LP-M. Novel Butanol-Extracts Liriope platyphylla, Induce Isolated from could the Survival Outgrowth Neuronal Cell and Neuritic **Hippocampus** of Mice in through Akt/ERK Activation on NGF Signal Pathway

So He Nam^{1†}, Sun II Choi^{1†}, Jun Seo Goo¹, Ji Eun Kim¹, Yoen Kyung Lee¹, In Sik Hwang¹, Hye Ryun Lee¹, Young Ju Lee¹, Hong Gu Lee², Young Whan Choi³ and Dae Youn Hwang¹*

¹Department of Biomaterials Science, ²Department of Animal Science, ³Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received March 31, 2011 / Revised June 7, 2011 / Accepted August 31, 2011

Liriope platyphylla has been used in oriental medicine as an effective medical plant to improve symptoms of cough, sputum production, neurodegenerative disorders, obesity and diabetes for long time. In order to investigate the effects of novel extracts on nerve growth factors (NGF)-stimulated neuritic outgrowth, the alteration of NGF expression and NGF receptor signaling pathway were detected in neuroblastoma cells and C57BL/6 mice. Of a total of 13 novel extracts, 4 extracts (LP-E, LP-M, LP-M50, LP2E17PJ) showed high viability on MTT assay. Also, all of these extracts induced NGF secretion and NGF mRNA expression in neuroblastoma cells. However, the NGF-induced neuritic outgrowth from PC12 cells was only stimulated by LP-E, LP-M and LP-M50. Furthermore, we selected LP-M as a best candidate, based on method and amounts of extraction, in order to verify its effect in mice. C57BL/6 mice were treated with 50 mg/kg of LP-M for 2 weeks and the effects on NGF regulation were analyzed with various methods. The expression of NGF mRNA was significantly increased in LP-M treated mice compared to vehicle treated mice. Also, the signaling pathway of p75 NTR was inhibited in the cortex by LP-M treatment, with no change in the hippocampus of brain. However, the signaling pathway of TrkA was dramatically activated in only hippocampus via LP-M treatment. Therefore, these results suggest that the novel four extracts of L. platyphylla may contribute to the regulation of NGF expression and secretion in neuronal cells. LP-M was especially considered to be an excellent candidate for a neurodegenerative disease-therapeutic drug.

Key words: Liriope platyphylla, nerve growth factors (NGF), NGF receptor signaling pathway

서 론

Nerve growth factors (NGF)는 neurotrophin family에 속하는 가장 잘 알려진 단백질로서 교감신경계(sympathetic nervous system)와 감각신경계(sensory nervous system)의 유지와 발달을 위해 매우 중요한 역할을 수행한다[5]. NGF는 cytokines에 반응하는 다양한 형태의 세포에서 분비된다. 이러한 세포로는 neuron, inflammatory cells (lymphocytes 혹은 mast cells), structural cells (fibroblast, epithelial cells, smooth muscle cells) 등이 포함된다[6]. 근육세포는 interleukin (IL)-1 β에 의해 NGF합성이 유도되고, fibroblasts에서는 IL-1β, platelet derived growth factor (PDGF), acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), tumor necrosis factor (TNF)-a, epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)-a, TGF-β에 의해 NGF합성이 증가된다[3,4,14]. 체내로

*Corresponding author

Tel: +82-55-350-5388, Fax: +82-55-350-5389

E-mail: dyhwang@pusan.ac.kr

분비된 NGF는 세포막에 분포하는 두 종류의 receptor (high와 low affinity receptor)에 결합하여 세포내로 신호를 전달한다. 두 종류의 receptor 중에서, 높은 결합력을 갖는 high affinity receptor는 TrkA로서 세포질쪽에 위치한 tyrosine-kinase domain을 통하여 Akt 혹은 ERK를 거쳐 neuritic outgrowth를 유도할 수 있다[24]. 그러나, 낮은 결합력을 갖는 low affinity receptor는 p75로서 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있으며, RhoA를 거쳐 Bcl2/Bax의 발현을 조절한다[3,6]. 이러한 조절기전은 신경세포의 분화와 성장에 매우 중요하기 때문에 지금까지 다양한 물질들에 의해 유도되는 NGF receptor의 신호전달과정에 대한 많은 연구들이 중요하게 취급되고 있다.

맥문동(Liriope platyphylla)은 한국, 중국 등의 동양권에서 한 방치료제로 주로 사용되는 한약재로서 항염증제와 항미생물제 기능[23,26], 인슐린 sensitizer와 비만억제 기능[2,10], neurotropic factor의 분비촉진을 통한 신경세포의 활성화 기능[8,9] 등을 갖고 있다. 이러한 기능 중에서 맥문동 추출물의 neuritic outgrowth와 관련된 기능은 신경퇴행성질환의 치료를 위한 새로운 전략으로서 관심이 집중되고 있다. 맥문동의

This authors equally contributed this work.

