

# 산수유 추출물에 의한 LNCaP 전립선 세포의 증식 억제 및 양성 전립선 비대증 유발 인자의 발현에 미치는 영향

김민영<sup>1,2</sup> · 지선영<sup>1,2</sup> · 황보현<sup>1,3</sup> · 이혜숙<sup>1,2</sup> · 홍수현<sup>1,2</sup> · 최영현<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>2</sup>동의대학교 항노화연구소, <sup>3</sup>부산대학교 한국나노바이오테크놀로지센터

## Inhibition of Proliferation of LNCaP Prostate Cells by Corni Fructus Extract Is Associated with a Decrease in the Expression of Benign Prostatic Hyperplasia-Causing Factors

Min Yeong Kim<sup>1,2</sup>, Seon Yeong Ji<sup>1,2</sup>, Hyun Hwangbo<sup>1,3</sup>, Hyesook Lee<sup>1,2</sup>, Su Hyun Hong<sup>1,2</sup>, Yung Hyun Choi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, <sup>2</sup>Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, <sup>3</sup>Korea Nanobiotechnology Center, Pusan National University

Received: April 28, 2021

Revised: May 26, 2021

Accepted: June 4, 2021

**Correspondence to:** Yung Hyun Choi  
Department of Biochemistry,  
Dong-eui University College of Korean  
Medicine, 52-57 Yangjeong-ro,  
Busanjin-gu, Busan 47227, Korea  
Tel: +82-51-890-3319  
Fax: +82-51-890-3333  
E-mail: choiyh@deu.ac.kr

Copyright © 2021 by The Society of Korean  
Medicine for Obesity Research

**Objectives:** Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a progressive pathological condition characterized by excessive proliferation of the prostate. In this study, we evaluated the effect of Corni Fructus water extract (CF) on the promotion of prostate cell proliferation by dihydrotestosterone (DHT).

**Methods:** The effect of CF on the proliferation of LNCaP prostate cells was evaluated, and DHT was treated to induce an *in vitro* BPH model. To study the mechanism of inhibition of cell proliferation and BPH by CF, changes in the expression of key factors related to cell cycle and BPH were investigated. We further investigated the effect on the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory efficacy of CF.

**Results:** Inhibition of LNCaP cell proliferation by CF was associated with decreased expression of cyclin D1 and cyclin A and increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21. CF also suppressed expression of BPH inducing factors such as 5 $\alpha$ -reductase type 2 and androgen receptor (AR) as well as prostate specific antigen (PSA). Furthermore, CF significantly blocked DHT-induced LNCaP cell proliferation and effectively attenuated DHT-induced expression of BPH mediators and cyclins. In addition, CF inhibited DHT-induced oxidative and inflammatory reactions by inhibiting production of ROS and NO.

**Conclusion:** Our results demonstrated that CF probably acted as 5 $\alpha$ -reductase type 2 inhibitor, preventing the 5 $\alpha$ -reductase type 2-AR signaling pathway, thereby reducing the conversion of testosterone to DHT and the expression of PSA, which is at least correlated with the antioxidant and anti-inflammatory activities of CF.

**Key Words:** Corni Fructus, Benign prostatic hyperplasia, LNCaP cells, 5 $\alpha$ -reductase type 2, Prostate-specific antigen

## 서론

가장 대표적인 전립선 질환 중의 하나인 양성 전립선 비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)은 노화와 함께

그 발병 빈도가 증가한다<sup>1,2)</sup>. 최근 연구 동향에 의하면 BPH 유발은 전립선 질환뿐만 아니라 비만과도 직접적인 상관관계를 보이며, 특히 내장 비만, 인슐린 저항성, 죽상 경화성 이상 지혈증(atherogenic dyslipidemia), 내피 기능

장애, 전신 염증 등과 관련된 대사증후군의 유병률 증가와 연관성이 있음이 보고되고 있다<sup>3,4</sup>). BPH의 초기 단계에서는 비대해진 전립선이 방광을 압박하여 야간뇨, 지연뇨, 빈뇨 등을 포함하는 하부 요로 증상(lower urinary tract symptoms) 등이 나타나지만 전립선 비대가 진행됨에 따라 반복적인 요로 감염 및 요로 폐색으로 인한 방광과 신장 기능의 손상으로 이어진다<sup>1,2</sup>). 전립선의 성장과 기능 유지에 androgen이 필수적이지만 노화에 따라 성호르몬의 불균형으로, 특히 testosterone의 농도가 감소하면서 5 $\alpha$ -reductase의 활성은 높은 수준으로 유지된다. 이로 인하여 testosterone이 androgen receptor (AR)에 대한 친화력이 더욱 높은 dihydrotestosterone (DHT)으로 전환되며 DHT 수치는 BPH 환자에서 정상 남성에 비하여 높은 수준으로 존재한다<sup>3,5</sup>). DHT는 AR 및 steroid receptor coactivator 1 (SRC1)에 결합하여 전립선 세포의 증식을 유도하며<sup>5</sup>, AR과의 결합으로 prostate specific antigen (PSA) 발현 수준 또한 증가시킨다<sup>3,5</sup>). 따라서 5 $\alpha$ -reductase는 BPH의 발달에 크게 기여하는 핵심 인자로 작용하며 5 $\alpha$ -reductase 저해제인 항안드로젠성 약물(anti-androgenic drug) 또는  $\alpha$  차단제( $\alpha$ 1-AR antagonist)인 항아드레날린성 수용체 약물이 현재 BPH 치료에 널리 사용된다<sup>6</sup>). 예를 들어 finasteride와 같은 5 $\alpha$ -reductase 저해제는 testosterone에서 DHT로의 전환을 차단하여 AR과의 결합을 억제하고 BPH 환자에서 PSA 수준을 감소시킨다<sup>7,8</sup>). 그러나 5 $\alpha$ -reductase 저해제는 식욕 부진, 발기 부전 또는 사정 장애를 포함한 다양한 성기능 부작용을 유발하고<sup>9,10</sup>)  $\alpha$  차단제는 전립선 및 방광의 평활근을 이완시켜 소변 흐름을 돕는 능력 때문에 BPH 치료에 유용하지만 전립선 비대를 직접 완화시키지는 못한다<sup>11,12</sup>). 아울러 산화적 및 염증성 스트레스는 BPH의 개시와 진행에서 중요한 신호 분자로서 작용할 수 있기 때문에<sup>13,14</sup>) 항산화 및 항염증성 효능이 뛰어나며 부작용이 적은 전통의약 소재는 BPH 제어를 위한 후보 소재로서의 잠재력이 매우 높다<sup>7,15</sup>).

