

Nährstoffe . 2020 Jun; 12 (6): 1575.

Online veröffentlicht am 28. Mai 2020.doi: [10.3390 / nu12061575](https://doi.org/10.3390/nu12061575)

PMCID: PMC7352698

PMID: [32481550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32481550/)

# Die Auswirkungen des *Aronia melanocarpa*-Extrakts auf die Testosteron-induzierte benigne Prostatahyperplasie bei Ratten und die quantitative Analyse der Hauptbestandteile in Abhängigkeit von den Extraktbedingungen

[Na-Hyun Kim](#) , <sup>1,†</sup> [Jonghwan Jegal](#) , <sup>2,†</sup> [Yun Na Kim](#) , <sup>3</sup> [Jeong-Doo Heo](#) , <sup>1</sup> [Jung-Rae Rho](#) , <sup>4</sup> [Min Hye Yang](#) , <sup>2,\*</sup> und [Eun Jeong Ju](#) <sup>3,\*</sup>

[Autoreninformationen](#) [Artikelhinweise](#) [Copyright- und Lizenzinformationen](#)

## 1. Einleitung

Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) ist ein pathologischer Prozess, der sich eher nach dem mittleren Alter entwickelt [ [1](#) ]. Mehr als 50% der Männer über 60 haben BPH und 15% bis 30% der Betroffenen leiden an Symptomen der unteren Harnwege, wie Harnverhalt, Blasenentzündung, Blasenstein oder Nierenversagen [ [2](#) , [3](#) ]. Diese Komplikationen beeinträchtigen nicht nur die Lebensqualität, sondern können auch dazu führen, dass medizinische Behandlungen oder chirurgische Eingriffe wie Prostatektomie und die damit verbundenen Risiken für Morbidität und Tod erforderlich sind [ [2](#) ]. Patienten mit BPH weisen charakteristischerweise eine erhöhte Anzahl von Epithel- und Stromazellen in Prostatageweben auf [ [4](#) ]. Der genaue Mechanismus, der für die Entwicklung von Hyperplasie verantwortlich ist, ist nicht endgültig bekannt, aber Sexualhormone, Stroma-Epithel-Wechselwirkungen, Wachstumshormone und Neurotransmitter, die zusammen wirken, können zu abnormalem Zelltod oder Apoptose oder zur übermäßigen Proliferation von Epithel- und Stromazellen führen geben auf die Pathogenese von BPH [ [5](#) , [6](#) ].

Es ist bekannt, dass BPH von Androgenen abhängt, insbesondere von Dihydrotestosteron (DHT) [ [7](#) ], dem vorherrschenden Hormon in unreifen, reifen und hypertrophen Prostatadrüsen [ [7](#) , [8](#) ]. DHT wird aus Testosteron durch zwei Isoenzyme der 5 $\alpha$ -Reduktase, dh Typ 1 und 2, synthetisiert [ [9](#) ], und es ist bekannt, dass die Wirkung von Testosteron in Fortpflanzungsorganen durch die lokale Umwandlung von Testosteron in DHT verstärkt wird [ [9](#) , [10](#) ]. 5 $\alpha$ -Reduktase vom Typ 2 kommt vorwiegend

in Prostata- und anderen Genitalgeweben vor, während Typ 1 im gesamten Körper vorkommt, wo 5 $\alpha$ -Reduktase exprimiert wird, einschließlich Haut, Leber und Prostata [ 11]. Darüber hinaus sind die therapeutischen Wirkungen von 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren wie Finasterid und Dutasterid auf die Prostatahyperplasie fest etabliert und aufgrund ihrer Nebenwirkungsprofile für die Langzeitanwendung geeignet [ 11 , 12 ].

*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, allgemein als Apfelbeere bezeichnet, gehört zur Familie der Rosaceae und wurde aus Nordamerika nach Osteuropa eingeführt [ 13 ]. Es wurde berichtet, dass *A. melanocarpa* verschiedene biologische Aktivitäten aufweist, wie hepatoprotektive [ 14 ], hypolipidämische [ 15 ] und kardiovaskuläre Schutzwirkungen [ 16 ]. Die Früchte von *A. melanocarpa* wurden traditionell als natürliches Heilmittel von Potawatomi-Indianern zur Behandlung von Erkältungen verwendet. Diese medizinische Wirkung von Apfelbeeren kann auf ihre antimikrobiellen Aktivitäten zurückzuführen sein. In verschiedenen Screening-Experimenten auf antimikrobielle Aktivität wurde festgestellt, dass die Apfelbeere die Biofilmbildung verhinderte und das Bakterienwachstum inhibierte. Handeland et al. (2014) berichteten, dass die Einnahme von Apfelbeersaft bei Menschen mit Harnwegsinfektionen eine starke antibakterielle Wirkung hat [ 17]. Sechs Monate lang wurden Apfelbeersaft, der einen hohen Gehalt an Gesamtphenolen einschließlich Procyanidinen vom B-Typ, Anthocyanen und Chlorogensäuren enthielt, bei Bewohnern von Pflegeheimen angewendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die signifikante Verringerung der Antibiotika gegen Harnwegsinfektionen während des Zeitraums der Saftverabreichung beobachtet wurde. In Bezug auf die vorteilhaften Wirkungen von Apfelbeeren bei Erkrankungen des Harnsystems haben Kirakosyan et al. (2015) festgestellt, dass Apfelbeer-Anthocyane nach oraler Aufnahme bei Ratten hauptsächlich in der Harnblase und der Niere verteilt sind [ 18 ].

Die Früchte von *A. melanocarpa* sind reich an phenolischen Verbindungen und enthalten hauptsächlich vier Cyanidinglycoside: 3-Galactosid, 3-Glucosid, 3-Arabinosid und 3-Xylosid [ 19 ]. Procyanidine und Anthocyane sind für den adstringierenden Geschmack bzw. die dunkelviolette Farbe ihrer Beeren verantwortlich [ 20 ]. Diese Anthocyane zeigen die vorteilhaften Wirkungen der Frucht auf Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen [ 21 ]. Es gibt jedoch immer noch eine Einschränkung bei der kommerziellen Verwendung von natürlichen Ressourcen, die Anthocyane enthalten, aufgrund ihrer hohen Reaktivität, die anfällig für Temperatur, pH-Wert, Wasseraktivität und Sauerstoff usw. ist. Anthocyane werden unter den unerwünschten Bedingungen leicht abgebaut und strukturell umgewandelt [ 22 , 23 , 24 , 25 , 26 , 27 ]. Es wird berichtet, dass das Vorhandensein von Co-Pigmenten, Licht, Konzentration, Metallionen, Enzymen, Zuckern und Proteinen die Farbe und Stabilität von Anthocyanen beeinflusst [ 28 , 29 , 30 ].

Basierend auf der traditionellen Verwendung von Apfelbeeren und den kürzlich berichteten biologischen Aktivitäten haben wir in der vorliegenden Studie versucht, das Potenzial von Apfelbeeren zur Verbesserung einer mit dem Harnsystem verbundenen Krankheit - BPH - zu bewerten. Darüber hinaus wollten wir herausfinden, ob

Anthocyanin, ein wichtiger bioaktiver Bestandteil von Apfelbeeren, zu den therapeutischen Wirkungen auf die BPH bei Ratten beiträgt. Vier ethanolische Extrakte von *A. melanocarpa*-Früchten wurden unter Verwendung eines Lösungsmittels mit unterschiedlicher Temperatur und Extraktion hergestellt, was die Stabilität und Ausbeute der in *A. melanocarpa* enthaltenen Anthocyane beeinflusst. Die Auswirkungen von vier Extrakten auf die Prostatavergrößerung, die Proteinexpression von DHT und 5 $\alpha$ -Reduktase (5AR), die mRNA-Expression von Androgenrezeptoren (AR), das prostataspezifische Antigen (PSA) und die proliferierenden Zellkernantigene (PCNA) in der Prostata-Gewebe wurden in einem Testosteronpropionat (TP)-induzierten BPH-Rattenmodell bewertet. Der Gehalt an Anthocyanen und Phenolen in vier *A. melanocarpa*-Extrakten wurde unter Verwendung von LC / MS- und HPLC-Experimenten analysiert.