부탄올 추출물을 C6 세포와 primary astrocyte에 처리하여 얻어진 배지는 PC12 세포의 neuritic outgrowth를 촉진하였으며, 이러한 효과는 NGF항체, GF109203X, 그리고 protein kinase C의 저해제 처리에 의해 억제되었다[8]. 또한 맥문동을 메탄올-에틸아세테이트-부탄올로 추출한 spicatoside A (10 ug/ml)는 NGF (50 ug/ml)와 유사하게 neuritic outgrowth를 촉진한다[9]. 맥문동의 ethanol extract는 마우스에서 NGF의 발현을 촉진하였다[12]. 그러나, 이상에서 보고된 연구 이외에 최근까지 neuritic outgrowth를 촉진시키는 새로운 맥문동 추출물을 분리하고 작용기전을 밝히는 연구는 거의 진행되지 않고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이전에 보고되지 않은 새로운 추출 물을 분리하여 이들이 신경세포의 분화에 중요한 인자인 NGF 의 분비와 NGF receptor signaling pathway에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 그 결과, 4가지 추출물이 NGF의 분화를 촉진하였으며, 특히 LP-M은 마우스의 hippocampus와 cortex 에서 NGF-receptor signaling pathway를 다른 방식으로 조절 함을 확인하였다.

재료 및 방법

맥문동 추출물

맥문동은 2009년 5월에 충북지역에서 재배된 후 거심하여 건조한 것을 구입하여 사용한 것으로 50℃의 열풍 건조기에서 5일 동안 건조한 것을 사용하였다. 먼저, 건조맥문동 1,676.42 g을 믹서기(한일, 한국)로 완전히 분쇄한 다음, 건물중량의 3배 에 해당하는 용매로 3회 추출하여 회전증발기로 농축하였다. 구체적인 추출방법은 다음과 같다. 맥문동 1,676.42 g에 헥산 (hexane) 용액을 3배 첨가하여 1시간 동안 초음파분해 시킨 후, Whatamn No. 2 여과지로 필터하였으며, 이와 동일한 방 법을 3회 반복하여 얻은 추출물을 회전증발기로 농축하여 헥 산 추출물(LP-H1과 2)을 확보하였다. 그리고, 에틸아세테이트 (LP-E), 100% 메탄올(LP-M), 80% 메탄올(LP-M80), 50% 메탄 올(LP-M50), 20% 메탄올(LP-M20)도 헥산 추출물과 유사한 방 법으로 추출하였다. LP2E17P5는 에틸아세테이트 추출물인 LP-E를 H-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-Aceton, CH₂Cl₂-MeOH, CHCl₃-MeOH을 이용하여 LP2EF1부터 LP2EF75까지 75개 추출물을 확보한 후 LP2EF17 추출물을 CH2Cl2-Aceton을 이용하여 순 수분리하여 확보하였다.

포제맥문동을 만들기 위하여, 먼저 20 kg의 생맥문동을 약 1시간 동안 전통 곡주에 침전 시킨 후, 300~400℃ 수증기를 이용하여 약 20~30분 동안 찌고, 1-3일 동안 음건하였다. 건조된 맥문동은 전통곡주 침전과 수증기 가열과정을 반복한 후다시 건조하였다. 이러한 과정을 9회 반복하여 완전한 포제맥문동을 제조하였다. 포제맥문동의 추출을 위해, 포제맥문동 1 kg을 믹서기로 완전히 분쇄한 다음 80% 메탄올 3 l를 첨가하

여 1시간 동안 초음파분해를 실시한 후 용액을 회수하고, 남은 찌꺼기에 80% 메탄올을 첨가하여 3회 반복하여 추출하였다. 80% 메탄올 추출물은 Whatamn No. 2 여과지로 필터하였으며, 80% 메탄올 추출물과 동량의 핵산을 분획에 첨가하여 실온에서 일정한 시간 동안 배양한 후 핵산층을 회수하였다. 이러한 방법을 3회 반복하여 핵산추출물을 확보하였다(LP9M80-H1과 2). CHCl3와 부탄올(BuOH) 추출물도 핵산추출물과 동일한 방법으로 분획하여 각각의 추출물 LP9M80-C와 LP9M80-B를 얻었다. 80% 메탄올 추출물은 핵산, CHCl3와 부탄올(BuOH) 분획으로 추출한 다음 남은 액체를 회전농축기로 농축하여 확보하였다(LP9M80). 준비된 맥문동에서 추출한 10가지의 추출물인 LP-H, LP-E, LP-M, LP-M80, LP-M50, LP-H2O, LP9M80-H, LP9M80-C, LP9M80-B, LP9M80은 최종농도가 200 μg/ml가 되도록 dimethly sulphoxide (DMSO, Sigma, USA)로 희석시켜 실험에 사용하였다.

세포배양(Cell culture)

맥문동이 신경세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 B35, PC12 세포를 사용하였다. Neuroblastoma인 B35 cells은 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 37℃, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. Pheochromocytoma인 PC12 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지에 37℃, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

세포독성시험

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존률을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다[7]. 먼저, B35 세포를 96 well (3×10⁴ 세포/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (DMSO)과 10 μg/ml 맥문동의 추출물을 처리하고, 24시간 동안을 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, MTT용액을 50 μl 첨가한 뒤, 4시간 동안 배양한 후 세포 내에 보라색결정이 생성되면 DMSO 용액을 이용하여 formazan을 용해시켰다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서측정하였다.

