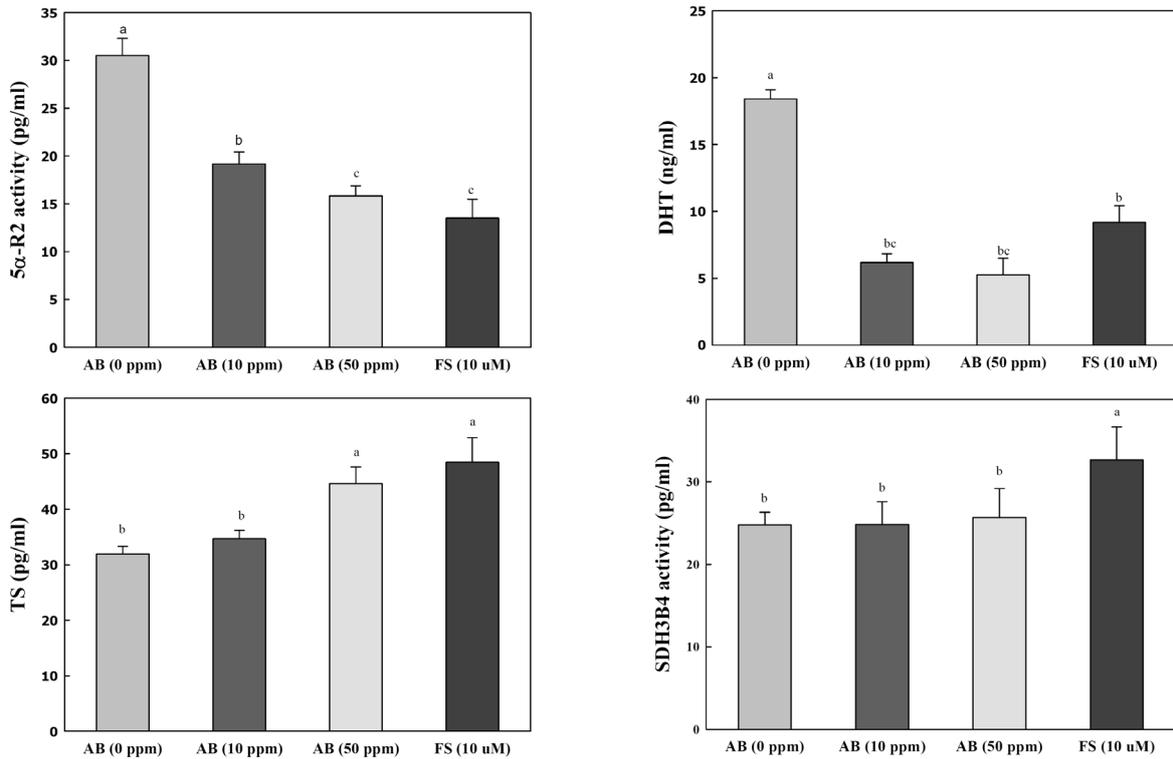


Fig. 1. Influence of a hot-water extract of ABMLCE on some biochemical markers related to BPH in RWPE-1 cells. Means with different small superscripts in the same panel represent significantly difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

ABMLCE 처리 농도에 따라 유의성 있게 증가 되었지만, FS 처리 효과보다 낮았다. ABMLCE 시료 처리는 RWPE-1 세포에서 항염증효과를 보였다. COX-2 효소활성, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  함량은 시료 처리 농도에 따라 유의성 있게 감소( $p < 0.05$ )되었지만, 이들의 효과는 FS보다 낮았다.

