

Effects of Schisandrae Fructus and Corni Fructus Extracts on the Proliferation and Expression of Prostatic Hyperplasia-inducing Factors in Dihydrotestosterone-stimulated LNCaP Human Prostate Carcinoma Cells

Min Yeung Kim^{1,2}, Seon Yeong Ji^{1,2}, Hyun Hwangbo^{1,2}, Hyesook Lee^{1,2}, Tae Hee Kim³, Seonhye Yoon⁴, Hyun Jin Kim⁴, Sung Yeon Kim⁵, Tae Jung Kim⁵, Min Ji Kim⁵, Ha Eun Jung⁵ and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

²Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

³Hamsopharm Central Research, Jinan 55442, Korea

⁴R&D Center, Naturetech Co. Ltd., Jincheon 27858, Korea

⁵BIO Center, Chungbuk Technopark, Ochang 28115, Korea

Received June 15, 2021 / Revised June 29, 2021 / Accepted June 29, 2021

Schisandrae Fructus (SF) and Corni Fructus (CF) have been used for a long time for the prevention and treatment of various diseases. Although reports have highlighted the possibility of inhibiting the onset and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH), studies on related mechanisms are still lacking. In this study, we investigated the potential of SF and CF in improving BPH by using a dihydrotestosterone (DHT)-induced *in vitro* BPH model using LNCaP prostate carcinoma cells. According to our results, water and ethanol extracts of SF and CF significantly inhibited the proliferation of LNCaP cells by DHT treatment and markedly downregulated the expression of DHT-induced BPH biomarkers and growth factors. They also regulated the expression of apoptosis regulatory factors and significantly reduced DHT-mediated oxidative stress. In addition, the protective effect on major factors involved in the pathogenesis of BPH was more effective in the ethanol extract treatment group than in the water extract group. Furthermore, the improvement effect on BPH was higher in the 1:1 combined treatment group than in the ethanol extract alone treatment group of SF and CF, and 60% ethanol extracts showed a better effect than 40% ethanol extracts. Therefore, our findings demonstrate that SF and CF can protect against BPH by preventing the hyperproliferation of prostate cells through the inhibition of the androgen signaling pathway, which was correlated with their antioxidant activities. Therefore, SF and CF extracts may be useful in the clinical treatment of BPH, and the combination of these two extracts can be synergistic.

Key words : Benign prostatic hyperplasia, Corni Fructus, Dihydrotestosterone, LNCaP prostate cells, Schisandrae Fructus

서론

양성 전립선 비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH)은 전 세계적으로 40~50세 남성의 약 50%에서 발생하는 노화와 관련된 비뇨기 계통의 흔한 만성 질환이다[25, 29]. BPH는 전립선의 세포의 비정상적인 증가로 인해 전립선이 비대해지는 것을 특징으로 한다[25, 44]. BPH의 초기 단계인 환자에서는 비대해진 전립선에 의한 방광의 압박으로 야간뇨, 지연뇨, 빈뇨 등을 포함하는 하부 요로 증상(lower urinary tract symp-

toms)이 나타나지만, 전립선 비대가 진행됨에 따라 반복적인 요로감염 및 요로 폐색으로 인한 방광과 신장 기능의 손상으로 이어진다[1, 29]. 비록 BPH는 생명을 위협하는 치명적인 질환은 아니나 삶의 질을 저하시킨다는 점에서 고령화되어가는 현 사회의 중요한 의료문제로 대두되고 있다.

현재까지 BPH의 발병 기전은 완전히 밝혀지지 않았지만 androgen에 대한 반응이 주요 요인으로 인식되고 있다[1, 14]. Androgen은 배아 발달과 정상적인 전립선의 성장과 기능 유지에 중요하지만, 자가 분비 또는 주변 분비를 통하여 전립선 상피 세포 또는 간질 세포의 증식을 촉진하며 전립선 세포 증식 및 세포사멸(apoptosis)의 불균형을 초래한다[6, 44]. 노화에 따라 성호르몬의 불균형으로, 특히 testosterone의 농도가 감소하면서 5 α -reductase (5AR)의 활성은 높은 수준으로 유지된다. 이로 인하여 testosterone은 androgen receptor (AR)에 대한 친화력이 5배 이상 높은 dihydrotestosterone (DHT)으로 전환되며 DHT 수치는 BPH 환자에서 정상 남성에 비하여 높

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

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.

은 수준으로 존재한다[1, 43]. Testosterone과 DHT는 AR 및 AR coactivator와 결합하여 androgen 의존성 유전자들의 전사 활성을 증가시키고 궁극적으로 전립선 세포의 증식을 유도한다[14, 25].

DHT가 AR에 결합하면 prostate specific antigen (PSA) 발현의 수준 또한 향상시키며 PSA 수치는 BPH와 전립선암의 개시와 발병 동안 증가하기 때문에 PSA는 BPH 및 전립선암의 진단을 위한 바이오 마커로서 널리 사용된다[29, 43]. 전립선 세포를 포함한 진핵세포의 증식은 세포주기 조절 인자들에 의하여 엄격하게 조절된다. 특히 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 세포주기 개시인 G1기에서 S기로의 진입에 핵심적인 역할을 하기 때문에 BPH 동안 전립선 세포의 증식 상태를 반영할 수 있다[13, 43].

현재 BPH 치료를 위해 임상에서 적용되고 있는 약물은 tamsulosin과 naftopidil과 같은 α_1 -아드레날린성 수용체 길항제(α_1 -adrenergic receptor antagonists)와 finasteride와 dutasteride을 포함하는 5 α -reductase 억제제 및 bicalutamide, flutamide 및 nilutamide와 같은 항안드로젠(anti-androgens) 등으로 대별된다[40, 50]. α 차단제는 전립선의 평활근 긴장을 이완시키고 소변의 흐름을 개선하지만, 두통, 저혈압 또는 발기 부전과 사정 장애 같은 부작용을 동반하며, 전립선의 크기를 조절할 수 없다[38]. 그리고 5AR 억제제는 testosterone에서 DHT로의 전환을 감소시키고 전립선 조직의 수축을 유도하지만[10, 31], 성욕 상실 및 발기 부전 등을 동반하기 때문에[40, 41] 기존 약물의 부작용을 대체할 수 있는 치료의 필요성이 요구된다. 따라서 부작용이 적고 효과적인 치료 전략에 천연물의 활용에 관한 연구가 증대되고 있다.

비록 정확한 기전 연구가 미비하지만, 그동안 전통 의학에서 다양한 약재들이 BPH 치료를 위해 사용되어 왔다. 최근 이들에 대한 재평가가 이루어지고 있으며, 다수의 천연물이 BPH의 예방과 치료에 적용되고 있다[22, 28, 47]. 그 중 오미자나무[*Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.)]의 열매인 오미자(五味子, *Schisandrae Fructus*)는 한국, 중국 및 기타 많은 동아시아 국가에서 널리 사용되는 전통 한약재이며, 그동안 신경계, 심혈관, 위장관, 간 및 피부 질환 등의 치료에 널리 사용되어 왔다[34, 39, 49]. 최근 연구에 의하면, 오미자 추출물과 그 활성 성분들은 항염증, 항산화, 항바이러스, 항암, 신경 보호 및 노화 방지 효과 등을 포함한 다양한 약리학적 효능이 있음이 보고된 바 있다[7, 20, 37, 48, 51]. 산수유나무(*Cornus officinalis* Sieb et. Zucc)의 열매인 산수유(山茱萸, *Corni Fructus*) 또한 간과 신장 기능을 강화하고 무력증 질환, 간 및 신장 질환, 생식계 질환의 치료 목적으로 동아시아 국가에서 전통적으로 사용되어 왔다[8, 9, 12, 16]. 최근의 실험적 연구에 따르면, 산수유 추출물과 그 활성 성분은 항산화, 항암, 항염증, 항당뇨, 항골다공증, 면역 조절, 신경 보호, 심혈관 보호와 같은 다양한

약리학적 효과가 있음이 보고되고 있다[11, 16, 23, 26, 46]. 아울러 Wei et al. [45]은 오미자의 유효 생리활성 성분인 schizandrin A가 BPH 치료를 위한 선도 화합물로 사용될 수 있음을 제시한 바 있다. 산수유 또한 BPH 발병 인자들의 발현을 억제할 수 있으며[4, 17, 19], 산수유 및 멸골[*Stauntonia hexaphylla* (Thunb.) Decne.] 잎 추출물의 조합이 BPH의 임상 치료에 유용할 수 있음이 보고된 바 있다[20]. 그럼에도 불구하고 오미자와 산수유 추출물에 의한 BPH 치료를 위한 근거는 여전히 부족한 실정이다. 본 연구에서는 BPH의 예방과 치료 적용 가능성이 높은 오미자와 산수유 추출물의 활용성에 대한 추가적인 근거의 도출과, 두 추출물의 복합 처리에 따른 효능 증진을 위한 최적 배합 비율을 설정을 시도하였다. 이를 위하여 *in vitro* BPH 모델로 가장 널리 사용되고 있는 LNCaP 전립선 암세포를 이용하였다.

재료 및 방법

세포 배양

본 연구에서 사용된 LNCaP 인간 전립선 암세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, RPMI-1640 (WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea)에 10% fetal bovine sera (FBS, WELGENE Inc.)과 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin (P/S, WELGENE Inc.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.

