

## 맥문동 유수추출물이 NGF의 mRNA 발현과 단백질 분비에 미치는 영향

최선일\* · 박지희\*\* · 허윤경\* · 이연경\* · 김지은\* · 남소희\* · 구준서\* · 장민주\*\*  
이희섭\*\*\*\*\* · 손흥주\*\*\* · 이충열\*\*\* · 황대연\*\*\*†

\*부산대학교 생명자원과학대학, \*\*부산대학교 밀양생물자원웰빙제품RIS사업단, \*\*\*부산대학교 생활환경대학

## Effects of Water Extract of *Liriope platyphylla* on the mRNA Expression and Protein Secretion of Nerve Growth Factors

Sun Il Choi\*, Jee Hee Park\*\*, Youn Kyng Her\*, Yoen Kyung Lee\*, Ji Eun Kim\*, So Hee Nam\*, Jun Seo Goo\*,  
Min Ju Jang\*\*, Hee Sup Lee\*\*\*\*\*, Hong Ju Son\*\*\*, Chung Yeol Lee\*\*\* and Dae Youn Hwang\*\*\*†

\*College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University/PNU-Laboratory Animal Resources Center,  
Miryang 627-706, Korea.

\*\*Wellbeing Products Center, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea.

\*\*\*College of Human Ecology, Pusan National University,  
Pusan 609-735, Korea.

**ABSTRACT :** *Liriope platyphylla* has been thought as an useful medical plant to improve the cough, sputum, neurodegenerative disorders, obesity, and diabetes in Korea and China from old times. In order to investigate the effects of *Liriope platyphylla* on expression and secretion of nerve growth factor (NGF), the mRNA expression and protein secretion were detected in the neuronal cell (B35) and neuroglial cell (C6) cultured with three differences concentration (5%, 10%, 15%) of *Liriope platyphylla*. In MTT assay and FACS anlysis, the some death of some B35 and C6 cells were observed in 15% extract-treated group, while other groups did not induce the death. Also, the mRNA expression of NGF were significantly increased in 5% and 10% extracts treated-group. Furthermore, the NGF protein concentration in supernatant collected from cultured cells showed the very similar pattern with mRNA expression. In order to verify the activity of secreted NGF, the culture supernatant collected from B35 and C6 cells cultured with *Liriope platyphylla* extracts for 24 hrs were treated into undifferentiated PC12 cells, and the differentiation level of PC12 cell were also observed with microscopes. The differentiation level of PC12 cell were significantly increased depend on the dose of extract. Therefore, these results suggested that the water extracts of *Liriope platyphylla* may contribute the regulation of NGF expression and secretion in the neuronal cell and be considered as an excellent candidate for a neurodegenerative disease-therapeutic drug.

**Key Words :** *Liriope platyphylla*, Water Extracts, NGF, Neuronal Cell Differentiation

### 서 언

맥문동 (*Liriope platyphylla*)은 한국과 중국에서 기침, 가래 등의 질병 치료제로 한방에서 주로 사용되어왔으며, 최근에는 당뇨 치료, 기억력 증진, 미생물 억제, 염증억제 등의 기능이 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있다. 이와 더불어 맥문동의 성장, 광합성, 물질생산 등의 특성을 증가시키기 위한 다양한 연구가 시행되고 있어 향후 새로운 고부가가치 제품으로서 발전가능성이 매우 높다 (Seong *et al.*, 2000; Won and Lee, 2002). 이러한 맥문동 효능 중에서 항미생물제와 항염증제로서의 기능은 가장 오래 동안 연구되어오고 있는 분야이다. 항

미생물제는 일반적으로 sortase의 활성저해력을 관찰함으로써 평가하는데, 맥문동은 이들 효소를 강하게 저해하는 효과를 나타내었다 (Katon *et al.*, 2009). 항염증제로서의 기능은 천식마우스 모델에서 맥문동이 airway inflammation과 hyperresponsiveness를 저해하는 효과가 있으며, Th1/Th2 cytokine의 불균형을 조절하는 immunomodulator로서의 기능이 알려져 있다 (Krentz *et al.*, 2008).

