

토마토 추출액 복합체가 전립선 암 세포와 전립선 비대증에 미치는 영향

강한샘 · 김광윤 · 정일 · 오성덕 · 김창훈 · 심봉섭 · 박근형¹ · 오석중*

(주)이코바이오, ¹전남대학교 농업생명과학대학 응용생물공학부

The Effect of the Compound of Tomato Extract to the Prostatic Cancer Cell and the Prostate of the Rat Model of Benign Prostatic Hyperplasia

Han Saem Kang, Gwang Yun Kim, Il Jung, Sung Dug Oh, Chang Hoon Kim, Bong Sup Shim,
Keun Hyung Park¹ and Suk Jung Oh*

ECOBIO INC. Rm 802, TBI Center, Chonnam National University

¹Department of Biological & Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University

Abstract – Benign prostatic hyperplasia (BPH) is one of the common disease in elderly men. Recently old-age population is increased and we are growing more and more interested in clinical importance of BPH. In this study, the effect of PLX, which was the mixture of tomato extract (including 2% of lycopene) and chitooligosaccharide, on prostatic cancer cell and testosterone-induced BPH in adult rats of the Sprague Dawley strain was determined. The cell viability was evaluated by MTT method using L929 and LNCaP cell line, pretreated with various concentrations of PLX. The expression of prostatic specific antigen (PSA) and 5 α -reductase genes were evaluated by realtime PCR using LNCaP cell line and compared various concentrations of PLX with 50 μ M of finasteride. An experimental prostatic hyperplasia was induced in male Sprague Dawley rats by giving testosterone for 8 weeks. After 2 weeks from start of giving testosterone, PLX and finasteride were administered orally once a day. The results were analyzed with prostate weight per body weight at 8 weeks. Cell viability of L929 cell line decreased specifically at the concentration of 2000 μ g/ml of PLX. The cytotoxicity of PLX to the LNCaP cell line was shown at above 500 μ g/ml of PLX. The inhibitory effect of PLX to the expression of PSA and 5 α -reductase genes in LNCaP cell line increased with the concentration of PLX. In vivo study, the results of PLX and finasteride administered group were 3.75 ± 0.60 and 3.49 ± 0.49 prostate weight $\times 10^3$ /body weight, which were lower than the result of BPH induced group (4.74 ± 0.58). These results suggested that PLX may be an effective material in BPH by having the role of the 5 α -reductase inhibitor.

Key words – benign prostatic hyperplasia, chitooligosaccharide, lycopene, prostate, PSA, 5 α -reductase

전립선 비대증은 요도를 둘러싼 전립선이 어떠한 원인에 의해 비대되어 소변의 원활한 배출을 막고 이로 인한 증상이 발생한 상태를 말한다. 최근의 통계에 따르면 전 연령에서 25%가 전립선 비대를 나타내게 되고, 나이가 들 수록 발병률이 증가하는데, 60대 이상 남성의 50% 이상, 그리고 85세 이상 남성의 90% 이상에서 전립선 비대가 나타난다고 한다.^{1,2)} 이러한 전립선 비대증의 정확한 발병 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 일반적으로 받아들여지고 있는 가설 중의 하나는 과다한 dehydrotestosterone(DHT)의 생성에 의한 전립선 세포의 비대를 원인으로 보고 있다.^{3,4)} 즉, 혈액 내에서 testosterone이 과다하게 존재하면 전립선에서 5 α -

reductase에 의해 DHT를 다량 합성하게 되고 합성된 DHT는 전립선 세포에 있는 androgen receptor에 결합하여 전립선 비대를 유발하게 된다. 또한, 남성이 노화가 되면서 남성 호르몬의 분비가 줄어들게 되고, 그로 인해 내분비계 균형을 유지하기 위해 전립선 세포의 androgen receptor가 증가하게 되어 DHT가 더 많은 부위에 결합함으로서 전립선의 비대가 유발하게 된다.⁵⁾

Testosterone을 활성화가 더욱 높은 DHT로 변환시키는 효소인 5 α -reductase는 type I과 type II 두 종류로 나뉘며, type I 5 α -reductase는 전립선에도 존재하지만 간과 신장, 그리고 피부, 특히 피지선과 모낭에 많이 존재한다. type II 5 α -reductase는 남성 생식기와 전립선에 다량 존재하며 간과 피부에는 상대적으로 양이 적다.^{6,7)} 전립선 비대증에 이