오미자 및 산수유 추출물의 준비

본 연구에서 사용된 오미자와 산수유의 열수 및 에탄올(40% 및 60%) 추출물은 (주)네이처텍(Naturetech Inc., Jincheon, Korea)에서 원료를 제공하여 충북테크노파크(Cheongju, Korea)에서 추출한 것을 공급받아 사용하였다. 열수 추출물은 건조 오미자와 산수유를 마쇄한 후 시료 1:10 (w/v)의 비율로 각각 증류수를 가한 후 110°C에서 4시간 동안 초고속진공저온추출기(Ultra-fast vacuum low-temperature extractor, COSMOS 660, Kyungseo E&P Co., Incheon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 시료의 40% 및 60% ethanol 추출물은 건조 오미자와 산수유를 마쇄한 후 시료 1:10 (w/v)의 비율로 각각 40% 및 60% ethanol을 각각 가하여 50°C에서 4시간 동안 초고속진공저온추출기를 이용하여 추출하였다. 추출된 용액은 여과 후 감압농축기(Eyela N-21NS, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축 및 분말화 하였다. DHT는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 phosphate buffered saline (PBS)에 100 μ M로 희석한 후, 적정 농도에 세포 배양 배지에 재희석하여 처리하였다. 오미자 및 산수유 추출물은 멸균수에 200 mg/ml로 stock solution을 만들어 실험에 따라 적절하게 희석, 혼합하여 사용하였다.

DHT, 오미자 및 산수유 추출물 처리에 따른 세포 증식을 측정

LNCaP 세포의 증식에 미치는 DHT, 오미자 및 산수유 추출물의 영향을 조사하기 위하여 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석법을 실시하였다. 이를 위하여 6 well plate의 well 당 7×10^4 개의 LNCaP 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 이후 100 unit/ml의 P/S가 포함된 세포 배양용 배지로 교체 후 24시간 동안 배양하고, 5% FBS 및 100 unit/ml의 P/S가 포함된 배지를 사용하여 오미자 및 산수유 추출물을 다양한 농도로 1시간 동안 전처리한 후, DHT를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 well에 0.5 mg/ml의 MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액을 첨가 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 각 well에 형성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 모두 용해시키고, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 각 물질에 대한 세포 독성은 대조군 값을 기준으로 백분율로 환산하여 나타내었다.

Hemocytometer를 이용한 세포 생존율 측정

DHT 처리에 의한 세포 생존율을 확인하기 위하여 6 well plate의 well 당 7×10^4 개의 LNCaP 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 이후 100 unit/ml P/S가 포함된 배지로 교체하여 24시간 동안 배양하였으며, 그 후 5% FBS 및 100 unit/ml의 P/S가 포함된 배지를 사용하여 DHT를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 수집하여 PBS에 희석한 후 동량의 0.5% trypan blue solution (Invitrogen)을 첨가하여 2분간 염색하고 hemocytometer에 적용하여 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)을 이용하여 계수하였다.

단백질의 분리 및 Western blot analysis

다양한 조건에서 배양된 세포들을 수확한 후, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후, pellet에 1X lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% nonidet P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4°C, 30분간 반응시킨 후 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)을 이용하여 정량하였고, 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 준비된 샘플은 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동으로 분리하였고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 그 후 membrane을 5% skim milk 용액에 30분 동안 처리한 후, 검출 대상 단백질에 대한 1차 항체(Table 1)를 처리하여 4°C에서 반응시킨 다음 1x PBS-T (PBS with Tween 20)로 10분간 3번 세척하고 적정 2차 항체(Table 1)를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시켰다. Membrane을 1x PBS-T로 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL) immunoblotting detection reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 Fusion Solo S system (Vilber Lourmat, Collégien, France)를 이용하여 조사 대상 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 변화 측정

다양한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 ROS 생성 변화를 측정하기 위해 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 이용하였다. 이를 위하여 LNCaP 세포에 적정 농도의 오미자 및 산수유 추출물을 1시간 전처리 후, DHT를 1시간 처리하였다. 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 10 μM의 DCF-DA (Invitrogen) 용액을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator

Table 1. Primary and secondary antibodies used for Western blot analysis

Antibody	Manufacturer	Cat. No.	Dilution
AR	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7305	1:1,000
ARA70	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-373739	1:1,000
Bad	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-8044	1:1,000
Bax	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7480	1:1,000
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-783	1:1,000
b-FGF	Bioss Antibodies.	BS0217R	1:1,000
EGF	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-374255	1:1,000
PCNA	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-56	1:1,000
PSA	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7316	1:1,000
β-actin	Bioworld Technology, Inc.	BS6007M	1:25,000

*Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA); Bioss Antibodies (Woburn, MA, USA); Bioworld Technology, Inc. (St Louis Park MN, USA)

tor에서 20분간 반응시키고 유세포 분석기(Accuri C6 flow cytometer, BD Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 ROS 생성 변화 여부를 평가하였다.

PSA 생성 수준의 분석

PSA 생성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)에서 구입한 Human KLK3/PSA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하였다. 이를 위하여 DHT와 오미자 및 산수유 추출물이 처리된 세포의 배양액을 모아 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 kit에 제공된 standard 용액을 혼합하여 항체가 결합되어 있는 96 well plate에 옮긴 후 37°C에서 2시간 동안 반응시키고, 1x Biotinylated detection antibody를 상층액과 standard 용액의 동량을 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 1x wash buffer로 5회 세척 후 1x horseradish peroxidase-avidin 용액을 96 well plate에 넣어 37°C에서 1시간 반응시키고 wash buffer로 5회 세척하였다. 세척 후, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate 용액을 96 well plate에 넣어 15~30분 반응시키고, stop 용액을 첨가하여 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 샘플 값은 standard curve에 대입하여 계산하였다.

통계 처리

GraphPad Prism® version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)의 one-way analysis of variance (ANOVA)를 사용하여 통계 분석을 실시하였으며, Tukey’s test로 사후 검정하여 $p < 0.05$ 값을 유의한 값으로 보고 통계 처리하였다.

결과 및 고찰

LNCaP 세포를 이용한 DHT 유도 *in vitro* BPH 모델의 설정

LNCaP 세포를 이용한 BPH 모델의 설정을 위한 조건의 확립을 위하여 LNCaP 세포의 증식과 생존에 미치는 DHT의 영향을 먼저 조사하였다. 이를 위하여, 다양한 농도의 DHT를 처리하여 적정시간 배양 후 MTT 분석과 hemocytometer counting를 실시하였다. Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 DHT 처리 후 24시간 배양하였을 때 세포 증식율에 큰 차이를 보이지 않았으나, 48시간 배양 후 50 nM 이상의 DHT 처리군에서는 세포 증식율의 유의적 증가가 관찰되었다. 또한 DHT를 48시간 처리 후 LNCaP 세포의 증식 생존 정도를 확인한 결과에서도 DHT의 농도 의존적으로 생존 촉진 현상이 관찰되었으며(Fig. 1B), 세포의 형태적 관찰에서도 DHT의 처리 농도가 증가함에 따라 세포의 밀도가 증가되었다(Fig. 1C). 이러한

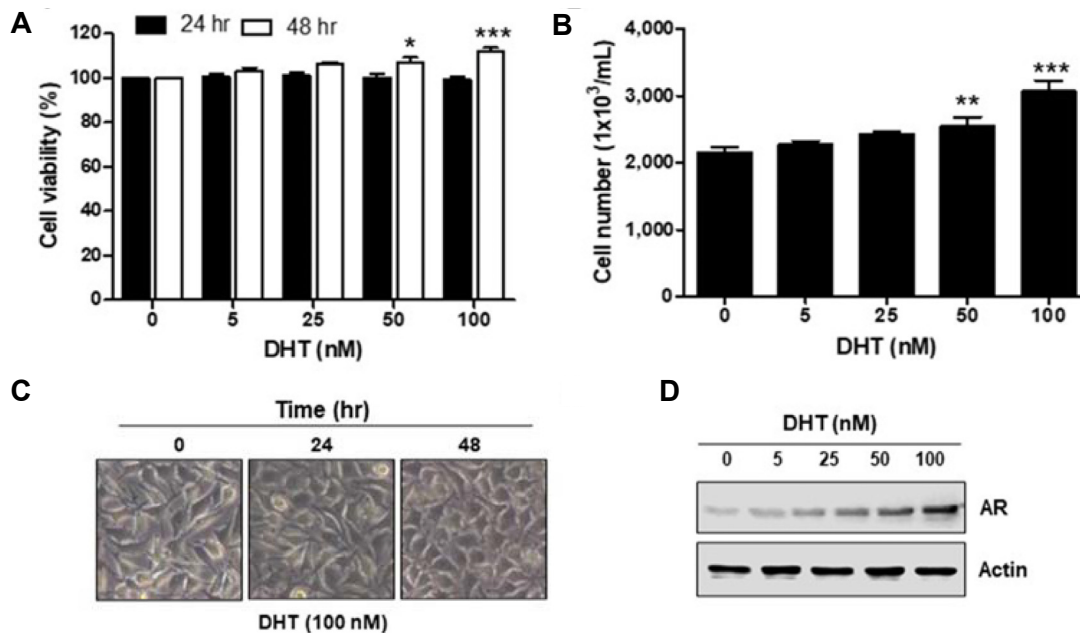


Fig. 1. Induction of *in vitro* BPH model using DHT in LNCaP cells. The cells were treated with the indicated concentrations of DHT for 24 hr or 48 hr. Cell viability (A) and viable cell number (B) were measured by the metabolic-dye-based MTT assay and trypan blue assay, respectively. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD, n=3). The statistical analyses were conducted using analysis of variance (ANOVA-Tukey’s post-hoc test) between groups (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ when compared to control). (C) Morphological changes of LNCaP cells were observed by a phase-contrast microscope. Representative photographs of the morphological changes were presented. (D) After treatment with the indicated concentrations of DHT for 48 hr, the cells were lysed, and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and then transferred to membranes. The levels of AR expression were visualized using anti-AR antibody and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