한편 일부 연구자들은 맥문동이 당뇨와 비만에 미치는 영향에 대한 연구결과를 보고하였다. Choi 등 (2004)은 맥문동의 homoisoflavone-enriched fraction을 분리하여 3T3-L1 adipocytes에 처리하여 인슐린과 glucose uptake 정도를 관찰하였으며,

†Corresponding author: (Phone) +82-55-350-5388 (E-mail) dyhwang@pusan.ac.kr

Received 2010 July 23 / 1st Revised 2010 August 17 / 2nd Revised 2010 September 10 / 3rd Revised 2010 September 15 / Accepted 2010 October 6

그 결과 이러한 추출물이 인슐린 sensitizer로서 기능을 함을 보고하였다. 또한 OLEFT 비만 랫드에 8주 동안 맥문동이 첨가된 경신강제환을 투여하여 체중, leptin 농도, 먹이섭취량, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) 발현 등의 감소현상을 관찰하였다 (Jeong *et al.*, 2008).

또한 맥문동은 neurotrophic factor의 분비촉진을 통한 신경세포의 활성화를 유도한다. 맥문동의 butanol fraction은 C6와 primary astrocyte cells로부터 신경세포의 분화와 성장에 중요한 NGF의 분비를 촉진시키며 (Hur *et al.*, 2004), 맥문동에서 분리한 Spicatoside A는 PC12 cells에서 tyrosin kinase A receptor pathway를 통해 neurite outgrowth를 촉진시키는 효과가 있다 (Hur *et al.*, 2009). 뿐만 아니라, 맥문동의 ethanol extract를 14일 동안 투여한 마우스는 BDNF나 NGF 발현증가에 의해 기억력과 학습력이 증가됨을 관찰하였다 (Lee *et al.*, 2005). 이러한 신경세포 성장과 분화에 대한 효능 때문에 맥문동을 이용한 다양한 기능성 제품을 개발하려는 시도가 최근에 급증하고 있다. 그러나 실제로 맥문동 추출물을 제품화로 연결하기 위해서는 추출물의 경제적 추출효율과 효능 사이의 상관관계 분석이 매우 중요하다. 이러한 측면에서 용이하게 추출이 가능한 유수추출물을 이용하여 효능을 분석하는 것이 중요하게 고려되어야 함에도 불구하고, 유수추출물을 이용하여 신경조직을 구성하는 신경세포와 neuronal cell과 neuroglia cell의 분화에 미치는 영향에 대한 세부적인 연구는 수행된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 맥문동 유수추출물을 3가지 농도로 제조하여 이들 물질이 neuronal cell과 neuroglial cell에서 NGF 발현과 분비에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 그 결과 두 종류의 세포 모두에서 5% 이상의 추출물을 처리하는 NGF mRNA의 발현과 분비를 촉진하는 기능이 관찰되었으며, 분비된 NGF는 PC12 cell의 분화를 촉진하였다. 이러한 결과는 유수추출물도 향후 체계적인 연구를 수행하여 *in vivo* 기능을 확인된다면 새로운 기능성 제품을 개발하기 위한 후보소재 혹은 치료 소재로서 가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에서 사용된 맥문동은 충북지역에서 재배된 후 거침하여 건조한 것을 구입하여 사용하였으며, 맥문동 열수 추출물을 얻기 위하여 먼저 맥문동 샘플 (600 g)을 60°C에서 열풍 건조시켜 완전히 건조시켰다. 건조된 맥문동은 믹서기를 이용하여 분쇄하고, 분쇄한 맥문동 샘플을 증류수 2 L에 60°C에서 2시간 동안 환류 추출 장비 (IKA LABORTECHNIK, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출은 2반복을 수행하였으며 얻어진 추출액을 Adventec No.5A 여과지 (Toyo, Japan)를 이용

하여 여과하였다. 여과된 용액은 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 vial에 담아 동결보관하였으며, 사용하기 전에 5%, 10%, 15% 농도로 희석하여 준비하였다.

### 2. 세포배양 (Cell Culture)

맥문동이 신경세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 B35, C6, PC12 cell을 사용하였다. Neuroblastoma인 B35 cell과 neuroglial cell인 C6 cell은 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. Pheochromocytoma인 PC12 cell은 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

### 3. MTT assay

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co. 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 (Gerlier and Thomasset, 1986).

