

구척으로부터 신경재생 효능 성분 분리

김상태[#] · 한용남^{*} · 손연경^{*} · 장형석^{**} · 김수장^{**} · 신준식^{**}
[#]지젠생명공학연구소, ^{*}서울대학교 천연물과학연구소, ^{**}자생한방병원
(Received September 23, 2002; Revised October 23, 2002)

Isolation of the Efficacy Constituent for Neuronal Regeneration from *Cibotium barometz*

San-Tae Kim[#], Yong Nam Han^{*}, Yeon Kyoung Son^{*}, Hyong Seok Jang^{**},
Su Jang Kim^{**} and Jun Shik Shin^{**}

[#]JY-Gene JuAm of Research Institute Bioscience & Biotechnology, Seoul 135-816 Korea

^{*}Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

^{**}Jaseng Hospital of Oriental Medicine, Seoul 135-896, Korea

Abstract — A phytochemical study on the root of *Cibotium barometz* J. Smith led to the isolation of onitin (I), daucosterol (II) and a new compound (III). Compound III was characterized as 2-O-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-O-[α-D-galactopyranosyl-(1"6)-O-β-D-galactopyranosyl] glycerol, named shinbarometin by ¹H-, ¹³C-NMR and LC/MS data. Compound III exerted an induced neuronal regeneration on nogo-A induced neuroblastoma cells.

Keywords □ *Cibotium barometz* (L.) J. Smith, monoacylglyceryl, dl-galactoside, shinbarometin, neuronal regeneration

구척은 금모구척이라고도 부르며 고비(*Cibotium barometz* (L.) J. Smith, 구척과 Dicksoniaceae)의 뿌리줄기로서 약재의 모양이 개의 척추뼈와 비슷하고 황금색의 털이 달려 있다고 하여 이름 붙여진 것으로 뼈관절 질환에 효과가 크다.¹⁾ 4~5 월경에 고비의 어린 잎을 채취하여 삶아 말려 나물로 먹고 지하경을 편충 구충제로도 사용하였으며 지하경 추출한 녹말을 풀로 사용한다. 민간에서는 임질, 각기, 수종, 풍한, 마비증, 허리와 등의 동통에 쓴다. 민간에서는 구척을 허리와 무릎이 저리고 아프며, 다리에 힘이 없고 오줌을 참지 못하는데 달여서 마신다. 또 구척은 속을 편하게 하고 대소장을 청결하게 하며 또한 이뇨(利尿), 부종(浮腫)등을 다스린다. 구척의 성분으로는 triterpene 성분인 woodwardinic acid, 아스파라긴산, 글루타민산, 탄닌 등과²⁾ onitin, onitin 4-O-β-D-glucopyranoside, pterosin R(4-deoxy,4-chloro-onitin)³⁾ 이 알려져 있으며 onitin은 평활근 이완작용이 있는 것으로 밝혀져 있다.⁴⁾ 한편 신경이 지금까지는 재생이 불가능하다고 보고되었으나 90년대 이후부터 신경은 nogo-A,⁵⁻⁸⁾ MAG,⁹⁻¹²⁾

chondroitin sulfate, polyglycan¹³⁾ 등에 의해 신경돌기의 신장이 차단된다고 보고된 이래로 많은 연구가 진행되고 있으나 아직 치료제로써 두각을 나타내고 있는 약물은 없다. 그래서 본 연구자는 구척에 관심을 가지고 골질환에 관련성분을 분리하던 중에 구척에서 신경회복에 관여하는 아직 보고된 바 없는 새로운 monoacylglycerol계 성분인 shinbarometin을 분리하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

구척은 2000년 3월 경동시장에서 국산을 구입하여 식물학적 감정을 거친 후 (한대석, 한약재 시험검사소) 이를 분말로 만들어 사용하였다.

기기 및 시약

¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectra는 Varian Gemini 2000의 300 MHz 및 75 MHz spectrometer로, MS spectra는 Hewlett Packard HP 5985B mass spectrometer로 IR spectra는 JASCO FT/IR-5300 spectrometer로 측정하였다. 추출 및 칼럼크로마토

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3444-8799 (팩스) 02-3444-8147
(E-mail) hskst@empal.com

그래피용 용매는 1급을 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. 칼럼크로마토그래피용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art.7734 and 9385, Merck)를 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 충전제는 Sephadex LH-20(Amersham Pharmacia, piscataway, NJ, USA)를 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ plate (Art 5554, Merck)를 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin(Gibco BRL), ethanol (Merck, Germany) 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator(VS-9108 MS, Visica Scientific Co.), light microscope(Olympus), immunofluorescence microscope (Olympus)등을 사용하였다.