DHT 처리에 따른 LNCaP 세포의 세포 증식 및 생존 축진이 *in vitro* BPH 모델로 적용하기에 적절한지를 평가하기 위하여 AR의 발현 변화를 조사하였으며 Western blotting의 결과에 의하면, DHT 처리 농도 의존적으로 AR의 발현이 증가하였음을 확인하였다(Fig. 1D). 이러한 결과는 동일 세포주를 사용한 선행 연구의 결과와 유사한 현상이었으며[5, 15], LNCaP 세포를 이용한 *in vitro* BPH 모델 설정을 위한 DHT의 처리 농도는 100 nM로, 처리 시간은 48시간으로 고정하여 다음 실험을 수행하였다.

DHT 처리로 증가된 LNCaP 세포의 증식에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향

DHT 유도 *in vitro* BPH 모델에서 BPH 유발 관련 유전자들의 발현에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향 조사를 위한 조건 설정을 위하여 LNCaP 세포의 증식에 미치는 오미자 및 산수유의 열수 및 40% 에탄올 추출물의 영향을 먼저 조사하였다. 각 추출물의 처리 후 수행된 MTT 분석의 결과에 의하면, 오미자 열수 추출물(WESF)은 350 µg/ml에서 다소 LNCaP 세포의 증식을 억제하였지만, 산수유 열수 추출물(WECF)과 오미자 및 산수유 40% 에탄올 추출물(40% EESF 및 40% EECF)은 처리 농도 350 µg/ml까지 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 따라서 4가지 추출물이 LNCaP 세포에

독성을 나타내지 않았던 농도인 250 µg/ml을 설정하여 향후 실험을 진행하였다.

다음은 오미자와 산수유 추출물이 DHT에 의해 유도된 LNCaP 세포의 증식 축진을 억제하는지 확인하기 위하여, 세포 독성이 없는 농도인 250 µg/ml로 각각의 열수 및 40% 에탄올 추출물을 LNCaP 세포에 전처리하고 1시간 후 DHT를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식 축진은 오미자 열수 추출물(WESF)에 의해 다소 감소된 경향을 나타내었다. 그러나 산수유 열수 추출물(WECF)과 40% 에탄올 오미자(40% EESF) 및 산수유(40% EECF) 추출물은 DHT에 의한 증식 축진을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 3A). 이러한 결과는 각각의 추출물이 BPH의 개시와 진행에 필수적인 전립선 세포의 과다 증식을 억제할 수 있음을 의미한다.

DHT가 처리된 LNCaP 세포에서 BPH 유도 관련 유전자 발현에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향

이상에서 관찰된 오미자와 산수유 추출물의 전립선 세포 과다 증식 억제 효과가 BPH 개선과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 BPH 관련 유전자들의 발현 변화에 미치는 오미자와 산수유 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 DHT 처리에 의해 증가되었던 AR의 발현 변화를 먼저 조사하였다.

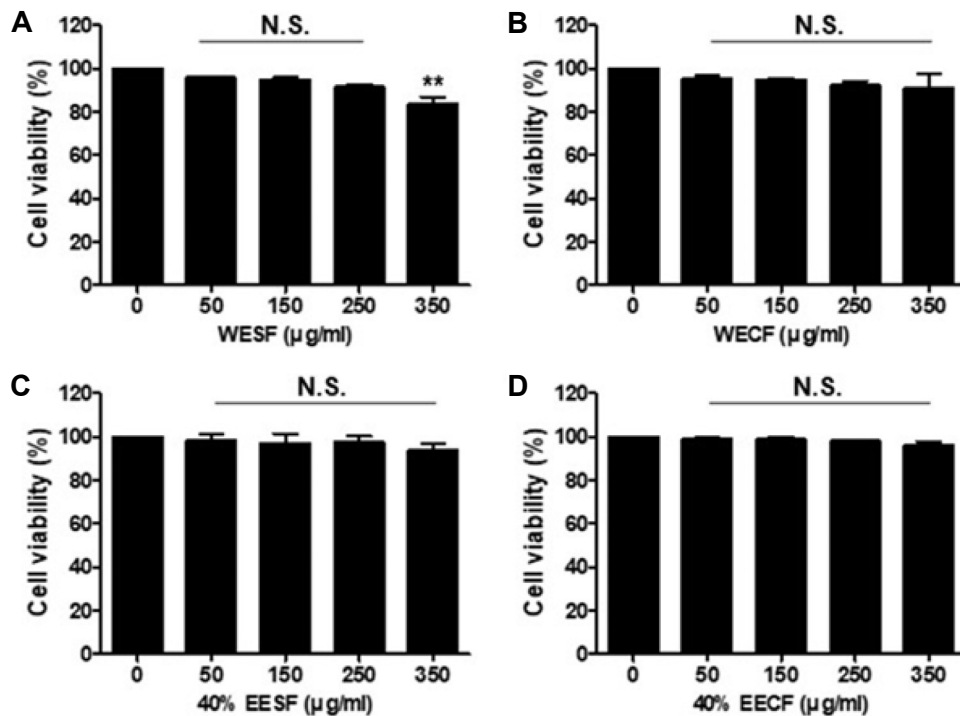


Fig. 2. Effects of Schisandrae Fructus and Corni Fructus extracts on the cell viability of LNCaP cells. The cells were treated with different concentrations of water extracts of Schisandrae Fructus (WESF) and Corni Fructus (WECF) or 40% ethanol extracts of Schisandrae Fructus (40% EESF) and Corni Fructus (40% EECF) for 48 hr. And then cell viability was measured by an MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD ($p < 0.01$ when compared to control. N.S., not significant when compared to control).

Fig. 3B에 나타난 Western blotting의 결과에서 알 수 있듯이, 오미자와 산수유의 열수 추출물(WESF 및 WECF)이 단독 처리된 세포에서는 AR의 발현이 대조군 수준으로 유지되었지만, 오미자와 산수유의 40% 에탄올 추출물(40% EESF 및 40% EECF) 단독 처리군에서는 대조군에 비하여 AR의 발현이 다소 증가되었다. 그러나 DHT 처리에 의해 크게 증가되었던 AR의 발현은 오미자와 산수유 추출물이 전처리된 조건에서는 모두 감소하였으며, AR 발현 억제 정도는 열수 추출물에 비하여 에탄올 추출물이 전처리된 경우에서 더 높게 나타났다. 이는 아마도 열수 추출물보다 통상적으로 에탄올과 같은 유기 용매를 이용한 추출물이 열수 추출물에 함유하고 있지 않을 수 있는 다양한 생리활성 성분들이 더 많이 추출되었기 때문이라고 생각한다.

다음은 AR 활성 증가 의존적이면서 BPH 및 전립선암의 진단을 위해 사용되는 대표적인 바이오 마커인 PSA [29, 43]의 발현에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향을 조사한 결과, PSA는 DHT 단독 처리에 의하여 매우 증가되었으며, 오미

자 및 산수유 추출물이 단독 또는 전처리된 조건에서는 AR의 발현 변화 유형과 매우 유사하게 관찰되었다. 그리고 전립선 세포의 증식 상태를 반영하는 PCNA [13, 43]의 발현 또한 DHT 처리에 의하여 증가되었으며, 오미자 및 산수유 추출물이 단독 처리된 세포에서는 대조군 수준으로 유지되었다. 그러나 오미자 및 산수유의 40% 에탄올 추출물(40% EESF 및 40% EECF)이 전처리된 조건에서는 DHT에 의한 발현이 대조군 수준으로 억제되었다. 아울러 대표적인 AR의 coactivator인 AR-associated protein 70 (ARA70)의 발현[14, 25] 또한 DHT 단독 처리군에서 매우 증가되었지만, 오미자 및 산수유 추출물이 존재하는 조건에서는 유의적으로 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 따라서 오미자와 산수유 추출물은 DHT에 의해 증가된 AR 뿐만 아니라 PSA와 PCNA의 발현을 모두 억제할 수 있었으며, 40% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비하여 억제 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 또한, 이러한 PSA와 PCNA의 발현 차단은 AR의 coactivator인 ARA70의 발현 감소와 연관성이 있었으며, 이는 오미자 및 산수유 추출물이 AR