먼저 B35 cell과 C6 cell을 96 well (3 × 10<sup>4</sup> cell/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH<sub>2</sub>O), 맥문동의 5%, 10%, 15% 추출물을 10  $\mu$ l/ml의 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, MTT용액을 50  $\mu$ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu$ l 씩 넣고, formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS, Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

### 4. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 분석

각 cell에서 발생하는 apoptosis는 Apoptosis Detection Kit (BD Bioscience)를 이용하여 제조사의 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, B35 cell과 C6 cell을 10 mm dish (1 × 10<sup>6</sup> cell/dish)에 분주하여, 맥문동 5%, 10%, 15% 추출물을 10  $\mu$ l/ml의 농도로 처리하여, 24시간 동안 배양하였다. 세포를 1X PBS로 세척한 뒤, 1X binding buffer를 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 희석한 후, FITC Annexin V와 PI를 각각 5  $\mu$ l 씩 첨가하여, 실온에서 15분간 세포에 결합시켰다. 여기에 1X binding buffer를 400  $\mu$ l 첨가한 뒤 1시간 이내에 FACS 장비

(Cytomics FC 500, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 5. PC12 세포주에서 신경돌기 성장 효과

C6와 B35 세포주에서 분비되는 NGF가 신경세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양액을 이용한 세포분화를 측정하였다. 이를 위해 먼저 B35 세포와 C6 세포에 맥문동을 5%, 10%, 15% 처리한 뒤 24시간 배양을 하여, NGF가 분비된 세포 배양액을 확보하였다. 분비된 배양액을 PC12 세포주에 처리하여 시간의 경과에 따른 세포주의 변화를 위상차 도립현미경 (Nikon ts100-f)을 이용하여 세포 상태를 관찰하였으며, 신경돌기의 성장은 세포 몸체의 직경에 대한 신경 돌기 길이 비로 환산하였다.

### 6. NGF ELISA 측정

맥문동 추출물에 의한 NGF 분비량은 NGF ELISA kit (Millipore, USA)를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 신경세포인 B35 cell과 C6 cell을 96 well plate에  $3 \times 10^4$  cell/well 이 되도록 분주한 후, 70~80% 자랄 때까지 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 그리고 각 well에 맥문동 5%, 10%, 15% 추출물을 10 µl/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 채취하여 5000 rpm에서 2분 동안 세포를 침전시켜 상층액을 준비하였다. ELISA kit의 각 well에 100 µl의 배양액을 넣고, plate sealer로 plate를 덮고 밤새동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 250 µl로 4번 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody 100 µl를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 2시간 후 wash buffer로 4번 세척해주고, peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100 µl를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 여기에 100 µl의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100 µl의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 7. Reverse transcription (RT)-PCR 분석

맥문동 유수추출물이 NGF 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 3가지 농도 (5%, 10% 15%)의 유수추출물이 처리된 B35와 C6 세포주로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. RNA의 분리를 위해, 먼저 원심분리를 이용하여 세포주를 수확한 후 RNAzol (Tel-Test Inc., CS104)을 이용하여 RNA를 추출하였다. RNAzol 추출물에 포함된 단백질을 chloroform을 이용하여 침전시킨 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 RNA만을 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 5 µg을 RT반응에 사용하였

다. RT반응은 먼저 5 µg의 RNA에 0.5 µg의 oligo dT (Invitrogen, 18418-012)를 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5X 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (Invitrogen, 18064-014, 200 U/ul)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치 후 42°C에서 50분 동안 RT반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 90°C에서 5분 동안 처리하여 RNA와 cDNA를 분리하고, RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 3.2 U/ul 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94°C (45 sec), 62°C (30 sec), 72°C (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 특이적 서열 (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.