추출 및 분리

구적 분말 2 kg을 70% 에탄올 8 L씩 4회 끓는 수조에서 6시간 끓탕한 후 가제로 여과하고 여과액을 감압농축하여 에탄올엑스 14 g을 얻었다. 이 엑스를 물 1 L에 현탁시키고 hexane (1 L×3회), 1-butanol (1 L×3회)로 차례로 추출하였다. hexane 층, butanol 층 및 수층을 각각 농축하여 hexane 엑스 (CBE) 52 g, butanol 엑스 (CBB) 93 g, 수층 엑스 (CBW) 263 g을 얻었다. 분리된 CBB분획 90 g을 80% 메탄올 300 ml에 녹이고, 이 용액을 3등분하여 3회에 걸쳐 Sephadex LH-20 칼럼 (6×90 cm, 80% 메탄올로 평형화)에서 크로마토그래피를 실시하였다. 첫 번째 분획 (CBB-10)은 백탁액으로 용출되는 것을 모은 것이며, 두 번째 분획 (CBB-20)은 설탕이 주로 용출되는 분획을 모은 것이다. 세 번째 분획 (CBB-30)은 칼럼을 60% acetone으로 세척하여 모은 것이다. 각 소분획의 수율은 CBB-10, 2.1 g; CBB-20, 58 g; CBB-30; 23 g을 분획하였다. 구적의 소분획 CBB-10 (2 g)을 실리카겔 칼럼에서 클로로포름/메탄올(CM으로 약칭) 20:1 용매를 출발로 하여 CM 10:1→5:1→3:1→2:1 용매를 차례로 용출시켰다. CM 10:1 용출액에서 화합물 compound I (onitin) 25 mg (메탄올에서 무정형분말)을, CM 5:1 용출액에서 compound II (aucosterol) 95 mg (메탄올에서 무색 침상결정)을 얻었다. CM 2:1 용출액을 모아 Sephadex LH 20 (용매는 메탄올)에서 정제하여 compound III (shinbarometin, 신규) 420 mg(클로로포름/메탄올 용매에서 무정형)을 얻었다.

Compound I - mp. 212°C, ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.19(6H, s, 11-H₃), 2.34(3H, s, 12-H₃), 2.59(3H, s, 15-H₂), 2.83(2H, s, 3-H₂), 3.00(2H, m, 13-H₂), 3.61(2H, m, 14-H₂).

Compound II - mp. 295°C, IRV_{max}^{KBr} (cm⁻¹) : 3409, 2934, 1464, 1379, 1165, 1074, 1024, 801.

Compound III - mp. 143°C, [α]_D²² : +0.642(c, 1.25 in MeOH), IRV_{max}^{KBr} (cm⁻¹) : 3400, 3010, 1735, 1721, 1650, 1638, 1144, 1074, 669, LC/MS m/z : 677.5[(M-1)⁻], EI/MS m/z(%)

: 354(C₂₁H₃₈O₄⁺, 3.5) (glycerol linolate), 299([354-C₄H₇]⁺, 8.3), 262(C₁₇H₃₀CO⁺, 18.5), 163(C₁₂H₁₉⁺, 5.6), 149(C₁₁H₁₇⁺, 7.4), 134(C₁₀H₁₆⁺, 29.6), 123(C₉H₁₅⁺, 7.4), 109(C₈H₁₃⁺, 18.5), 95(C₇H₁₁⁺, 37.0), 81(C₆H₉⁺, 54.6), 67(C₅H₇⁺, 57.4), 55 (C₄H₇⁺, 74.1), ¹H-NMR (CD₃OD), ¹³C-NMR (CD₃OD) : Table I참조

Acetylation of compound III

Compound III 분말 40 mg을 pyridine 0.5 ml에 녹이고 무수 초산 1 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 하룻밤 방치하여 상법에 따라 아세틸화하였다. 반응액을 감압농축한 다음 실리카겔에서 CHCl₃ : ethyl acetate (3:1) 혼합 용매로 칼럼크로마토그래피를 실시하여 compound III acetate 45 mg (무정형)을 얻었다.

Compound III acetate - mp 165°C, IRV_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 2930, 2857, 1752, 1638, 1373, 1229, 1138, 1067, 910, 602. ¹H-NMR (CDCl₃), ¹³C-NMR (CDCl₃): Table I참조

Acid hydrolysis of compound III

Compound III 분말 5 mg에 1N HCl-50% 에탄올용액 1 ml를 가하여 녹이고 잘 밀봉한 다음 100°C에서 2시간 가열한 후 식히고 감압건조시킨 후 잔사를 100 μl의 증류수에 녹인 다음, silica gel TLC plate에 점적하고 CHCl₃ : methanol : H₂O (15 : 10 : 2.5) 혼합용매로 전개시킨 후 묽은 황산용액 (10%)을 뿌린 다음 105°C에서 가열하였을 때 galactose와 일치하는 spot을 얻었다. (Rf, 0.35)