## **2. Materialien und Methoden**

---

### **2.1. Probenvorbereitung**

Die Früchte von *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot wurden von der Samheung Agricultural Corporation (Geochang, Südkorea) erhalten und von Professor Yang, Min Hye (College of Pharmacy, Pusan National University) identifiziert. Ein Belegexemplar (GNP-78) wurde im Labor für Pharmakognosie des College of Life Sciences der Nationalen Universität für Wissenschaft und Technologie in Gyeongnam hinterlegt.

### **2.2. A. Melanocarpa-Extraktion**

Die beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE) wurde unter Verwendung eines BUCHI Speed Extractor E-916 (BUCHI Labortechnik AG, Schweiz) durchgeführt. Die Früchte von *A. melanocarpa* wurden 5 Tage lang gefriergetrocknet und vor der Extraktion in kleine Stücke geschnitten, was wie folgt durchgeführt wurde. Zwei Gramm einer Mischung aus 0,5 g Aronia-Pulver und 1,5 g Celite wurden in eine 20 ml PLE-Zelle geladen und das Restvolumen mit Quarzsand gefüllt. Die verwendeten Extraktionsbedingungen waren: Extraktionstemperatur (30 ° C oder 100 ° C), Lösungsmittel (60% oder 100% Ethanol), ein Extraktionszyklus, Haltezeit (10 min) und Extraktionsdruck (100 bar). Jeder Extrakt (20 ml) wurde in einem 60-ml-Glasfläschchen gesammelt und 15 bis 20 Minuten an der Luft ruhen gelassen. Für die In-vivo-Untersuchung wurde der erhaltene Extrakt im Vakuum konzentriert und dann gefriergetrocknet, um das Extraktlösungsmittel zu entfernen. Der pulverförmige Extrakt wurde gelöst und mit 0,5% Natriumcarboxymethylcellulose (CMC-Na) verdünnt und den Tieren verabreicht. Für chemische Studien,

### **2.3. LC / MS-Analyse von Aronia-Extrakt**

Relative Mengen an Anthocyanen und Polyphenolen in Aronia-Extrakt wurden durch Multiple Reaction Monitoring (MRM) bestimmt. Das zur Analyse verwendete System bestand aus einer Agilent 1200 HPLC-Einheit und einem ABSCIEX QTRAP 3200-Massenspektrometer. Zur chromatographischen Trennung wurden 5 µl Aronia-Extrakt, hergestellt unter Verwendung von ASE, direkt in eine Synergi-Fusionssäule (2,6 µm, 2,1 × 50 mm) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,35 ml / min unter einer Gradientenelution unter Verwendung von Lösungsmitteln A (0,1% H<sub>2</sub>O) und B (0,1% Methanol) unter Verwendung des folgenden Programms; 15% –50% B von 0 bis 5 min, 50% – 100% B von 5 bis 6 min und 100% B von 6 bis 7,5 min, gefolgt von 4 min Äquilibrierung mit 15% B. Drei Anthocyane wurden positiv identifiziert Der MRM-Modus (449/287 für Cyanidin-3-Galactosid oder Cyanidin-3-Glucosid, 419/287 für Cyanidin-3-Arabinose und 287/287 für Cyanidin) und zwei Phenole wurden im negativen Modus identifiziert (353/191 für Caffeoylchinchininsäure und 595/301 für Quercetin-Vicianosid).

## **2.4. Hochleistungsflüssigchromatographieanalyse von Phenolverbindungen**

Die Quantifizierung der Phenolverbindungen in den ASE-Extrakten wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. Das System besteht aus einem Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC-System mit einer Pumpe, einem Autosampler, einem Säulenfach und einem Diodenarray-Detektor (DAD-3000). Mit ASE hergestellter Aronia-Extrakt wurde durch ein 0,45 µm Nylonmembranfilter filtriert und mit Methanol (1:1) verdünnt in die HPLC injiziert. Die Säulen- (Phenomenex Gemini, 4,6 mm × 250 mm) und Proben-temperaturen wurden bei 30 bzw. 10 ° C gehalten. Als mobile Phasen wurden Lösungsmittel A (0,1% Trifluoressigsäure in Wasser) und Lösungsmittel B (Acetonitril) verwendet (0–5 min, 10% –15% B; 5–15 min, 15% B; 15–45 min, 15%) – 30% B). Die Flussrate betrug 1,0 ml / min. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und der Nachweis wurde bei 280 nm durchgeführt.

## **2.5. Tiere**

Insgesamt 42 männliche Wistar-Ratten (7 Wochen alt) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 ± 10 g wurden von Orient Bio (Seoul, Südkorea) gekauft. Die Tiere wurden zwei Wochen lang unter einem 12-stündigen: 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei 20 ± 2 ° C und 50 ± 5% Raumfeuchtigkeit mit ad libitosem Zugang zu Futter und Wasser akklimatisiert. Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien der Gyeongnam-Abteilung für Umwelt und Toxikologie des Korea Institute of Toxicology zur Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt. Die Tierpflege und das Tierprotokoll wurden vom IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) des Korea Institute of Toxicology, Abteilung für Umwelttoxikologie und -chemie in Gyeongnam, geprüft und genehmigt (Zulassungsnummer 1609-0004).

## 2.6. Induktion von BPH und Behandlung

Um den Einfluss von Testosteron auszuschließen, wurden 36 Ratten durch Entfernen der Hoden und des Nebenhodens kastriert. Die verbleibenden 6 Ratten erhielten die Scheinoperation. Für die Kastrationschirurgie wurden die Tiere durch intramuskuläre Injektion von Zoletile 20 mg / kg + Rompun 10 mg / kg Körpergewicht anästhesiert. Präoperative Antibiotika wurden subkutan verabreicht (Cephazolin 20 mg / kg). Eine Woche nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Testmaterialien oral behandelt und eine Prostatahyperplasie wurde durch subkutane Injektion von 3 mg / kg Testosteronpropionat (TP, Tianjin Jinyao Aminosäure Co. Ltd .; Chargennummer 1301141) 6 Wochen lang subkutan täglich induziert. Kastrierte Tiere wurden zufällig in sechs Gruppen eingeteilt (  $n= 6$  pro Gruppe), wie unten beschrieben. Während der 6-wöchigen Induktionsperiode der Prostatahyperplasie erhielten die Tiere in der Scheingruppe und der VC-Gruppe 0,5% CMC-Na. Den Tieren in der positiven Kontrollgruppe wurde subkutan TP verabreicht, und sie erhielten eine Sägepalme durch orale Sonde in einer Dosis von 100 mg / kg Körpergewicht täglich, und den Tieren in den vier Testgruppen (T1 ~ T4) wurde TP subkutan verabreicht und mit TP behandelt Aronia-Extrakt in einer Dosis von 100 mg / kg Körpergewicht täglich für 6 Wochen. Zusammenfassend:

1. Group Sham: nicht BPH-induziert und erhielt oral 0,5% CMC-Na
2. Gruppe VC: BPH-induziert und erhielt oral 0,5% CMC-Na
3. Gruppe PC: BPH-induzierte und erhaltene Sägepalme (100 mg / kg Körpergewicht, Schlundsonde)
4. Gruppe T1: BPH-induziert und erhielt 100% Ethanol / niedrige Temperatur (30 ° C) *A. melanocarpa*- Extrakt (100 mg / kg Körpergewicht, orale Sonde).
5. Gruppe T2: BPH-induziert und erhielt 100% Ethanol / hohe Temperatur (100 ° C) *A. melanocarpa*- Extrakt (100 mg / kg Körpergewicht, orale Sonde).
6. Gruppe T3: BPH-induziert und erhielt 60% Ethanol / niedrige Temperatur (30 ° C) *A. melanocarpa*- Extrakt (100 mg / kg Körpergewicht, Schlundsonde).
7. Gruppe T4: BPH-induziert und erhielt 60% Ethanol / hohe Temperatur (100 ° C) extrahiertes *A. melanocarpa* (100 mg / kg Körpergewicht, orale Sonde).