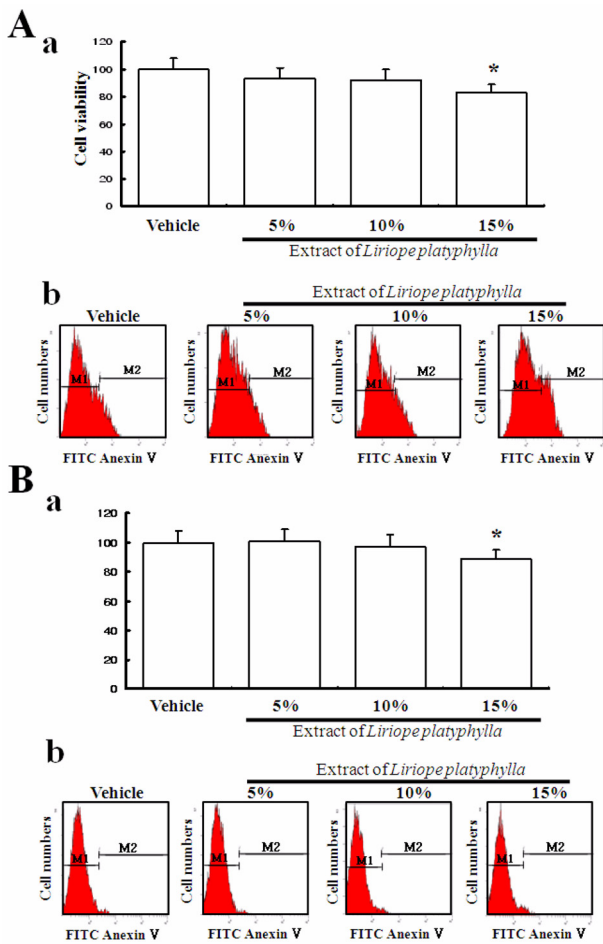
### 8. 통계분석

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

### 1. 맥문동 추출물이 신경세포 생존율에 미치는 영향

맥문동 유수추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 평가하기 위하여 신경조직에 주로 분포하는 neuronal cell과 neuroglia cell에서 기원된 2가지 세포주를 이용하여 맥문동의 5%, 10%, 15% 유수추출물을 10 µl/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT 분석과 FACS 분석을 실시하였다. MTT 분석 결과, B35 cell에서는 5%와 10%를 처리한 그룹에서 일부 세포생존율의 감소가 관찰되었으나 유의성은 없었다. 그러나, 15%를 처리한 그룹에서는 유의적으로 세포생존율이 약간 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1Aa). 이러한 결과는 FITC annexin V를 처리하여 FACS로 분석한 결과에서도 유사하게 관찰되었다 (Fig. 1Ab). Neurglial cell인 C6 cell에서도 5%와 10% 맥문동 유수추출물을 처리한 집단에서는 유의적으로 세포생존율의 감소를 관찰할 수 없었으나, 15% 처리군에서는 유의적으로 생존율이 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1Ba).

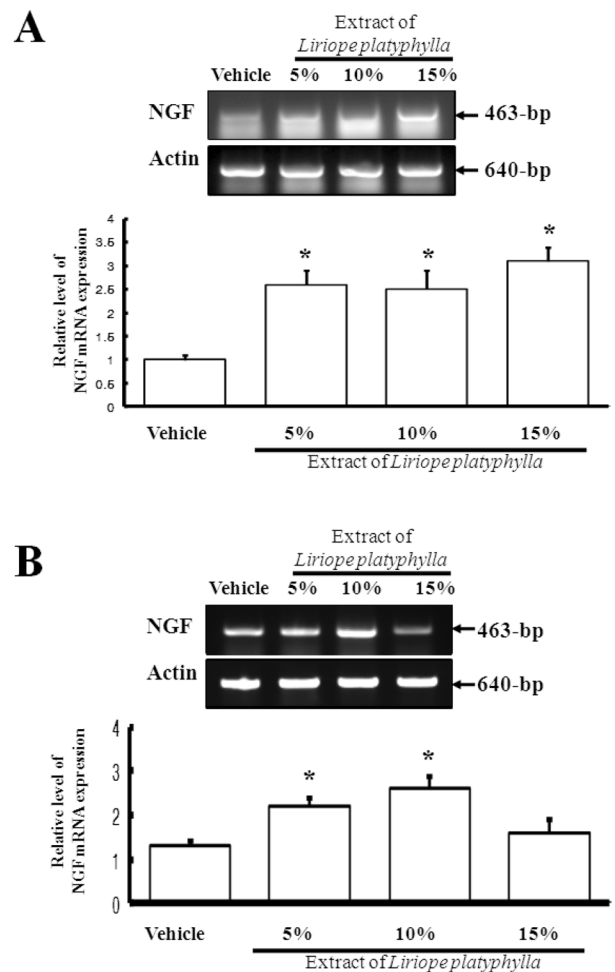


**Fig. 1.** Toxicity of the water extract of *Liriope platyphylla* on the cell viability of B35 (A) and C6 (B) cell. Two cell lines were cultured with one of the three extracts (5%, 10%, 15%) in dH<sub>2</sub>O for 24 hrs. Activity of cell viability was measured using MTT assay and FACS analysis. The results from these two assay were showed that only 15% extraction of *Liriope platyphylla* could induce the death of B35 and C6 cell. M1 indicated in figure represented the live cells, and M2 also represented either undergoing apoptosis or had already died. The values of data represented mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P < 0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