산수유(山茱萸, Corni Fructus)는 층층나무과(Cornaceae)에 속한 낙엽소교목인 산수유나무(*Cornus officinalis* Sieb. et. Zucc.)의 잘 익은 열매로 성(性)은 미온(微溫)하고, 미(味)는 산삼(酸澁)하다<sup>16</sup>). 간(肝)과 신(腎)으로 귀경(歸經)하여 보익간신(補益肝腎)하고 삼정고탈(澁情固脫) 및 럽한(斂汗)하는 효능이 있어 현훈이명(眩暈耳鳴), 요슬산통(腰膝酸痛), 양위유정(陽痿遺精), 유뇨(遺尿), 뇨의빈삭(尿

意頻數), 붕루(崩漏), 대하(帶下), 대한허탈(大汗虛脫), 내열소갈(內熱消渴) 등을 치료하기 위해 사용되어 왔다<sup>17,18</sup>). 아울러 최근 연구들에 의하면 산수유에는 loganin, morroniside, gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural과 함께 다양한 polysaccharide가 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다<sup>17,19</sup>). 또한 산수유 추출물과 이들 구성 성분들은 면역 증진, 항산화, 항염증, 항암, 항당뇨, 골다공증 등을 포함한 광범위한 약리적 효능이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>17,18,20,21</sup>). 최근 본 연구실에서는 산수유 열수 추출물(Corni Fructus water extract, CF)이 testosterone에 의해 유발된 *in vivo* BPH 모델에서 증가된 전립선 무게와 조직병리학적 변화를 억제하였음을 보고한 바 있다<sup>22</sup>). 본 연구에서는 이를 바탕으로 *in vitro* 모델에서 전립선 세포의 증식 억제 및 DHT에 의한 증식 촉진에 미치는 CF의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 *in vitro* 전립선 모델로 가장 널리 사용되고 있는 LNCaP 전립선 세포를 이용하였으며, CF에 의한 LNCaP 세포의 증식에는 BPH 유발 관련 인자들의 발현 억제와 연관성이 있음을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

본 연구에서 사용된 인간 전립선 세포(LNCaP)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. LNCaP 세포는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640; WELGENE Inc., Daegu, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS; WELGENE Inc.)과 100 unit/ml penicillin/streptomycin (P/S; WELGENE Inc.)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다.

### 2. 산수유 추출물의 준비

본 연구에 사용된 산수유는 2018년 전라남도 구례시 주변에서 채취된 것으로서 구례산수유영농조합법인으로부터 제공받았다. 산수유 열수 추출물(CF)은 선행 방법에 준하여 건조된 산수유를 마쇄하여 증류수에서 2시간 동안 끓인 후 0.45  $\mu$ m 필터를 이용하여 불용성 성분을 제거하고, 동결 건조 후 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다<sup>22</sup>). 획득 수율은 23.5% 정도였으며 바우처 표본(WECU-17-2)이 동의대학교 한의과대학 생화학교실에 보관 중이다.

### 3. 세포생존을 측정

CF 단독 및 DHT (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와의 동시 처리에 따른 세포독성을 평가를 위하여 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. 이를 위하여 6 well plate에 well 당 LNCaP 세포를  $7 \times 10^4$ 씩 분주하여 24시간 안정화시켰다. 이후 100 unit/ml P/S가 포함된 세포 배양 용 배지로 교체 후 24시간 동안 배양하고 CF를 다양한 농도로 처리하거나, 배지에 5%의 FBS와 100 unit/ml의 P/S가 포함된 배지를 사용하여 DHT 처리하기 한시간 전에 CF를 농도별로 처리하였다. 48시간 배양 후 각 well에 0.5 mg/ml의 MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액을 첨가 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시켰다. 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 넣어 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 세포독성 평가는 대조군 대비 처리군의 흡광도를 기준으로 백분율로 환산하여 나타내었다.

### 4. 세포주기 변화의 분석

CF 단독 및 DHT와 동시 처리된 조건에서 배양된 LNCaP 세포의 세포주기 분포도 변화 관찰을 위하여 Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하였다. 준비된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척 후 제시된 protocol에 따라 고정 후 4°C, 암실에서 30분 동안 propidium iodide (PI) 용액과 반응시켰다. 이들 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일 세포로 분리하고 실험군당 최소 10,000개 이상의 세포를 flow cytometer (Becton Dickinson)에 적용시켜 세포 내 DNA 함량에 따른 histogram을 대상으로 세포주기 각 기에 속하는 세포의 빈도를 산출하였다.

### 5. 세포사멸(apoptosis)의 정량적 분석

동일 조건에서 배양된 LNCaP 세포에서 유발된 apoptosis 정도의 정량적 분석을 위하여 Annexin-V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 준비된 세포를 PBS로 세척하고, kit에 제공된 binding buffer를 첨가한 후 annexin V-fluorescein isothiocyanate와 PI를 처리하여 암실에서 반응시켰

다. 15분 후 binding buffer를 추가하여 반응시킨 후 flow cytometer를 이용하여 세포사멸 유도 빈도를 측정하였다.

### 6. Western blot analysis

CF 단독 또는 DHT와 CF가 동시에 처리된 세포들을 수집한 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 얻어진 세포 pellet에 1X lysis buffer (25 mM Tris-Cl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 14,000 rpm, 4°C, 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 포함된 단백질의 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였고, 동량의 Laemli sample buffer (Bio-Rad Lab.)를 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 이를 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용한 전기영동으로 분리하고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 그 후 30분간 membrane에 5% skim milk를 처리한 후 1차 항체를 처리하여 4°C에서 over night시켰다. 그 후 1x PBS-T (PBS with Tween 20)로 10분간 3회 세척하고, 적정 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 1x PBS-T로 세척 후 Chemi-Smart 5000 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France)를 이용하여 조사 대상 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 각 단백질 밴드의 발현 값은 ImageJ® software (v1.48; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량화하였다.

### 7. Reactive oxygen species (ROS) 생성의 측정

LNCaP 세포에서 DHT에 의한 ROS 생성에 미치는 CF의 영향을 조사하기 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 적용하였다. 이를 위하여 0.6 mg/ml의 CF를 1시간 전 처리한 후 10 nM의 DHT를 1시간 처리하여 세포를 배양하였다. 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 10  $\mu$ M의 DCF-DA (Invitrogen)를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20분간 반응시키고, flow cytometer (BD Accuri C6 flow cytometer; BD Biosciences)를 이용하여 ROS 생성 변화 여부를 평가하였다.

## 8. Nitric oxide (NO) 생성의 측정

DHT로 자극된 LNCaP 세포로부터 생성되는 NO에 미치는 CF의 영향을 조사하기 위하여 Griess reagent를 사용하였다. 이를 위하여 LNCaP 세포에 10 nM의 DHT를 단독으로 24시간 처리하거나 0.6 mg/ml의 CF를 1시간 전처리한 후 DHT가 존재하는 배지에서 24시간 배양하였다. 그 후 세포 배양 상등액 100 µl와 Griess 시약(Sigma-Aldrich Chemical Co.) 100 µl를 혼합하여 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DHT에 의한 NO 생성의 CF 저해 정도를 평가하기 위하여 sodium nitrite의 농도별 표준 곡선을 이용하여 NO 농도를 산출하였다.