## 2.7. Gewebe, Blutentnahme und biochemische Analyse

Nach einer Behandlungsdauer von 6 Wochen wurden die Ratten durch eine CO<sub>2</sub> -Kammer getötet und eine Blutprobe aus der Bauchorta entnommen. Die ventrale Prostata wurde gesammelt und gewogen, bevor sie eingefroren wurde. Blutproben wurden 30 min bei Raumtemperatur in Trennröhrchen belassen und 15 min bei 3000 U / min zentrifugiert. Serumspiegel von Gesamtprotein, Albumin (ALB), Blutharnstoffstickstoff (BUN), Kreatinin (CREA), Aspartattransaminase (AST),

Alanintransaminase (ALT), alkalischer Phosphatase (ALP), Gesamtbilirubin (Bil), Triglycerid (TG), und Gesamtcholesterin (TCHO) wurden unter Verwendung eines automatischen Analysegeräts Hitachi 7180 (Hitachi High Technologies, Seoul, Südkorea) gemessen.

## **2.8. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit**

Die Gesamt-RNA-Extraktion und die cDNA-Synthese aus dem Prostatagewebe der Ratte wurden unter Verwendung der Protokolle des Herstellers (Qiazol-Lyse-Reagenz, QuantiTect Reverse Transcription Kit; QIAGEN, Hilden, Deutschland) verfolgt. Echtzeit-PCR basierend auf dem SYBR-Grün-Schritt wurde mit einem Stratagene Mx3005P-Thermocycler (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt, und die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 95 ° C für 2 Minuten, dann 40 Zyklen von 95 ° C für 15 s und 60 ° C für 1 min gemäß dem Benutzerhandbuch des Gotaq qPCR-Master-Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Alle Proben wurden dreifach getestet und nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert. Darüber hinaus wurde jedes Datum durch den GAPDH-mRNA-Spiegel normalisiert. Primersequenzen sind wie folgt aufgeführt; AR (vorwärts; gggtgacttctctgcctctg, rückwärts; ccggagtagttctccatcca), PSA (vorwärts; gggggcaagatatatgcaa, rückwärts; gcacaccatcacaatgagg),

## **2.9. Prostata-Index (PI) und 5AR- und DHT-Ausdrücke in Prostatageweben**

Das Körpergewicht und die Prostatagröße wurden nach einer Behandlungsdauer von 6 Wochen genau gemessen. Um die Spiegel von 5AR und DHT im Prostatagewebe zu bestimmen, wurde die gesamte Prostata in Proteinlysepuffer homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren bei 12.000 U / min wurde das Protein extrahiert und die Konzentration unter Verwendung eines Bradford-Proteinassays bestimmt. Die Mengen an 5AR und DHT im Proteinextrakt wurden unter Verwendung von ELISA-Kits (Cusabio Biotech Co., LTD. # CSB-EL022654RA für 5AR; MyBiosource MBS265478 für DHT) quantifiziert.

## **2.10. Statistische Analyse**

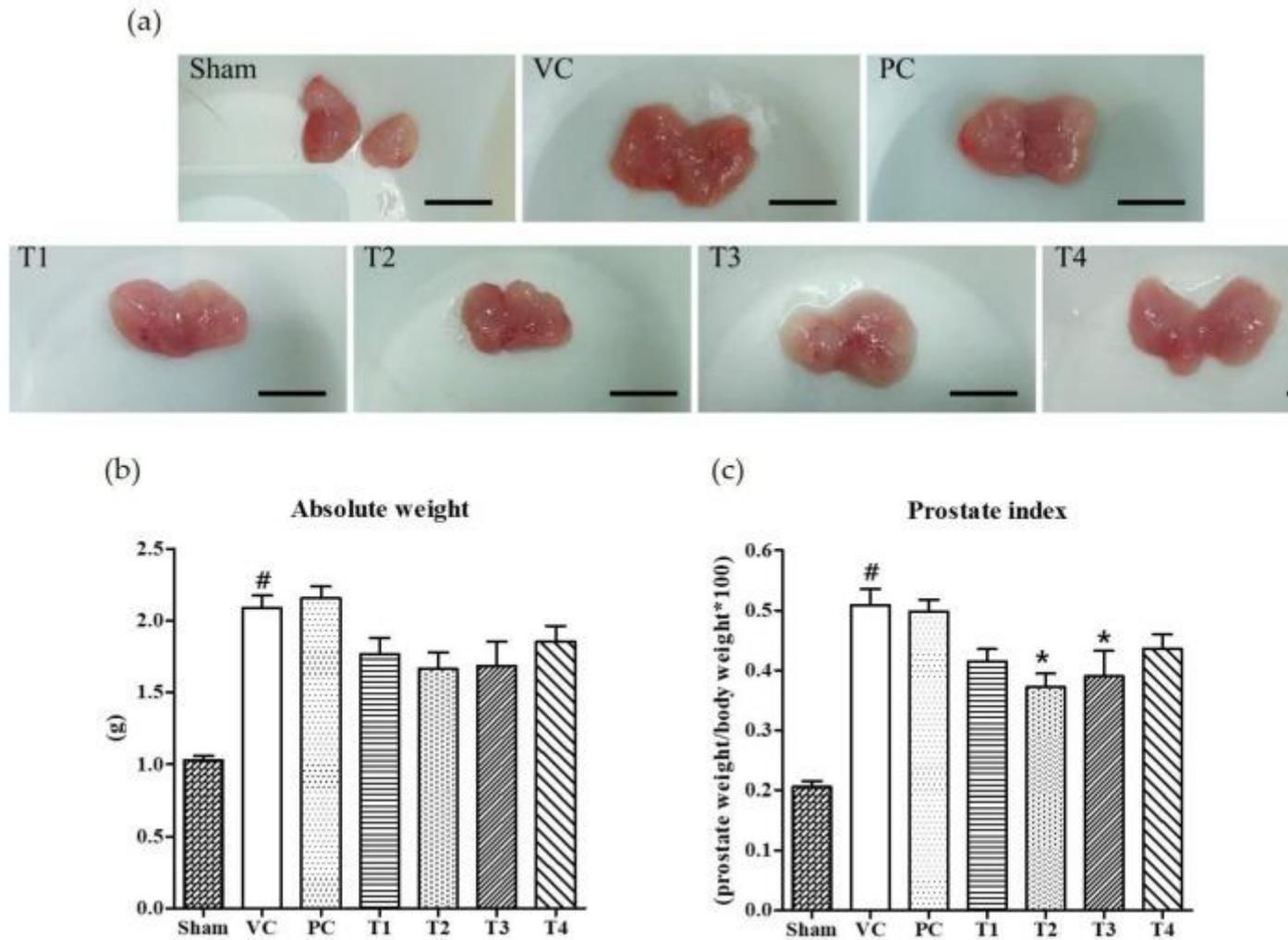
Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., IL, USA), einer Einweg-ANOVA, gefolgt von Dunnetts Post-Hoc-Test durchgeführt, der für die mit dem Levene-Test zufriedenstellenden Daten verwendet wurde. Ansonsten wurde ein nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test durchgeführt.  $p$ -Werte von  $<0,05$  wurden als signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden von GraphPad Prism 5 (CA, USA) in das Diagramm konvertiert, in dem alle Spalten des Diagramms Fehlerbalken aufwiesen, die den Standardfehler des Mittelwerts bezeichneten.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.1. Auswirkungen von *A. Melanocarpa*-Extrakten auf PI- und Serumleberenzyme im TP-induzierten BPH-Mausmodell