따라서 이러한 실험결과는 맥문동 유수추출물은 신경조직을 구성하는 대표적인 두 가지 종류인 neuronal cell과 neuroglial cell에 낮은 농도에서는 세포독성을 나타내지 않으나 15% 이상의 고농도에서는 약간의 세포독성을 유도함을 제시하고 있다.

**2. 맥문동 유수추출물이 NGF mRNA 발현에 미치는 영향**

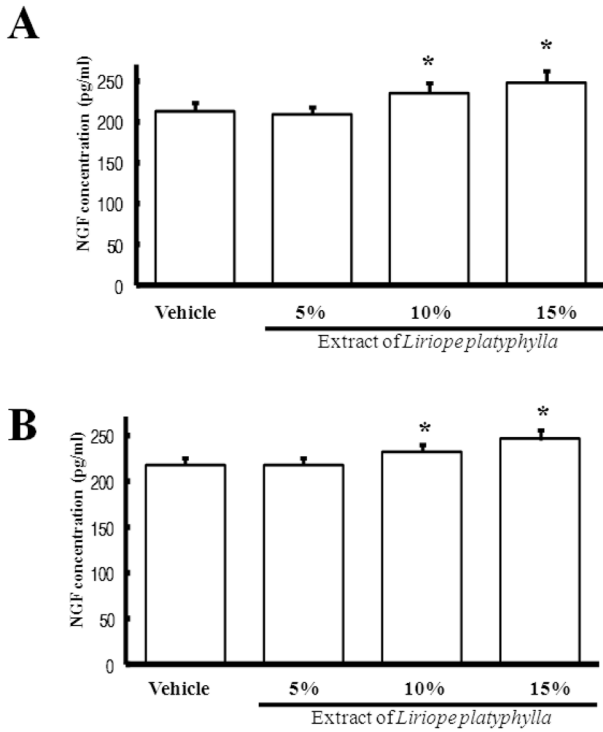
맥문동의 부탄올 분획물이나 에탄올 추출물 등은 마우스에서 NGF의 발현을 유도하는 특성이 있다 (Hur *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005). 맥문동의 유수추출물이 두 종류의 신경세포주에서 NGF의 발현에 영향을 평가하기 위하여 5%, 10%,



**Fig. 2.** Effects of the water extract of *Liriope platyphylla* on NGF expression of B35 (A) and C6 (B) cell. The  $\beta$ -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 cell with *Liriope platyphylla* 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  $\pm$  SD of three experiments. \*P < 0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

15%의 유수추출물을 처리한 후 세포주에서 NGF의 발현을 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, B35세포주에서는 5%, 10%, 15% 추출물을 처리한 그룹에서 NGF mRNA의 발현은 vehicle 그룹에 비하여 농도에 따라 증가비율에 차이는 있었으나 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2A). C6세포주에서도 B35세포주와 유사한 결과가 관찰되었으나, 15% 처리그룹에서만 발현량이 감소하였다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 맥문동 유수추출물은 10%의 농도에서 두 종류의 신경세포에서 NGF mRNA의 발현을 유도하는 특성이 있음을 제시하고 있다.