Alkaline hydrolysis of compound III

Compound III 분말 10 mg을 1N NaOH -50% 에탄올 용액 1 ml를 가하여 녹이고 잘 밀봉한 다음 100°C에서 2시간 가열한 후 식히고 반응액에 1N HCl을 가하여 pH 3으로 조절한 다음 CHCl₃ 3 ml를 가하여 pH 3으로 조절한 다음 CHCl₃ 3 ml를 가하여 추출하였다. CHCl₃ 층을 감압농축시켜 oil상의 물질을 얻었다. 이 물질은 CHCl₃ : methanol (20:1) 혼합용매로 silica gel TLC plate에서 크로마토그래피를 실시한 후 묽은 황산용액을 뿌린 다음 105°C에서 가열하였을 때 Rf 0.55에서 단일 spot를 나타내었다.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.82 (3H, t, J=6.9 Hz, 18-CH₃), 1.57 (2H, m, 3-CH₂), 1.98 (4H, m, 8-, 14-CH₂), 2.28 (2H, t, J=7.5 Hz, 2-CH₂), 2.71(2H, t, J=5.7 Hz, 11-CH₂), 5.28 (4H, m, 9, 10, 12, 13=CH-CH₂)

Nogo-A과발현 세포주로부터 DNA fragmentation

nogo-A과발현 SK-N-SH cell lines를 10³ 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 신바로메틴(YG) 5, 25, 50 μg/ml 농도별로 처리하여 DNA fragmentation를 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5,

1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l 첨가한 후 30 min 간 얼음에 유지한 다음 proteinase K (100 μ g/ml)를 첨가하고 50°C에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합 후 상기와 같이 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취해 100% ethanol로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase (50 μ g/ml)가 함유한 dH₂O 35 μ l 첨가하여 녹인 후 이 용액을 1.5% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

BDNF와 GDNF mRNA를 확인을 위한 RT-PCR

Nogo-A를 세포이입시킨 (transfection) 세포주에 처리하여 신경세포의 신호전달계에서 신경 수초의 neurite outgrowth에 미치는 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)와 GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) 발현을 조사하기 위해 상기 세포주를 6-well에 10⁴ 세포수가 되게 분주한 다음 24시간 배양하고 NGF (neuron growth factor)를 50 ng/ml이 되게 5시간 동안 자극을 가한 후 약물농도가 5, 25 50 μ g/ml이 되도록 가한 후 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 policeman으로 모아서 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNazol 용액을 200 μ l 첨가한 다음 chloroform 50 μ l를 가하고 조심스럽게 pipetting하여 세포를 lysis하고 이를 15,000 rpm에서 4°C하에 15분간 원심분리하여 total RNA를 회수한 다음 isopropanol 동량을 넣고 4°C에서 15분간 침전시켜 75% EtOH로 한번 세척하여 건조시킨 다음 RNase free dH₂O를 20 μ l을 넣고 60°C에서 30분간 가하여 녹인 다음 total RNA 5 μ l에 10 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 6 μ l, 10x RNA PCR buffer 5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, AMV-Optimized Taq 1 μ l, AMV reverse Transcriptase XL 1 μ l, 50 pM specific primer (sense/antisense) 1 μ l, RNase free dH₂O 26 μ l을 첨가하여 42°C에서 30분간 역전사 반응을 실시하고, 94°C에서 2분간 반응을 정지시켜서 DNA합성반응(polymerase chain reaction: PCR)를 실시하였는데 반응조건은 92°C 1 min, 52°C 45 sec, 71°C 60 sec에서 35 cycles를 진행시켜 71°C에서 최종적으로 5분간 elongation 반응을 실시하여 종결한 후 이 PCR 산물을 1% agarose gel에 elute시켜 band유무를 확인하였다.

Nogo-A에 의해 neurite outgrowth 길이에 미치는 영향

nogo-A 과발현 SK-Y-SH (neuroblastoma)세포주를 poly-L-lysine coated glass된 6-well에 10³세포수를 분주하고 24시간동안 배양하고 NGF를 50 ng/ml이 되게 5시간동안 자극을 가한 후 무혈청 내지 상기 약물 농도가 50 μ g/ml이 되도록 가한 후 neurite outgrowth length를 현미경 하에서 사진을 촬영하면서 조사하였다. 무혈청배지에 NGF 및 약물을 1시간동안 처리한 부

착된 총 세포수에서 관찰한 다음 사진 촬영하여 통계처리하여 조사하였다.

실험결과 및 고찰

구척으로부터 유효성분의 분리 및 화학구조 결정

구척의 70% 에탄올 추출 엑스로부터 신경재생 작용이 있는 분획인 CBB-10으로부터 3종의 화합물을 분리 정제하였다. Compound I은 ¹H-NMR data가 이미 Pteridaceae 속 식물에서 분리된 onitin의 것³⁾과 동일하였다. Compound II는 authentic 화합물인 daucosterol과 TLC 및 IR spectrum에 있어서 완전히 overlap 됨을 확인하였다.