*교신저자(E-mail): sjoh555@hanmail.net
(FAX): 062-530-0784

환되었을 경우 이러한 5 α -reductase의 양이 증가하는 경향을 보이게 된다.⁸⁾ 전립선 비대증의 치료를 위해 5 α -reductase를 저해하는 약물을 사용하는 것은 전립선의 비대를 유발하는 DHT의 합성을 억제하여 실제적으로 전립선의 크기를 줄여주는 근본적인 치료 방법이라고 할 수 있다. 하지만 이러한 5 α -reductase inhibitor의 단점은 최소한 4~6개월을 복용해야만 배뇨 장애가 개선되는 것을 환자가 느낄 수 있다 는 것이고 또한, 복용을 중단하면 재발된다는 단점도 있다. 전립선 비대증 치료를 위한 또 다른 약물요법으로는 α_1 -receptor blocker가 있다. α_1 -receptor blocker는 전립선의 periurethral zone에 있는 평활근의 긴장성 수축을 완화시켜 요도의 협착을 억제하여 배뇨 장애를 개선한다. 복용 시 신속하게 배뇨 장애를 개선할 수 있다는 장점이 있지만, 전립선이 비대해지는 것을 막을 수 없는 대증 요법으로, 근본적인 치료가 불가능하다는 단점이 있다.

기존의 약물 치료법의 이러한 단점들과 삶의 질을 떨어뜨리는 전립선 비대증 증상의 특징으로 인하여, 배뇨 장애를 개선하기 위해 생약을 이용하는 사례가 늘고 있다.^{9,10)} 전립선 비대증에 이환된 사람들 중에서 비수술적인 치료법을 선택한 남자의 3분의 1이 생약을 이용하거나 생약과 합성의 약품을 병용하고 있다.¹¹⁾ 몇몇 생약들은 일정 기간 섭취시 하부 요도 증상과 배뇨장애를 어느 정도 개선하는 효과가 있다는 객관적인 증거가 있다.^{12,13)}

토마토에 함유된 다양한 카로티노이드 성분과 플라본류는 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 체내에서 항산화,¹⁴⁾ androgen receptor 발현 억제,¹⁵⁾ 항암¹⁶⁾ 등의 효과를 발휘하는 것으로 연구되고 있다. 토마토 추출액에 다행 포함된 라이코펜은 카로티노이드 색소 성분으로 강력한 항산화능을 가지고 있기 때문에 전립선 암의 발생 위험을 약 21%까지 낮춘다는 보고가 있다.¹⁷⁾ 또한, 라이코펜은 5 α -reductase의 발현을 억제하여 결과적으로 prostatic spermine-binding protein, prostatic steroid-binding protein C2, 그리고 cystatin related protein 2와 같은 androgen target gene의 발현을 억제하기 때문에 전립선암 뿐만 아니라 전립선 비대증에도 효과가 있을 것이라고 예상해 볼 수 있다.¹⁸⁾ 라이코펜은 안정제로 비타민 E가 소량 포함 시 남성호르몬 관련 유전자의 발현도가 더욱 억제된다.¹⁸⁾ 이러한 안정제의 역할을 함과 동시에 콜레스테롤 저하,¹⁹⁾ 면역력 증가,²⁰⁾ 항균,²¹⁾ 항암,²²⁾ 항산화²³⁾ 작용 등 탈아세틸화와 분자량에 따라 여러 가지 기능을 나타내는 키톤리고당을 라이코펜이 2% 함유된 토마토 추출액과 혼합하여 본 실험의 실험 물질로 사용하였다.

본 실험은 라이코펜이 2% 함유된 토마토 추출액과 키톤리고당을 3:5로 혼합, 균질화한 것을 PLX라고 명명하였으며, PLX를 이용하여 마우스 섬유모 세포인 L929과 전립선암 세포주인 LNCaP에 대한 세포 생존율을 측정하였으며, LNCaP

세포주에서 전립선 특이 항체인 prostate specific antigen (PSA)과 5 α -reductase를 역전사중합연쇄반응법으로 유전자 발현도를 측정하였고, 쥐에게 실험적으로 전립선 비대증을 유발하여 PLX의 구강 투여에 의한 전립선 무게의 감소에 대한 효과를 판별하였다.

재료 및 방법

In vitro study

실험 물질 – 라이코펜이 2% 함유된 토마토 추출액은 Lycored Natural Product Inc.(Israel)에서 제공 받아 사용하였으며, 키톤리고당은 (주)이코바이오에서 제작한 것을 사용하였다. 토마토 추출액과 키톤리고당을 3:5의 비율로 혼합하여 균질화한 물질인 PLX를 본 실험에 사용하였다. 양성 대조군으로는 5 α -reductase inhibitor 제제로 대표적인 약물인 finasteride를 사용하였다.