맥문동 추출물이 NGF의 mRNA발현과 단백질 분비에 미치는 영향



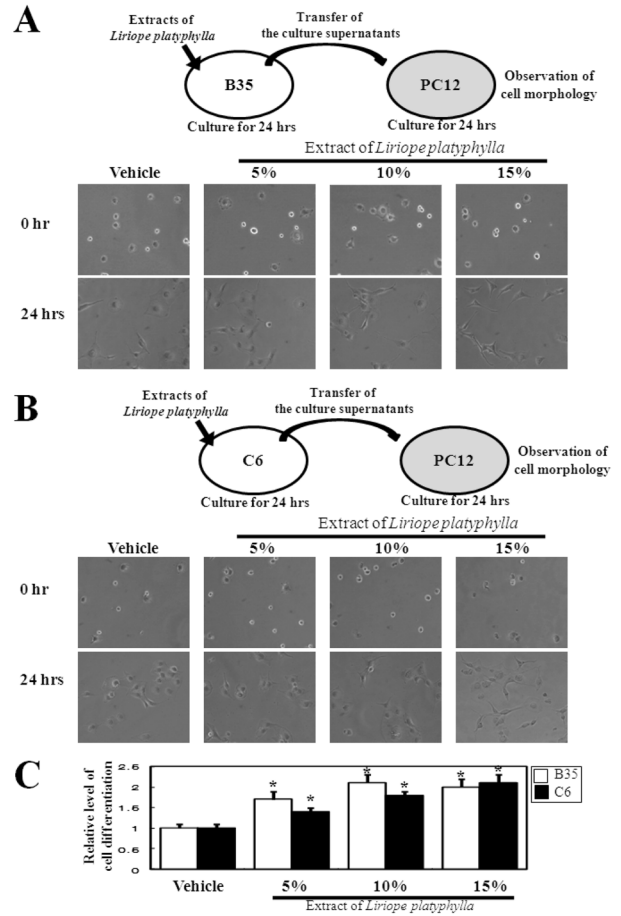
**Fig. 3.** Effects of the water extract of *Liriope platyphylla* on NGF secretion of B35 (A) and C6 (B) cell. Cells were cultured with one of the three extracts (5%, 10%, 15%) in dH<sub>2</sub>O for 24 hrs. The culture supernatant were collected from each cells. An insulin concentration in the supernatant was measured using anti-NGF ELISA kit. The values of data represented mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P < 0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

3. 맥문동 유수추출물이 NGF 분비에 미치는 영향

다음으로 mRNA 수준에서 확인된 NGF가 세포배양액으로 분비되는지 확인하기 위하여 맥문동 유수추출물을 처리한 후 배양액 내에 NGF의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과, B35 cell과 C6세포는 비처리군에서도 모두 NGF를 과량 발현하였으며, 발현양은 두 세포주에서 유사하게 관찰되었다. NGF의 분비량은 맥문동 유수추출물의 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었으며, 특히 15%에서 가장 많은 분비를 유도하였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 맥문동 유수추출물이 NGF의 mRNA 발현뿐만 아니라 단백질의 분비도 촉진함을 제시하고 있다.

4. 맥문동 유수추출물에 의해 분비된 NGF가 PC12세포의 분화에 미치는 영향

또한, 분비된 NGF가 실제로 세포의 분화를 촉진시키는지 확인하고자 PC12 cell을 이용한 배양액-유도반응을 실시하였다. 그 결과, B35 cell에서 채취한 배양액을 첨가한 PC12



**Fig. 4.** Microscope images of B35 (A) and C6 (B) cell after 24 hrs of treatment with water extracts of *Liriope platyphylla* at various concentrations. Vehicle-treated cell were treated with DMSO as using the dissolving agents of four compounds. Cellular morphology was viewed at 20x magnification. The values of data represented mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P < 0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

cell은 모두 vehicle에 비하여 분화가 촉진되는 것으로 관찰되었으며, 이러한 분화촉진은 10% 추출물 처리배양액에서 가장 높았다. C6 cell을 이용한 실험결과도 동일하게 관찰되었으며, 농도의존적인 경향이 나타났다 (Fig. 4). 따라서 이상의 모든 결과는 종합해보면, 맥문동의 유수추출물은 B35와 C6 cell의 NGF 발현을 촉진시키며, 분비된 NGF는 기능적으로 다른 세포의 분화를 촉진할 수 있는 기능을 갖는 완전한 형태임을 제시하고 있다.

고찰

NGF는 약 50년 전에 Rita Levi-Montalcini 등에 의해서 신경의 분화, 증식, 생존에 중요한 기능을 하는 단백질로 처음

보고되었다 (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). NGF는 neurotrophin family에 속하는 가장 잘 알려진 단백질로서 교감신경계 (sympathetic nervous system)과 감각신경계 (sensory nervous system)의 유지와 발달을 위해 매우 중요한 역할을 수행한다 (Einarsdottir *et al.*, 2004).

NGF는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 3개 단위체 (subunit)가 비공유결합 (non-covalently linkage)에 의해 결합된 구조를 갖고 있으며, 이 중에서  $\beta$  단위체가 성장촉진활성을 나타내기 때문에 일반적으로  $\beta$ -NGF라 불리운다 (Selby *et al.*, 1987; Ullrich *et al.*, 1983).