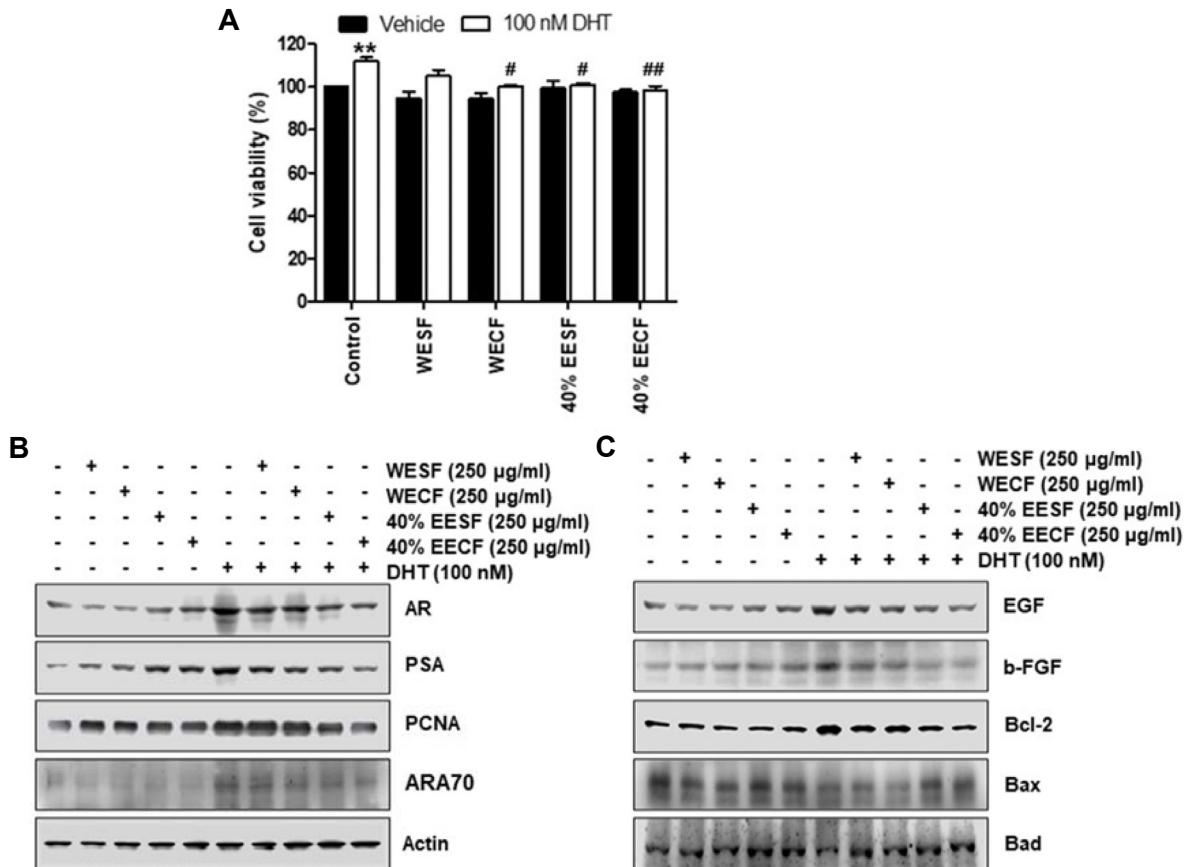


Fig. 3. Effects of Schisandrae Fructus and Corni Fructus extracts on the cell viability and the expression of BPH-related proteins, growth factors and Bcl-2 family proteins in DHT-stimulated LNCaP cells. The cells were pretreated with or without 250 µg/ml WESF, WECF, 40% EESF or 40% EECF for 1 hr, before 100 nM DHT treatment for 48 hr. (A) The cell viability was measured by an MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD (***p*<0.01 vs. control group; #*p*<0.05 and ##*p*<0.01 vs. DHT-treated group). (B and C) The expression levels of the indicated proteins were determined by Western blotting with whole cell lysates. Equal protein loading was confirmed by actin as an internal control.

신호계의 활성 억제를 통하여 BPH의 억제에 기여함을 의미한다. 이상의 결과는 Wei et al. [45]에 의한 오미자 추출물이 BPH의 개선에 효과가 있을 것이라는 가설을 잘 지지하여 주며, 산수유 추출물에 의한 BPH 발병 억제가 AR, PSA, PCNA 및 AR의 coactivator의 발현 차단과 연관성이 있을 것이라는 Karunasagara et al. [20]과 Hwangbo et al. [17]의 동물 실험 결과와 잘 일치된다.

DHT가 처리된 LNCaP 세포의 성장인자 및 세포사멸 조절인자 발현에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향

BPH의 개시와 진행이 전립선을 구성하는 세포들의 비정상적인 증식의 촉진에 의한 것이라는 측면에서 전립선 세포들의 증식과 사멸을 조절하는 유전자들의 제어는 BPH의 예방과 치료의 핵심 전략이 될 수 있다. 이를 잘 지지하여 주는 예로서, BPH 환자에서 성장인자(growth factor)들의 수준이 정상인에 비하여 높게 관찰되며, 세포사멸을 조절하는 유전자들의 발현은 정상 세포와는 매우 다르게 유지되고 있다[24, 44]. 특히 전립선 간질 세포는 AR 신호계와 상호 작용하여 epidermal growth factor (EGF)와 basic-fibroblast growth factor (b-FGF)와 같은 자가 분비 성장인자들을 생성을 증가시켜 전립선 세포의 증식 촉진에 기여한다[24, 36]. 아울러 BPH의 상피 및 간질 세포는 정상 전립선 세포에 비하여 세포증식을 촉진하기 위하여 세포사멸에 대한 저항성을 지니며, 이는 Bcl-2 family 단백질 중에서, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2와 같은 유전자들의 발현이 증가되어 있는 반면, Bax와 같은 세포사멸 유도 유전자의 발현은 상대적으로 낮게 발현되어 있다[31, 32].

BPH 환자에서 관찰되는 이러한 병리적인 특징이 DHT 처리에 따른 *in vitro* LNCaP 세포 BPH 모델에서도 나타나는지를 조사한 결과, DHT가 단독 처리된 LNCaP 세포에서 EGF와 b-FGF의 발현이 증가하였으며, Bcl-2의 발현 또한 증가된 반면, Bax 및 Bad와 같은 세포사멸 촉진 유전자들의 발현은 감소되었다(Fig. 3C). 따라서 이러한 유전자들의 발현에 미치는 오미자와 산수유 추출물의 영향을 조사한 결과, DHT 처리에 의하여 증가되었던 EGF와 b-FGF 발현이 오미자 및 산수유 추출물이 전처리된 조건에서는 모두 감소되었으며, 열수 추출물에 비하여 40% 에탄올 추출물군에서 더욱 감소되었다. 이와 유사하게 증가된 Bcl-2의 발현 또한 오미자 및 산수유 추출물의 전처리에 의하여 억제되었지만, Bax 및 Bad는 DHT 처리에 의해 감소되었으며, 오미자와 산수유 추출물이 존재하는 조건에서는 회복되었으며, 이러한 효과 역시 40% 에탄올 추출물에서 더욱 강하게 관찰되었다(Fig. 3C). 따라서 오미자 및 산수유 추출물에 의한 BPH의 제어는 AR 신호계의 억제와 함께 전립선 세포에서 성장인자의 과다 생산 차단과 세포사멸 유도의 항상성 유지를 통하여 이루어지고 있음을 의미한다.

DHT가 처리된 LNCaP 세포의 ROS 생성에 미치는 오미자 및 산수유 추출물의 영향

비록 BPH 발달과 관련된 가장 중요한 요소 중 하나는 만성 염증이지만, 산화적 스트레스 또한 BPH의 병인 및 병리와 관련된 주요 인자이다[3, 30]. 실제로 ROS는 전립선 상피 세포와 간질 세포의 과증식을 유지하는 데 핵심적인 역할을 한다고 보고된 바 있다[3, 33]. 아울러 ROS 생산은 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 경로를 통해 다량의 반응성종(reactive species)을 생산하는 염증 세포의 모집을 증폭시키며, 산화적 스트레스는 BPH에서 염증 상태의 합병증 유발에 기여한다[2, 35]. 그럼에도 불구하고 *in vitro* BPH 모델에서 ROS 생성 관련 연구는 거의 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서 사용한 LNCaP 세포에서도 DHT 처리에 의하여 산화적 스트레스가 유도되는지, 또한 이러한 산화적 스트레스가 오미자 및 산수유 추출물에 의하여 상쇄될 수 있는지에 관한 연구를 수행하였다. 따라서 DHT가 처리된 LNCaP 세포에서 ROS가 생성되는지를 조사하기 위하여 DCF-DA 염색에 의한 유세포분석을 수행하였다. Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이, DHT

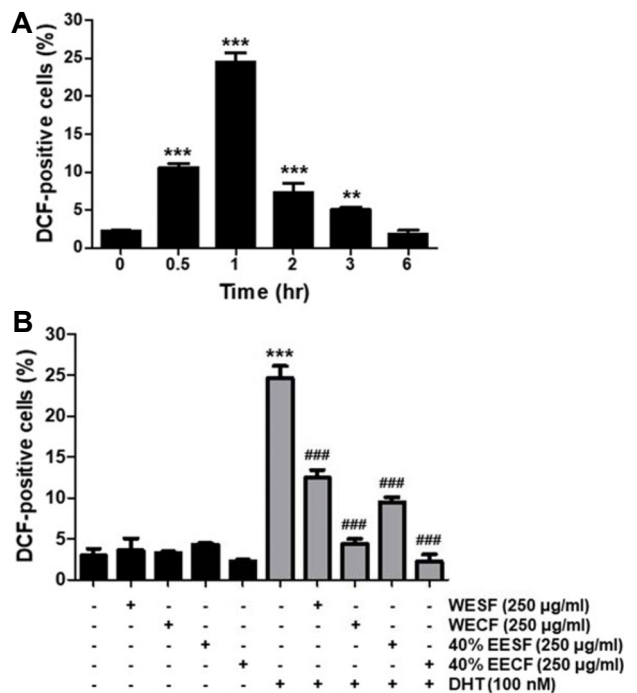


Fig. 4. Effects of Schisandrae Fructus and Corni Fructus extracts on DHT-induced ROS generation in LNCaP cells. The cells were treated with 100 nM DHT for the indicated times (A) or pretreated with or without 250 µg/ml WESF, WECF, 40% EESF or 40% EECF for 1 hr, before 100 nM DHT treatment for 1 hr (B). The cells were collected and stained with DCF-DA dye for flow cytometry analysis. The levels of intracellular ROS generation were determined by counting the percentages of DCF-DA-stained cells. Data are expressed as the mean ± SD (***p*<0.01 and ****p*<0.001 vs. control group; ###*p*<0.001 vs. DHT-treated group).