Sechs Wochen nach der Induktion von BPH durch TP-Injektion und der gleichzeitigen Behandlung von Testproben bei sieben Wochen alten Wistar-Ratten wurde festgestellt, dass das absolute Prostatagewicht und der PI im Vergleich zu nicht TP-behandelten Kontrollen erheblich erhöht waren ( Scheingruppe) ( [Abbildung 1](#) ). Kommerzielles Sägepalmenprodukt (PC-Gruppe), 100% Ethanol / Niedertemperatur (T1), 100% Ethanol / Hochtemperatur (T2), 60% Ethanol / Niedertemperatur (T3) und 60% Ethanol / Hochtemperatur (T4) -Extrakte von *A. melanocarpa*- Früchten wurden auf ihre schützende Wirkung auf TP-induzierte Prostatahyperplasie bei Ratten getestet. Wie in [Abbildung 1](#) b gezeigt, war das durchschnittliche Gewicht von Prostata und PI bei Ratten, die mit *A. melanocarpa* behandelt wurden, niedriger Extrakte im Vergleich zu TP-behandelten Vehikelkontrollen (VC-Gruppe). Von den vier *A. melanocarpa*-Extraktgruppen (T1 ~ T4) führte die Verabreichung von T2 zu der größten Verringerung des PI ( [Abbildung 1](#) c), die berechnet wurde, indem das Prostatagewicht als Prozentsatz des Körpergewichts ausgedrückt wurde. Es wurde vorgeschlagen, dass PI ein Risikofaktor für BPH und Prostatakrebs ist (Rodriguez et al., 2001). Sägepalme ( *Serenoa repens* ) wird häufig als Alternative zu Medikamenten zur Behandlung von Symptomen der unteren Harnwege (LUTS) empfohlen, die BPH zugeschrieben werden [ 31]. In der vorliegenden Studie wurde jedoch keine signifikante therapeutische Wirkung auf die Prostatavergrößerung bei Ratten beobachtet, die sechs Wochen lang mit Sägepalme in einer Dosis von 100 mg / kg Körpergewicht als Positivkontrolle (PC) behandelt wurden. Das absolute Gewicht von Prostata und PIs war in allen mit *A. melanocarpa* behandelten Gruppen (T1 ~ T4) im Vergleich zur VC-Gruppe tendenziell niedriger , während statistische Signifikanz nur in mit T2 oder T3 behandelten Gruppen gefunden wurde.



### Abbildung 1

Auswirkungen von oral verabreichten *A. melanocarpa*-Extrakten, T1 ~ T4, auf das Prostatagewicht und die Prostataindizes von mit Testosteronpropionat behandelten Wistar-Ratten. Klinische Merkmale der TP-induzierten Prostatahyperplasie; Balken = 10 mm (a), absolute Prostatagewichte (b) und Prostataindizes (c). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ( $\pm$  SD) der Tiere in jeder Gruppe ausgedrückt. <sup>#</sup>  $p < 0,001$  gegenüber der Scheingruppe; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  gegenüber der VC-Gruppe. Schein, nicht BPH-induziert und erhielt 0,5% CMC-Na; VC, BPH-induziert und erhielt 0,5% CMC-Na; PC, BPH-induzierte und mit Sägepalme behandelte Gruppe. Die Herstellung und Verabreichung von T1 ~ T4 ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

Zusätzlich überprüften wir die Serumchemie, um den klinischen Gesamtstatus von Ratten zu überprüfen (Tabelle 1). Alle biochemischen Indizes mit Ausnahme einiger Leberenzyme lagen im normalen Bereich und es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Interessanterweise nahmen die Serum-AST-Werte in allen mit *A. melanocarpa* behandelten Gruppen (T1 ~ T4) ab, und die ALP-Werte nahmen in der T4-Gruppe ab. Obwohl die veränderten Aktivitäten von Leberenzymen durch *A. melanocarpa* nicht direkt mit den vorteilhaften Wirkungen auf

BPH zusammenhängen, ist dies ein günstiges Ergebnis für die Entwicklung funktioneller Lebensmittel unter Verwendung von *A. melanocarpa*.

**Tabelle 1**

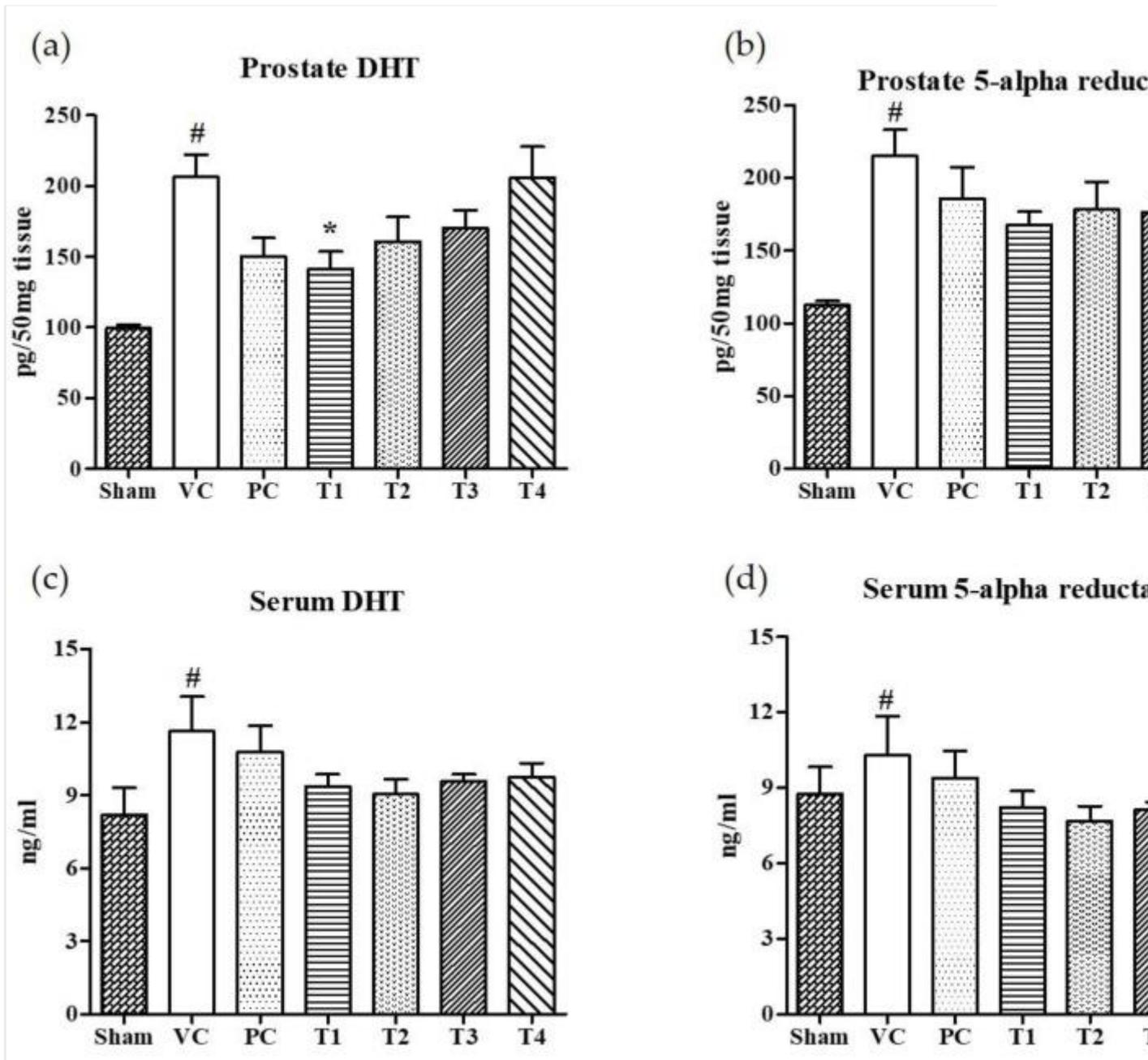
Serumbiochemische Daten bei der Autopsie für alle Versuchsgruppen von Ratten.