## 9. 통계 분석

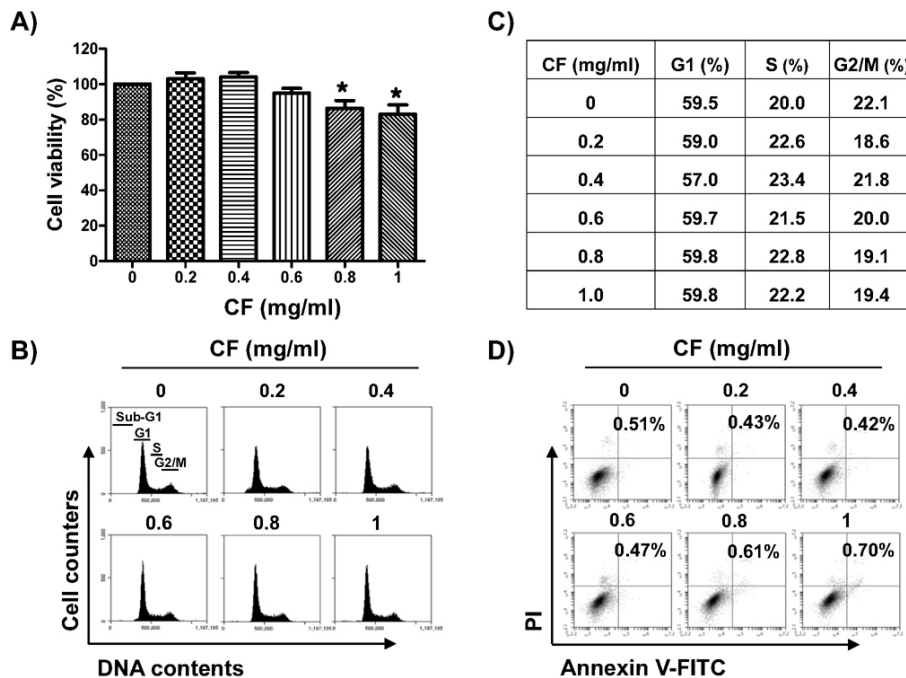
본 연구에서 얻어진 실험 결과의 유의성 분석을 위하여 GraphPad Prism 5.03 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 평균

±표준 편차(standard errors)로 표시하였으며, one-way analysis of variance에 이어 Tukey's post hoc 테스트로 분석하여 0.05 미만의 값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결과

### 1. LNCaP 세포 증식에 미치는 CF의 영향

LNCaP 세포 증식에 미치는 CF의 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 CF가 48시간 처리된 LNCaP 세포를 대상으로 MTT assay를 수행하였다. Fig. 1A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 0.6 mg/ml 농도까지의 CF가 처리된 세포에서는 유의적인 증식 억제 현상이 관찰되지 않았지만 그 이상의 농도에서는 처리 농도 의존적으로 세포 증식이 억제되었으며, 특히 1 mg/ml의 CF 처리군에서는 대조군 대비 18% 정도의 생존력 저하가 관찰되었다. 이러한 CF에 의한 증식 억제가 LNCaP 세포의 세포주기 변화



**Fig. 1.** Effect of CF on the cell proliferation and apoptosis of LNCaP cells. Cells were treated with the indicated concentrations of CF for 48 h. (A) Cell viability was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Data are expressed as the mean±standard errors (n=3). The statistical analysis was conducted using analysis of variance between groups (\*P<0.05 when compared to control). (B and C) After 48 h treatment with increasing concentrations of CF, cells were stained with PI. The cell DNA was analyzed by flow cytometry. (B) Representative histograms are presented. (C) The average values of the cell frequency corresponding to each phase of the cell cycle are shown. (D) Cell apoptosis was detected by flow cytometry following annexin-V and PI double staining. The frequencies of apoptosis positive cells were quantified by expressing the number of annexin V-positive cells. CF: Corni Fructus water extract, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, PI: propidium iodide.

에 미치는 영향을 조사한 결과, 모든 CF 처리군에서 세포주기 특이적인 정지(arrest) 현상 및 apoptosis가 유발된 세포 집단을 의미하는 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도는 관찰되지 않았다(Fig. 1B, C). 아울러 annexin V/PI 염색에 의한 유세포 분석의 결과에서도 대조군에서는 약 0.51% 정도의 세포에서 apoptosis가 유발되었으나, 0.8 및 1.0 mg/ml의 CF 처리군에서는 0.61% 및 0.70%로 나타나 apoptosis가 유발되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 1D).

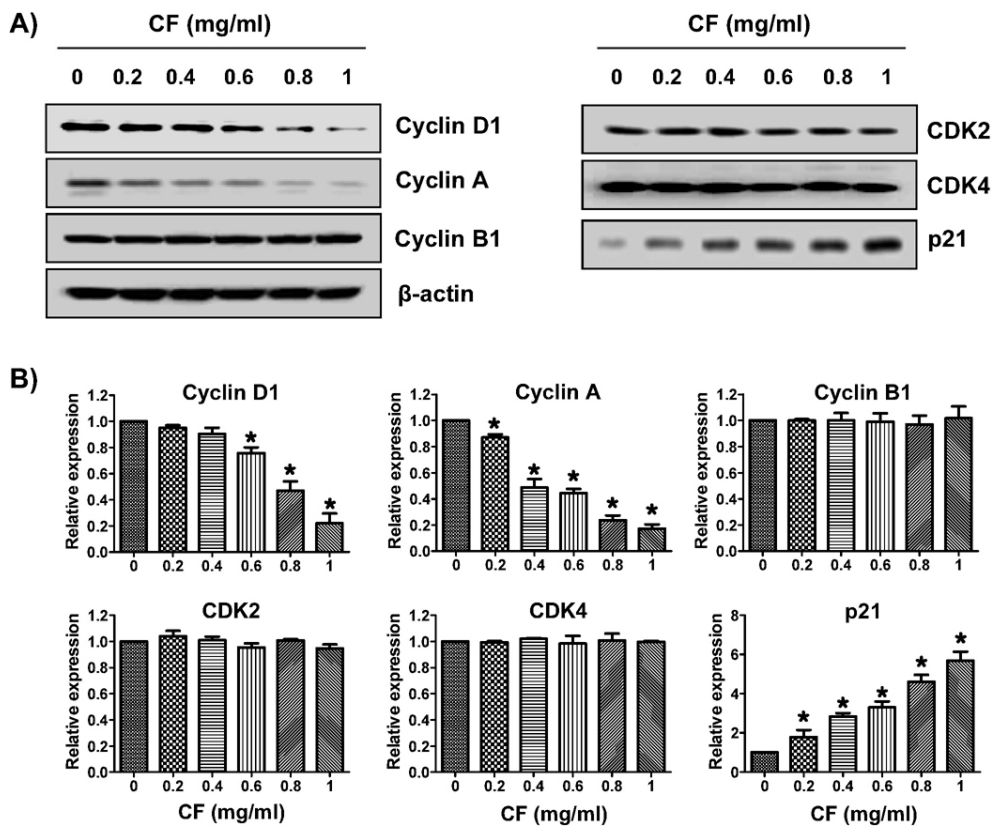
## 2. LNCaP 세포의 세포주기 조절인자들의 발현에 미치는 CF의 영향

동일 조건에서 세포주기 조절에 관여하는 다양한 인자들의 발현에 미치는 CF의 영향을 조사하기 위하여 Western blotting을 수행하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 세포주기 G1의 진행에 중

요한 역할을 하는 cyclin D1의 발현과 S기에서 G2기로의 진행에 관여하는 cyclin A의 발현이 대조군 대비 1.0 mg/ml의 CF 처리군에서 각각 80% 및 82% 정도로 현저하게 감소된 반면 G2/M기 전이에 요구되는 cyclin B1의 발현과 cyclin-dependent kinase (CDK) 4, CDK6의 발현은 대조군 수준으로 유지되었다. 반면, 대표적인 CDK 억제제인 p21의 발현은 CF 처리 농도 의존적으로 현저하게 증가되어 대조군 대비 0.6 및 1.0 mg/ml의 CF 처리군에서 3.3배 및 5.8배 이상 증가하였다.