세포 생존율 실험 – 실험에 사용한 세포주는 총 2가지로, 생쥐 섬유모 세포의 일종인 L929과 androgen receptor에 의존적인 사람유래 전립선 종양 세포인 LNCaP을 사용하였다. 세포 배양은, L929은 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM배지를 사용하였으며, LNCaP은 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 RPMI1640배지를 사용하였다. 각 세포주는 37°C, 5% CO₂로 조정된 배양기 내에서 배양하였으며, 배양 액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 trypsin-EDTA로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 혈구계측기 (Hematocytometer)로 세포수를 계산하였다. 세포독성 시험은 MTT 정량법으로 하였다. 먼저, 배양한 세포주를 각각 5×10³ cell/ μ l 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이를 세포를 0(control), 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 μ g/ml 농도의 실험물질이 포함된 배양액에서 24시간 배양 후 MTT 200 μ g/ml가 포함된 배양액을 well당 200 μ g 씩 넣은 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 well당 100 μ g/ml 넣어 5분간 실온에 방치하며 Formazan을 용해한 후 microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

LNCaP 세포에서 RNA의 분리 – 배양한 LNCaP 세포에 PLX를 각각의 dish에 100, 200, 500, 1000 μ g/ml 농도로 처리하고, finasteride를 50 μ M의 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. 대조군은 아무것도 처리하지 않은 것으로 하였다. 농도별로 처리한 LNCaP 세포가 있는 100 mm dish를 1X PBS로 세척한 후 세포를 긁어모아서 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 세포를 모아서 RNAzolB 1000 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl₃) 100 μ l를 첨가한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 400 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol

Table I. The oligonucleotide used as primers were as follows

Gene	Oligonucleotide sequence
PSA	5'-CTCTCGTGGCAGGGCAGTCT-3' 5'-GGTCGTGGCTGGAGTCATCA-3'
5α-reductase	5'-GGCGATTATGTTCTGTACCTG-3' 5'-GCATAGGCCACACCACTCC-3'
GAPDH	5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' 5'-TCCATTGATGACAAGCTCCC-3'

400 μl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 70% 에탄올로 수세하고 5분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC로 처리한 20 μl의 증류수에 녹여 65°C의 heating block에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

역전시중합연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR) – RT 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 65°C에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μl 10 mM dNTPs, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmol/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor(20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5X RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

Realtime PCR – PCR은 Corbett Rotor-Gene 3000(Corbett Life Science, UK)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 2 μl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형

에 대한 primer는 PSA, 5α-reductase, GAPDH 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmol/μl)와 antisense primer(20 pmol/μl)를 혼합하여 3 μl를 가하고, Qiagen사의 QuantiTect SYBR Green PCR kit mix 10 μl를 첨가한 다음 최종 부피가 20 μl가 되도록 멀균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95°C, 15분, denaturation; 94°C, 20초, annealing; 60°C, 20초, elongation; 72°C, 20초를 60 cycle 조건으로 PCR을 수행하였다(Table I). PCR을 수행한 후 실험 결과는 Rotor-Gene 3000의 Delta Delta CT relative Quantitation으로 분석하였다.

In vivo study

실험 동물 – 3개월령의 수컷 Sprague Dawley계 쥐를 중앙실험동물에서 공급받아 사용하였다. 고형사료와 물은 상시 공급하고 실온 22±2°C, 상대습도 50~65%, 조도 200 lux (8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 testosterone를 투여하지 않고 생리식염수를 먹인 control군, testosterone를 투여하고 생리식염수를 먹인 T-control군, testosterone를 투여하고 finasteride를 먹인 T-finasteride군으로, 총 4군으로 나누었으며 군 당 8마리씩 배정하였다.

실험 방법 – 쥐에게 남성 호르몬인 Testosterone를 과다 투여하여 전립선 비대증을 유발하였다. 실험군은 총 4군으로 나누었으며 실험 방법은 Fig. 1과 같다. 즉, control군은 생리식염수를 testosterone 대신에 다른 군의 testosterone 투여법과 같은 방법으로, 실험 시작일부터 2주째까지는 생리식염수 0.3 ml를 2일에 한 번 오후 4시에 피하주사를 하였고, 실험 2주째부터 종료일인 8주째까지는 생리식염수 0.15 ml를 3일에 한 번 오후 4시에 피하주사를 하였다. 실험

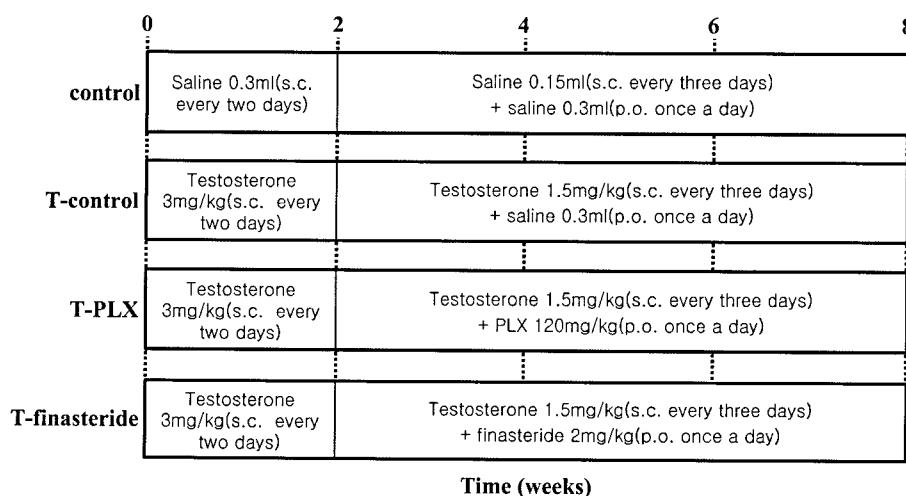


Fig. 1. Treatment protocol identifying the dose, route, and sequence of saline, testosterone, PLX, and finasteride used for treatment for each of the four groups evaluated. (s.c.:sub cutaneous, p.o.:by mouth)