에 노출된 LNCaP 세포는 DHT 처리 30분 이내부터 ROS의 생성이 매우 증가되었으며, DHT 처리 1시간의 조건에서 대조군 대비 10배 이상의 ROS가 생성되었고, 그 이후부터는 시간의 경과에 따라 점차 감소하여 6시간 경과 후에는 대조군과 유사한 수준으로 감소되었다. 따라서 오미자 및 산수유 추출물이 1시간 처리된 세포에 DHT를 1시간 처리한 후 ROS 생성 변화의 여부를 조사하였다. Fig. 4B의 결과에 의하면, DHT에 의한 ROS의 생성은 오미자와 산수유 추출물의 처리 농도의존적으로 억제되었으며, ROS 생성의 억제 효능에서도 열수 추출물에 비하여 40% 에탄올 추출물에서 더 높게 나타났다. 이는 DHT에 의한 *in vitro* BPH 모델 유도 초기 단계에 ROS 생성이 동반되었음을 보여주는 것이며, 오미자와 산수유 추출물의 이를 강력하게 억제하였음을 알 수 있다. 아울러 본 연구에서 관찰된 오미자와 산수유 추출물의 항산화 활성은 그동안 다양한 질환 모델에서 밝혀진 두 추출물의 항산화 활성에 대한 결과와 잘 일치된다[7, 11, 12, 16, 23, 37, 39, 46, 49]. 또한 BPH 억제 효능을 가지는 몇 가지 천연물이 항산화 활성과

연관성을 가진다는 최근 선행 연구들 또한 본 연구의 결과를 잘 지지하여 준다[18, 21, 42].

***In vitro* BPH LNCaP 세포 모델에서 40% 에탄올 추출물의 혼합물 효능 비교**

다음은 이상에서 얻은 결과를 바탕으로 다양한 평가항목에서 효능이 우수하였던 오미자 및 산수유 에탄올 추출물을 대상으로 복합 비율을 달리한 조건에서 최적의 BPH 제어 효과 조합 비율의 도출을 시도하였다. 이를 위하여 서로 다른 처리 혼합 비율(40% 오미자 및 산수유 에탄올 추출물의 1:1, 2:1 및 1:2 조합)에 따른 DHT로 유도된 세포증식 억제 효능을 평가하였다. Fig. 5A의 MTT 분석 결과에 의하면, 1:1, 2:1 및 1:2 비율의 오미자 및 산수유 40% 에탄올 추출물의 혼합물을 각각 250 µg/ml로 처리시 LNCaP 세포에 유의적인 독성을 나타내지 않았으며, DHT로 유도된 LNCaP 세포증식 유도 현상이 오미자 및 산수유 40% 에탄올 추출물의 2:1 복합 혼합물에서도 유의적으로 억제되었지만, 1:1 및 1:2 비율의 복합 혼합물에서

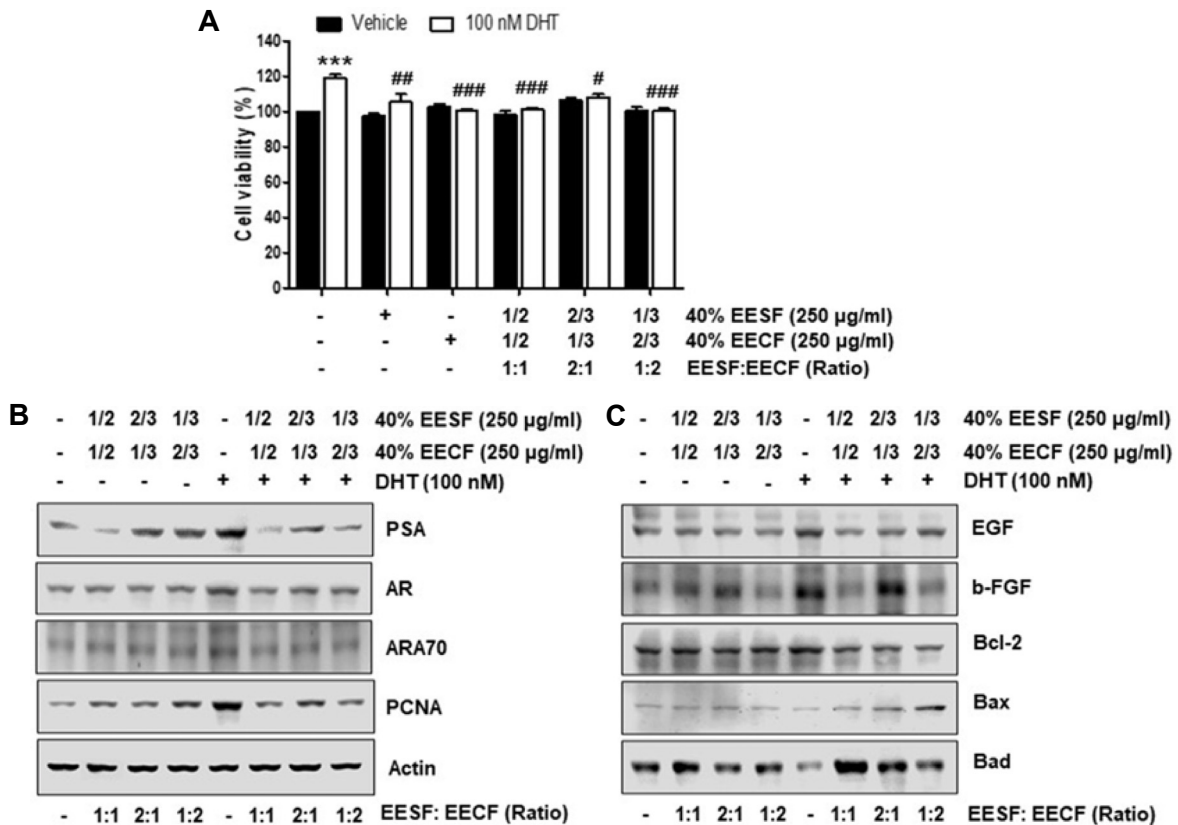


Fig. 5. Effects of mixtures containing ethanol extracts of Schisandrae Fructus and Corni Fructus on the cell viability and the expression of BPH-related proteins, growth factors and Bcl-2 family proteins in DHT-stimulated LNCaP cells. The cells were treated with 1:1, 2:1 and 1:2 mixtures containing 40% EESF and 40% EECF for 48 hr or pretreated with or without their mixtures for 1 hr, before 100 nM DHT treatment for 48 hr. (A) The cell viability was measured by an MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD (^{***}*p*<0.001 vs. control group; [#]*p*<0.05, ^{##}*p*<0.01 and ^{###}*p*<0.001 vs. DHT-treated group). (B and C) The expression levels of the indicated proteins were determined by Western blotting with whole cell lysates. Equal protein loading was confirmed by actin as an internal control.

더욱 억제되었다. 또한, DHT로 유도된 AR, ARA70, PSA와 PCNA 발현 역시 2:1 복합 혼합물에 비해 1:1 및 1:2 비율의 복합 혼합물에서 더욱 감소되었다(Fig. 5B). 그리고 성장인자들의 발현을 평가한 결과에서는 1:1 비율의 혼합물 처리군에서 EGF와 b-FGF의 발현이 모두 억제되었으며, 1:2 비율의 혼합물 처리군에서는 b-FGF만이 억제되었고, 2:1 비율의 복합 혼합물 처리군에서는 두 인자의 억제 효과가 미미하였다(Fig. 5C). 아울러 Bcl-2 family에 속하는 단백질 중에서 DHT에 의한 Bcl-2의 발현 증가에서는 세 가지 조합의 복합물 처리에서 모두 유사한 억제 효과를 보였으며, Bax 및 Bad의 발현 억제 효과는 1:2 및 2:1 복합 혼합물 처리군에서 상대적으로 높은 발현 유도 현상을 보여주었다(Fig. 5C). 또한, DHT 처리에 의해 증가된 ROS의 생성은 1:1 비율의 오미자 및 산수유 40% 에탄올 추출물 복합 처리군에서는 거의 대조군 수준으로 유지되었으며, 2:1 및 1:2 비율의 오미자 및 산수유 40% 에탄올 추출물의 혼합물 전처리군에서도 유의적인 감소 효과가 나타났다(Fig. 6A). 결론적으로 세 가지 비율의 복합 혼합물 중 1:1 비율의 조합에서 DHT에 의해 증가된 BPH 유도 관련 인자, 성장인자 및 ROS의 생성을 억제하는 능력이 상대적으로 높은 것으로 나타나, 1:1 비율의 복합 혼합물이 최적의 조합임을 알 수 있다.