또한 NGF는 일부 cytokines 혹은 맥문동 추출물에 반응하는 다양한 세포형태에 의해서 생산된다. NGF를 생산하는 세포는 neuron, inflammatory cell (lymphocytes 혹은 mast cell), structural cell (fibroblast, epithelial cell, smooth muscle cells) 등이 포함되지만 (Freund-Michel and Frossard, 2008), 맥문동 butanol과 ethanol fraction은 primary astrocyte cell과 마우스에서도 NGF 발현을 유도한다 (Hur *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). IL-1 $\beta$ 는 근육세포에서 NGF합성을 유도하고, fibroblasts에서는 IL-1 $\beta$ , platelet derived growth factor (PDGF), acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 에 반응해서 합성이 증가한다 (di Mola *et al.*, 2000; Ehrhard *et al.*, 1993; Levi-Montalcini *et al.*, 1996). NGF의 반응을 유도하는 신호전달은 두 종류의 receptor (high와 low affinity receptor)에 결합함에 의해 증계된다. High affinity receptor는 TrkA로서 세포질쪽에 위치한 tyrosin -kinase domain을 통하여 신호를 전달한다 (Tsui-Pierchala and Ginty, 1999). 특히, 맥문동에서 분리된 spicatoside A도 TrkA의 인산화를 증가시키는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, Erk 1/2와 Akt의 인산화도 유도한다 (Hur *et al.*, 2009). 한편, Low affinity receptor는 p75로서 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있어 신호전달을 수행한다 (di Mola *et al.*, 2000; Freund-Michel and Frossard, 2008). 따라서 본 연구에서는 이러한 NGF의 중요성과 특성을 바탕으로 인간의 신경퇴행성 질병, 신경성스트레스 등의 개선효과를 나타내는 중요한 지표로 NGF를 선정하여 맥문동 추출물이 NGF 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

최근까지, 다양한 식물로부터 유래된 추출물들이 NGF의 발현 증가를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 맥문동과 유사하게 사포닌을 많이 함유하고 있는 인삼이 NGF의 발현 증가를 유도하는 기능이 알려졌다. 다중낭성난소 (polycystic ovary)를 유도한 동물에 인삼추출물 (korea red ginseng extract)을 투여하면, 교감신경계는 활성이 증가되었으

며, 이러한 증가는 NGF protein과 mRNA의 발현과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다 (Park *et al.*, 2009). 또한 Ginsenoside Rb1의 투여는 랫드의 hippocampus에서 NGF mRNA의 발현증가와 basal forebrain에서 choline esterase와 TrkA mRNA의 발현 증가를 유도하였다 (Salim *et al.*, 1997). 맥문동 일부 추출물도 마우스에서 NGF의 발현을 유도하였다. 특히 맥문동의 butanol extract는 C6세포 등에서 NGF의 발현을 촉진하였고, ethanol extract는 마우스에서 NGF의 발현을 촉진하였다 (Hur *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2005). 그러나 우수추출물을 이용하여 신경 세포에 따른 반응을 관찰한 연구는 현재까지 수행되지 않았다. 본 연구 결과에서 우수추출물은 neuronal cell과 neuroglial cell에서 NGF mRNA의 발현을 촉진하였으며, 특히 10%와 15%에서 유의적으로 증가하는 현상을 나타내었다. 또한 실제 mRNA에서 관찰된 합성 NGF가 세포배양액으로 대부분 분비되는 것으로 관찰되었으며, 분비된 NGF는 PC12 세포의 증식을 유도하는 기능을 정상적으로 나타내었다. PC12 세포는 Rat pheochromocytoma cell line으로서 크롬 친화성 세포종으로 epinephrine, norepinephrine 등 신경전달물질의 분비가 활발하여 신경계 연구에 많이 사용되고 있다. 특히 PC12 cell은 NGF receptor를 발현하고 있는 미분화세포로서 NGF에 의해 발현이 증가되는 특성이 있어 NGF의 기능연구에 많이 사용되고 있다 (Greene and Tischler, 1976).