2주째부터 종료일인 8주째까지는 매일 한 번 구강으로 생리식염수를 0.3 ml 투여하였다. T-control, T-PLX, T-finasteride군은 testosterone을 실험 시작 일부터 2주째까지 3 mg/kg으로 2일에 한 번 오후 4시에 피하주사를 하였고, 실험 2주째부터 종료일인 8주째까지 testosterone를 1.5 mg/kg으로 3일에 한 번 오후 4시에 피하 주사하였다. 실험 2주째부터 종료일까지 T-control, T-PLX, T-finasteride군에게 각각 생리식염수 0.3 ml, PLX 120 mg/kg, finasteride 2 mg/kg을 매일 한 번 경구투여하였다(Fig. 1).

실험 8주째에 모든 쥐를 안락사 시켜서 체중을 측정하고 부검을 하여 양쪽 고환과 전립선의 무게를 측정하였다. 실험 물질의 효과를 판별하기 위한 최종 데이터는 전립선 무게에서 체중을 나눈 후 1000을 곱한 값으로 하였다.

결 과

In vitro study

세포 생존율 실험 - MTT 정량방법을 이용하여 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/ml 농도의 PLX가 포함된 배양액에서 L929 세포주와 LNCaP 세포주의 24시간 배양 후 세포생존율을 측정하여 대조군과 비교하였다. L929에서는 PLX의 농도별 처리에 따라 50, 100 µg/ml에서는 대조군(100%)에 비하여 약간 증가하는 경향을 보였지만, 2000 µg/ml에서 79.41±2.09%로 유의적으로 생존율이 감소하였다(Fig. 2). LNCaP 세포주에서는 PLX의 농도별 처리에 따라서 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 감소하는 경향을 보였으며 500, 1000, 2000 µg/ml에서 각각 58.62±6.87, 51.14±7.52, 40.72±2.17%로 대조군에 비하여 유의적으로 생존율이 감소하였다(Fig. 3).

PSA 유전자 발현도 측정 - 배양한 LNCaP 세포에 PLX를 각각의 dish에 100, 200, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하고, finasteride를 50 µM의 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 realtime PCR법으로 PSA 수치를 측정한 결과, 대조군(100%)에 비하여 finasteride 처리군의 PSA 수치가 18%로 현

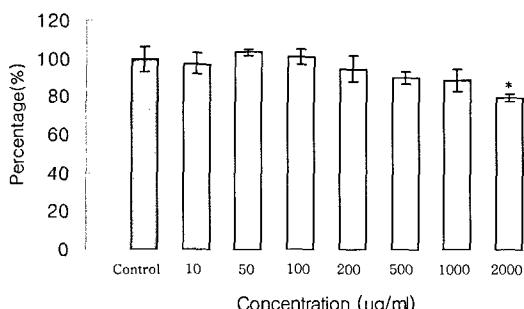


Fig. 2. Cell viability was assessed by the MTT assay in L929 cell line pretreated with PLX for 24 h. Each bar is the mean±SD. *:p<0.01

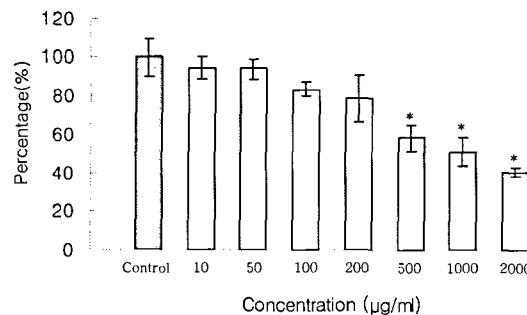


Fig. 3. Cell viability was assessed by the MTT assay in LNCaP cell line pretreated with PLX for 24 h. Each bar is the mean±SD. *:p<0.01

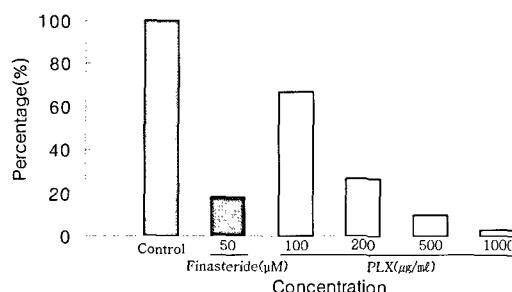


Fig. 4. Effect of finasteride and various concentrations of PLX on the inhibition of PSA by realtime-PCR in LNCaP cell line.