## 3. LNCaP 세포의 BPH 조절인자들의 발현에 미치는 CF의 영향

CF 처리에 따른 LNCaP 세포의 증식 억제와 연관된 BPH 조절 관련 유전자들의 변화를 분석을 위하여 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1, arylhydrocarbon receptor nuclear trans-



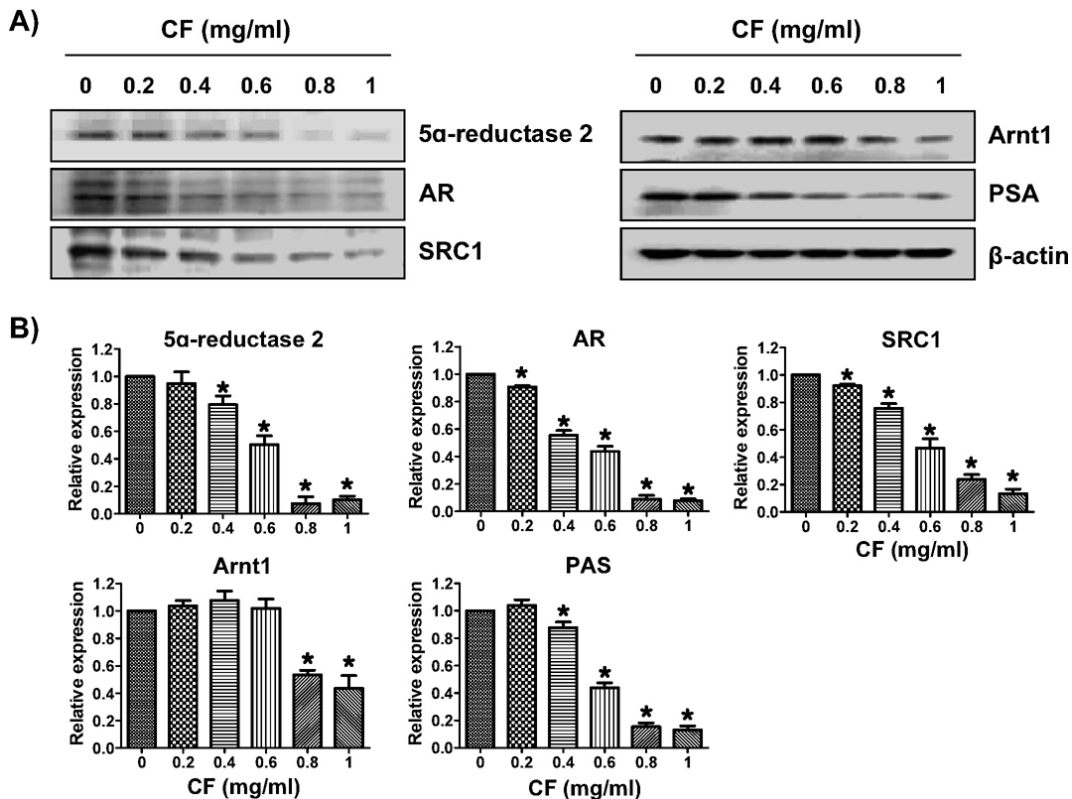
**Fig. 2.** Effect of CF on the expression of cell cycle regulators in LNCaP cells. Cells were treated with the indicated concentrations of CF for 48 h. (A) Total cell lysates were prepared. Western blotting was then performed using the indicated antibodies and an enhanced chemiluminescence detection system.  $\beta$ -actin was used as an internal control. (B) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ<sup>®</sup> software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The results are presented as the mean $\pm$ standard errors (n=3, \*P<0.05 when compared to control). CF: Corni Fructus water extract, CDK: cyclin-dependent kinase.

locator 1 (Arnt1) 및 PSA의 발현을 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 3에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 CF 처리 농도의 증가에 따라 5 $\alpha$ -reductase type 2의 경우 대조군 대비 0.6 및 1.0 mg/ml의 CF 처리군에서 50% 및 90% 정도 감소하였다. AR, SRC1 및 Arnt1의 경우도 이와 유사한 발현 감소를 보여주었으며, PSA의 발현 0.4 mg/ml 농도의 CF 처리군에서부터 억제되는 경향성을 보여주었다. 대조군 대비 0.6 및 1.0 mg/ml의 CF 처리군에서 50% 및 80% 이상 감소하였다.

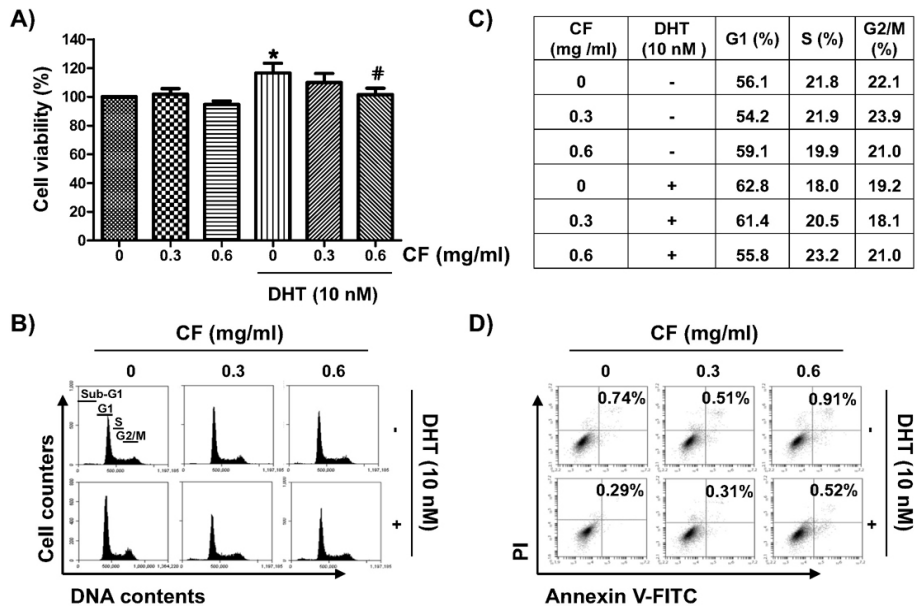
#### 4. DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 촉진에 미치는 CF의 영향

이상의 결과를 바탕으로 *in vitro* BPH 유도 모델에서 CF의 효능을 검증하기 위하여 DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 촉진에 미치는 CF의 영향을 조사하였다. 이를 위

하여 대조군 대비 120% 정도의 증식 촉진 효과를 보이는 DHT의 농도(10 nM)를 설정하였으며(Fig. 4A), DHT 처리 1시간 후 세포독성이 없는 범위에서 CF를 48시간 처리 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 4A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 CF는 DHT 처리에 의하여 증가된 세포의 증식을 0.3 및 0.6 mg/ml의 CF 전처리군에서 각각 10% 및 17% 정도로 억제하였다. 그리고 세포주기 분석 결과 DHT 단독 처리군에서는 G1기에 속하는 세포의 빈도가 약간 상승한 반면(62.8%), G2/M기에 속하는 세포의 빈도(19.2%)는 약간 감소되었지만 이러한 변화는 CF 처리 농도 의존적으로 점차 대조군 수준으로 회복되어 0.6 mg/ml의 CF 전처리군에서 각각 55.8% 및 21.0%로 나타났다(Fig. 4B, C). 아울러 이러한 모든 조건에서 apoptosis 유발은 관찰되지 않았다(Fig. 4D).