PC12 세포주에서 신경돌기 성장관찰

B35 세포주에서 분비되는 NGF가 신경세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양액을 이용한 세포분화를 측정

하였다. 이를 위해 먼저 B35 세포에 맥문동 추출물을 처리한 뒤 24시간 배양을 하여, NGF가 분비된 세포 배양액을 확보하였다. 분비된 배양액을 PC12 세포주에 처리하여 24시간의 경과 후 세포주의 변화를 위상차 도립현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 분화정도를 관찰하였고, dendrite의 길이는 Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

맥문동 추출물에 의한 세포와 실험동물에서 NGF 분비량 은 NGF ELISA kit (Chemicon, USA & Canada)를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 신경세포인 B35세포를 96 well plate에 3×10⁴ 세포/well가 되도록 분주한 후, 70~80% 자랄 때까지 37℃, CO₂ incubator에 배양하였다. 그리고 각 well에 vehicle과 10 μl/ml의 맥문동 추출물을 처리하고, 24시간 동 안 배양한 후, 배양액을 채취하여 5,000 rpm에서 2분 동안 세 포를 침전시켜 상층액을 준비하였다. ELISA kit의 각 well에 100 μl의 배양액을 첨가하여 밤새 배양하여 NGF를 항체에 결합시켰다. 미부착된 용액을 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody를 100 μl 첨가하여 실온에서 2시간 동 안 shaking 배양하였다. 미부착된 항체를 제거하고, 2차 항체 인 peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100 山를 첨가하여 실온에서 shaking 배양하 였다. 여기에 100 ul의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

Reverse transcription (RT)-PCR

맥문동 추출물이 NGF 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰 하기 위하여 각각의 맥문동 추출물이 처리된 B35 세포주와 마우스의 뇌조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시 하였다. 세포주의 경우, 세포주로부터 배지를 모두 제거한 후 RNAzol (Tel-Test Inc., CS104)을 이용하여 세포로부터 RNA 를 추출하였다. 마우스의 경우, 뇌조직 100 mg을 적출하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. RNAzol 추출물에 포함된 단백질은 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하 였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 5 μg을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 먼저 3-5 μg의 RNA 에 0.5 µg의 oligo dT (Invitrogen, 18418-012)를 처리하고, 70℃ 에서 10분 동안 반응하여 oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기 에 5X 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (Invitrogen, 18064-014, 200 U/山)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치 후 42℃에서 50분 동안 RT반응을 수행하였다. RT반 응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 3.2 U/µl 처리하여 37℃에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94℃ (45 sec), 62℃ (30 sec), 72℃ (45 sec) 32 cycle로 NGF 특이적인 서열(sense primer: 5′-CAT GTT GTT CTA CAC TCT GAT CAC-3′, anti-sense primer: 5′-CTC CTT GCC CTT GAT GTC TGT GG)과 actin 특이적서열(sense primer:5′-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAG GGC-3′, anti-sense primer: 5′-CTC CTT AAT GCT ACG CAC GAT TTC-3′)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다. PCR 산물이 전기영동에서 나타내는 band의 density는 Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120을 이용하여 3회 반복 실험한 결과를 통계처리하여 분석하였다.

동물실험

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free (SPF) 상태의 C57BL/6 마우스(8주령, 20±5 g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록하였고, 12 시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐숭인(승인번호: PNU-2009-0056)을 받아 수행되었다. 먼저, 마우스를 6마리씩 2군(Vehicle 처리군, LP-M 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 olive oil 용액만을, LP-M처리군은 맥문동 추출물인 LP-M을 50 mg/kg 농도로 2주 동안 6회에 걸쳐 경구투여하였다. 2주 후, 마우스는 Zoletil® 1 ml/kg을 투여하여 마취하고, 조직을 적출하였다.

Western blot analysis

마우스 뇌조직에서 NGF receptor signaling pathway의 변화를 관찰하기 위하여 조직 100 mg을 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, 17081)을 참가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하고, SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology, 21071)을 이용하여 단백질을 정량하여 western blot analysis에 사용하였다. 4-20% SDS-PAGE gel에 50-100 μg의 단백질을 전기영동 한 후 ECL membrane (Amersham Life Science, RPN2020D)에 전이하고, 3% skim milk에서 2시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 다음과 같은 anti-p75^{NTR} antibody (#4201, Cell Signaling Technology), anti-RhoA antibody (#9272, Cell Signaling Technology), anti-P-Akt antibody (#4058, Cell Signaling Technology), anti-P-Akt antibody (#4058, Cell Signaling Technology), anti-P-Akt antibody (#4058, Cell Signaling

Technology), anti-ERK antibody (sc-94, Santa Cruz Biotechnology), anti-p-ERK antibody (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), anti-actin antibody (A5316, Sigma-Aldrich) 로 4℃에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하여 ECL Kit (RPN2108, Amersham Life Science)를 이용하여 develop하였다.

통계분석

실험군과 vehicle 처리군 간의 실험 결과에 대한 유의성은 One way ANOVA를 이용하여 분석하였고, P-value<0.05를 유의성이 있는 값으로 인정하였으며, 실험 결과는 means±SD로 제시하였다.