In vitro BPH LNCaP 세포 모델에서 40% 및 60% 에탄올 추출물 복합 혼합물의 효능 비교

이상의 결과에 의하면, 오미자 및 산수유의 열수 추출물에 비해 40% 에탄올 추출물이 DHT에 의한 LNCaP 세포의 증식, AR 관련 유전자 발현 및 ROS 생성의 억제에 더 효과적으로 나타나 추출 방법에 따라 효능의 차이가 있음을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 오미자 및 산수유 에탄올 추출과정에서 에탄올의 농도 변화에 따른 차이점을 확인하기 위하여 60% 에탄올 추출물과 40% 에탄올 추출물의 효능을 추가로 비교하였다. 이를 위하여 LNCaP 세포를 대상으로 60% 에탄올 추출물 및 1:1 비율의 혼합 복합물을 처리하여 MTT 분석을 실시한 결과에 의하면, 250 µg/ml 처리 범위에서도 세포 독성을 나타내지 않았다. 그리고 DHT로 유도된 LNCaP 세포증식의 억제 효과도 40% 에탄올 추출물과 유사하게 나타났다(Data not shown). 그러나 ROS 생성 억제 측면에서는 40%의 에탄올 오미자 및 산수유 추출물에 비하여 60%의 에탄올 추출물에서 매우 강하게 나타났으며, 40%의 에탄올 오미자 및 산수유 추출물의 1:1 비율의 복합 혼합물에 비하여 60%의 에탄올 복합 혼합물 처리군에서 더 높은 ROS 생성 억제 효과를 나타냈다(Fig. 6B). 또한, DHT에 의해 유도된 AR 관련 유전자들의 발현 억제 효과에서도 40%의 에탄올 추출물에 비하여 60%의 에탄올 추출물이 각각의 단독 그리고 1:1 비율로의 복합물 처리군에서 높게 나타났다(Fig. 7A).

이상에서 확인된 오미자 및 산수유의 추출물에 의한 BPH

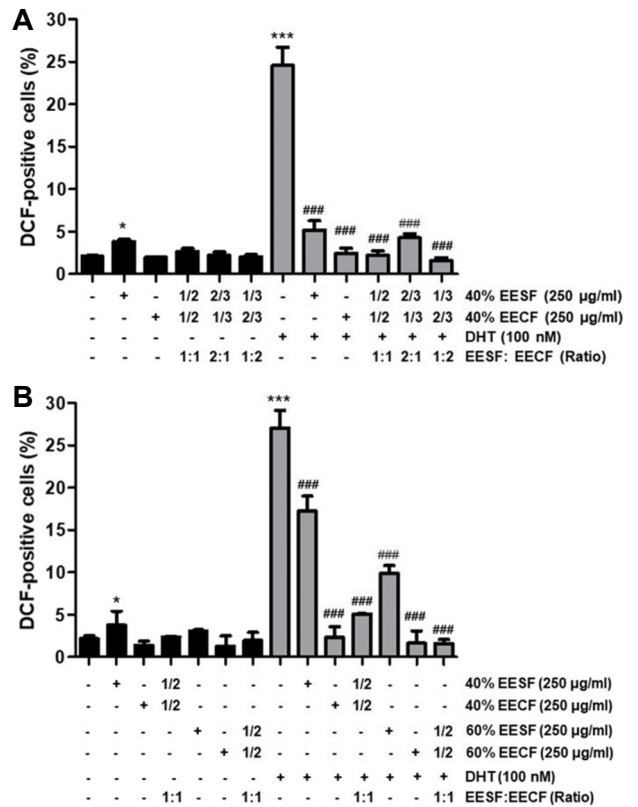


Fig. 6. Effects of mixtures containing ethanol extracts of Schisandra Fructus and Corni Fructus on the ROS generation in DHT-stimulated LNCaP cells. (A) The cells were treated with 250 µg/ml 40% EESF and 40% EECF, 1:1, 2:1 and 1:2 mixtures containing 40% EESF and 40% EECF for 1 hr, and then stimulated with 100 nM DHT treatment for 1 hr. (B) The cells were treated with 250 µg/ml 40% or 60% EESF and EECF or their 1:1 mixtures for 1 hr and then treated with or without 100 nM DHT for 1 hr. The cells were collected and stained with DCF-DA dye for flow cytometry analysis. The levels of intracellular ROS generation were determined by counting the percentages of DCF-DA-stained cells. Data are expressed as the mean ± SD (*p*<0.05 and ****p*<0.001 vs. control group; ###*p*<0.001 vs. DHT-treated group).

개선 효과가 PSA 수준의 감소와 직접 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 40% 및 60%의 에탄올 추출물을 각각 단독 또는 1:1 비율의 복합 혼합물을 전처리한 후, DHT가 존재하는 배지에서 48시간 배양된 LNCaP 세포를 대상으로 PSA 생성의 정도를 비교하였다. Fig. 7B의 ELISA 결과에 의하면, 대조군에 비하여 DHT가 단독 처리된 LNCaP 세포에서 PSA의 생성 수준은 10배 이상 증가되어, Fig. 3B에 제시한 단백질 수준에서의 PSA 발현의 증가와 잘 일치되었다. 그러나 40% 에탄올 오미자 및 산수유 추출물 단독 처리군에서도 단백질 수준에서의 PSA 발현의 다소 증가하였듯이(Fig. 3B) 40% 및 60% 에탄올 오미자 및 산수유 추출물 단독 처리군에서도 PSA

의 수준이 처리 농도 의존적으로 다소 증가되었다(Fig. 7B). 그러나 DHT 처리에 의해 증가된 PSA의 생성의 정도가 에탄올 단독 및 1:1 복합 혼합물 처리군에서 처리 농도 증가 따라 유의적인 감소를 보였다. 특히 40% 에탄올 1:1 복합 혼합물 처리군에 비하여 60% 1:1 복합 혼합물 처리군에서 PSA 생성 억제 효능이 높게 관찰되어 60% 에탄올 추출물이 DHT로 유도된 BPH의 개선하는 효과가 좀 더 높은 것으로 추측된다. 그러나 오미자 및 산수유 에탄올 추출물 자체에 의해 증가된 PSA 수준이 생체 내에서는 어떤 의미를 지니는지에 관한 연구가 추가로 요구된다.

본 연구에서는 LNCaP 세포를 이용한 *in vitro* BPH 모델에서 오미자와 산수유의 열수 및 에탄올 추출물에 의한 BPH 개선 효과를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 오미자 및

산수유 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비하여 DHT에 의하여 유도된 LNCaP 세포의 증식 억제능이 우수하였으며, 이는 BPH의 바이오 마커(AR, PSA, PCNA 및 ARA70) 뿐만 아니라 성장인자(EGF 및 b-FGF)의 발현 저해 및 세포사멸 조절 인자(Bcl-2 family 단백질)의 발현 조절과 연관이 있었다(Fig. 8). 아울러 오미자 및 산수유 추출물은 DHT에 의한 산화적 스트레스(ROS) 완화 효과가 있었으며, 열수 추출물에 비하여 에탄올 추출물에서 항산화 효능이 높게 나타났다. 그리고 이러한 효능은 오미자와 산수유의 에탄올 단독 추출물에 비하여 1:1 비율로 조합하여 혼합한 복합물에서 높게 나타났으며, 40% 에탄올 추출물에 비하여 60% 에탄올 추출물의 1:1 복합 혼합물에서 BPH의 바이오 마커에 대한 개선 효과가 우수하였다. 그러나 오미자 및 산수유 추출물에 의한 성장인자 조절 기전