**EA의 BPH 관련 biochemical marker 개선**

EA 시료 처리는 RWPE-1 전립선세포에서 BPH 유발 핵심 인자인 5 $\alpha$ -R2 효소의 활성 억제와 DHT 함량을 감소시켰으며 항산화 효소 인 CAT 효소활성을 증가시켰고, 염증인자 인 TNF- $\alpha$  함량을 감소시켰다(Fig. 3). 5 $\alpha$ -R2 효소활성은 EA의 농도(1, 5, 10 ppm) 의존적으로 감소되어 10 ppm 처리에서 Control 처리의 32.5 pg/ml에서 23.3 pg/ml로 71%로 감소되었다. DHT 함량은 5 $\alpha$ -R2 효소활성이 농도 의존적으로 감소됨과 마찬가지로 EA 10 ppm 처리는 Control 처리의 23.9 pg/ml에 비해 32%로 감소( $p < 0.05$ )되었다. 또한 EA는 농도 의존적으로 CAT 효소활성을 증가시켜, EA 10 ppm 처리는 Control 처리의 CAT 효소활성(11.4 ng/ml)보다 157%로 증가( $p < 0.05$ )시켰다. TNF- $\alpha$ 는 EA 10 ppm 처리로 Control에 비해 74% 감소( $p < 0.05$ )되었다.

ABMLCE의 EA 함량을 Moon 등[25]의 방법으로 측정하였다. Fig. 4는 ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6x250 mm, 5  $\mu$ m particle size)이 장착된 Agilent Technologies 1200 series

HPLC를 사용하여 분석한 HPLC chromatograms이다. Moon 등[25]의 결과와 같이 시료 ABMLCE의 EA는 다른 물질과의 분리가 잘 되었고 표준물질의 retention time과 일치하였다. External standard curve를 통하여 ABMLCE에 함유된 EA 함량은 건물 중 100 g 당 15.3 mg이었다. 대부분의 식용이나 약용버섯 자실체에 EA가 함유되어 있었고, 그 중 EA가 가장 많이 함유된 버섯은 표고버섯 자실체(*Lentinus edodes*: 642 mg/100 g 건중)이었고, AB자실체에는 403 mg/100 g (건중) 함유되어 있다고 보고되었다[1]. 본 연구에서 사용한 ABMLCE의 EA의 함량(15.3 mg/100 g)은 AB자실체보다 함량이 낮았다.

**고 찰**

본 연구에서 ABMLCE가 RWPE-1 전립선세포의 BPH 예방 및 치료를 위한 핵심 효소인 5 $\alpha$ -R2 효소활성을 감소시켰고 동시에 핵심 물질인 DHT 함량을 감소시켰음을 확인하였다. 이와 같은 효과는 ABMLCE의 항염증효과(COX-2 효소활성 감소, TNF- $\alpha$ 와 IL-1b 함량 감소)와 항산화효과(SOD 효소 및 CAT 효소활성 증가)에 기인하며, EA가 이들 효과에 관여함을 확인하였다(Fig. 5).

