

원 저

## 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포 독성에 대한 원추리의 억제 효과 탐색

김은숙, 최수진, 류병호<sup>1</sup>, 최진호<sup>2</sup>, 오명석<sup>3</sup>, 박우진<sup>3</sup>, 최영환<sup>4</sup>,  
백도현, 하권철, 강대욱, 조용권, 박기태<sup>5</sup>, 문자영<sup>\*</sup>

경성대학교 공과대학 식품공학과<sup>1</sup>, 부경대학교 수산과학대학 식품생명공학부<sup>2</sup>  
광주과학기술원 생명과학과<sup>3</sup>, 부산대학교 생명자원과학대학 생명자원과학부 원예학과<sup>4</sup>  
(주)네오허브 한방생명공학연구소<sup>5</sup>, 창원대학교 자연과학대학 보건과학과<sup>\*</sup>

### Protective Effects of *Hemerocallis Fulva* Extracts on Amyloid $\beta$ -Protein-Induced Death in Neuronal Cells

Eun-Sook Kim, Soo-Jin Choi, Beung-Ho Ryu<sup>1</sup>, Jin-Ho Choi<sup>2</sup>, Myung-Sok Oh<sup>3</sup>,  
Woo-Jin Park<sup>3</sup>, Young-Whan Choi<sup>4</sup>, Do-Hyeon Paik, Kwon-Chul Ha, Dae-Ook Kang,  
Yong-Kweon Cho, Ki-Tae Park<sup>5</sup>, Ja-Young Moon<sup>\*</sup>

Department of Food Science & Technology, College of Engineering, KyungSung University<sup>1</sup>,  
Division of Food Science and Biotechnology, College of Fisheries Sciences, Pukyong National University<sup>2</sup>,  
Department of Life Science and National Research Laboratory of Proteolysis, Kwangju Institute of Science and  
Technology<sup>3</sup>, Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan  
National University<sup>4</sup>, Institute of NeoHerb Oriental Medicine Biotechnology<sup>5</sup>,  
Department of Biochemistry and Health Sciences, Changwon National University<sup>\*</sup>

**Objectives** : The amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) is the principal component of the senile plaques characteristic of Alzheimer's disease (AD) and elicits a toxic effect on neurons *in vitro* and *in vivo*. Many environmental factors including antioxidants and proteoglycans modify  $A\beta$  toxicity. In this study, we have investigated the protective effects of water- and organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted with methanol on  $A\beta$ -induced oxidative cell death in cultured rat pheochromocytoma (PC12) cells.

**Methods** : For this study, we used MTT reduction assay for detection of protective effects of water- and organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted with methanol on  $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity to PC12 cells. We also used cell-based  $\beta$ -secretase assay system to investigate the inhibitory effect of water- and organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root on  $\beta$ -secretase activity.

**Results** : We previously reported that methanol extracts of *Hemerocallis fulva* root strongly attenuated cytotoxicity induced by the three  $A\beta$  fragments ( $A\beta_{25-35}$ ,  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-43}$ ) to both SK-N-MC and PC12 cells. In the present study, we found that butanol-, ethylacetate-, chloroform-, and water-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted with methanol had strong protective effects against  $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity to PC12 cells and inhibitory potency to  $\beta$ -secretase activity.

**Conclusion** : These results suggest that butanol-, ethylacetate-, chloroform-, and water-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted with methanol may contain the protective component(s) against  $A\beta$ -induced cell death in PC12 cells as well as inhibitory component(s) to  $\beta$ -secretase activity.

**Key Words**: amyloid  $\beta$ -protein, BACE,  $\beta$ -secretase, *Hemerocallis fulva*, Liliaceae, PC12 cell.

## 서론

원추리는 백합과에 속하는 속근성의 다년생 약초로서 학명이 *Hemerocallis fulva* L.이며 英名은 day lily이다. 원추리는 “세상살이의 근심을 잊게 하는” 풀로 널리 알려져 있어서 萱草 또는 忘憂草라고 부르기도 하며, 임신한 부인들은 아들까지 낳게 하는 꽃이라 하여 宜男草라고 부르기도 한다. 이외에도 중국에서는 金針采 등으로도 불리는 원추리는 우리말로 “넘나물”이라고 하여 봄철에는 어린 싹을, 여름철에는 꽃을 따서 김치를 담가 먹거나 나물로 무쳐 먹기도 한다.