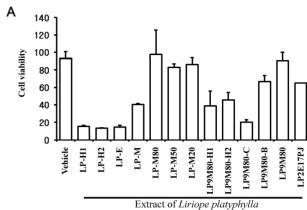
결 과

맥문동 추출물이 신경세포 생존율에 미치는 영향

맥문동 추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 평가하기 위하 여 신경조직에서 주로 분포하는 neuronal cells에서 기원된 세 포주를 이용하여 맥문동 추출물을 10 μl/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT 분석을 실시하였다. MTT 분석 결과, LP-M80을 처리한 그룹에서는 세포생존율에 큰 변화가 관찰 되지 않았으나, LP-M50, LP-M20, LP9M80을 처리한 그룹에서 는 5~7%의 감소를 나타내어, 세포생존율에 유의적인 변화를 유도하지 못하였다. 그러나 LP9M80-B, LP2E17PI를 처리한 그 룹에서는 유의적으로 세포생존율이 35~40% 감소하였고, LP-M과 LP9M80-H를 처리한 그룹에서는 50%의 세포생존율 을 나타내었다. 또한 LP-H, LP-E, LP9M80-C, LP2E를 처리한 그룹에서는 20~30%의 생존율을 나타내어, 강한 세포독성이 있음을 관찰하였다(Fig. 1A). 따라서 이러한 실험결과는 맥문 동 추출물 중에서 LP-M80, LP-M50, LP-M20, LP9M80-B, LP9M80, LP2E17PJ는 신경조직을 구성하는 neuronal cells에 서 세포독성을 나타내지 않으나, LP-H, LP-E, LP-M, LP9M80-H, LP9M80-C, LP2E는 세포독성을 유도함을 제시하 고 있다.

맥문동 추출물이 NGF 분비에 미치는 영향

NGF가 세포배양액으로 분비되는지 확인하기 위하여 맥문동 유수추출물을 처리한 후 배양액 내에 NGF의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 13가지 맥문동추출물 중에서 LP-M과 LP2E17PJ가 높은 NGF 분비(200 pg/l, 193 pg/l)를 촉진하는 것으로 확인되었으며, 다음으로는 LP-E, LP-M50, LP9M80-C가 약간의 증가(76 pg/l, 87 pg/l, 69 pg/l)를 나타내었다. 그러나 다른 물질을 처리한 그룹에서는 특별한 증가를 나타내지 않았다(Fig. 1B). 이러한 결과부터상대적으로 세포독성이 적고, NGF 분비량이 많은 후보물질 4가지를 확인하였다.



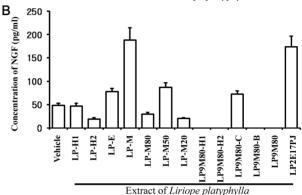


Fig. 1. Toxicity of the novel extracts of *Liriope platyphylla* on the cells viability of B35 cells. Cells were cultured with one of the 13 extracts in DMSO for 24 hr. Activity of cells viability was measured using MTT assay (A). The culture supernatant was collected from each group. An NGF concentration in the supernatant was measured using anti-NGF ELISA kit (B). The values of data represented mean±SD of three experiments. *p<0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

맥문동 추출물이 NGF mRNA 발현에 미치는 영향

이상의 결과로부터 세포독성이 적으면서 NGF의 분비가 많았던 맥문동 추출물의 후보물질 4가지(LP-M, LP-M50, LP9M80-C, LP2E17PJ)를 세포주에 처리한 후 NGF mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, B35세포주에서의 NGF mRNA 발현은 NGF 분비량과 일부 차이는 있으나 전체적으로 유사하게 증가되었다. 특히, LP2E17PJ를 처리한 그룹에서 mRNA 발현이 가장 높았으나, 높은 NGF의 분비를 나타내었던 LP-M를 처리한 그룹에서의 mRNA 발현은 상대적으로 적었다. 그러나 LP-M 처리그룹도 vehicle 그룹보다 1.5배 높은 발현양을 나타내었다(Fig. 2).

맥문동 추출물에 의해 분비된 NGF가 PC12세포의 분화에 미치는 영향

또한, 분비된 NGF가 실제로 세포의 분화를 촉진시키는지 를 확인하고자 PC12 cells을 이용한 배양액-유도반응을 실시

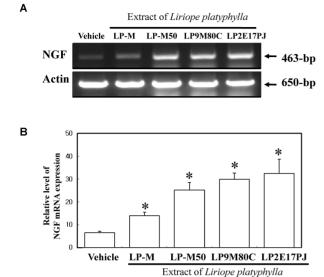


Fig. 2. Effects of four novel extracts of *Liriope platyphylla* on NGF expression of B35 cells. The β-actin signal was used as the endogenous control, and the transcript (650-bp) indicates the RNA loading. The levels of NGF mRNA were significantly changed in the treated cells with *L. platy-phylla* extract compare to vehicle treated group. The density of transcript was quantified using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120. The values of data represented mean±SD of three experiments. *p<0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

하였다. 그 결과, 맥문동 유수추출물을 처리한 B35 cells에서 채취한 배양액을 첨가한 PC12 세포는 vehicle을 처리한 배양액보다 LP-M, LP-M50, LP9M80-C를 처리한 배양액에서 분화가 촉진되는 것으로 관찰되었다. 그러나, LP2E17PJ의 경우에는 배양액은 PC12세포의 분화를 촉진하는 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

맥문동추출물이 마우스의 뇌조직에서 NGF의 발현에 미치 는 영향

세포주에서 효능을 나타내었던 4가지 추출물 중에서 추출 방법과 추출양의 측면에서 제품화로 연결이 가능한 추출물인 LP-M을 선정하여 C57BL/6마우스를 이용한 동물실험을 실시 하였다. 먼저, 2주 동안 LP-M 추출물을 투여한 후 대뇌피질에 서 NGF mRNA의 발현을 관찰하였다. LP-M을 처리한 마우스 는 대조군과 비교하여 2배 이상의 NGF발현 증가를 나타내었 다(Fig. 4). 이러한 결과는 LP-M은 마우스의 뇌조직에서 NGF 발현을 촉진하는 기능이 있음을 제시하고 있다.