**Fig. 3.** Effect of CF on the expression of BPH regulators in LNCaP cells. Cells were treated with the indicated concentrations of CF for 48 h. (A) Total cell lysates were prepared. Western blotting was then performed using the indicated antibodies and an enhanced chemiluminescence detection system.  $\beta$ -actin was used as an internal control. (B) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ<sup>®</sup> software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The results are presented as the mean $\pm$ standard errors (n=3, \*P<0.05 when compared to control). CF: Corni Fructus water extract, BPH: benign prostatic hyperplasia, AR: androgen receptor, SRC1: steroid receptor coactivator 1, Arnt1: arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 1, PSA: prostate specific antigen.



**Fig. 4.** Effect of CF on cell proliferation and apoptosis of DHT-treated LNCaP cells. Cells were pre-treated with or without the indicated concentrations of CF for 1 h before 10 nM DHT treatment for 48 h. (A) Cell viability was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Data are expressed as the mean±standard errors (n=3, \*P<0.05 when compared to control; #P<0.05 when compared to the control DHT-treated cells). (B and C) After pre-treatment with or absence of DHT, cells were stained with PI. The cell DNA was analyzed by flow cytometry. (B) Representative histograms are presented. (C) The average values of the cell frequency corresponding to each phase of the cell cycle are shown. (D) Cell apoptosis was detected by flow cytometry following annexin-V and PI double staining. The frequencies of apoptosis positive cells were quantified by expressing the number of annexin V-positive cells. CF: Corni Fructus water extract, DHT: dihydrotestosterone, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide, PI: propidium iodide.

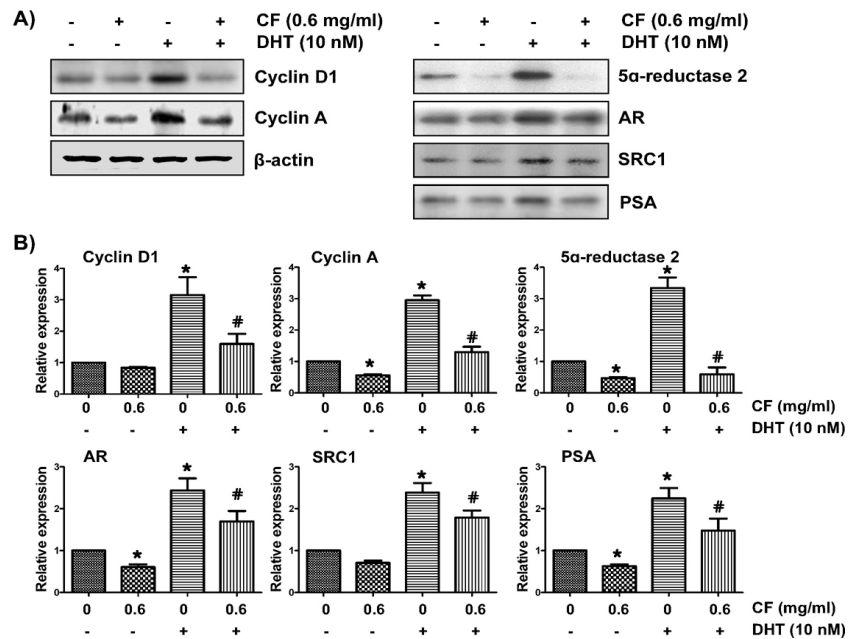
### 5. LNCaP 세포에서 DHT에 의한 세포주기 및 BPH 조절인자 발현 변화에 미치는 CF의 영향

DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 촉진에서 세포주기 조절 관련 유전자들의 발현에 미치는 CF의 영향을 조사하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 DHT가 단독으로 처리된 LNCaP 세포에서 cyclin D1과 cyclin A의 발현은 대조군 대비 각각 3배 이상 현저하게 증가하였으며, 이는 DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 촉진과 연관성이 있을 것으로 생각한다. 그러나 DHT에 의한 cyclin D1 및 cyclin A의 발현 증가는 CF가 존재하는 DHT 처리군 대비 각각 1.7배 및 1.4배 정도 감소하였다. 아울러 DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 촉진 과정에서 BPH 조절 관련 주요 유전자들의 발현을 조사한 결과, 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1 및 PSA의 발현이 DHT가 단독 처리된 LNCaP 세포에서 모두 발현이 증가하였다. 특히 5 $\alpha$ -reductase type 2는 대조군 대비 약 3.3배 이상 증가하였으며 AR, SRC1 및 PSA 발현의 경우는 모두 2.5배 정도로 증가하였다. 그러나 CF가 존재하는 조건에서는 DHT에 의한 5 $\alpha$ -reductase type 2의 발현 증가는 대조군 수준으로 유지되었고 AR,

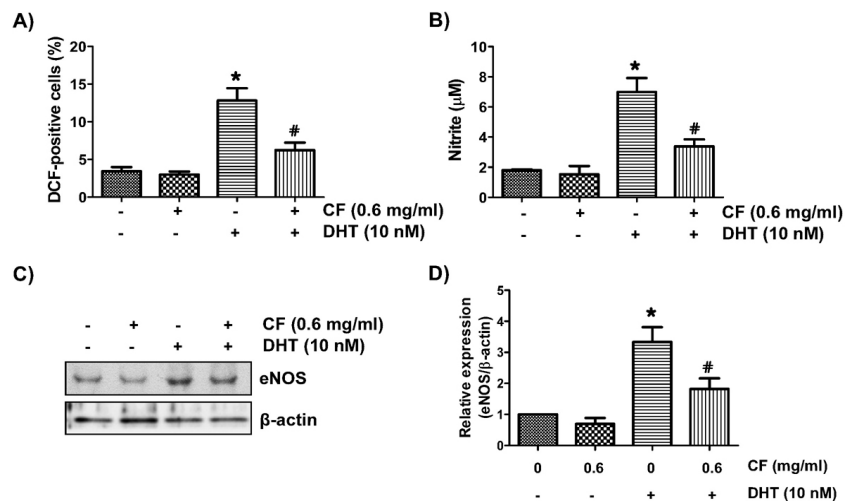
SRC1 및 PSA의 발현 또한 유의적으로 억제되었다.