BPH는 노화에 의해 발생하는 남성 만성질환이다. 노화의 원인은 다양하지만, 생체 내에서 생성되는 free radical (super-

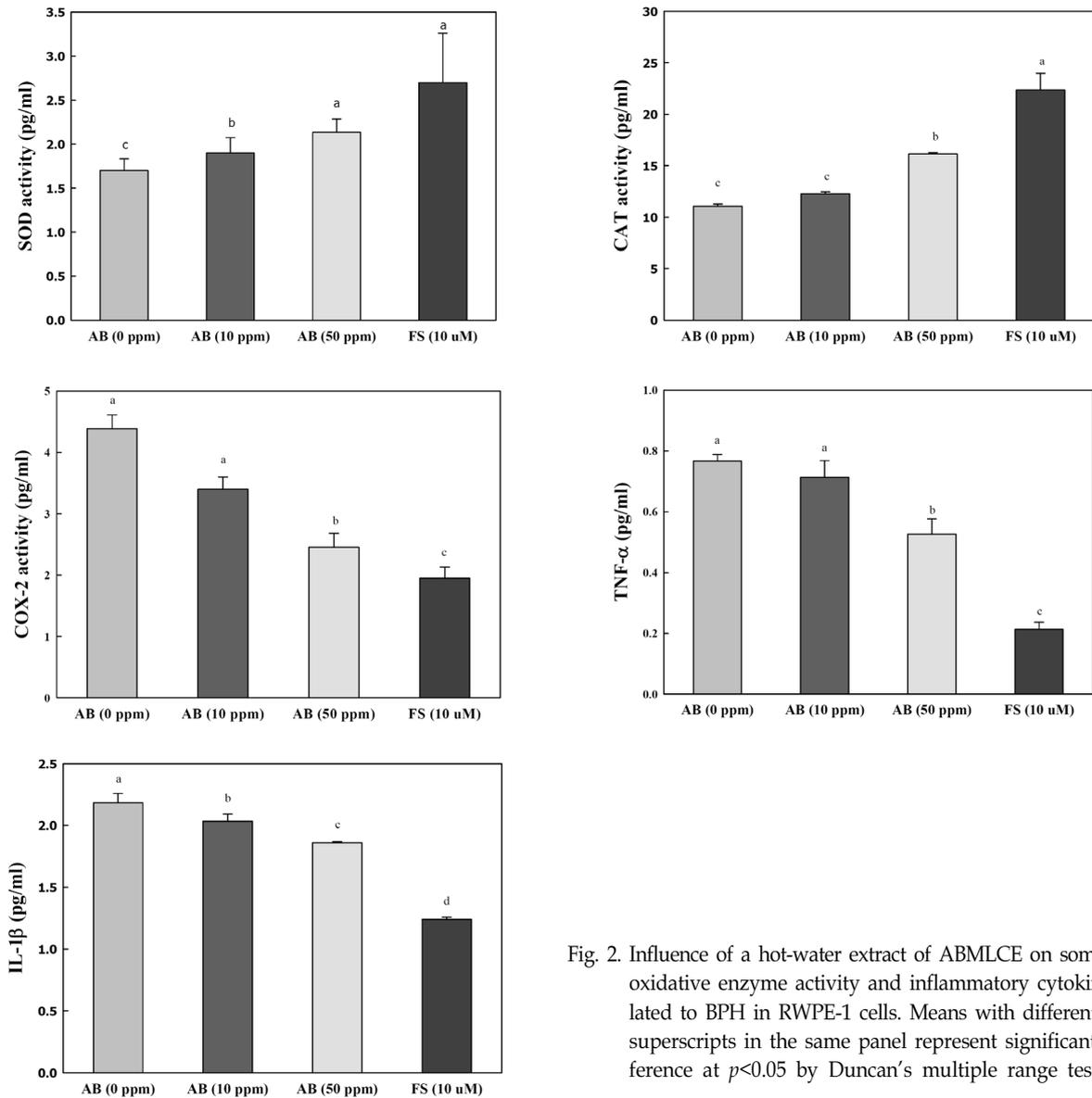


Fig. 2. Influence of a hot-water extract of ABMLCE on some anti-oxidative enzyme activity and inflammatory cytokines related to BPH in RWPE-1 cells. Means with different small superscripts in the same panel represent significantly difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

oxide radical, hydrogen peroxide 등)을 소거하지 못하여 이들이 생체막이나 DNA, RNA 및 다양한 생체 고분자 물질을 파괴하여 일어나는 현상이다[20, 22, 33, 35]. ABMLCE에는 AB자실체 추출물과 마찬가지로 gallic acid, syringic acid, pyrogallol, oxalic acid, malic acid 등이 함유되어 있어 *in vitro*에서 항산화성을 나타내고[5, 7], Kozarski 등은 AB자실체로부터 유래한 다당체가 *in vitro*에서 항산화효과와 면역증강효과를 나타낸다고 보고하였다[17]. 또한 AB자실체나 ABMLCE에 상당량의 tocopherol, ergosterol, agaritine, phenolic compounds, nucleotide, nucleoside 등의 이차대사산물을 함유하고 있어 항산화성을 비롯한 다양한 생리활성 나타낸다고 보고되었다 [18, 22, 28]. 이들 보고 결과와 마찬가지로 본 연구의 ABMLCE가 RWPE-1 전립선세포의 SOD와 CAT 효소활성을 증가시켜 free radical을 소거함으로써, BPH 생성을 억제하는 것으로

판단된다.