맥문동추출물이 마우스의 뇌조직에서 low affinity receptor 를 통한 신호전달에 미치는 영향

또한, 체내에서 증가된 NGF가 대뇌피질(cortex)과 해마부

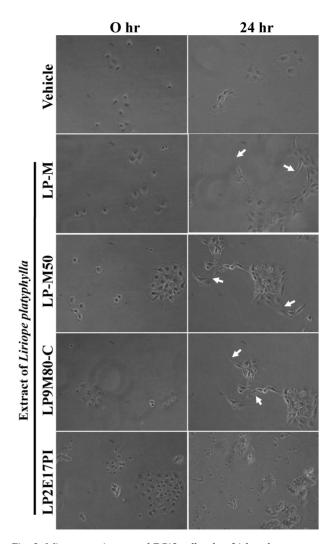
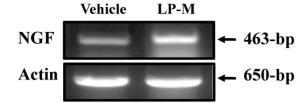


Fig. 3. Microscope images of PC12 cells after 24 hr of treatment with four B35 cells cultured supernatants which was contained NGF secreted with four extracts of *Liriope platyphylla*. Vehicle-treated cells were treated with DMSO as using the dissolving agents of four compounds. Cellular morphology was viewed at 20× magnification. Arrows on microscope images indicate the dendrites of PC12 cells.

위(hippocampus)에서 NGF의 low affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향을 관찰하기 위해 p75^{NTR}과 RhoA의 단백질 변화를 western blot analysis를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 대뇌피질의 경우, 맥문동 추출물인 LP-M을 처리한 마우스에서는 p75^{NTR}과 RhoA의 단백질이 vehicle 처리그룹에 비하여 유의적으로 감소하였다. 그러나 해마의 경우, LP-M을 처리하여도 특별한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과는 LP-M은 대뇌피질에서 NGF의 low affinity receptor를 통한 신호전달을 억제하지만 해마에서는 특이적 반응을 유발하지 못함을 제시하고 있다.



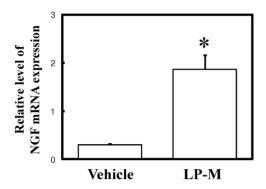


Fig. 4. Effects of LP-M extracted from *Liriope platyphylla* on NGF expression of C57BL/6 mice brain. The β-actin signal was used as the endogenous control, and the transcript (650-bp) indicates the RNA loading. The density of transcript was quantified using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120. The values of data represented mean±SD of three experiments. **p*<0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

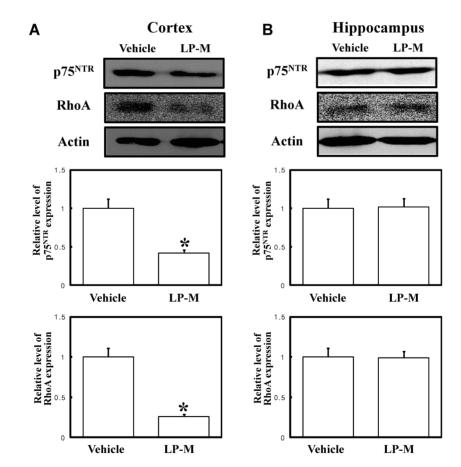


Fig. 5. Effect of LP-M on down-stream signaling pathway of NGF low affinity receptor in cortex (A) and hippocampus (B) of brain using western blot. Total cells lysate were prepared from brain tissues of vehicle treated mice and LP-M treated mice, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate using Western blotting. The values are the mean±SD. *p<0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

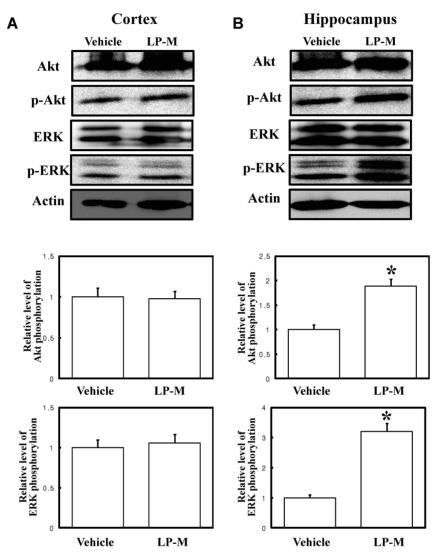


Fig. 6. Effect of LP-M on down-stream signaling pathway of NGF high affinity receptor in cortex (A) and hippocampus (B) of brain using western blot. Total cells lysate were prepared from brain tissues of vehicle treated mice and LP-M treated mice, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate using Western blotting. The values are the mean±SD. *p<0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

맥문동추출물이 마우스의 뇌조직에서 low affinity receptor 를 통한 신호전달에 미치는 영향

맥문동 추출물인 LP-M이 NGF의 high affinity receptor를 통한 신호전달에 미치는 영향을 관찰하기 위해 TrkA의 dawn-stream 신호전달 단백질인 Akt와 ERK의 변화를 western blot analysis를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 대뇌피질에서는 특이적 변화가 없었지만, 해마에서는 Akt와 ERK의 인산화를 촉진시킴을 확인하였다(Fig. 6). 이러한결과는 LP-M은 NGF의 high affinity receptor를 통한 신호전달을 촉진함으로서 neuritic outgrowth를 촉진함을 제시하고 있다.