Compound III는 무정형의 분말 (mp 143°C)로 얻어졌으며 IR spectrum에서 알콜성 OH (3400 cm⁻¹), olefine (CH=CH, cis-form, 3010, 1650, 1638, 669 cm⁻¹)과 ester (1735, 1721 cm⁻¹)의 존재를 확인하였다. Compound III를 산가수분해 하였을 때 galactose를, 알칼리 가수분해하였을 때 2개의 olefine을 가진 지방산을 확인하였다. Anomeric proton 2개가 존재한다는 사실을 ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra (Table I)에서 δ 4.24 (d, *J*=6.9 Hz), 105.21 및 4.86 (d, *J*=3.6 Hz), 100.44의 signal로부터 알 수 있었고, 한 개의 galactose는 β 결합, 다른 한 개의 galactose는 α 결합을 하고 있음을 알 수 있었다. ¹H-¹H COSY와 HETCOR 분석 결과에 의하여 ¹³C-NMR에서 나타난 δ 100.44, 70.16, 71.40, 70.96, 72.44, 62.67에서의 signal 들은 terminal sugar 가 α -galactopyranose 입을, δ 105.21, 72.50, 74.48, 74.59, 69.60, 66.54 signal 들은 β -galactopyranose의 6번 위치에 glycosylation 되어 있음을 알 수 있었다. Oxygenated carbons에 연결된 ABMX H-H coupling system이 ¹H-NMR spectrum (1-CH₂, 3.79, 3.66; 2-CH, 5.03; 3-CH₂, 3.92, 3.71)과 ¹³C-NMR spectrum (1-CH₂, 72.06, 2-CH, 70.04; 3-CH₂, 67.71)에서 관찰되므로 이 데이터는 glycerol moiety가 존재함을 나타낸다. 한 개의 acyl group에 기인하는 한 개의 carbonyl carbon signal이 δ 173.53에서 나타나며 두 쌍의 double bond signal이 δ 130.90, 130.83, 129.05, 129.00에서 나타나고, 또한 ¹H-NMR spectrum에서 δ 2.77 (t, *J*=5.7 Hz) 및 2.35 (t, *J*=7.5 Hz)의 signal 들은 각각 double bond 와 double bond 사이에 있는 methylene 수소 (11"-CH₂) 및 carbonyl 관능기 옆의 methylene 수소(2"-CH₂) signal의 chemical shift 값과 잘 일치하였다. 이 불포화 지방산 moiety에 있는 double bond의 geometry는 ¹³C-NMR data에서 double bond 옆 methylene 탄소(8", 14")가 δ 28.12에서 관찰되므로 cis라고 할 수 있다. 왜냐하면 일반적으로 double bond가 cis 입체구조일 때 double bond 옆 methylene 탄소가 δ 27~28에서 나타나고, trans 입체구조일 때의 것은 δ 32~33에서 나타나는 것으로 알려져 있기 때문이다.¹⁴⁾ 이러한 결과로부터 불포화 지

Table I - ¹H- and ¹³C-NMR data of compound and its acetate

	Compound (CD ₃ OD)		Compound III Acetate (CDCl ₃)	
	¹ H(m, in Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H(m, in Hz)	δ ¹³ C
1a	3.79 ^a (m)	72.06	4.28(dd, 3.3, 12.0)	62.17
1t	3.66 ^a (m)	72.06	4.12(dd, 6.0, 12.0)	62.17
2	5.03(m)	70.04	5.15(m)	70.83 ^b
3a	3.92 ^a (m)	67.71	3.95(dd, 5.0, 10.8)	67.38
3t	3.71 ^a (m)	67.71	3.64(dd, 5.7, 10.8)	67.38
1'	4.24(d, 6.9)	105.21	4.47(d, 7.8)	101.52
2'	3.53(dd, 6.9, 9.6)	72.50	5.16(dd, 7.8, 10.5)	68.57 ^b
3'	3.49(dd, 3.3, 10)	74.48	4.98(dd, 3.3, 10.5)	66.54 ^b
4'	3.74 ^a (m)	74.59	5.39(dd, 0.6, 3.3)	67.33 ^b
5'	3.98(m)	69.60	3.83(ddd, 0.6, 5.7, 7.4)	71.55 ^b
6a	4.16(dd, 5.7, 12.0)	66.54	3.75(dd, 5.7, 10.2)	65.51
6t	4.10(dd, 7.8, 12.0)	66.54	3.42(dd, 7.4, 10.2)	65.51
1''	4.86(d, 3.6)	100.44	4.93(d, 3.6)	96.63
2''	3.78(dd, 3.6, 10.2)	70.16	5.09(dd, 3.6, 11.1)	67.12 ^b
3''	3.73 ^a (m)	71.40	5.27(dd, 3.3, 11.1)	67.86 ^b
4''	3.89 ^a (m)	70.96	5.43(dd, 0.9, 3.3)	67.54 ^b
5''	3.85 ^a (m)	72.44	4.19(ddd, 0.9, 5.7, 7.0)	69.86 ^b
6a''	3.72 ^a (m)	62.67	4.10(dd, 5.7, 11.0)	61.52
6t''	3.69 ^a (m)	62.67	4.06(dd, 7.0, 11.0)	61.52
1'''		173.53		173.29
2'''	2.35(t, 7.5)	34.90	2.28(t, 7.8)	33.99
3'''	1.61(m)	25.95	1.58(m)	24.80
4'''-7'''	1.37-1.28(m)	33.02, 30.71(2) 30.41(2), 30.18, 23.68	1.29-1.2(m)	29.20, 29.40, 29.01, 29.54(2) 31.84, 22.61
15'''-17'''				
8'''-14'''	2.06(m)	28.12	2.06(m)	27.12(2)
9'''-13'''	5.34(m)	130.90, 130.83 129.05, 129.00	5.32(m)	130.14, 129.93 127.99, 127.82
12'''-13'''				
11'''	2.77(t, 5.7)	26.51	2.74(t, 5.7)	25.55
13'''	0.90(t, 6.9)	14.44	0.85(t, 6.9)	14.04
CH ₃ CO			2.110(s), 2.107(s), 2.061(s) 2.046(s), 2.044(s), 2.034(s) 1.950(s), 1.946(s)	20.80, 20.60(3) 20.54(3) 20.48
CF ₃ CO				170.54, 170.32, 170.09, 169.97(3) 169.87, 169.35