따라서 본 연구에서는 맥문동의 우수추출물의 독성과 NGF 발현조절에 미치는 영향을 분석하였으며, 그 결과, 독성은 높은 농도에서 일부 관찰되었으나, neuronal cell과 neuroglial cell에서 NGF의 발현을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 저농도의 우수추출물을 이용한 다양한 제품을 개발한다면 신경세포의 분화를 촉진함으로써 신경성 질병을 완화시키는 효능을 갖는 우수한 제품을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부의 09-지역연고산업육성사업 (RIS-13)의 지원을 받아 부산대학교 생물자원웰빙제품RIS사업단 주관으로 수행하였으며, 세포분석에 협조를 해주신 정영화 교수님께 진심으로 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- Cartwright M, Martin S, D'Mello S and Heinrich G (1992). The human nerve growth factor gene: structure of the promoter region and expression in L929 fibroblasts. *Brain Research Molecular Brain Research*. 15:67-75.
- Choi SB, Wha JD and Park S. (2004). The insulin sensitizing

- effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Science*. 75:2653-2664.
- di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopoulos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A and Büchler MW.** (2000). Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 46:670-679.
- Ehrhard PB, Erb P, Graumann U and Otten U.** (1993). Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 90:10984-10988.
- Einarsdottir E, Carlsson A, Minde J, Toolanen G, Svensson O, Solders G, Holmgren G, Holmberg D and Holmberg M.** (2004). A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. *Human Molecular Genetics*. 13:799-805.
- Freund-Michel V and Frossard N.** (2008). The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 117:52-76.
- Gerlier D and Thomasset N.** (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*. 94:57-63.
- Greene LA and Tischler AS.** (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:2424-2428.
- Hur JY, Lee PJ, Kim JM, Kim AJ, Kim HC and Kim SY.** (2004). Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27:1257-1260.
- Hur JY, Lee PJ, Moon EJ, Kang IS, Kim SH, Oh MS and Kim SY.** (2009). Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *European journal of Pharmacology*. 620:9-15.
- Jeong SH, Chae KS, Jung YS, Rho YH, Lee JM, Ha JR, Yoon KH, Kim GC, Oh KS, Shin SS and Yoon MC.** (2008). The Korean traditional medicine Gyeongshingangjeehan inhibits obesity through the regulation of leptin and PPARalpha action in OLETF rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 119:245-251.
- Katon W, Russo J, Lin EHB, Heckbert SR, Karter AJ, Williams LH, Ciechanowski P, Ludman E and Korff M Von.** (2009). Diabetes and Poor Disease Control: Is comorbid depression associated with poor medication adherence or lack of treatment intensification? *Psychosomatic Medicine*. 71:965-972.
- Krentz AJ, Patel MB and Bailey CJ.** (2008). New drugs for type 2 diabetes mellitus: what is their place in therapy? *Drugs*. 68:2131-2162.
- Lee YC, Lee JC, Seo YB and Kook YB.** (2005). Liriope tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*. 101:144-152.
- Levi-Montalcini R and Hamburger V.** (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*. 116:321-361.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L and Leon A.** (1996). Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends in Neurosciences*. 19:514-520.
- Park SC, Kim SE, Oh DM, Shim KM, Jeong MJ, Lim SC, Nah SY, Park SH, Kang SS, Moon CJ, Kim JC, Kim SH and Bae CS.** (2009). Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. *Archives of Pharmacological Research*. 32:347-352.
- Racke MM, Mason PJ, Johnson MP, Brankamp RG and Linnik MD.** (1996). Demonstration of a second pharmacologically active promoter region in the NGF gene that induces transcription at exon 3. *Brain Research Molecular Brain Research*. 41:192-199.
- Salim KN, McEwen BS and Chao HM.** (1997). Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Research Molecular Brain Research*. 47:177-182.
- Selby MJ, Edwards R, Sharp F and Rutter WJ.** (1987). Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Molecular and Cellular Biology*. 7:3057-3064.
- Seong JD, Park KD, Kwack YH, Kim SM and Kang JH.** (2000). Effects of nitrogen levels and split application ratio on growth and yield in *Liriope platyphylla* WANG et TANG. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 8:69-73.
- Tsui-Pierchala BA and Ginty DD.** (1999). Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 19:8207-8218.
- Ullrich A, Gray A, Berman C and Dull TJ.** (1983). Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*. 303:821-825.
- Won JY and Lee CY.** (2002). Characteristics of photosynthesis and dry matter production of *Liriope platyphylla* WANG et TANG. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:82-87.