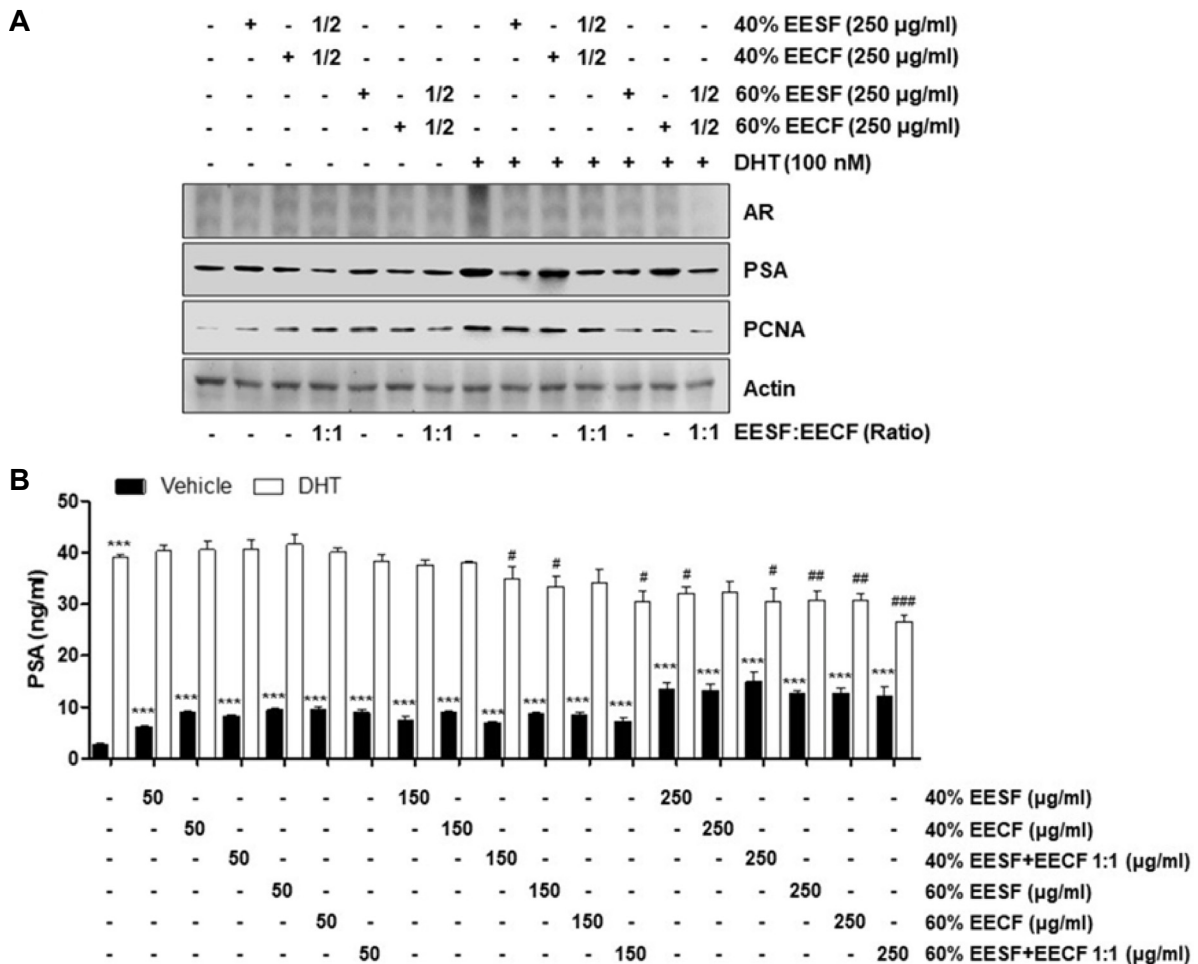


Fig. 7. Effects of mixtures containing ethanol extracts of Schisandrae Fructus and Corni Fructus on the expression of BPH-related proteins and the levels of PSA in DHT-stimulated LNCaP cells. (A) The cells were treated with 250 µg/ml 40% or 60% EESF and EECF or their 1:1 mixtures for 1 hr and then treated with or without 100 nM DHT for 48 hr. The expression levels of AR, PSA, PCNA and ARA70 were determined by Western blotting with whole cell lysates. Equal protein loading was confirmed by actin as an internal control. (B) The cells were treated with the indication concentrations of EESF, EECF and their 1:1 mixture for 1 hr, and then treated with or without 100 nM DHT for 48 hr. The cell culture supernatants were collected and then the levels of PSA were examined by ELISA. Data are expressed as the mean ± SD (***p<0.001 vs. control group; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. DHT-treated group).

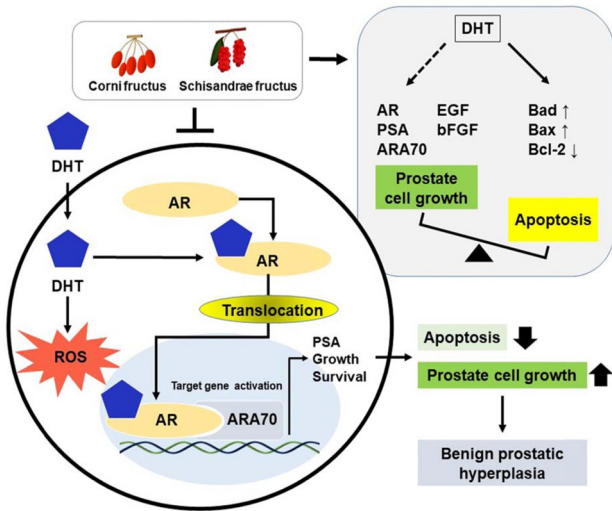


Fig. 8. A suggested schematic model for the inhibitory effect of Schisandrae Fructus and Corni Fructus on pathogenesis of BPH.

과 세포사멸 조절 인자들의 조절 작용 기전에 대한 상위 신호계의 역할 및 AR 신호계 조절에서 ROS의 역할에 관한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 아울러 오미자와 산수유의 추출 방법에 따른 생리활성 성분의 차이 및 그들이 BPH의 개선에 미치는 영향 등이 동물 실험을 통하여 추가로 밝혀져야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업(S2874684)” 연구개발비 지원으로 수행된 연구 결과임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R. and Zirkin, B. R. 2018. Androgen action in prostate function and disease. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* **6**, 62-77.
2. Berger, A. P., Kofler, K., Bektic, J., Rogatsch, H., Steiner, H., Bartsch, G. and Klocker, H. 2003. Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *Prostate* **57**, 57-65.
3. 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.
4. Cheon, S. Y., Jin, B. R., Kim, H. J. and An, H. J. 2020. Oleanolic

acid ameliorates benign prostatic hyperplasia by regulating PCNA-dependent cell cycle progression *in vivo* and *in vitro*. *J. Nat. Prod.* **83**, 1183-1189.

5. Choi, Y. J., Fan, M., Tang, Y., Yang, H. P., Hwang, J. Y. and Kim, E. K. 2019. *In vivo* effects of polymerized anthocyanin from grape skin on benign prostatic hyperplasia. *Nutrients* **11**, 2444.
6. Chu, K. F., Rotker, K. and Ellsworth, P. 2013. The impact of obesity on benign and malignant urologic conditions. *Postgrad. Med.* **125**, 53-69.
7. Chun, J. N., Cho, M., So, I. and Jeon, J. H. 2014. The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia* **97**, 224-233.
8. Clément, C., Witschi, U. and Kreuzer, M. 2012. The potential influence of plant-based feed supplements on sperm quantity and quality in livestock: a review. *Anim. Reprod. Sci.* **132**, 1-10.
9. Czerwińska, M. E. and Melzig, M. F. 2018. *Cornus mas* and *Cornus Officinalis*-analogues and differences of two medicinal plants traditionally used. *Front. Pharmacol.* **9**, 894.
10. Dhurat, R., Sharma, A., Rudnicka, L., Kroumpouzos, G., Kassir, M., Galadari, H., Wollina, U., Lotti, T., Golubovic, M., Binic, I., Grabbe, S. and Goldust, M. 2020. 5-Alpha reductase inhibitors in androgenetic alopecia: Shifting paradigms, current concepts, comparative efficacy, and safety. *Dermatol. Ther.* **33**, e13379.
11. Dong, Y., Feng, Z. L., Chen, H. B., Wang, F. S. and Lu, J. H. 2018. Corni Fructus: a review of chemical constituents and pharmacological activities. *Chin. Med.* **13**, 34.
12. Gao, X., Liu, Y., An, Z. and Ni, J. 2021. Active components and pharmacological effects of *Cornus officinalis*: Literature review. *Front. Pharmacol.* **12**, 633447.
13. Halvorsen, O. J. 2008. Molecular and prognostic markers in prostate cancer. A study of cell-cycle regulators, angiogenesis and candidate markers. *APMIS* **123**, 5-62.
14. Heinlein, C. A. and Chang, C. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. *Endocr. Rev.* **23**, 175-200.
15. Hong, G. L., Park, S. R., Jung, D. Y., Karunasagara, S., Lee, K. P., Koh, E. J., Cho, K., Park, S. S. and Jung, J. Y. 2020. The therapeutic effects of *Stauntonia hexaphylla* in benign prostate hyperplasia are mediated by the regulation of androgen receptors and 5alpha-reductase type 2. *J. Ethnopharmacol.* **250**, 112446.
16. 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.
17. Hwangbo, H., Kwon, D. H., Choi, E. O., Kim, M. Y., Ahn, K. I., Ji, S. Y., Kim, J. S., Kim, K. I., Park, N. J., Kim, B. H., Kim, G. Y., Hong, S. H., Park, C., Jeong, J. S. and Choi, Y. H. 2018. Corni Fructus attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by suppressing 5alpha-reductase and androgen receptor expression in rats. *Nutr. Res. Pract.* **12**, 378-386.
18. Jahan, N., Chowdhury, A., Li, T., Xu, K., Wei, F. and Wang,