^aAssignments were established HETCOR.

^bOverlapping signals.

방신기는 9Z,12Z-octadecadienoyl (linoleyl)임을 추정할 수 있었고, 그 결합위치는 glycerol moiety의 2번 CH-O에 ester 결합하고 있음을, 2번 methine 수소의 chemical shift 값이 85.03인 것으로 보아 확정할 수 있었다. 따라서 compound III와 구조가 유사한 천남성(Arisaema amurense)으로부터 분리한 compound 5 (1,2-C-diacyl-3-O-[α-D-galactopyranosyl-(1''-6'')-O-β-D-galactopyranosyl]glycerol)¹⁵⁾와 compound 11 (3-O-[α-D-galactopyranosyl-(1''-6'')-O-β-D-galactopyranosyl] glycerol)¹⁵⁾의 경우 glycerol moiety의 2번 methine 수소의 chemical shift 값이 compound 5에 있어서는 85.25에서, compound 11에 있어서는 83.78에서 나

타나기 때문이다. 한편 compound III에 있어서 sugar moiety의 결합위치는 compound 5와 compound 11의 것과 동일하게 glycerol moiety의 3번 methylene 임을 알 수 있었다. 이것은 glycerol moiety의 3번 methylene의 ¹H-NMR spectra에서의 chemical shift 값이 compound III의 경우 83.92, 3.71이며, compound 5에서는 δ 3.93, 3.73이고 compound 11의 경우 83.91, 83.70으로써 서로 매우 유사하기 때문이다. Compound III의 LC/MS data에서 [M-1]의 값이 677.5이므로 분자식은 C₃₃H₅₈O₁₄이며 Fig. 1에 제시한 구조식의 분자량과 잘 일치하였다.

Compound III의 구조를 더욱 명확히 하기 위하여 acetate를 제

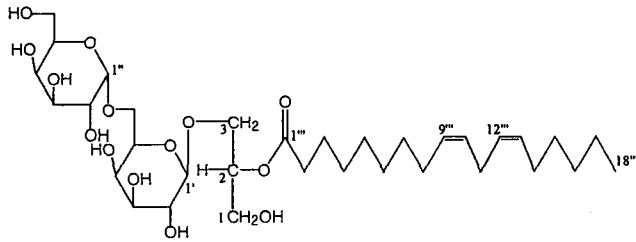


Fig. 1 - The structure of compound III from *Cibotium barometz*.

조하여 NMR data를 Table I에 나타내었다. Compound III acetate는 8개의 acetyl기를 가지고 있으며, compound III에서 H-H coupling constant를 명확히 제시할 수 없었던 1분자의 glycerol 및 2분자의 galactose moiety들의 H-H coupling을 제시할 수 있었다(Table I) 이러한 결과로부터 compound III의 구조는 2-O-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-O-[α -galactopyranosyl-(1'' \rightarrow 6')-O- β -D-galactopyranosyl]glycerol임을 명확히 규명할 수 있었다.

전남성에서 분리하여 보고한 diacylglycerylgalactoside 들은 galactose가 1 분자이거나 2 분자이며 glycerol의 3번 탄소에 glycoside 결합을 하고, acyl기 2 종류는 glycerol 1번 탄소에 포화지방산 에스테르가, 2번 탄소에 불포화지방산 에스테르가 결합되어 있다.¹⁵⁾ 그러나 compound III은 glycerol 3번 탄소에 galactose 2분자가 glycoside 결합을 하고 glycerol 2번 탄소에 불포화지방산 에스테르가 결합되어 있으나 glycerol 1번 탄소에는 어떤 지방산도 결합되어 있지 않은 monoacylglyceroldigalactoside로서 현재까지 자연에서 분리된 바 없는 신물질이므로 shinbarometin이라 명명하였다.