	TP	ALB	BRÖTCHEN	CREA	AST	ALT	ALP	Bil	TG	TCHO
	5,4							0,16		
	±	3,3 ±		0,50 ±	123,1	34,3	485,5	±	114,7	73,7 ±
Schein	0,1	0,1	20,4 ± 0,5	0,05	± 10,4	± 5,8	± 68,9	0,03	± 33,1	4,4
	6,3						530,8	0,17		
	±	4,1 ±		0,56 ±	134,2	33,7	±	±	99,9 ±	86,6 ±
VC	0,9	0,5	25,2 ± 4,3	0,10	± 22,5	± 7,9	110,3	0,03	33,6	18,4
	6,5						595,8	0,14		
	±	4,1 ±		0,51 ±	132,4	36,5	±	±	130,7	87,8 ±
PC	0,6	0,3	25,0 ± 2,0	0,05	± 11,5	± 5,5	128,4	0,04	± 51,2	21,8
	5,7						517,4	0,17		
	±	3,8 ±		0,52 ±	94,1 ±	31,9	±	±	79,0 ±	78,4 ±
T1	0,1	0,1	23,4 ± 2,6	0,03	8,7 *	± 2,8	103,3	0,01	26,9	6,6
	5,7				100,6			0,16		
	±	3,7 ±		0,50 ±	± 8,1	34,0	435,3	±	113,3	83,0 ±
T2	0,1	0,1	21,4 ± 0,8	0,09	*	± 3,3	± 91,8	0,03	± 57,3	9,4
	5,8							0,16		
	±	3,8 ±		0,52 ±	96,3 ±	31,6	469,2	±	123,9	74,8 ±
T3	0,2	0,1	22,7 ± 2,2	0,06	8,0 *	± 3,6	± 91,9	0,02	± 59,3	12,7
	5,6						358,8	0,18		
	±	3,7 ±		0,44 ±	82,5 ±	32,6	± 37,1	±	72,3 ±	73,8 ±
T4	0,2	0,2	20,1 ± 1,3	0,03	19,4 *	± 2,1	*	0,02	19,9	6,8

Serumspiegel von Gesamtprotein (TP), Albumin (ALB), Blutharnstoffstickstoff (BUN), Kreatinin (CREA), Aspartattransaminase (AST), Alanintransaminase (ALT), alkalischer Phosphatase (ALP), Gesamtbilirubin (Bil), Triglycerid (TG) und Gesamtcholesterin (TCHO) wurden als Mittelwert (± SD) der Tiere in jeder Gruppe angegeben. \*  $p < 0,05$  gegenüber der VC-Gruppe. Schein, nicht BPH-induziert und erhielt 0,5% CMC-Na; VC, BPH-induziert und erhielt 0,5% CMC-Na; PC, BPH-induzierte und mit Sägepalme behandelte Gruppe.

### 3.2. Auswirkungen von *A. Melanocarpa*-Extrakten auf die Expressionsniveaus von DHT und 5AR in Serum- und Prostatageweben

Die 5 $\alpha$ -Reduktase-vermittelte Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) in auf Androgen reagierenden Zielzellen wird als obligatorischer Schritt für die Entwicklung von BPH angesehen [ 32 ]. Darüber hinaus können die Inhibitoren für 5AR das Fortschreiten der BPH verhindern und verzögern, indem sie die DHT-Synthese unterdrücken [ 32 , 33 ]. Finasterid, 4-Aza-Steroid, ist ein selektiver Inhibitor für Typ 2-5AR, der den Serum-DHT-Spiegel senkt [ 34 ]. Bei Männern, die Finasterid wegen Harnproblemen einnahmen, traten jedoch Nebenwirkungen auf, darunter ein erhöhtes Risiko für verminderte Libido, Impotenz und erektile Dysfunktion [ 35 ]. In jüngster Zeit haben sich BPH-Patienten der Verwendung von Naturstoffen zugewandt, um ein sichereres und wirksameres Mittel zur Behandlung von BPH zu finden [36 , 37 ]. In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen von vier *A. melanocarpa*-Extrakten (T1 - T4) auf die DHT- und 5AR-Spiegel sowohl im Serum als auch im Prostatagewebe untersucht. Von den vier Extrakte zeigten T1 die größte Hemmung auf DHT - Spiegel in Prostatagewebe ( 2 a) im Vergleich zu der VC - Gruppe ( **Figur 2** b). Obwohl keine statistische Signifikanz gefunden wurde, wurde in allen mit *A. melanocarpa*-Extrakt behandelten Gruppen (T1 - T4) eine relative Verringerung der DHT- und 5AR-Spiegel sowohl im Serum als auch im Prostatagewebe gefunden . Es ist bekannt, dass Sägepalme die DHT und 5AR der Prostata senkt und das Testosteron-induzierte Prostatawachstum und die Hyperplasie in vivo abschwächt [ 38 , 39 , 40]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass Sägepalme die prostataspezifischen Antigenspiegel (PSA) bei Männern mit vergrößerter Prostata senkte [ 41 ]. Heutzutage wird eine Vielzahl von Nahrungsergänzungsmitteln, die Sägepalmenextrakt enthalten, üblicherweise von Männern mit Prostatavergrößerung und BPH konsumiert. In unserem Experimentiersystem beobachteten wir die Tendenz der DHT- und 5AR-Spiegel zur Abnahme des Serum- und Prostatagewebes in der mit Sägepalme behandelten Gruppe (PC), jedoch wurde im Vergleich zur VC-Gruppe keine statistische Signifikanz gefunden.