BPH 환자의 전립선 조직에서는 TNF-α를 비롯한 염증성 cytokine의 높은 발현이 growth factor 생성과 angiogenesis를 유발하여 BPH를 유발된다고 보고되었다[6], 이들 염증성 cytokine 발현은 산화적 스트레스나 노화에 의한 현상으로 reactive oxygen species (ROS) 및 COX-2에 의해 증가되어 염증 반응으로 나타난다[27]. 전립선 개선 소재인 saw palmetto 열매 추출물[36]의 항염증효과가 보고되었고, TS로 유도한 BPH 흰쥐에 울금(*Curcuma longa* L.) 열수추출물은 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 발현을 현저히 감소시켰고, COX-2 활성의 감소와 염증전사인자 인 NF-κb의 활성화를 감소시켰다[19]. 따라서 이들 보고 결과와 마찬가지로 ABMLCE의 항산화성 및 항염증성이 RWPE-1 전립선세포의 TNF-α와 IL-1 β의 함량 감소와 COX-2 효소활성을 억제하였다.

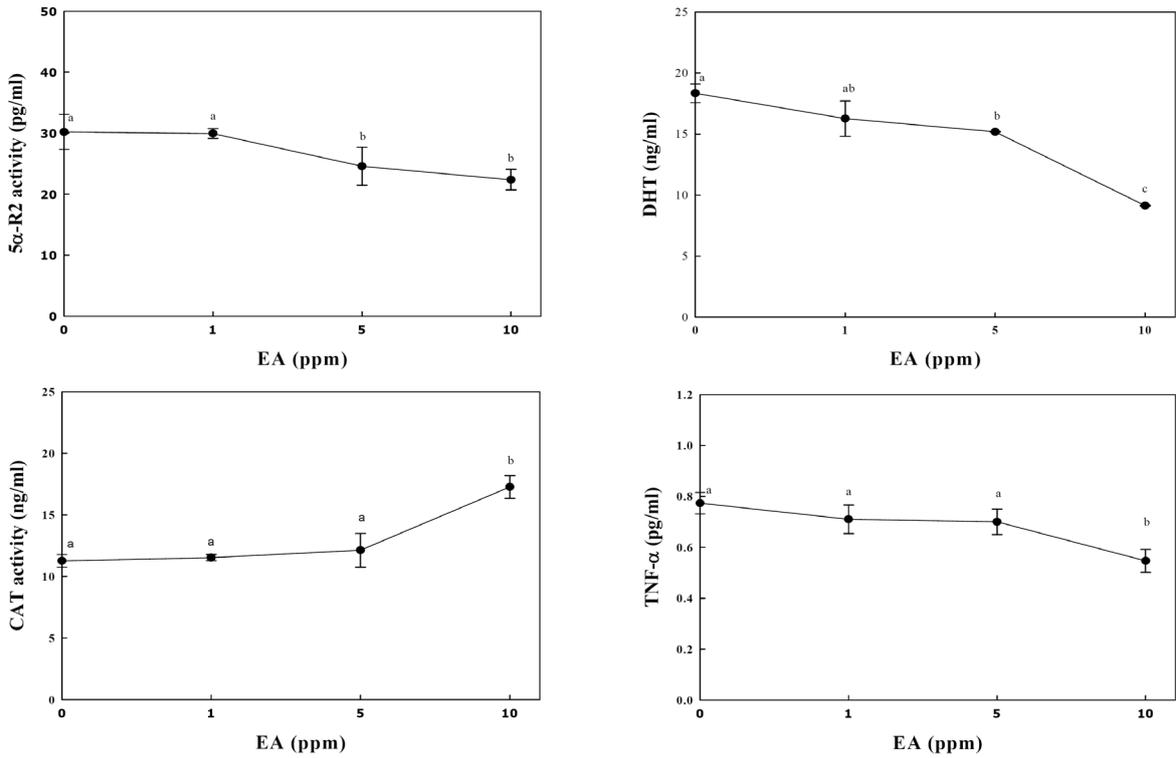


Fig. 3. Influence of EA on some biochemical markers related to BPH in RWPE-1 cells. Means with different small superscripts on the same line represent significantly difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