Nogo-A과발현 세포주로부터 DNA fragmentation에 미치는 영향

Shinbarometin(YG)이 nogo-A 과발현 세포주인 SK-N-SH cell의 신경돌기 신장에 미치는 세포사에 미치는 영향을 알아보기 위해 shinbarometin 5, 25, 50 μ g/ml을 처리하고 세포를 12시간동안 배양한 후 세포사의 억제정도를 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, shinbarometin에 의한 세포사는 5 μ g/ml 이하의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 약간 DNA fragmentation의 ladder가 감소하는 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 25 μ g/ml 이상 농도부터는 서서히 세포사의 유도가 억제되어 50 μ g/ml 이상의 농도에서는 대조군에 비교하여 85%이내의 세포사의 억제효과를 보임에 따라 shinbarometin이 신경상해에서 유발되는 신경돌기의 신장이 억제되는 것을 지연하거나 신경세포 생존을 유도하는 경향을 보여주었다.

Nogo-A에 의해 neurite outgrowth 길이에 미치는 영향

nogo-A가 유도된 neuroblastoma cell에서의 세포사멸에 신경돌기의 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 nogo-A 과발현 SK-N-SH cell에 shinbarometin 5, 25 및 50 μ g/ml의 농도에서 12 시간 처리하고

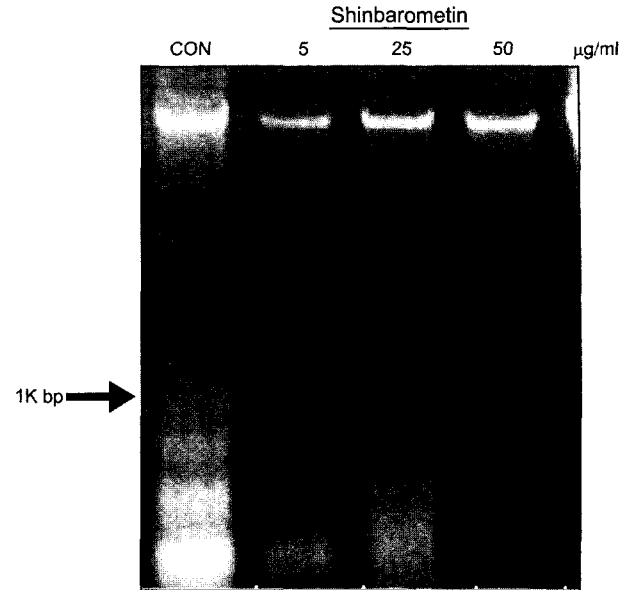


Fig. 2 - Analysis of DNA ladders from nogo-neuroblastoma cultures treated with or without shinbarometin (YG). Genomic DNA was isolated from untreated (CON) and 5, 25 and 50 μ g/ml YG with nogo-induced neuroblastoma cell lines (12-h drug exposure). DNA was subjected to agarose gel electrophoresis (2% agarose/1xTAE buffer), stained with ethidium bromide for 30 min, and visualized on short-wave UV light box. M, marker DNA, 1-kb ladder (Life Technologies, Inc.).

SK-N-SH cell에 shinbarometin 50 μ g/ml의 농도에서 12 시간 처리하고 그후에 형태학적인 변화를 phase-light microscopy와 신경돌기의 신장에 관여하는 neurofilament를 확인하기 위해 rhodamine-phalloidin으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 신경돌기의 신장을 저해하여 신경마비를 유도하는 nogo-A는 합성된 IN-1항체에 의해 신경재생이 작용하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁶⁾ 그러므로 본 연구는 Fig. 3에서처럼 shinbarometin 50 μ g/ml 농도에서는 대조군과 비교하여 세포모양과 수에 큰 변화를 관찰할 수 있었고 신경세포사의 수도 감소하는 경향과 신경세포의 신경돌기가 신장되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 신경돌기의 F-actin의 분포를 확인하기 위해 rhodamine-phalloidin으로 형광염색시 shinbarometin으로 처리한 군은 신경돌기의 신장이 촉진됨을 알 수 있었는데 Fig. 4에서처럼 대조군에 비해 신경돌기의 신장이 40~80%정도의 증가됨을 알 수 있었는데 이러한 결과 shinbarometin이 신경상해로부터 신경재생에 관여하는 기능을 가지고 있음이 예측되어진다.