### 6. LNCaP 세포에서 DHT에 의한 산화적 및 염증성 스트레스 반응에 미치는 CF의 영향

이상의 결과에서 관찰된 CF의 효능이 항산화 및 항염증 활성과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 ROS 및 NO의 생성에 미치는 CF의 영향을 조사하였다. Fig. 6A에 나타난 바와 같이 DHT가 단독 처리된 LNCaP 세포에서는 ROS 생성은 대조군(3.2%)에 비하여 4배 이상 증가(13.14%)하였으나, CF가 존재하는 조건에서는 DHT 처리군과 비교하여 50% 정도의 ROS 생성 억제(6.14%) 효과를 보였다. 아울러 NO의 경우, DHT가 단독 처리된 세포에서는 대조군 대비 3.25배 이상 증가되었으나, CF의 전처리군에서는 DHT 단독 처리군에 비하여 50% 이상의 유의적인 억제가 관찰되었으며(Fig. 6B), 이는 endothelial nitric oxide synthetase (eNOS)의 발현 수준 변화와 유사한 경향성을 보여 CF에 의한 NO 생성의 억제에는 최소한 eNOS 발현 억제와 연관성이 있을 것으로 추측된다(Fig. 6C, D).



**Fig. 5.** Effect of CF on the expression of cell cycle and BPH regulators in LNCaP cells. Cells were pre-treated with or without 0.6 mg/ml CF for 1 h before 10 nM DHT treatment for 48 h. (A) Total cell lysates were prepared. Western blotting was then performed using the indicated antibodies and an enhanced chemiluminescence detection system.  $\beta$ -actin was used as an internal control. (B) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ<sup>®</sup> software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The results are presented as the mean $\pm$ standard errors (n=3, \*P<0.05 when compared to control; #P<0.05 when compared to DHT-treated cells). CF: Corni Fructus water extract, BPH: benign prostatic hyperplasia, DHT: dihydrotestosterone, AR: androgen receptor, SRC1: steroid receptor coactivator 1, PSA: prostate specific antigen.



**Fig. 6.** Effect of CF on the production of ROS and NO in DHT-stimulated LNCaP cells. Cells were pre-treated with or without 0.6 mg/ml CF for 1 h before 10 nM DHT treatment for 1 h (A) or 48 h (B-D). The cells were incubated at 37°C in the dark for 20 min with a culture medium containing 10  $\mu$ M DCF-DA to monitor ROS production. (A) The degree of ROS production was measured with a flow cytometer. Quantitative data of DCF-DA intensity of CF-treated cells with or without 10 nM DHT. (B) The nitrite concentration in culture media was evaluated by Greiss reaction. (C) Total cell lysates were prepared. Western blotting for eNOS was then performed using an enhanced chemiluminescence detection system.  $\beta$ -actin was used as an internal control. (D) The expression of eNOS protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ<sup>®</sup> software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The results are presented as the mean $\pm$ standard errors (n=3, \*P<0.05 when compared to control; #P<0.05 when compared to DHT-treated cells). CF: Corni Fructus water extract, ROS: reactive oxygen species, NO: nitric oxide, DHT: dihydrotestosterone, DCF-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, eNOS: endothelial nitric oxide synthetase.



## 고찰

본 연구에서는 산수유 열수 추출물(CF)에 의한 양성 전립선 비대증(BPH) 억제 효능을 조사하기 위하여 LNCaP 세포의 증식에 미치는 CF의 영향을 먼저 조사하였다. 본 연구 결과에 의하면 0.8 mg/ml 이상의 CF가 처리된 LNCaP 세포에서는 유의적인 생존율 저하를 보였지만 apoptosis가 유도되지 않았으며, 이는 세포주기 정지 현상과도 무관함을 알 수 있었다. 세포는 분열하기 위하여 DNA 합성 및 중심체 복제를 위한 G1/S기 단계에 진입한 후 유사 분열 준비 및 세포 분열을 위해 G2/M기 단계로 진입하여야 한다<sup>23,24</sup>. 이러한 세포주기의 진행은 CDK 저해제를 포함한 세포주기 음성 조절인자와 cyclins 및 CDKs와 같은 양성 조절인자와의 상호 작용에 의해 엄격하게 제어된다<sup>23,24</sup>. 이 과정에서 G1기 및 S기로의 전이는 CDK4-cyclin D 복합체를 통해 조절되고, S기에서 G2기에서 전이에는 CDK2-cyclin A/E 복합체가 관여한다<sup>24,25</sup>. 그리고 G2기에서 M기로의 전이 동안 CDK1-cyclin A 복합체가 prophase의 개시에 필요하며 세포주기를 완료하기 위한 CDK1-cyclin B 복합체는 M기 전이 단계에 요구된다<sup>25,26</sup>. 본 연구 결과에 의하면 cyclin B와 CDK2 및 CDK4를 포함한 세포주기 양성 조절인자들의 발현은 CF 처리에 따라 유의적인 변화를 관찰할 수 없었지만 cyclin D 및 cyclin A의 발현은 CF 처리 농도 의존적으로 감소하였다. 반면 kinase inhibitory protein/CDK interacting protein family에 속하는 전형적인 CDK 억제제에 속하는 p21의 발현은 CF가 처리된 조건에서 현저하게 증가하였다. p21은 DNA 손상에 의해 유도된 종양 억제자(tumor suppressor)인 p53 의존성 세포주기 정지의 주요 유도 인자로 처음 보고되었지만 다양한 유형의 암세포에서 p53 비의존적인 세포주기 정지에 매개하는 것으로 보고되고 있다. CDK 억제제로서 p21의 발현이 증가하면 CDKs와의 복합체를 형성하여 kinase 활성을 감소시켜 세포주기 진행을 차단한다<sup>25,26</sup>. 비록 본 연구에서 처리된 CF 농도 범위에서 LNCaP 세포의 세포주기 특이적인 정지 현상은 관찰되지 않았지만 CF 처리에 따른 증식 억제는 아마도 cyclin D 및 cyclin A와 같은 세포주기 양성 조절인자들의 발현 감소와 p21의 발현 증가가 최소한 영향을 주었을 것으로 추정된다. 이러한 p21의 발현 증가는 산수유의 항암 활성에서 관찰된 세포주기 정지 현상에서 나타난 경우와도 매우 유사한 결과이다<sup>27,28</sup>.

이상에서 관찰된 CF 처리에 따른 LNCaP 세포의 증식 억제 효과가 BPH 조절인자들의 발현 변화와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, BPH 발달에 핵심적인 역할을 하는 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1 및 Arnt1의 발현이 CF의 처리 농도 의존적으로 모두 감소하였다. 아울러 PSA의 발현 또한 감소하였으며 PSA의 발현은 AR의 발현 감소와 연관성이 있을 것으로 추정된다. 이러한 BPH 관련 유전자들의 발현 억제 효과를 *in vitro* BPH 모델에서 확인하기 위하여 대조군 대비 120% 정도의 증식 촉진 효과를 나타내는 DHT를 LNCaP 세포에 처리한 결과, 선행 연구의 결과와 유사하게 세포증식 양성 조절인자인 cyclin D 및 cyclin A의 발현이 증가하였다<sup>29,30</sup>. 또한 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1 및 PSA의 발현도 모두 증가하여 *in vitro* BPH 모델이 유의적으로 설정되었음을 알 수 있었다<sup>31-33</sup>. 그러나 DHT 처리에 의하여 증가된 cyclin D1 및 cyclin A의 발현은 CF가 전처리된 조건에서는 모두 대조군 수준으로 유지되었으며, 이는 DHT에 의하여 촉진된 LNCaP 세포의 증식이 CF가 존재하는 조건에서 대조군 수준으로 유지되는 결과와 부합되며 Jin 등<sup>34</sup>의 선행 결과와 일치된다. 또한 CF는 DHT 처리에 의한 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1 및 PSA의 발현 증가를 모두 억제하였다. 따라서 CF는 5 $\alpha$ -reductase type 2의 억제제로 작용하여 5 $\alpha$ -reductase type 2-AR 신호전달 경로를 차단하여 testosterone이 DHT로 전환되는 것을 감소시켰을 것으로 추정된다. 아울러 CF에 의한 PSA의 발현 억제 또한 5 $\alpha$ -reductase type 2-AR 신호전달 경로의 활성 억제에 따른 결과로 예측된다.