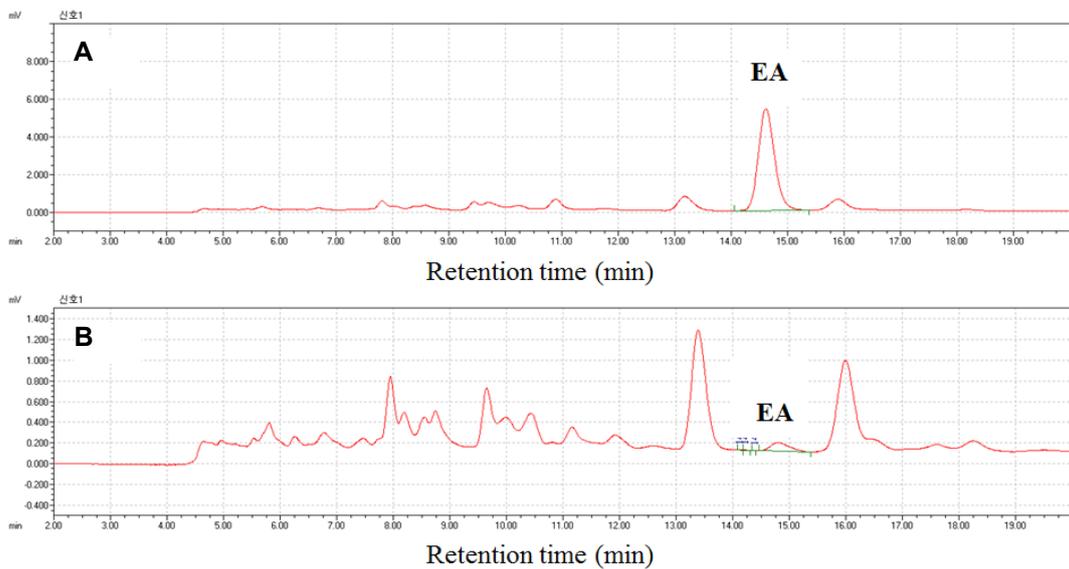


Fig. 4. Typical HPLC chromatograms of authentic EA (A) and EA from ABMLCE sample (A). Chromatograms were obtained using the Agilent Technologies 1200 series HPLC equipped with a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6x250 mm, 5 μm particle size) and detected at 260 nm [25].

EA는 RWPE-1 전립선세포의 항산화성(CAT 효소활성)과 항염증성(COX-2, TNF-α, IL-1β)을 증가시켰다(Fig. 4). EA는 지방간 및 혈중 콜레스테롤 개선효과[29], ACE 효소활성을 저해하여 혈압을 정상화하는 효과[1]와 TM3 cell에서 TS 생성

을 촉진하여 성기능 개선효과가 있다고 보고되었다[13,16]. ABMLCE에 EA가 AB자실체의 EA 함량(403 mg/100 g 건중) 보다는 낮지만, 15.3 mg/g 함유되어 있었다[1]. 따라서 EA가 ABMLCE의 RWPE-1 전립선세포에서 BPH 관련 biochemical