고 찰

NGF는 약 50년 전에 Rita Levi-Montalcini 등에 의해서 신경의 분화, 중식, 생존에 중요한 기능을 하는 단백질로 처음보고되었다[13]. NGF는 α , β , γ 의 3개 단위체가 비공유결합에의해 결합된 구조를 갖고 있으며, 이 중에서 β 단위체가 성장촉진활성을 나타내기 때문에 일반적으로 β -NGF라 불리운다. 사람의 체내에서, 활성 NGF는 β dimer로서 발견된다. β -NGF는 signal peptide와 pro-peptide가 절단되어 형성된 120-아미노산으로 구성된 성숙 polypeptide의 homodimer 단백질이다. NGF 유전자는 마우스에서는 chromosome 3번에, 사람에

서는 1번에 위치하고 있으며, 6개의 exon과 4개의 intron으로 구성되어 있다[22,25]. NGF 유전자의 발현을 조절하는 promoter는 2가지 형태로 존재하며, 하나는 마우스에서 2개의 TATA box와 2개의 CAAT box를 갖고 있으나 사람에서는 TATA box가 없는 형태로 관찰되었다[1]. 다른 하나는 사람과 마우스에서 3번째 intron에서 발견되었으며, 3번째 exon의 transcription과 관련이 있는 것으로 알려져 있다[20]. 이러한 NGF의 특성으로 인해 신경퇴행성질환을 치료하기 위한 중요한 표적으로 많은 연구에서 NGF를 고려하고 있다. 본 연구에서도 맥문동의 신경퇴행성질환 치료효능을 평가하는 지표로 NGF 분비와 세포분화를 측정하였다.

지금까지 NGF분비를 촉진하는 맥문동의 2가지 추출물(부 탄을 추출물과 spicatoside A)에 대한 기능이 PC12세포를 이용하여 연구되었다[8,9]. 그러나 본 연구에서는 맥문동으로 부터 핵산, 에틸아세테이트, 메탄올 등을 이용하여 14가지 추출물을 확보하여 이들의 NGF 분비능을 측정하였다. 이들 중에서 NGF 분비를 촉진하면서 세포독성이 상대적으로 적은 4가지의 에틸아세테이트와 메탄올 추출물을 확인하였다. 특히, LP2E17PJ는 NGF 분비능도 우수하면서 세포독성도 없는 가장우수한 추출물로 확인되었다. 그러나 LP2E17PJ는 추출방법이복잡하고 추출양도 매우 적어 제품화로 연결하기 위해서는 많은 문제를 나타내었다. 한편, LP-M은 비록 약간의 독성은 있었지만 NGF 분비능이 우수하고 추출방법이 단순하고 많은양을 추출할 수 있어 매우 바람직한 추출물로서 판단되어 동물실험에 선정하였다.

맥문동 이외에 일부 식물추출물들도 neuritic outgrowth를 촉진한다. 특히 맥문동과 유사하게 사포닌을 많이 함유하고 있는 인삼이 NGF의 발현 증가를 유도하는 기능이 알려졌다. 다중낭성난소(polycystic ovary)를 유도한 동물에 인삼추출물 (korea white ginseng extract)을 투여하면, 교감신경계는 활성 이 증가되었으며, 이러한 증가는 NGF protein과 mRNA의 발 현과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다[19]. 또한 ginsenoside Rb1의 투여는 랫드의 hippocampus에서 NGF mRNA의 발현증가와 basal forebrain에서 choline esterase와 TrkA mRNA의 발현 증가를 유도하였다[21]. Picrohizae Rhizoma의 메탄올 추출물은 PC12 세포의 NGF에 의해 유도되는 neuritic outgrowth를 촉진하였으며, 4종류의 에틸렌 아세테이트 추출 물(2개 iridoid glycosides, picrosides I과 II) 중에서 picrosides 는 neurotrophic activity는 없지만 PC12 세포의 NGF-mediated neurite outgrowth를 촉진하였다[16]. 또한, shu-jinghuoxie-tang, wu-ling-san과 같은 몇 가지 중국약재는 NGF-induced neuritic outgrowth를 NGF 단독처리보다 30배 이상 증가시키는 효과를 나타내었다[11]. 중국의 전통한약재 인 Polygala caudata로부터 분리된 euxanthone은 다양한 neurite growth 자극효과를 나타내었다. 먼저, euxanthone은 neurotrophins의 추가 없이 chick embryo dorsal root ganglia 의 neurite growth와 세포생존을 크게 자극하는 작용을 하였으며, 랫드의 primary sensory neurons의 neurite growth도 촉진하였다[18]. 감송향(Nardostachys chinensis)으로부터 분리된 nardosinone은 neurotrophic activity는 없었지만 NGF-mediated neuritic outgrowth를 촉진시켰다[15]. 본연구에서, 맥문동 추출물은 Picrohizae Rhizoma과 유사하게 메탄올과 에틸아세테이트를 이용하여 추출하였으며, PC12 세포에서 동일하게 NGF-mediated neurite outgrowth를 촉진하였다. 따라서 메탄올과 에틸아세테이트를 이용한 추출방법은 NGF 분비를 촉진하는 물질을 분리하는 우수한 방법으로 고려될 수 있으리라 예측된다.