- S. 2021. Neferine improves oxidative stress and apoptosis in benign prostate hyperplasia *via* Nrf2-ARE pathway. *Redox Rep.* **26**, 1-9.
19. Jin, B. R., Cheon, S. Y., Kim, H. J., Kim, M. S., Lee, K. H. and An, H. J. 2020. Anti-proliferative effects of standardized *Cornus officinalis* on benign prostatic epithelial cells *via* the PCNA/E2F1-dependent cell cycle pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9567.
 20. Karunasagara, S., Hong, G. L., Jung, D. Y., Kim, K. H., Cho, K. and Jung, J. Y. 2020. 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* **15**, e0236879.
 21. Kim, E. H., Brockman, J. A. and Andriole, G. L. 2018. The use of 5-alpha reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Asian J. Urol.* **5**, 28-32.
 22. Kim, J. H., Park, K. M. and Lee, J. A. 2019. Herbal medicine for benign prostatic hyperplasia: A protocol for a systematic review of controlled trials. *Medicine (Baltimore)* **98**, e14023.
 23. Kopustinskiene, D. M. and Bernatoniene, J. 2021. Antioxidant effects of *Schisandra chinensis* fruits and their active constituents. *Antioxidants (Basel)* **10**, 620.
 24. La Vignera, S., Condorelli, R. A., Russo, G. I., Morgia, G. and Calogero, A. E. 2016. Endocrine control of benign prostatic hyperplasia. *Andrology* **4**, 404-411.
 25. Langan, R. C. 2021. Men's health: Benign prostatic hyperplasia. *FP Essent.* **503**, 18-22.
 26. Li, C., Hu, W. L., Lu, M. X. and Xiao, G. F. Resveratrol induces apoptosis of benign prostatic hyperplasia epithelial cell line (BPH-1) through p38 MAPK-FOXO3a pathway. *BMC Complement. Altern. Med.* **19**, 233.
 27. Li, Y., Huang, J., Lu, J., Ding, Y., Jiang, L., Hu, S., Chen, J. and Zeng, Q. 2019. The role and mechanism of Asian medicinal plants in treating skin pigmentary disorders. *J. Ethnopharmacol.* **245**, 112173.
 28. Ma, C. H., Lin, W. L., Lui, S. L., Cai, X. Y., Wong, V. T., Ziea, E. and Zhang, Z. J. 2013. Efficacy and safety of Chinese herbal medicine for benign prostatic hyperplasia: systematic review of randomized controlled trials. *Asian J. Androl.* **15**, 471-482.
 29. Madersbacher, S., Sampson, N. and Culig, Z. 2019. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: A mini-review. *Gerontology* **65**, 1-7.
 30. 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.
 31. Minutoli, L., Rinaldi, M., Marini, H., Irrera, N., Crea, G., Lorenzini, C., Puzzolo, D., Valenti, A., Pisani, A., Adamo, E. B., Altavilla, D., Squadrito, F. and Micali, A. 2016. Apoptotic pathways linked to endocrine system as potential therapeutic targets for benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1311.
 32. Prajapati, A., Gupta, S., Mistry, B. and Gupta, S. 2013. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 107954.
 33. Ren, H., Li, X., Cheng, G., Li, N., Hou, Z., Suo, J., Wang, J. and Za, X. 2015. The effects of ROS in prostatic stromal cells under hypoxic environment. *Aging Male* **18**, 84-88.
 34. Rybníkář, M., Šmejkal, K. and Žemlička, M. 2019. *Schisandra chinensis* and its phytotherapeutic applications. *Ceska. Slov. Farm.* **68**, 95-118.
 35. Sampson, N., Koziel, R., Zenzmaier, C., Bubendorf, L., Plas, E., Jansen-Dürr, P. and Berger, P. 2011. ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol. Endocrinol.* **25**, 503-515.
 36. Soulitzis, N., Karyotis, I., Delakas, D. and Spandidos, D. A. 2006. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFβ1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Oncol.* **29**, 305-314.
 37. Sowndhararajan, K., Deepa, P., Kim, M., Park, S. J. and Kim, S. 2018. An overview of neuroprotective and cognitive enhancement properties of lignans from *Schisandra chinensis*. *Biomed. Pharmacother.* **97**, 958-968.
 38. Srivilai, J., Minale, G., Scholfield, C. N. and Ingkaninan, K. 2019. Discovery of natural steroid 5 alpha-reductase inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **17**, 44-57.
 39. Szopa, A., Ekiert, R. and Ekiert, H. 2017. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochem. Rev.* **16**, 195-218.
 40. Thomas, D., Chughtai, B., Kini, M. and Te, A. 2017. Emerging drug therapies for benign prostatic hyperplasia. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* **22**, 201-212.
 41. Traish, A. M., Hassani, J., Guay, A. T., Zitzmann, M. and Hansen, M. L. 2011. Adverse side effects of 5alpha-reductase inhibitors therapy: Persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J. Sex. Med.* **8**, 872-884.
 42. Vafa, A., Afzal, S. M., Barnwal, P., Rashid, S., Shahid, A., Alpashree, Islam, J. and Sultana, S. 2020. Protective role of diosmin against testosterone propionate-induced prostatic hyperplasia in Wistar rats: Plausible role of oxidative stress and inflammation. *Hum. Exp. Toxicol.* **39**, 1133-1146.
 43. Velonas, V. M., Woo, H. H., Remedios, C. G. and Assinder, S. J. 2013. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11034-11060.
 44. Vickman, R. E., Franco, O. E., Moline, D. C., Vander Griend, D. J., Thumbikat, P. and Hayward, S. W. 2020. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J. Urol.* **7**, 191-202.
 45. Wei, F., He, X., Xu, K. and Wang, S. 2020. Stepwise frontal analysis coupled with cell membrane chromatography for affinity screening and characterization analysis of bioactive constituent from the mature fruits of *schisandra chinensis*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1161**, 122443.
 46. Wu, Y., Wang, X., Shen, B., Kang, L. and Fan, E. 2013. Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from Fructus corni. *Recent Pat Food Nutr. Agri.* **5**, 57-61.

47. Yeh, H. F., Li, T. F., Tsai, C. H., Wu, P. W., Huang, Y. H., Huang, W. J., Chen, F. J., Hwang, S. J., Chen, F. P. and Wu, T. P. 2020. The effects of a Chinese herbal medicine (VGHBPH0) on patients with benign prostatic hyperplasia: A pilot study. *J. Chin. Med. Assoc.* **83**, 967-971.
48. Zhang, M., Xu, L. and Yang, H. 2018. *Schisandra chinensis* fructus and its active ingredients as promising resources for the treatment of neurological diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1970.
49. Zhou, Y., Men, L., Sun, Y., Wei, M. and Fan, X. 2021. Pharmacodynamic effects and molecular mechanisms of lignans from *Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.), a current review. *Eur. J. Pharmacol.* **892**, 173796.
50. Zhou, Z., Cui, Y., Wu, J. and Jin, H. 2020. 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.* **20**, 1566-1574.
51. Zhu, P., Li, J., Fu, X. and Yu, Z. 2019. Schisandra fruits for the management of drug-induced liver injury in China: A review. *Phytomedicine* **59**, 152760.

초록 : 오미자와 산수유 추출물이 dihydrotestosterone가 처리된 LNCaP 인간 전립선 암세포의 증식 및 전립선 비대 유발 인자 발현에 미치는 영향

김민영^{1,2} · 지선영^{1,2} · 황보현^{1,2} · 이혜숙^{1,2} · 김태희³ · 윤선혜⁴ · 김현진⁴ · 김성연⁵ · 김태중⁵ · 김민지⁵ · 정하은⁵ · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소, ³㈜합소아제약 중앙연구소, ⁴㈜네이처텍, ⁵충북테크노파크 바이오센터 화장품 산업팀)

오미자와 산수유는 한국을 포함한 동아시아 지역에서 다양한 질병의 예방 및 치료에 오랫동안 사용되어 왔다. 최근에 이들 추출물에 의한 양성 전립선 비대증(BPH)의 발병 및 진행을 억제할 수 있다는 가능성에 대한 보고가 있었지만 관련 기전에 대한 연구는 여전히 부족한 실정이다. 본 연구에서는 LNCaP 전립선 세포를 사용하여 DHT 처리에 의한 *in vitro* BPH 모델에서 오미자 및 산수유 추출물에 의한 BPH의 개선 가능성을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 오미자와 산수유의 열수 및 에탄올 추출물은 DHT 처리에 의해 LNCaP 세포의 증식을 유의적으로 억제하였으며, DHT로 유도된 BPH 바이오 마커와 성장인자의 발현을 현저히 감소시켰다. 그들은 또한 세포사멸 관련 인자의 발현을 조절하였고, DHT 매개 산화적 스트레스를 유의적으로 감소시켰으며, BPH 발병에 관여하는 주요 인자에 대한 보호 효과는 열수 추출물보다 에탄올 추출물 처리군에서 더 효과적이었다. 또한, BPH에 대한 보호 효과는 오미자와 산수유의 에탄올 추출물 단독 처리군보다 1:1 복합 혼합물 처리군에서 더 높았으며, 60% 에탄올 추출물이 40% 에탄올 추출물보다 더 높은 개선 효과를 보였다. 따라서 본 연구 결과는 오미자와 산수유 추출물이 항산화 활성과 연관된 androgen 신호 전달 경로의 억제를 통해 전립선 세포의 과다 증식을 방지함으로써 BPH 개선에 관여할 수 있음을 의미한다. 따라서 오미자와 산수유 추출물은 BPH의 임상 치료에 유용할 수 있으며, 이 두 추출물의 조합은 BPH 개선에 상승 효과를 낼 수 있을 것이다.