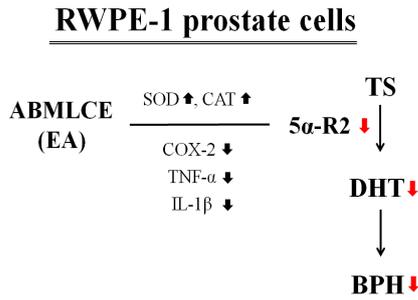


Fig. 5. Proposed mechanisms of BPH suppression by ABMLCE containing EA.

marker 개선 결과에 일부 기여하였을 것이다. 그러나 아직 RWPE-1 세포에서 EA의 항산화성 및 항염증성 효과 증가 이전에 관한 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

AB나 AB균사체 및 ABMLCE가 동물이나 전립선세포의 5α-R2 효소활성 억제에 관한 논문은 문헌상에 찾기 어렵다. 단지, *Lentinus edodes* (상황버섯) 추출물의 BPH에 미치는 영향에 관한 연구[15]와 *Ganoderma lucidum* (영지버섯)으로부터 분리된 triterpenoids의 5α-R1 효소활성 억제에 관한 보고가 있을 뿐이다[21]. 그리고 야콘에 함유된 polyphenol과 같은 물질들이 5αR 효소활성을 억제하여 BPH 증상 개선 효과가 보고되었다 [31, 34]. 따라서 본 연구의 ABMLCE가 RWPE-1 세포의 5α-R2 효소활성을 억제하여 DHT 생성을 억제하고, TS의 함량을 증가시킨 결과는 합성 FS를 BPH 치료제로 사용할 때 나타나는 부작용(성기능 저하와 TS 생산 저하로 인한 발기부전)을 보완할 수 있는 BPH 예방 및 치료제로 개발할 수 있음을 의미한다.

### 감사의 글

이 연구논문은 “2017년 중소기업벤처부 산연지원사업 (C0505034)”에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

### References

1. Afrin, S., Rakib, M. A., Kim, B. H., Kim, J. O. and Ha, Y. L. 2016. Eritadenine from edible mushrooms inhibits activity of angiotensin converting enzyme *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 2263-2268.
2. Al-Dbass, A. M., Al-Daihan, S. K. and Bhat, R. S. 2012. *Agaricus blazei* Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **19**, 303-309.
3. Biedron, R., Tangen, J. M., Maresz, K. and Hetland, G. 2012. *Agaricus blazei* Murill - immunomodulatory properties and health benefits. *Functional Foods Heal. Dis.* **2**, 428-447.
4. Bostanci, Y., Kazzazi, A., Momtahan, S., Laze, J. and Djavan, B. 2012. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Cuur. Opin. Urol.* **23**, 5-10.
5. Carvajal, A. E. S. S., Koehnlein, E. A., Soares, A. A., Eler, G.

- J., Nakashima, A. T. A., Bracht, A. and Peralta, R. M. 2012. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. *LWT - Food Sci. Technol.* **46**, 493-499.
6. Chughtai, B., Lee, R., Te, A. and Kaplan, S. 2011. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia. *Rev. Urol.* **13**, 147-150.
7. Cohen, N., Cohen, J., Asatiani, M. D., Varshney, V. K., Yu, H. T., Yang, Y. C., Li, Y. H., Mau, J. L. and Wasser, S. P. 2014. Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *Int. J. Med. Mushrooms* **16**, 273-291.
8. Firenzuoli, F., Gori, L. and Lombardo, G. 2007. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Adv. Access Public.* **27**, 3-15.
9. Friedman, M. 2016. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods* **5**, E80. doi:10.3390/foods5040080.
10. Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A. M. A. and Grinde, B. 2008. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *J. Scandinavian J. Immunol.* **68**, 363-370.
11. Hiipakka, R. A., Zhang, H. Z., Dai, W., Dai, Q. and Liao, S. 2002. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 alpha-reductase by polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 1165-1176.
12. Jang, J. H., Noh, K. H., Choi, J. N., Jin, K. S., Shin, J. H., On, J. H., Cho, C. W., Jeong, W. S., Kim, M. J. and Song, Y. S. 2010. Effect of *Hericium erinaceus* mycelia supplementation on the oxidative stress and inflammation processes stimulated by LPS and their mechanisms in BALB/C mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 227-236.
13. Kim, J. O. 2018. Composition for stimulating testosterone comprising eritadenine as effective component. KR10-2018-0001201.
14. Kim, M. S. and Cho, H. B. 2007. Immune enhancing effects of intracellular and extracellular polysaccharides extracted from mycelial cultivate of *Agaricus blazei* Murill. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 292-297.
15. Kim, Y. N. 2012. Effects of *Phellinus linteus* water extract on benign prostatic hyperplasia, acne symptoms and hair growth. Master thesis. International University of Korea.
16. Kim, Y. S., Jung, J. E., Moon, Y. K., Jeong, H. J., Kim, J. O. and Ha, Y. L. 2018. Enhancement of testosterone in TM3 Leydig cells by an eritadenine-containing *Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract. *J. Life Sci.* **28**, 648-655.
17. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsenper, J. P. F. G. and Griensven, L. J. L. D. V. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chem.* **129**, 1667-1675.
18. Kweon, M. H., Kwon, S. T., Kwon, S. H. and Park, Y. I.