NGF receptor signaling pathway에 영향을 미치는 일부 식 물추출물에 대한 기전연구가 알려져 있다. 맥문동으로 부터 추출된 spicatoside A는 neuritic process를 시작하는 TrkA를 통하여 ERK1/2와 PI3-kinase/Akt를 활성화되며, siRNA에 의 해 TrkA가 knockdown된 PC12 세포에서는 spicatoside A의 neuritic outgrowth 효과가 사라진다[9]. 한편, shu-jing-huoxie-tang, wu-ling-san 등의 중국약재는 MAPK 활성을 유도하 지는 못했다[11]. Nardosinone는 단독으로 MAP kinase의 인 산화를 촉진하지 못하지만 dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) 와 staurosporine-induced neuritic outgrowth를 촉진하였다. 이러한 결과는 nardosinone이 MAP kinase-dependent signaling pathway에서 MAP kinase의 downstream을 촉진시키며, dbcAMP와 staurosporine의 neurotogenic action을 촉진하는 첫 번째 물질임을 보여준다[17]. 또한, Polygala caudata로부터 추출한 euxanthone-stimulated dorsal root ganglion의 western blot 분석에서, MAP kinase의 인산화는 euxanthone 처리 후 1시간만에 증가되며, MAP kinase의 저해제인 PD98059의 처리에 의해 억제된다. 그러나, euxanthone는 phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway를 활성화하지는 못하였다[18]. 본 연구에서는 맥문동 추출물인 LP-M을 마우스에 투여한 후 뇌조직의 피질과 해마에서 NGF receptor signaling pathway 의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 2 종류의 NGF receptor는 해 마와 피질에서 LP-M에 의해 상반된 반응을 나타내었다. Low affinity receptor인 p75^{NTR}은 피질에서만 신호전달을 억제하 였으며, high affinity receptor를 통한 신호전달은 해마에서만 neuritic outgrowth 촉진 신호를 유도하는 것으로 확인하였다. 또한 본 연구에서 사용된 LP-M은 spicatoside A와 매우 유사 하게 NGF receptor signaling pathway를 활성화하는 효과를 나타냄을 알 수 있다(Fig. 7).

이상의 결과를 종합해보면, 맥문동의 새로운 추출물 중에서 NGF의 분비를 촉진하는 새로운 13종류의 추출물을 확인하였으며, 이중에서 LM-P는 마우스의 뇌조직 중에서 피질에서는 low affinity receptor를 통한 억제신호를 전달하지만 해마에서는 high affinity receptor를 통하여 신호를 전달하여 neuritic outgrowth를 촉진하였다. 따라서 맥문동의 새로운 추출

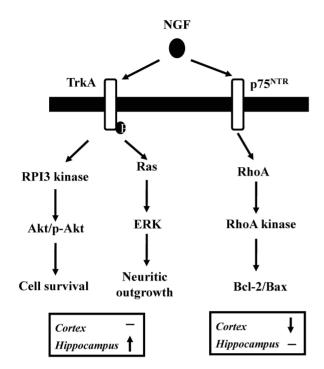


Fig. 7. Signaling pathway of NGF receptors TrkA and p75^{NTR}. NGF could bind two type receptors located on cells membrane. p75^{NTR} receptor has the week binding activity to NGF and regulated the Bcl-2/Bax expression through RhoA kinase activation. But, TrkA receptor showed the strong binding activity to NGF and induced the cells survival and neuritic outgrowth via Akt and ERK activation. "↑" in the above diagram indicates "activation", "↓" indicates "inhibition", "—" indicates "No change".

물인 LM-P는 약학적인 기전연구가 추가적으로 수행된다면 새로운 신경퇴행성질환의 치료제로서 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터에 의해 지원 된 사업이며, 세포촬영에 도움을 주신 부산대학교 정영화 교 수님께 진심으로 감사드립니다.

References

- Cartwright, M., S. Martin, S. D'Mello, and G. Heinrich. 1992.
 The human nerve growth factor gene: structure of the promoter region and expression in L929 fibroblasts. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 15, 67-75.
- Choi, S. B., J. D. Wha, and S. Park. 2004. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci.* 75, 2653-2664.

- di Mola, F. F., H. Friess, Z. W. Zhu, A. Koliopanos, T. Bley, P. Di Sebastiano, P. Innocenti, A. Zimmermann, and M. W. Büchler. 2000. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Int. J. Gastroenterol. Hepatol.* 46, 670-679.
- Ehrhard, P. B., P. Erb, U. Graumann, and U. Otten. 1993.
 Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10984-10988.
- Einarsdottir, E., A. Carlsson, J. Minde, G. Toolanen, O. Svensson, G. Solders, G. Holmgren, D. Holmberg, and M. Holmberg. 2004. A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. *Hum Mol. Genet.* 13, 799-805.
- 6. Freund-Michel, V. and N. Frossard. 2008. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* **117**, 52-76.
- 7. Gerlier, D. and N. Thomasset. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94**, 57-63.
- 8. Hur, J., P. Lee, J. Kim, A. J. Kim, H. Kim, and S. Y. Kim. 2004. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol. Pharm Bull.* 27, 1257-1260.
- 9. Hur, J., P. Lee, E. Moon, I. Kang, S. H. Kim, M. S. Oh, and S. Y. Kim. 2009. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **620**, 9-15.
- Jeong, S., K. Chae, Y. S. Jung, Y. H. Rho, J. Lee, J. Ha, K. H. Yoon, G. C. Kim, K. S. Oh, S. S. Shin, and M. Yoon. 2008. The Korean traditional medicine Gyeongshingangjeehwan inhibits obesity through the regulation of leptin and PPARalpha action in OLETF rats. *J. Ethnopharmacol.* 119, 245-251.
- Kano, Y., S. Takaguchi, T. Nohno, F. Hiragami, K. Kawamura, M. K. Iwama, K. Miyamoto, and M. Takehara.
 2002. Chinese medicine induces neurite outgrowth in PC12 mutant cells incapable of differentiation. *Am J. Chin. Med* 30, 287-295.
- 12. Lee, Y. C., J. C. Lee, Y. B. Seo, and Y. B. Kook. 2005. Liriopis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 144-152.
- 13. Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger. 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathethic nervous system of chick embryo. *J. Exp. Zool.* **116**, 321-361.
- 14. Levi-Montalcini, R., S. D. Skaper, R. Dal Toso, L. Petrelli, and A. Leon. 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* 19, 514-520.
- 15. Li, P., K. Matsunaga, K. Yamamoto, R. Yoshikawa, K. Kawashima, and Y. Ohizumi. 1999. Nardosinone, a novel enhancer of nerve growth factor in neurite outgrowth from PC12D cells. *Neurosci. Lett.* **273**, 53-56.
- 16. Li, P., K. Matsunaga, and Y. Ohizumi. 2000. Nerve growth factor-potentiating compounds from *Picrorhizae Rhizoma*.