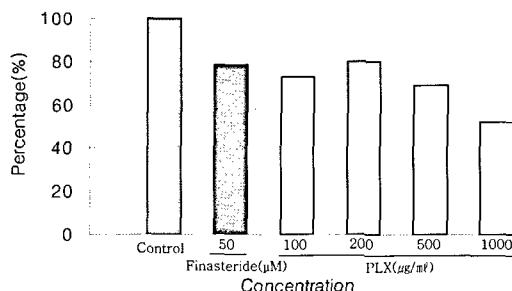


Fig. 5. Effect of finasteride and various concentrations of PLX on the inhibition of 5 α -reductase by realtime-PCR in LNCaP cell line.

저하게 감소된 결과를 보여주었으며, PLX 처리군의 경우 대조군에 비하여 100, 200, 500, 1000 µg/ml에서 각각 67, 27, 10, 3%로 농도 의존적으로 PSA 수치가 감소되었다(Fig. 4).

5 α -reductase 유전자 발현도 측정 - 배양한 LNCaP 세포에 PLX를 각각의 dish에 100, 200, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하고, finasteride를 50 µM의 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 realtime PCR법으로 5 α -reductase 수치를 측정한 결과, finasteride 처리군은 대조군(100%)에 비하여 5 α -reductase 수치가 78%로 감소하였으며, PLX 처리군은 대조군에 비하여 100, 200, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 73, 80, 69, 52%를 나타내어 200 µg/ml에서 수치가 증가하였지만 농도 의존적으로 5 α -reductase 수치가 감소하는 경향을

Table II. Effect of PLX and finasteride on the prostate weight per body weight after oral administration to the benign prostatic hyperplasia model rats

	body weight (g)	left testis (g)	right testis (g)	prostate (g)
control	511.75±9.91	2.20±0.05	2.20±0.04	1.73±0.09
T-control	518.00±9.64	1.55±0.15***	1.57±0.15***	2.46±0.30
T-PLX	516.25±10.59	1.48±0.08***	1.51±0.10***	1.94±0.35
T-finasteride	514.17±7.03	1.47±0.10***	1.48±0.09***	1.80±0.26

*:p<0.05 between control and T-control

**:p<0.05 between T-control and T-finasteride

***:p<0.02 between control and testosterone administered groups

보였다(Fig. 5).

In vivo study

전립선 비대증 동물 모델에서 전립선의 무게 비교 - 실험 8주째에 모든 쥐를 안락사 시킨 후 체중과 양쪽 고환, 전립선의 무게를 측정하였다. 전립선을 분리할 때에는 요도와 방광, 정낭선이 파열되지 않도록 최대한 둔성 분리하였고, 전립선이 파열되어 선액이 빠져나가지 않도록 주의해서 분리하였다. 모든 군을 부검하여 전립선 무게에서 체중을 나눈 후 1000을 곱한 결과, control군이 3.38±0.17, T-control군은 4.74±0.58로 유의적으로 전립선 무게가 증가하여 testosterone의 과다 투여로 인해 전립선 비대증이 유발되었다는 것을 알 수 있었다. T-PLX군과 T-finasteride군은 각각 3.75±0.60, 그리고 3.49±0.49로 T-control군의 수치와 비교하여 다소 감소하였으며, T-finasteride군은 통계상 유의적으로 감소한 결과를 보였다. 고환의 무개는 control군에 비하여 testosterone을 투여한 세 군 모두 유의적으로 감소하였으며 호르몬을 투여한 군 간의 유의적인 차이는 없었다(Table II).

고 찰

삶의 질을 떨어뜨리는 질환인 전립선 비대증은 나이든 남성에게 높은 비율로 이환된다. 양의에서 전립선 비대증의 치료는 크게 수술적인 치료법과 약물에 의한 치료법으로 나눈다. 최근 수술요법이 많이 발전하고 있어서, 나이든 환자에게도 수술로 최소한의 부작용과 저렴한 방법으로 전립선 비대증을 완치할 수 있는 길이 열려 있다. 하지만 전립선 비대증의 배뇨장애로 인해 일상 생활에 다소의 불편함만을 호소하는 남성들은 아직도 수술에 대한 거부감을 가지고 있으며, 필요성을 느끼지 못하는 경우가 많다. 약물적 치료법에서는, 전립선 비대증을 근본적으로 치료하는, 즉, 실제적으로 비대된 전립선의 크기를 줄여주는 검증된 약은 5α-reductase inhibitor인 finasteride와 dutasteride 정도밖에 없다. 그러나 이러한 약들은 환자가 효과를 느끼기까지의 기간이 6개월 정도로 매우 길고, 투약을 중지하면 바로 재발하기 때문에 환자들의 만족도가 낮고 실제로 finasteride를 상품화한 Proscar