2002. Lowering effects in plasma cholesterol and body weight by mycelial extracts of two mushrooms: *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 402-409.
19. Lee, J. Y., Kim, Y., Jun, W. and Lee, Y. H. 2015. Effect of hot water extract from *Curcuma longa* L. on inflammatory mediators in prostate tissue of BPH-induced rats. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **25**, 806-812.
20. Lepor, H. 2011. Medical treatment of benign prostatic hyperplasia. *Rev. Urol.* **13**, 20-33.
21. Liu, J., Kurashiki, K., Shimizu, K. and Kondo R., 2006. Structure-activity relationship for inhibition of 5 $\alpha$ -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 8654-8660.
22. Maja, K., Anita, K., Miomir, N., Dragica, J., Johannes, P. F. G., Helsper, C., Leo, J. L. D. and Van Griensven, C. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chem.* **129**, 1667-1675.
23. Mau, J. L., Lin, H. C. and Chen, C. C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6072-6977.
24. 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**, 249-54.
25. Moon, Y. K., Jung, J. E., Cho, B. I., Heo, J. D., Choi, J. I., Kim, J. O. and Ha, Y. L. 2018. Blood pressure reduction of SHR treated with EA-containing *Lentinus edodes* mycelial solid culture extract. *J. Life Sci.* **28**, 187-194.
26. Mysore, V. 2012. Finasteride and sexual side effects. *Indian Dermatol. Online J.* **3**, 62-65.
27. Nadler, R. B., Koch, A. E., Calhoun, E. A., Campbell, P. L., Pruden, D. L., Bennett, C. L., Yarnold, P. R. and Schaeffer, A. J. 2000. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *J. Urol.* **164**, 214-218.
28. Nickel, J. C. 2015. Role of prostatic inflammation in the clinical presentation of benign prostatic hyperplasia. *Eur. Assoc. Urol.* **14**, 1459-1463.
29. Oh, S. W., Lee, C. U. and Koh, J. B. 2004. Effects of liquid culture of *Agaricus blazei* Murill on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 821-826.
30. Okumura, K., Matsumoto, K., Fukamizu, M., Yasuo, H. and Taguchi, Y. 1974. Synthesis and hypocholesterolemic activities of eritadenine derivatives. *J. Med. Chem.* **17**, 846-855.
31. Park, J. S., Lee, T. W., Park, B. S., Han, S. B., Hong, J. T. and Han, K. 2014. Ameliorative effect of yacon containing herbal mixture against benign prostatic hyperplasia symptoms. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 233-239.
32. Park, W. S., Son, E. D., Nam, G. W., Kim, S. H., Noh, M. S., Lee, B. G., Jang, I. S., Kim, S. E., Lee, J. J. and Lee, C. H. 2003. Torilin from *Torilis japonica*, as a new inhibitor of testosterone 5  $\alpha$ -reductase. *Planta Med.* **69**, 459-461.
33. Savas, M., Verit A., Ciftci, E., Topal, U. and Erel, O. 2009. Oxidative stress in BPH. *J. Nepal Med. Assoc.* **48**, 41-45.
34. Simonovska, B., Vovk, I., Andrenek, S., Valentov, K. and Ulrichov, J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *J. Chrommatogr. A* **1016**, 89-98.
35. Sun, J., Xiang, H., Yang, L. L. and Chen, J. B. 2011. A review on steroidal 5 $\alpha$ -reductase inhibitors for treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr. Med. Chem.* **18**, 3576-3589.
36. Suzuki, M., Ito, Y., Fugino, T., Abe, M., Umegaki, K., Onoue, A., Noguchi, H. and Yamada, S. 2009. Pharmacological effects of saw palmetto extract in the lower urinary tract. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 271-281.
37. Yoon, K. N., Jang, H. S. and Jin, G. H. 2015. Antioxidant, anti-diabetic, anti-cholinesterase, and nitric oxide inhibitory activities of fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis*. *Kor. J. Clin. Lab. Sci.* **47**, 194-202.