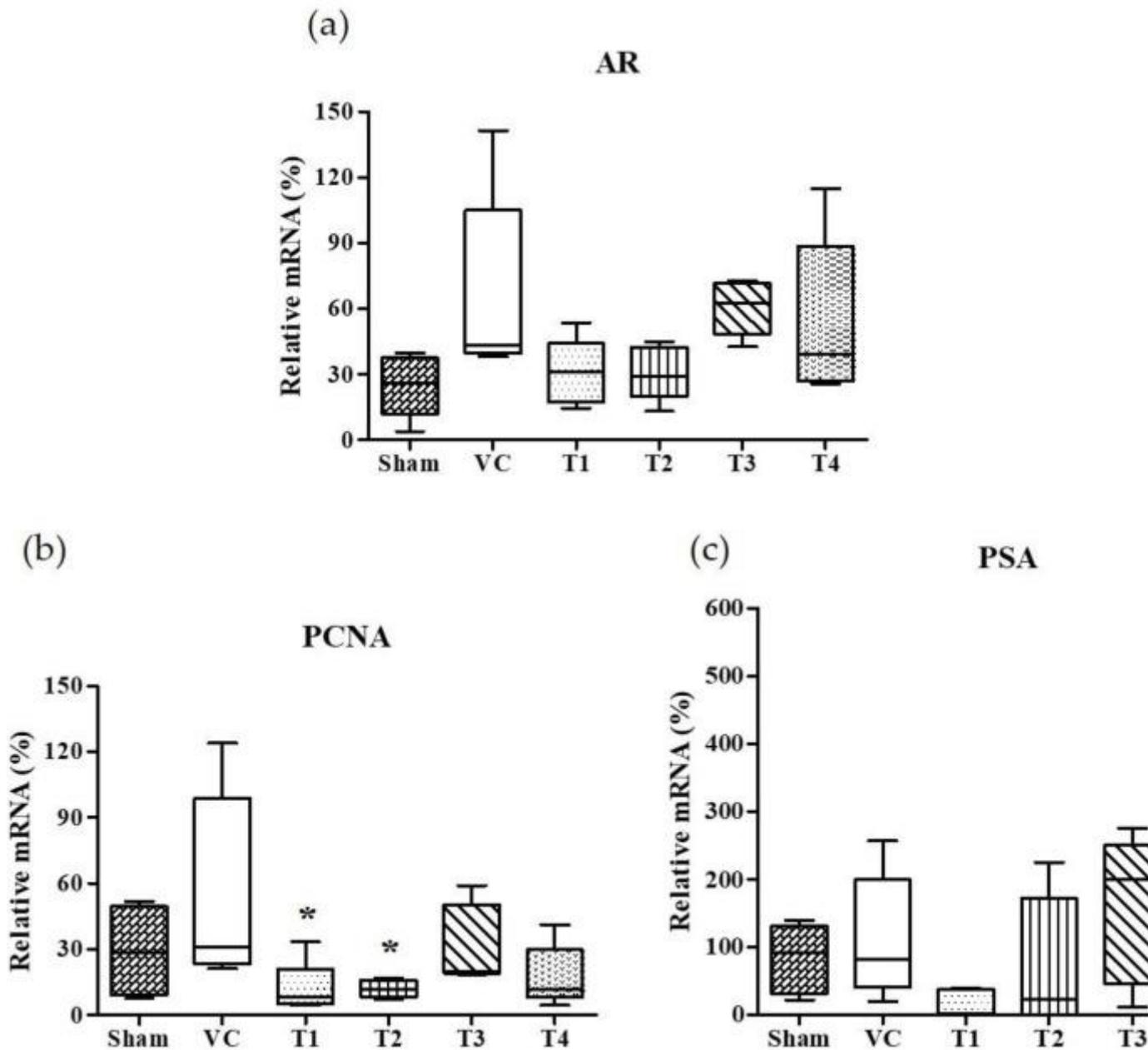


**Figur 2**

Auswirkungen von oral verabreichten *A. melanocarpa*-Extrakten T1 ~ T4 auf die Dihydrotestosteron- (DHT) und 5 $\alpha$ -Reduktase-Spiegel in Prostatagewebe und Serum von mit Testosteronpropionat behandelten Wistar-Ratten. DHT-Spiegel in Prostata ( **a** ), 5 $\alpha$ -Reduktase-Spiegel in Prostata ( **b** ), DHT-Spiegel in Serum ( **c** ) und 5 $\alpha$ -Reduktase-Spiegel in Serum ( **d** ). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ( $\pm$  SD) der Tiere in jeder Gruppe ausgedrückt. <sup>#</sup>  $p < 0,01$  gegenüber der Scheingruppe; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  gegenüber der VC-Gruppe. Die Herstellung und Verabreichung von T1 ~ T4 ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

### 3.3. Auswirkungen von *A. Melanocarpa*-Extrakten auf die mRNA-Expression von AR, PSA und PCNA

Androgene und AR, ein Mitglied der Steroidrezeptor-Superfamilie, sind für die Entwicklung, das Wachstum und die Funktion der Prostata essentiell [ 42 ]. In auf Androgen reagierenden Prostatazellen ist AR für die Initiierung der androgenabhängigen Gentranskription erforderlich und spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten von hormonresistentem Prostatakrebs [ 43 , 44 , 45 ]. Das durch Androgen aktivierte AR wird von Chaperonen dissoziiert und in Kerne transloziert. Es ist bekannt, dass die Bindung von AR an Androgen-Response-Elemente (AREs) die Genexpression von PSA und PCNA induziert [ 46 , 47 ]. PSA, ein wichtiges androgenreguliertes Gen, ist empfindlich und ein selektiver Marker für Prostatakrebs und wird als solches für Screening- und Bewertungszwecke verwendet [ 48 ]. Dementsprechend untersuchten wir die Auswirkungen der vier *A. melanocarpa*- Extrakte auf AR- und Androgen-regulierte Gene, PCNA- und PSA-Expression in Prostatageweben. Wie in **3 gezeigt** , war die Standardabweichung von AR, PCNA und PSA in der VC-Gruppe beträchtlich groß. Wir beobachteten jedoch die Tendenz der AR- und PSA-mRNA-Expression, bei *A. melanocarpa* abzunehmen-behandelte Gruppen, deren statistische Signifikanz nicht erhalten wurde. Basierend auf dem Mittelwert jeder Gruppe reduzierte die Verabreichung von T1 und T2 die mRNA-Expression von AR auf das Niveau von 46,3% bzw. 46,2% (T1:  $30,85 \pm 15,13$ , T2:  $30,75 \pm 12,36$ ) der VC-Gruppe (  $66,55 \pm 43,60$ ) ( **Abbildung 3**ein). Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von PSA durch Verabreichung von T1 bzw. T2 (T1:  $15,36 \pm 20,27$ , T2:  $73,53 \pm 97,82$ ) auf 13,6% und 65,2% der VC-Gruppe ( $112,7 \pm 91,77$ ) gehemmt. Die signifikante Änderung der mRNA-Expression von AR, PCNA und PSA wurde weder in der T3- noch in der T4-behandelten Gruppe beobachtet. Wir fanden, dass die Verabreichung von T1 eine Tendenz zeigte, die TP-induzierte mRNA-Überexpression von AR, PSA und PCNA in der Prostata zu reduzieren. Bei der mit T2 behandelten Gruppe war die Verringerung der AR- und PCNA-Expression ähnlich wie bei der mit T1 behandelten Gruppe, während eine Verringerung der PSA-Expression nicht beobachtet wurde. Zusammengenommen sind T1- und T2-Proben hochwirksam bei der Verbesserung der TP-induzierten BPH bei Ratten, obwohl einige Marker inkonsistente Ergebnisse zeigten (T1; PI-Index, T2; Prostata-DHT, und PSA-Ebene) und lassen einige Fragen zu den zugrunde liegenden Mechanismen. Es bedarf weiterer Forschung, einschließlich Transmissionselektronenmikroskopie, um die Morphologie der Prostatazellen zu bestätigen.