RT-PCR로 nogo-A의 유도에 의한 BDNF 와 GDNF mRNA 발현에 미치는 영향

nogo-A가 유도된 neuroblastoma cell에서 신경돌기의 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 nogo-A 과발현 SK-N-SH cell에 shinbarometin 5, 25 및 50 μ g/ml의 농도에서 12 시간 처리하고

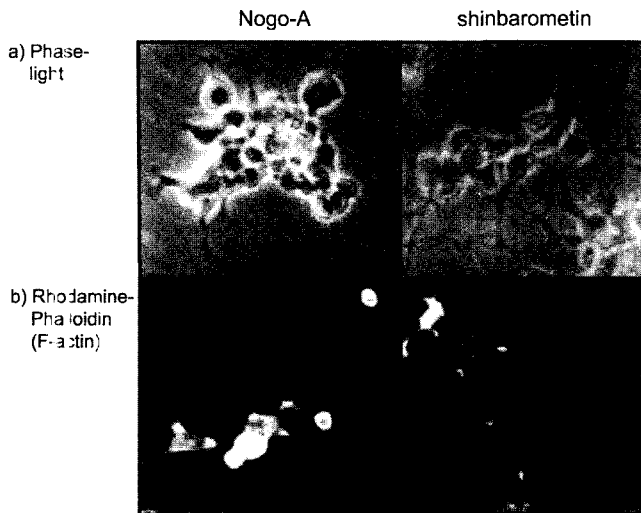


Fig. 3 – Nogo inhibits neurite outgrowth. Nogo has effect on inhibition of neurite outgrowth in cell morphology, in the presence (Upper; right) or absence (Upper; left) of shinbarometin (YG) treatment. (a) The morphology and proliferation of SK-N-SH cells after exposure to YG (50 µg/ml) was changed compared with control, untreated cultures. Treatment with YG (50 µg/ml) for 12 hrs caused cells to round (right) and was associated with a decrease in proliferation (left), as measured by phase-light microscopy. (b) Nogo-induced neuroblastoma cells not treated with YG (Bottom; left) or YG-treated SK-N-SH cells (Bottom; right) were cultured for 12 hrs in the presence of the indicated YG: no treated YG (left); Neurite outgrowth was visualized by staining with rhodamine-phalloidin. Scale bar, 200 µm.

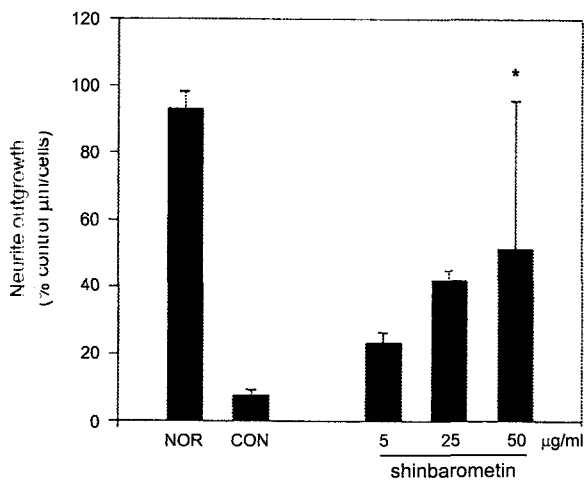


Fig. 4 – YG regenerated inhibition of neurite outgrowth by nogo-A. Nogo-induced SK-N-SH cells were cultured for 12 hours in the absence/presence of the indicated YG: no nogo-induced normal cells (NOR); Nogo-induced cells (CON); and 50 µg/ml YG. Neurite outgrowth was visualized by staining with rhodamine-phalloidin. Scale bar, 200 µm. Results from neurite outgrowth assays are quantitated. All results are the means S.E.M. Those values significantly different from control are indicated (asterisk, $P < 0.05$, Student's two-tailed t test).

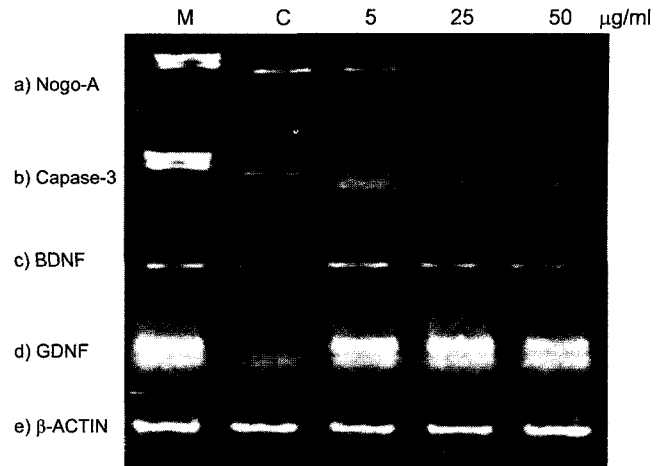


Fig. 5 – RT-PCR analysis of RNA amplified from nogo-induced neuroblastoma cells. Total RNA was isolated from SK-N-SH cells using the RNeasy kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. One µg of RNA was amplified as described in Method and "Materials and Methods". The amplified nogo-A, caspase-3, BDNF, GDNF, β-actin cDNA products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

total RNA를 분리하여 전사수준에서 nogo-A, caspase-3, BDNF, GDNF의 발현을 RT-PCR로 조사한 결과 신경돌기의 재생에 BDNF와 GDNF의 발현이 관여한다는 보고처럼¹⁶⁻¹⁷⁾ Fig. 5에서 처럼 nogo-A와 세포사에 관여하는 효소인 caspase-3의 발현은 shinbarometin의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 신경세포의 신경돌기의 신장에 관여하는 BDNF와 GDNF의 발현은 shinbarometin의 농도가 증가함에 따라 발현 양이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 shinbarometin은 신경세포의 상해로부터 신경돌기의 신장에 신경보호 내지 재생효과에 관여하고 있다는 사실을 알 수 있다.