는 판매량이 꾸준히 증가하지 않고 정체되어 있다. 반면, α_1 -receptor blocker인 terazosin, doxazosin 등은 요도 주위를 압박하고 있는 평활근을 이완시켜줌으로써 신속하게 배뇨장애를 개선하기 때문에 비록 α_1 -receptor blocker가 전립선의 실제적인 크기를 줄여주는 못하지만 불편함을 호소하는 환자들에게 많이 처방되고 있으며 매출 또한 성장곡선을 그리고 있다. 5α-reductase와 α_1 -receptor blocker의 장점을 동시에 갖춘 치료제가 개발되기 전까지 전립선 비대증의 치료를 위한 건강 식품의 필요성 및 시장성은 꾸준히 증가하고 있으며, 몇몇 생약들은 그 효과가 방대한 임상실험을 통하여 어느 정도 증명된 바가 있어서 전립선 비대증으로 인한 배뇨장애를 겪는 남성들에게 희망이 되고 있다.

L929은 생쥐의 섬유모 세포의 일종으로 일반적인 세포 독성 실험에 주로 쓰이는 세포주이다. LNCaP은 사람 유래의 전립선 암 세포주로 DHT가 결합되는 androgen receptor에 의존적이기 때문에 배지 내의 testosterone이나 DHT, testosterone을 DHT로 전환시키는 5α-reductase의 영향을 많이 받는다. PLX를 L929과 LNCaP 세포주에 농도별로 처리하여 각 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교한 결과, L929에서는 2000 µg/ml에서만 유의적인 생존율의 감소가 있었고, LNCaP에서는 100 µg/ml에서부터 고농도로 갈수록 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였으며 500, 1000, 2000 µg/ml에서 유의적인 감소를 보였다. 또한, LNCaP에 finasteride와 PLX를 처리하여 RT-PCR법으로 PSA와 5α-reductase의 유전자 발현도를 비교해 본 결과, 유의성을 판별할 수는 없었지만 PSA의 경우 PLX의 용량 의존적으로 수치가 control의 10% 이하로 저하되는 것을 알 수 있었으며, 5α-reductase의 경우 PLX의 모든 농도에서 finasteride와 비슷하거나 또는 더 낮은 수치를 보였다.

이상의 결과를 정리해 보면, PLX는 일반 섬유모 세포주인 L929에 처리시 고농도에서도 크게 독성을 나타내지 않으며 전립선 암 세포주인 LNCaP에 처리 시 농도 의존적으로 LNCaP 세포의 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PLX가 어떠한 기전으로 5α-reductase를 저해함으로써 배지 내 testosterone이 활성화 형태인 DHT로 변환되는 것을 억제하여 LNCaP 세포의 성장을 저해하는 것으

로 유추된다. 또한, 토마토 추출물에 함유된 라이코펜과 기타 카로티노이드 및 플라본 류는 유방암, 폐암,²⁴⁾ 전립선 암 세포²⁵⁾ 등 여러 암세포의 성장을 저해하고 apoptosis를 유도하기 때문에 LNCaP 세포에서도 항암 활성을 나타낸 것으로 보인다. 전립선 특이 항원인 PSA는 전립선암, 전립선 비대증에 이환되었을 경우에도 혈중에서 증가하지만 전립선암의 특이적인 지표물질로 사용하며 일반적으로 사람에서는 PSA가 4 ng/ml 이하일 때를 정상으로 본다. PSA는 5α-reductase inhibitor에 민감한 물질로 사람에서 전립선의 이상 유무를 알기 위해 PSA를 측정하는데 그전에 5α-reductase inhibitor를 처방받았다면 PSA 수치가 낮게 나와 오진의 위험이 있기 때문에 전립선암이 아니라는 확진을 하기 전에는 5α-reductase inhibitor를 일반적으로 처방하지 않는다. 이번 실험의 결과에서도 LNCaP에 finasteride의 처리에 따라 PSA의 수치가 처리하지 않은 군에 비하여 20% 이하로 감소하였으며, 5α-reductase inhibitor 및 항암 효과를 보이는 PLX 역시 LNCaP에 처리하였을 경우 농도 의존적으로 PSA 수치가 감소하는 것을 알 수 있었다.