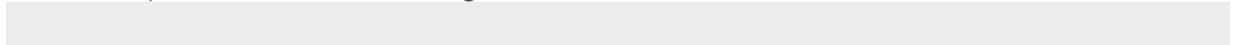


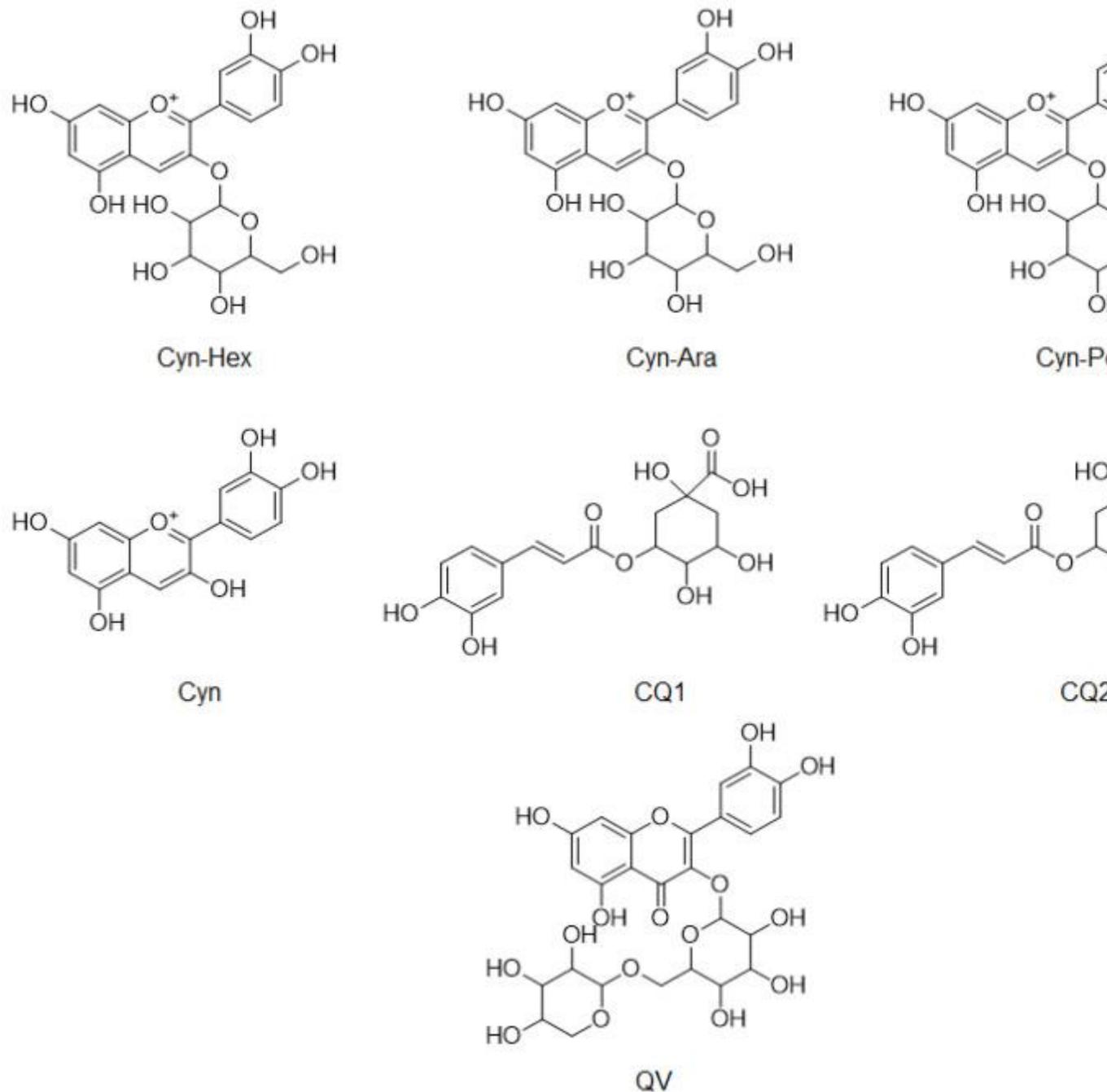
**Figur 3**

Auswirkungen von oral verabreichten *A. melanocarpa*-Extrakten T1 ~ T4 auf die Expression von Androgenrezeptor (AR), Prostata-spezifischem Antigen (PSA) und proliferierendem Zellkernantigen (PCNA) in den ventralen Prostatageweben von Testosteronpropionat-behandelten Wistar-Ratten. AR-mRNA-Expressionen ( a ), PSA-mRNA-Expressionen ( b ) und PCNA-mRNA-Expressionen ( c ). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ( $\pm$  SD) der Tiere in jeder Gruppe ausgedrückt. \*  $p < 0,05$  gegenüber der VC-Gruppe. Die Herstellung und Verabreichung von T1 ~ T4 ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

### 3.4. Vergleich der Häufigkeit phenolischer Verbindungen in A. Melanocarpa-Extrakten durch LC / MS-Analyse

LC / MS wurde verwendet, um die Zusammensetzungen von Phenolverbindungen in den vier Extrakten von *A. melanocarpa* zu vergleichen ( [Tabelle 2](#) ). Die Häufigkeit von Anthocyanen und Phenolen, von denen berichtet wurde, dass sie hauptsächlich in *A. melanocarpa* enthalten sind, wurde unter Verwendung von LC / MS im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) nachgewiesen. [Fig. 4](#) zeigt die chemischen Strukturen der sieben in T1 ~ T4 nachgewiesenen Verbindungen, nämlich Cyn-Hex (Cyanidin-3-Glucose oder Cyanidin-3-Galactose), Cyn-Ara (Cyanidin-3-Arabinose), Cyn-Pen (Cyanidin-3-pentose), Cyn (Cyanidin), CQ1 (Caffeonylchininsäure), CQ2 (Caffeonylchininsäure) und QV (Quercetin-Vicianosid). Infolgedessen waren die Gehalte aller sieben Verbindungen in T1 am höchsten. Die relative Häufigkeit des Haupt-Anthocyanins in *A. melanocarpa* Cyn-Hex (Cyanidin-3-Glucose oder Cyanidin-3-Galactose) war etwa 2,5-fach so groß wie T4.





**Figur 4**

Chemische Strukturen von Verbindungen, die in LC / MS nachgewiesen wurden

**Tabelle 2**

Relative Zusammensetzung von Phenolverbindungen in vier *A. melanocarpa*-Extrakten (T1 ~ T4), bestimmt durch LC / MS.

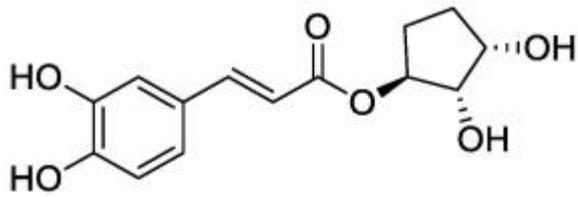
	<b>Cyn-Hex</b>	<b>Cyn-Ara</b>	<b>Cyn-Pent</b>	<b>Cyn</b>	<b>CQ1</b>	<b>CQ2</b>	<b>QV</b>
	<b>(<math>\times 10^3</math>)</b>						
T1	586	158	2,09	47.7	3,07	5.73	13.2

	Cyn-Hex	Cyn-Ara	Cyn-Pent	Cyn	CQ1	CQ2	QV
	(× 10 <sup>3</sup> )						
T2	268	68	1,08	20.9	2.21	3.55	10
T3	310	80.9	1.13	25.7	2.76	4.24	10.9
T4	230	56.8	0,69	18.4	2.45	3.86	0,88

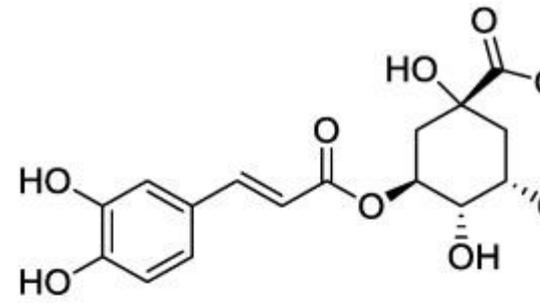
T1, 100% Ethanol / Extrakt bei niedriger Temperatur (30 ° C); T2, 100% Ethanol / Hochtemperatur (100 ° C) -Extrakt; T3, 60% Ethanol / Extrakt bei niedriger Temperatur (30 ° C); T4, 60% Ethanol / Hochtemperatur (100 ° C) -Extrakt; Cyn-Hex: Cyanidin-Hexose, Cyn-Ara, Cyanidin-3-Arabinose; Cyn-Pen, Cyanidin-3-pentose, Cyn, Cyanidin, CQ1, Caffeonylchininsäure; CQ2, Caffeonylchininsäure; QV, Quercetin Vicianosid.