결 론

구척(*Cibotium barometz*)에서 shinbarometin이 신경세포의 상해로부터 신경신장에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, nogo 과발현 neuroblastoma cell (SK-N-SH)세포에 여러 농도의 shinbarometin을 처리한 후 세포사의 DNA fragmentation, neurite outgrowth 그리고 RT-PCR를 수행하여 관찰하였는데 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 구척에서 골절환에 우수한 분획 CBB-10로부터 3종류의 화합물인 Compound I(onitin), Compound II(dausterol), Compound III(shinbarometin)을 분리하였고 화학구조를 규명한 결과 compound III는 신물질이었다.
2. DNA fragmentation에서는 shinbarometin을 nogo과발현 세포주 SK-N-SH에 5, 25, 50 µg/ml 농도로 처리시 농도 의존적으

로 DNA ladder가 감소하였는데 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 가장 우수하였다.

3. Neurite outgrowth의 신장에서 shinbarometin을 nogo과발현 세포주 SK-N-SH에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 처리시 대조군에 비해 세포사의 형태가 차이를 보였고 세포사의 수가 감소하고 신경돌기의 수가 증가하는 경향을 보이며 약 40~80%의 증가를 보였다.

4. Nogo의 과발현으로 neuroblastoma 세포에서 세포사에 세포사에 관여하는 nogo-A, caspase-3 및 신경돌기의 신장에 관여하는 유전자 GDNF, BDNF를 RT-PCR로 확인한 결과 shinbarometin을 농도별로 처리시 nogo-A와 caspase-3의 발현은 농도 의존적으로 감소하였고 신경돌기의 신장에 미치는 유전자인 GDNF와 BDNF의 전사물은 발현량이 증가하였다.

결론적으로 Shinbarometin 처리시 nogo-A에 의한 신경세포의 상해로부터 유의할 만한 변화를 유도하는데 이는 본 약물이 신경세포의 신경돌기의 회복 및 재생을 유도하므로 신경재생의 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) "Directory of Chinese Materia Medica" (Zhong Yao Da Ci Dian or 中藥大辭典) ed. by Jiansu New Medical College, Shanghai Scientific and Technological Publisher, Shanghai, p.1420 (1977).
- 2) Namba, T. The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures(I), Hoikusha Pub. Co., Osaka, 86 (1993).
- 3) Murakami, T., Satake, T., Ninomiya K., Iida, H., Yamauchi, K., Tanaka, N., Saiki, Y., and Chen, CM. : Pterisin-derivate aus der Famile Pteridaceae. *Phytochemistry* **19**, 1743 (1980).
- 4) Yang, M. S. : Studies on the Taiwan folk medicine VI. Studies on onitin. *Planta Medica* p 25 (1986).
- 5) Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F., and Schwab, M. E. : Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**, 434 (2000)
- 6) GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S. M. : Identification of the nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* **403**, 439 (2000).
- 7) Prinjha, R., Moore, S. E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L., and Walsh, F. S. : Neurobiology, Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* **403**, 383 (2000).
- 8) Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. : Perspectives neurobiology. regeneration in the nogo zone. *Science* **287**, 813 (2000).
- 9) Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., He, Z., and Filbin, M. : Myelin-associated glycoprotein interacts with the nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* **35**, 283 (2002).
- 10) Wickelgren, D. : Neuroscience. Animal studies raise hopes for spinal cord repair. *Science* **297**, 178 (2002).
- 11) Liu, B. P., Fournier, A., GrandPre, T., and Strittmatter, S. M. : Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the nogo-66 receptor. *Science*. **297**, 1190 (2002).
- 12) Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L., and He, Z. : Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**, 941 (2002).
- 13) Zuo, J., Neubauer, D., Graham, J., Krekoski, C. A., Ferguson, T. A., and Muir, D. : Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp. Neuron* **176**, 221 (2002).
- 14) Stothers, J. B. : carbon-¹³NMR Spectroscopy. Academic Press, New York (1972).
- 15) Jung, J. H., Lee H. K., and Kang, S. S. : Diacylglycerylgalactosides from *Arisaema amurense*. *Phytochemistry* **42**, 447 (1996).
- 16) Janiga T. A., Rind H. B., von Bartheld C. S. : Differential effects of the trophic factors BDNF, NT-4, GDNF, and IGF-I on the isthmo-optic nucleus in chick embryos. *J. Neurobiol Jun* **5**; 43(3), 289-303 (2000)
- 17) Mey J., Rombach N. : Retinoic acid increases BDNF-dependent regeneration of chick retinal ganglion cells *in vitro*. *Neuroreport Nov* **26**; 10(17), 3573 (1999)