최근, Cheon 등<sup>35</sup>은 산수유에서 추출한 pentacyclic triterpenoid의 일종인 oleanolic acid가 *in vitro* 및 *in vivo* BPH 모델에서 DHT 및 5 $\alpha$ -reductase 2의 수준을 저하시켰으며, BPH에서 관찰되는 전형적인 전립선의 조직학적 변화를 개선시켰음을 보고한 바 있다. 또한 Karunasagara 등<sup>31</sup>은 산수유와 멀꿀(*Stauntonia hexaphylla*)의 복합 추출물이 LNCaP 세포에서 testosterone으로 유도된 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR 및 PSA의 발현을 현저하게 하향 조절하였음을 보고한 바 있고, *in vivo* BPH 모델에서도 유의적인 효과가 있음을 밝힌 바 있다. 아울러 Jin 등<sup>36</sup>은 산수유와 보골지(*Psoralea corylifolia*) 복합 추출물에서도 이와 유사한 결과를 발표한 바 있으며 이러한 연구의 결과는 본 연구실의 선행 연구 결과와도 일치된다<sup>22</sup>. 그리고 CF는 본 연구

에서 사용된 *in vivo* BPH 모델에서 산화적 및 염증성 스트레스의 지표인 ROS 및 NO의 생성을 유의적으로 억제하였으며 NO의 생성 억제는 eNOS 발현 감소와 연관성이 있었다. 산화적 및 염증성 스트레스는 전립선 세포의 증식뿐만 아니라 나아가서 전립선 조직의 병리적 손상의 원인으로 작용한다<sup>13,14</sup>). 따라서 이러한 결과는 BPH의 발병에 중요하게 관여하는 산화적 및 염증성 스트레스를 CF가 유의적으로 차단함으로써 BPH의 개시나 진행을 차단하는데 기여하였음을 의미하며 다양한 실험 모델에서 산수유 추출물이 강력한 항산화 및 항염증 효과를 가진다는 선행 연구들의 결과와도 일치된다<sup>17,18,20,21</sup>). 예를 들어 RAW 264.7 대식세포에서 lipopolysaccharide에 의한 염증 반응에서 산수유 추출물에 의한 NO 생성의 억제는 inducible NO synthetase의 발현 저하와 연관성이 있었으며<sup>37</sup>) Sung 등<sup>20</sup>) 또한 이와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 그리고 해마세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 신경세포 손상에서 산수유 추출물의 보호 효과는 NO 및 ROS 생성 억제와 직접적인 연관성이 있었으며<sup>38</sup>), RAW 264.7 대식세포에서 산수유 추출물은 ROS 생성을 차단할 수 있는 copper-zinc-superoxide dismutase, manganese-dependent superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 다양한 항산화 효소의 활성을 증가시켰다<sup>21</sup>). 한편 전립선의 염증은 이미 잘 알려진 바와 같이 BPH 뿐만 아니라 PSA 증가와 연관된 전립선 종양의 기여에 핵심적인 역할을 하며<sup>13,14</sup>), Sciarra 등<sup>39</sup>)의 연구에 의하면 염증 조절 인자의 활성 억제는 5 $\alpha$ -reductase 저해제와 함께 BPH 조직에서 세포사멸 지수를 높일 수 있음이 밝혀졌다. 아울러 androgen은 미토콘드리아의 지방산의 산화를 증가시켜 전립선 세포 증식 및 돌연변이 유발과 관련된 ROS 생산을 증가시킨다<sup>30</sup>). 따라서 ROS 생성의 억제는 5 $\alpha$ -reductase 활성 저해와 함께 전립선 과다 증식의 예방에 대한 잠재적인 치료를 위한 근거가 될 수 있다<sup>40</sup>).

이상의 결과는 CF에 의한 LNCaP 전립선 세포의 과도한 증식 억제 효과가 세포주기 조절인자들의 발현 변화와 관련이 있으며, 세포증식 활성의 억제는 최소한 항산화 및 항염증 효능을 동반한 BPH 발생 관련 유전자들의 활성 억제와 연관성이 있음을 보여주는 것이다. 따라서 산수유는 BPH의 예방과 치료를 위한 식의약 소재로서의 가치가 높다고 판단된다. 그러나 CF에 함유된 생리 활성 물질의 확인과 그들의 효능에 대한 검토와 BPH 조절 관련

상위 유전자들과의 연관된 신호 전달계에 관한 추가 연구 등이 이루어져야 할 것이다.

## 결론

본 연구에서 산수유 추출물(CF)에 의한 LNCaP 전립선 세포의 증식 억제가 BPH 조절 인자들의 발현 억제와 연관성이 있음을 알 수 있었다. CF는 전립선 세포에서 세포주기 양성 조절자인 cyclin D1 및 cyclin A의 발현을 억제하였으며 음성 조절자인 p21의 발현은 촉진시켰다. 또한 CF는 BPH 조절 핵심 인자인 5 $\alpha$ -reductase type 2, AR, SRC1 및 Arnt1의 발현뿐만 아니라 PSA의 발현도 억제시켰다. 아울러 CF는 DHT에 의한 LNCaP 전립선 세포의 과도한 증식을 억제하였으며 DHT에 의해 유도된 세포주기 양성 조절자와 BPH 유발 인자들의 발현을 유의적으로 차단하였고, 이는 CF의 항산화 및 항염증 활성과 연관성이 있었다. 결론적으로 CF가 BPH 발병 기전의 기초가 되는 전립선의 증식을 억제시켜 BPH에 대한 보호 효과가 있음을 보여주는 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 ‘지역특화산업육성사업(R&D, S2874684)’ 지원으로 수행된 연구 결과임.