### 3.5. Quantifizierung von Anthocyanin und Phenolen in *A. Melanocarpa*-Extrakten mittels HPLC

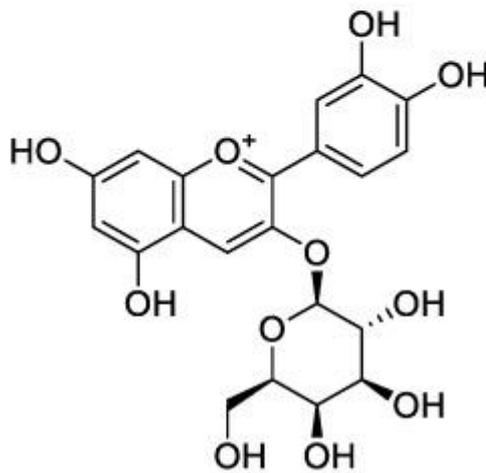
Basierend auf der LC / MS-Analyse wurde der Gehalt an vier Phenolverbindungen in *A. melanocarpa*- Extrakt mittels HPLC quantifiziert. Durch chromatographische Trennung wurden vier Verbindungen, einschließlich 1- (3,4-Dihydroxycinnamoylcyclopenta-2,3-dilo), Methyl-3-O-caffeoylchininsäure, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-xylosid, aus dem Extrakt von *A* isoliert *Melanocarpa*- Früchte ( [Abbildung 5](#) ). Wie in [Tabelle 3](#) **gezeigt** , wurden drei andere Verbindungen als Methyl-3-O-caffeoylchininsäure in *A. melanocarpa*- Extrakt unter Verwendung von HPLC nachgewiesen. Der Gehalt dieser Verbindungen wurde in *A. melanocarpa nachgewiesen* Der Extrakt T1 ~ T4 wurde anhand eines Vergleichs der Retentionszeit und des UV-Spektrums mit Standardverbindungen quantifiziert. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen wurde im Gehalt an Cyanidinglycosiden gefunden. Die Gehalte an Cyanidin-3-Glucose (0,7642 mg / ml) und Cyanidin-3-Xylose (2,6843 mg / ml) waren in T1 am höchsten. Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an Cyanidin-3-Glucose in T1 1,27–1,69-fach höher ist als in den anderen Extrakten (T2 ~ T4).



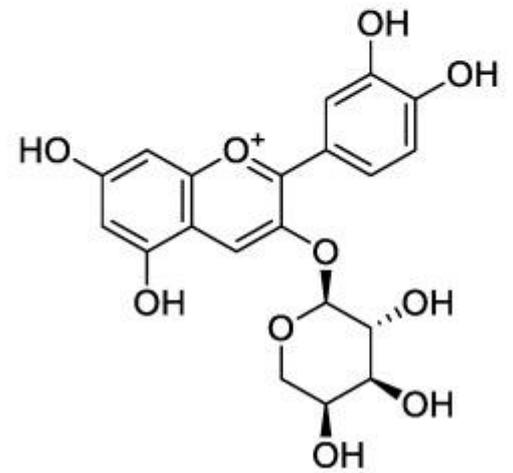
1-(3,4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2,3-diol



Methyl 3-O-caffeoylquinic a



cyanidin-3-glucoside



cyanidin-3-xyloside

### Abbildung 5

Chemische Strukturen von Verbindungen, die aus *A. melanocarpa*-Früchten isoliert wurden

### Tisch 3

Gehalt an Phenolverbindungen in vier *A. melanocarpa*-Extrakten (T1 ~ T4), bestimmt durch HPLC.

Inhalt (mg / ml)					
Stichprobe	1- (3,4-Dihydroxycinnamoylcyclopenta-2,3-diol)	Methyl-3-O-Caffeoylchininsäure	Cyanidin-3-Glucosid	Cyanidin-3-Xylosid	
T1	0,5349	ND	0,7642	2,6843	
T2	0,5461	ND	0,5107	2,3228	
T3	0,5015	ND	0,4559	2,1206	
T4	0,5583	ND	0,6002	2,4279	

T1, 100% Ethanol / Extrakt bei niedriger Temperatur (30 ° C); T2, 100% Ethanol / Hochtemperatur (100 ° C) -Extrakt; T3, 60% Ethanol / Extrakt bei niedriger Temperatur (30 ° C); T4, 60% Ethanol / Hochtemperatur (100 ° C) -Extrakt, ND: nicht nachgewiesen.

Die Stabilität von Anthocyanin wird leicht durch Temperatur, pH-Wert und Wasseraktivität während der Herstellung und Lagerung beeinflusst. Es ist bekannt, dass die Wasserlöslichkeit für den Abbau von Anthocyanen wesentlich ist [ 24 ]. Daher werden der Zersetzungsindex (DI) und die Wasseraktivität als Hauptindikatoren bei der Bewertung der Stabilität von Anthocyanen anerkannt [ 27 ]. In dieser Studie wurde Ethanol, eines der am häufigsten in kommerziellen Verfahren verwendeten Lösungsmittel, als Extraktionslösungsmittel ausgewählt. Es wurden vier Extraktionsbedingungen angewendet, indem die Temperatur (30 ° C und 100 ° C) und der Wassergehalt variiert wurden, was die Stabilität der Anthocyane beeinflusst. Als Ergebnis beobachteten wir, dass zwei Haupt-Anthocyane von *A. melanocarpa* Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-xylosid wurden unter Niedertemperaturbedingungen (T1) stabil mit Ethanol ohne Wasser extrahiert. Aufgrund neuer Erkenntnisse über die vorteilhaften Wirkungen von Polyphenolen, die häufig in Obst und Gemüse vorkommen, auf die Vorbeugung und Behandlung von Prostatakrebs und BPH [ 49 , 50 ] nahmen wir an, dass die reichlich vorhandenen Bestandteile von Polyphenolen, die hauptsächlich Anthocyane in T1 enthalten, zu deren Nutzen beigetragen haben könnten Auswirkungen auf die BPH in unserem TP-induzierten Rattenmodell.

## 4. Schlussfolgerung

---

In dem TP-induzierten BPH-Mausmodell neigte die Verabreichung der vier *A. melanocarpa*- Extrakte (T1 ~ T4) dazu, das absolute Gewicht der Prostata und des PI zu senken. Von den vier Extrakten zeigte T1 die starke Hemmung des DHT-Spiegels im durch TP induzierten Prostatagewebe. Darüber hinaus war die mRNA-Expression von PCNA in der Prostata in der T1-behandelten Gruppe reduziert. Bei LC / MS war die relative Häufigkeit der in *A. melanocarpa* enthaltenen Haupt-Anthocyane und Phenole in T1 im Vergleich zu den anderen Extrakten am höchsten. Die quantitative Studie unter Verwendung von HPLC zeigte, dass die Gehalte an Cyanidin-3-Glucose und Cyanid-3-Xylose in T1 am höchsten sind. Dementsprechend legen unsere Ergebnisse nahe, dass T1, der Extrakt von *A. melanocarpa* Früchte, die unter der Bedingung von 100% Ethanol / niedrigen Temperaturen (30 ° C) extrahiert wurden, hemmten wirksam die Entwicklung einer TP-induzierten Prostatahyperplasie, und es wird angenommen, dass die Anthocyanoglycoside zu ihrer pharmakologischen Wirkung beitragen.

## Danksagung

---

Die in dieser Studie verwendeten *A. melanocarpa*- Früchte wurden von Samheung Agricultural Corp. (Geochang, Südkorea) bereitgestellt.

## **Autorenbeiträge**

---

J.-DH, MHY und EJJ entwarfen die Experimente; N.-HK und YNK führten die Experimente durch; J.-RR, MHY und EJJ analysierten die Daten und interpretierten die Ergebnisse; JJ, MHY und EJJ haben das Manuskript verfasst. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und sind damit einverstanden.

## **Finanzierung**

---

Diese Arbeit wurde durch die Zuschüsse des koreanischen Instituts für Planung und Bewertung von Technologien in den Bereichen Ernährung, Land- und Forstwirtschaft sowie Fischerei (IPET) im Rahmen des vom koreanischen Ministerium finanzierten Programms zur Entwicklung von Lebensmitteln mit hohem Mehrwert (116016-3) unterstützt Landwirtschaft, Ernährung und ländliche Angelegenheiten (MAFRA), unterstützt durch das Entwicklungsprogramm für Bio- und Medizintechnik der National Research Foundation (NRF) und finanziert von der koreanischen Regierung (MSIP MOHW) (2016K1A1A8A01938673).

## **Interessenskonflikte**

---

Die Autoren erklären keine Interessenkonflikte.