Biol. Pharm. Bull. 23, 890-892.

- 17. Li, P., K. Matsunaga, T. Yamakuni, and Y. Ohizumi. 2003. Nardosinone, the first enhancer of neurite outgrowth- promoting activity of staurosporine and dibutyryl cyclic AMP in PC12D cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145, 177-813.
- Naidu, M., C. Y. Kuan, W. L. Lo, M. Raza, A. Tolkovsky, N. K. Mak, R. N. Wong, and R. Keynes. 2007. Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 148, 915-924.
- Park, S. C., S. E. Kim, D. M. Oh, K. M. Shim, M. J. Jeong, S. C. Lim, S. Y. Nah, S.H. Park, S. S. Kang, C. J. Moon, J. C. Kim, S. H. Kim, and C. S. Bae. 2009. Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. *Arch Pharm Res.* 32, 347-352.
- Racke, M. M., P. J. Mason, M. P. Johnson, R. G. Brankamp, and M. D. Linnik. 1996. Demonstration of a second pharmacologically active promoter region in the NGF gene that induces transcription at exon 3. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41, 192-199.
- 21. Salim, K. N., B. S. McEwen, and H. M. Chao. 1997.

- Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **47**, 177-182.
- 22. Selby, M. J., R. Edwards, F. Sharp, and W. J. Rutter. 1987. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol. Cell Biol.* **7**, 3057-3064.
- Seong, J. D., K. D. Park, Y. H. Kwack, S. M. Kim, and J. H. Kang. 2000. Effects of nitrogen levels and split application ratio on growth and yield in *Liriope platyphylla* WANG et TANG. *Korean J. Med. Crop. Sci.* 8, 69-73.
- 24. Tsui-Pierchala, B. A. and D. D. Ginty. 1999. Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **19**, 8207-8218.
- 25. Ullrich, A., A. Gray, C. Berman, and T. J. Dull. 1983. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* **303**, 821-825.
- 26. Won, J. Y. and C. Y. Lee. 2002. Characteristics of photosynthesis and dry matter production of *Liriope platyphylla* WANG et TANG. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **10**, 82-87.

초록: 맥문동(*Liriope platyphylla*)의 새로운 부탄올 추출물인 LP-M이 Akt/ERK NGF receptor signaling pathway를 통해 뇌조직에서 신경세포의 생존과 성장에 미치는 영향에 관한 연구

남소희 $^{1^{\dagger}}$ ·최선일 $^{1^{\dagger}}$ ·구준서 1 ·김지은 1 ·이연경 1 ·황인식 1 ·이혜련 1 ·이영주 1 ·이영주 2 ·최영환 3 ·황대연 1 * (부산대학교 생명자원과학대학 1 바이오소재과학과, 2 동물생명자원과학과, 3 원예생명과학과)

맥문동(Liriope platyphylla)은 동양의학에서 오래 동안 항염증제, 당뇨 혹은 비만 치료제, 그리고 신경세포활성화 약제로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 맥문동으로부터 NGF의 발현을 촉진하는 새로운 물질을 개발하고 이들의 작용기전을 밝히기 위하여 맥문동으로부터 13가지의 새로운 추출물을 확보하고 이들의 기능을 세포주와 마우스 실험을 통해 분석하였다. 그 결과, 상대적으로 세포독성이 낮고 NGF의 분비량이 많은 LP-E, LP-M, LP-M50, LP2E17PJ 등 4가지 추출물을 확보하였다. 또한 이들 중에서 LP2E17PJ를 제외한 3가지 추출물에 의해 분비된 NGF는 PC12세포의 neuritic outgrowth를 촉진하였다. 더불어 추출방법과 추출량의 측면에서 효과적인 LP-M을 C57BL/6 마우스에 2주간 투여하여 뇌조직에서 NGF mRNA의 발현을 확인하였다. LP-M은 오직 피질에서만 두종류의 receptor 중에서 low affinity receptor를 통한 억제신호를 전달하였으며, 해마에서는 유의적인 변화를 유도하지 못했다. 그러나 high affinity receptor를 통한 신호전달은 해마에서만 활성화 신호를 전달하였고 피질에서는 변화를 유도하지 못했다. 이러한 결과는 맥문동 추출물인 LP-M은 마우스 대뇌의 해마에서 high affinity receptor를 통한 신호전달을 통해 neuritic outgrowth를 촉진함을 확인하였다.