## 초록 : RWPE-1 전립선세포에서 eritadenine을 함유한 신령버섯균사체 액체배양물의 항염증효과 및 항산화효과에 의한 전립선비대증 관련 biochemical marker 개선 효과

하영래<sup>1\*</sup> · 문연규<sup>2</sup> · 김나현<sup>2</sup> · 허정두<sup>2</sup> · 조민정<sup>1</sup> · 김예라<sup>1</sup> · 김영숙<sup>1</sup> · 김정옥<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>HKBiotech 항노화연구소, <sup>2</sup>한국독성연구소 경남환경독성본부)

신령버섯균사체 액체배양 추출물(*Agaricus blazei* mycelial liquid culture extract, ABMLCE)은 TM-3 mouse Leydig 고환세포에서 testosterone (TS)의 생성을 촉진하였다. 이번 연구에서는 eritadenine (EA, 15.3 mg/100 g)을 함유한 ABMLCE가 RWPE-1 전립선세포에서 전립선비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH) 관련 핵심 효소인 5 $\alpha$ -reductase 2 (5 $\alpha$ -R2) 활성과 dihydrotestosterone (DHT) 함량을 감소시켰음을 보고한다. RWPE-1 전립선세포는 24-well plate에서 ABMLCE (0~50 ppm), EA (0~10 ppm), finasteride (FS 10  $\mu$ M: positive Control)를 함유한 Keratinocyte serum-free medium (K-SFM)에서 24시간 배양하였다. 시료처리 세포배양액에 대해 5 $\alpha$ -R2, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), cyclooxygenase-2 (COX-2) 효소활성, TS, DHT, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )를 assay kit를 사용하여 분석하였다. 5 $\alpha$ -R2 활성과 DHT 함량은 ABMLCE의 농도 의존적으로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소되었고, SOD와 CAT 효소활성은 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다. 반면에 COX-2 활성과 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 함량은 감소되었다( $p < 0.05$ ). 마찬가지로 EA의 효과도 ABMLCE 효과와 유사하였다. ABMLCE 50 ppm과 EA 10 ppm의 5 $\alpha$ -R2 및 DHT 감소효과는 FS 10  $\mu$ M 효과와 유사하였다. 이들 결과는 ABMLCE와 EA는 항염증효과와 항산화효과를 통하여 BPH 유발 핵심 인자인 5 $\alpha$ -R2 효소활성과 DHT 함량을 감소시켰다. 또한 이 결과는 EA를 함유하는 ABMLCE는 인체 BPH 개선 소재로 활용할 수 있음을 의미한다.