전립선 비대증의 동물 실험을 위한 실험 모델에는 몇 가지 종류²⁶⁻²⁸⁾가 있지만 가장 일반적인 방법은 인위적인 호르몬 투여에 의한 방법이다.^{29,30)} 남성 호르몬인 testosterone를 쥐에게 주기적으로 과다 투여하게 되면 전립선의 세포 표면에 있는 androgen receptor에 binding 하여 전립선의 성장을 촉진할 뿐 아니라 5α-reductase에 의해 DHT로 변환되어 testosterone보다 강한 활성으로 전립선의 비대를 유발하게 된다. 본 연구진은 예비 실험을 통하여 실험쥐에서 전립선 비대증 유발을 위한 적정 농도의 testosterone 주사량과 주사 일정을 알아본 결과, testosterone 3 mg/kg을 2일에 한 번 피하주사를 하면 전립선 비대증이 유발되지만 실험 물질의 투여에 따른 효과를 보기에는 너무 많은 양의 testosterone이 들어감으로 인해서 대조군과 실험군의 유의적인 차이를 판별하기 힘들기 때문에, 본 실험에서는 총 실험 기간인 8주에서 첫 2주 동안은 testosterone 3 mg/kg을 2일에 한 번 피하주사를 하고 나머지 6주 동안은 실험 물질을 경구 투여하면서 testosterone 1.5 mg/kg을 3일에 한 번 피하주사 하는 방법을 사용하였다. 과다한 호르몬의 투여로 전립선의 비대를 유발하면서 PLX와 finasteride를 경구 투여하여, 실험 8주째에 부검하여 체중 대비 전립선 무게에 1000을 곱한 값을 비교한 결과, control군이 3.38 ± 0.17 이고 T-control군은 4.74 ± 0.58 로 control군에 비하여 T-control군의 전립선 크기가 유의적으로 증가하여 전립선의 비대가 유발되었다는 것을 알 수 있었다. T-PLX군은 3.75 ± 0.60 으로 T-control군에 비하여 다소 전립선의 크기가 줄었으며, T-finasteride군은 3.49 ± 0.49 로 T-control 군에 비하여 유의적으로 감소된 결과를 보였다. 이러한 결과로 보아 본 실험에 사용된 PLX는 경구로 투여 시 장에서 흡수되어 전립선에서 5α-reductase의 효소 활성을 방해하여 과

다 투여된 testosterone이 DHT로 변환되는 것을 예방함으로써 전립선이 비대되는 것을 억제하였다고 유추해 볼 수 있다. 고환의 크기는 testosterone를 인위적으로 투여한 모든 군에서 위축된 소견을 보였고 이것은 testosterone를 생산하는 기관인 고환이 인위적인 호르몬 투여로 인해 기능을 잃어서 퇴화된 것으로 보인다. PLX와 finasteride의 투여로 인한 고환 무게의 유의적인 차이는 없었다.

이상의 결과로 PLX는 기존의 연구에서와 같이 전립선암에도 효과가 있을 뿐만 아니라 전립선 비대증에도 5α-reductase를 억제하는 기전을 통해 비대증을 완화 또는 치료하는 효과가 있다고 보여지며 차후 실험에서 PLX의 다른 기전 및 토마토 추출액과 키토올리고당의 단독 또는 혼합 비에 따른 효과를 판별해 보는 것이 필요할 것으로 보인다.

결 론

본 연구는 라이코펜이 2% 함유된 토마토 추출액과 키토올리고당이 3:5의 비율로 혼합된 PLX로 전립선 비대증에 대한 효과를 실험하였다. 전립선 암세포주에 대한 세포 성장 저해 효과를 알아보기 위해 PLX를 마우스 섬유모 세포 주인 L929과 전립선 암세포주인 LNCaP에 농도별로 처리한 결과, L929에서는 2000 µg/ml에서 유의적인 성장 저해 효과가 있었지만 LNCaP에서는 100 µg/ml에서부터 성장이 저해되는 경향을 보였고 500, 1000, 2000 µg/ml에서 유의적인 저해 효과를 보였다. RT-PCR법으로 LNCaP 세포에서 PSA와 5α-reductase의 유전자 발현도를 비교하여 본 결과, PSA는 finasteride 처리군의 수치가 18%로 현저하게 감소된 결과를 보여주었으며, PLX 처리군의 경우 대조군에 비하여 100, 200, 500, 1000 µg/ml에서 각각 67, 27, 10, 3%로 농도 의존적으로 PSA 수치가 감소되었다. 5α-reductase 수치는 finasteride 처리군이 78%로 대조군에 비하여 감소하였으며, PLX 처리군은 100, 200, 500, 1000 µg/ml 농도에서 각각 73, 80, 69, 52%를 나타내어 200 µg/ml에서 수치가 증가하였지만 농도 의존적으로 5α-reductase 수치가 감소하는 경향을 보였다. 쥐에게 호르몬의 인위적 투여로 만든 전립선 비대증 모델에서 PLX 120 mg/kg과 finasteride 2 mg/kg을 투여하여 체중 대비 전립선 무게를 비교하여 본 결과, control 군이 3.38 ± 0.17 , T-control군은 4.74 ± 0.58 로 testosterone의 과다 투여로 인해 전립선 비대증이 유발되었다는 것을 알 수 있었으며, T-PLX군과 T-finasteride군은 각각 3.75 ± 0.60 , 그리고 3.49 ± 0.49 로 T-control군의 수치와 비교하여 다소 감소하였으며, T-finasteride군은 통계상 유의적으로 감소한 결과를 보였다. 이상의 결과로 보아 PLX는 5α-reductase inhibitor로서의 기능을 통해 testosterone이 DHT로 변환되는 것을 억제하여 전립선 비대증을 치료 또는 예방한다고 유추해 볼 수 있다.