## References

1. Madersbacher S, Sampson N, Culig Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: A mini-review. *Gerontology*. 2019 ; 65 : 1-7.
2. Vickman RE, Franco OE, Moline DC, Vander Griend DJ, Thumbikat P, Hayward SW. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J Urol*. 2020 ; 7 : 191-202.
3. Langan RC. Men's health: Benign prostatic hyperplasia. *FP Essent*. 2021 ; 503 : 18-22.
4. Chu KF, Rotker K, Ellsworth P. The impact of obesity on benign and malignant urologic conditions. *Postgrad*

- Med. 2013 ; 125 : 53-69.
5. Velonas VM, Woo HH, Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 ; 14 : 11034-60.
  6. Gupta N, Rogers T, Holland B, Helo S, Dynda D, McVary KT. Three-year treatment outcomes of water vapor thermal therapy compared to doxazosin, finasteride and combination drug therapy in men with benign prostatic hyperplasia: Cohort data from the MTOPS trial. *J Urol.* 2018 ; 200 : 405-13.
  7. Dhurat R, Sharma A, Rudnicka L, Kroumpouzou G, Kassir M, Galadari H, et al. 5-Alpha reductase inhibitors in androgenetic alopecia: Shifting paradigms, current concepts, comparative efficacy, and safety. *Dermatol Ther.* 2020 ; 33 : e13379.
  8. Kim EH, Brockman JA, Andriole GL. The use of 5-alpha reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol.* 2018 ; 5 : 28-32.
  9. Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML. Adverse side effects of 5alpha-reductase inhibitors therapy: Persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J Sex Med.* 2011 ; 8 : 872-84.
  10. Thomas D, Chughtai B, Kini M, Te A. Emerging drug therapies for benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2017 ; 22 : 201-12.
  11. Zhou Z, Cui Y, Wu J, Jin H. Efficacy and safety of dutasteride compared with finasteride in treating males with benign prostatic hyperplasia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp Ther Med.* 2020 ; 20 : 1566-74.
  12. Black L, Naslund MJ, Gilbert TD, Jr Davis EA, Ollendorf DA. An examination of treatment patterns and costs of care among patients with benign prostatic hyperplasia. *Am J Manag Care.* 2006 ; 12 : 99-110.
  13. Bostanci Y, Kazzazi A, Momtahan S, Laze J, Djavan B. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Curr Opin Urol.* 2013 ; 23 : 5-10.
  14. Minciullo PL, Inferrera A, Navarra M, Calapai G, Magno C, Gangemi S. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Urol Int.* 2015 ; 94 : 249-54.
  15. Srivilai J, Minale G, Scholfield CN, Ingkaninan K. Discovery of natural steroid 5 alpha-reductase inhibitors. *Assay Drug Dev Technol.* 2019 ; 17 : 44-57.
  16. Korean Medicinal Herb. National College of Korean Medicine Textbook Review Committee. Seoul : Yeong-Rim Publishing Co., Ltd. 2016 : 688-9.
  17. KIOM. Korean medicinal materials. Seoul : GeoBook. 2014 : 178-9.
  18. Huang J, Zhang Y, Dong L, Gao Q, Yin L, Quan H, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *J Ethnopharmacol.* 2018 ; 213 : 280-301.
  19. Du W, Cai H, Wang M, Ding X, Yang H, Cai B. Simultaneous determination of six active components in crude and processed Fructus Corni by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 ; 48 : 194-7.
  20. Sung YH, Chang HK, Kim SE, Kim YM, Seo JH, Shin MC, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the aqueous extract of Corni Fructus in murine RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food.* 2009 ; 12 : 788-95.
  21. Hwang KA, Hwang YJ, Song J. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. *BMC Complem Altern Med.* 2016 ; 16 : 1-9.
  22. Hwangbo H, Kwon DH, Choi EO, Kim MY, Ahn KI, Ji SY, et al. Corni Fructus attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by suppressing 5alpha-reductase and androgen receptor expression in rats. *Nutr Res Pract.* 2018 ; 12 : 378-86.
  23. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: Several CDKs, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 2009 ; 28 : 2925-39.
  24. Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anti-cancer drug discovery. *Cancer Biol Med.* 2017 ; 14 : 348-62.
  25. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012 ; 28 : 128-36.
  26. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair.* 2016 ; 42 : 63-71.
  27. Liao CL, Hsu SC, Yu CC, Yang JS, Tang NY, Wood

- WG, et al. The crude extract of Corni Fructus induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-modulated pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells. *Environ Toxicol.* 2014 ; 29 : 1020-31.
28. Choi WH, Chu JP, Jiang MH, Baek SH, Park HD. Effects of fraction obtained from Korean Corni Fructus extracts causing anti-proliferation and p53-dependent apoptosis in A549 lung cancer cells. *Nutr Cancer.* 2011 ; 63 : 121-9.
29. Choi YJ, Fan M, Tang Y, Yang HP, Hwang JY, Kim EK. In vivo effects of polymerized anthocyanin from grape skin on benign prostatic hyperplasia. *Nutrients.* 2019 ; 11 : 2444.
30. Wijerathne CU, Park HS, Jeong HY, Song JW, Moon OS, Seo YW, et al. *Quisqualis indica* improves benign prostatic hyperplasia by regulating prostate cell Proliferation and apoptosis. *Biol Pharm Bull.* 2017 ; 40: 2125-33.
31. Karunasagara S, Hong GL, Jung DY, Kim KH, Cho K, Jung JY. Protective effects of combination of *Stauntonia hexaphylla* and *Cornus officinalis* on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia through inhibition of 5alpha-reductase type 2 and induced cell apoptosis. *PLoS One.* 2020 ; 15 : e0236879.
32. Choi YJ, Kim EK, Fan M, Tang Y, Hwang YJ, Sung SH. Effect of *Paecilomyces tenuipes* extract on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Sprague-Dawley rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 ; 16 : 3764.
33. Zhu YS, Cai LQ, You X, Cordero JJ, Huang Y, Imperato-McGinley J. Androgen-induced prostate-specific antigen gene expression is mediated *via* dihydrotestosterone in LNCaP cells. *J Androl.* 2003 ; 24 : 681-7.
34. Jin BR, Cheon SY, Kim HJ, Kim MS, Lee KH, An HJ. Anti-proliferative effects of standardized *Cornus officinalis* on benign prostatic epithelial cells *via* the PCNA/E2F1-dependent cell cycle pathway. *Int J Mol Sci.* 2020 ; 21 : 9567.
35. Cheon SY, Jin BR, Kim HJ, An HJ. Oleanolic acid ameliorates benign prostatic hyperplasia by regulating PCNA-dependent cell cycle progression *in vivo* and *in vitro*. *J Nat Prod.* 2020 ; 83 : 1183-9.
36. Jin BR, Kim HJ, Seo JH, Kim MS, Lee KH, Yoon IJ, et al. HBX-6, standardized *Cornus officinalis* and *Psoralea corylifolia* L. extracts, suppresses benign prostate hyperplasia by attenuating E2F1 activation. *Molecules.* 2019 ; 24 : 1719.
37. Najjar RS, Akhavan NS, Pourafshar S, Arjmandi BH, Feresin RG. *Cornus officinalis* var. *koreana* Kitam polyphenol extract decreases pro-inflammatory markers in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages by reducing Akt phosphorylation. *J Ethnopharmacol.* 2021 ; 270 : 113734.
38. Tian W, Zhao J, Lee JH, Akanda MR, Cho JH, Kim SK, et al. Neuroprotective effects of *Cornus officinalis* on stress-induced hippocampal deficits in rats and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Antioxidants (Basel).* 2019 ; 9 : 27.
39. Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Autran Gomez A, Monti S, Toscano V, et al. Prostate growth and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 ; 108 : 254-60.
40. Lin H, Lu JP, Laflamme P, Qiao S, Shayegan B, Bryskin I, et al. Inter-related *in vitro* effects of androgens, fatty acids and oxidative stress in prostate cancer: a mechanistic model supporting prevention strategies. *Int J Oncol.* 2010 ; 37 : 761-6.