인용문헌

1. Rhoerborn, C. G., Marks, L., Harkaway, R. (2006) Enlarged prostate: A landmark national survey of its prevalence and impact on US men and their partners. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **9**: 30-34.
2. AUA Practice Guidelines Committee. (2003) AUA guideline on management of benign prostatic hyperplasia, Chapter 1: Diagnosis and treatment recommendations. *J Urol* **170**: 530-547.
3. Clark, R. V., Hermann, D. J., Cunningham, G. R., Wilson, T. H., Morrill, B. B., Hobbs, S. (2004) Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5α-reductase inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2179-2184.
4. Isaacs, J. T. (1984) Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* **5**: 545-557.
5. Nixon, P. (1997) New clinical trial of medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Drug Benefit Trends* **9**: 44-45.
6. Bonkhoff, H., Stein, U., Aumuller, G., Remberger, K. (1996) Differential expression of 5 alpha-reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *Prostate* **29**: 261-267.
7. Lehle, C., Radvanyi, F., Gil Diez de Medina, S. (1999) Differences in steroid 5 alpha-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* **68**: 189-195.
8. Silver, R. I., Wiley, E. L., Davis, D. L., Thigpen, A. E., Russell, D. W., McConnell, J. D. (1994) Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase 2 in prostate disease. *J Urol* **152**: 433-437.
9. Di Silverio, F., Flammia, G. P., Sciarra, A. (1993) Plant extracts in benign prostatic hyperplasia, *Minerva Urol Nefrol* **45**: 143-149.
10. Buck, A. C. (1996) Phytotherapy for the prostate. *Br J Urol* **78**: 325-326.
11. Bales, G. T., Christiano, A. P., Kirsh, E. J., Gerber, G. S. (1999) Phytotherapeutic agents in the treatment of lower urinary track symptoms: a demographic analysis of awareness and use at the University of Chicago. *Urology* **54**: 86-89.
12. Wilt, T. J., MacDonald, R., Ishani, A. (1999) Beta-sisterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU International* **83**: 976-983.
13. Wilt, T. J., Ishani, A., Stark, G. (1998) Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *JAMA* **280**: 1604-1609.
14. Pannala, A. S., Rice-Evans, C., Sampson, J., Sin, S. (1998) Interaction of peroxynitrite with carotenoids and tocopherols within low density lipoprotein. *FEBS Letters* **423**: 297-301.
15. Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S. H., Young, C. V. (2001) Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **22**: 409-414.
16. Friedman, M. (2002) Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem* **50**: 5751-5760.
17. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., Willett, W. C. (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **94**: 391-398.
18. Siler, U., Barella, L., Spitzer, V., Schnorr, J., Lein, M., Goralczyk, R., Wertz, K. (2004) Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the dunning prostate cancer model. *FASEB J* **14**: 1-23.
19. Jameela, S. R., Misra, A., Jayakrishnan, A. (1994) Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. *J Biomater Sci Polym Ed* **6**: 621-632.
20. Okamoto, Y., Inoue, A., Miyatake, K., Ogihara, K., Shigemasa, Y., Minami, S. (2003) Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of macrophages. *Macromol Biosci* **3**: 587-590.
21. Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. Y., Varlamov, V. P. (2004) Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microbiol* **40**: 253-257.
22. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S., Suzuki, M. (1998) Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaos and Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull* **36**: 784-790.
23. Jeon, T. I., Hwang, S. G., Park, N. G., Jung, Y. R., Shin, S. I., Choi, S. D., Park, D. K. (2003) Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology* **187**: 67-73.
24. Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Soc Trans* **24**: 1023-1027.
25. Kotakanara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Myashita, K., Nagao, A. (2001) Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr* **131**: 3303-3306.
26. Berry, S. J., Coffey, D. S., Strandberg, J. D., Ewing, L. L. (1986) Effect of age, castration and testosterone replacement on the development and restoration of canine benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **9**: 295-302.
27. Karr, J. P., Kim, U., Resko, J. A., Schneider, S., Chai, L. S., Murphy, G. P., Sandbery, A. A. (1984) Induction of benign prostatic hypertrophy in baboons. *Urology* **23**: 276-289.
28. Schroeder, F. H. (1983) Current models and their relation to human diseases. In Hinman, F. (ed.), *Benign prostatic hypertrophy*, 215-228. Springer Verlag, New York, USA.
29. Coffey, D. S., Walsh, P. C. (1990) Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* **17**: 461-475.
30. Constantinou, C. E. (1996) Influence of hormone treatment on prostate growth and micturition characteristics of the rat. *Prostate* **26**: 30-35.