원추리는 한국, 중국, 일본을 중심으로 수천 년 동안 식용과 한방 및 민간요법으로 애용되어 왔다<sup>1)</sup>. 원추리는 마음을 안정시키고 스트레스와 우울증을 치료하는 약초로 알려져 있기도 하며, 肺結核, 貧血, 黃疸, 便秘, 소변불통 등의 치료를 위해 민간요법으로 많이 쓰여 왔다<sup>2)</sup>. 또한 뿌리를 달인 물은 결핵균을 죽이는 작용이 있고, 전초에 이노작용, 항염증 작용, 지혈작용이 있으며, 해독작용도 뛰어난 것으로 알려져 있다.

최근 연구결과를 살펴보면, 고서에 기록되어 있는 원추리의 약효들이 일부 확인되고 있다. 원추리에는 항우울증 치료 효과가 있음이 확인되었으며, 원추리 잎과 뿌리에는 염증과 황달의 치료에 효과가 있는 성분이 존재함이 보고되고 있다. 원추리 꽃잎으로부터 강력한 항산화 성질을 가지고 있는

나프탈렌 배당체인 스텔라데롤 (stelladerol)<sup>3)</sup>과, 주혈 흡충(住血吸蟲)을 퇴치하는 효능과 암세포를 사멸하는 효능이 있는 여러 종류의 안트라퀴논류 (anthraquinones)의 성분들이 확인되었다<sup>3,4,5)</sup>. Uezu<sup>6)</sup>에 의하면 원추리가 생쥐에서 신경계의 변화를 유발하는 약리효과가 있음을보고하였으며, 이 외에도 폐혈증 치료효능이 있는 락탐(lactams)<sup>7,8,9)</sup>을 비롯하여 에너지 증강효과가 있는 스테로이드성 사포닌(steroidal saponins)<sup>10)</sup> 등이 다량 함유되어 있음이 밝혀졌다.

알츠하이머 병은 뇌에서 베타아밀로이드 펩티드의 과대축적에 의하여 유발되는 신경질환이다. 알츠하이머병은 發病原因에 따라 遺傳性과 散發性으로 나눌 수 있으며, 아밀로이드 전구단백질이나 presenilin과 같은 특정한 유전자에 돌연변이가 생기면 100% 알츠하이머병으로 발전하는데, 이 경우가 전체 5% 내외를 차지하는 유전성 알츠하이머병이다. 전체 알츠하이머병의 90% 이상은 노인에게 주로 나타나는 散發性 알츠하이머병이다. 散發性 알츠하이머병은 아직까지 정확한 원인이 밝혀지지 않아 예방과 치료가 어려운 실정이었으나 최근에 發病原因이 하나씩 밝혀지고 있다.

遺傳性과 散發性 알츠하이머병의 공통된 원인으로 알려져 있는 아밀로이드 베타단백질(A $\beta$ )에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. A $\beta$ 는 정상인의 경우에도 인체 곳곳에서 소량 만들어지나, 빠르게 분해되어 인체 내에 쌓이지 않지만, 알츠하이머병 환자의 경우에는 A $\beta$ 가 비정상적으로 많이 생성되어 분해되지 않고 신경세포의 외부에 축적됨으로써 老人斑(senile plaque)이 생성되거나, 記憶과 學習에 중요한 역할을 하는 해마나 대뇌피질 부위의 신경세포에 과다하게 쌓여서 신경섬유다발(neurofibrillary tangle)을 형성하게 된다<sup>11-14)</sup>. 축적된 A $\beta$ 는 주변의 세포들에 염증반응을 일으킴으로써 신경세포가 손상되고 점점 뇌의 정상적인 기능을 유지하는 신경회로망을 훼손하게 된다.

A $\beta$ 는  $\beta$ -secretase에 의해 절단된 아밀로이드 전

· 접수 : 2006년 6월 2일 · 논문심사 : 2006년 6월 4일  
· 채택 : 2006년 6월 16일  
· 교신저자 : 문자영, Changwon National University,  
Changwon, 641-773, South Korea  
(Tel: 011-82-55-279-7662,  
Fax: 011-82-55-279-7660,  
E-mail: jymoon@changwon.ac.kr)

· 본 연구는 농림기술관리센터 지원 연구비(ARPC203050-03-I-CG000)와 창원대학교의 2006년도 간접연구경비(학술연구지원과제)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

구단백질(amyloid precursor protein)의 일부분으로서, 42개 내외의 아미노산으로 이뤄진 펩타이드이다. A $\beta$ 를 in vitro에서 배양하는 신경세포에 처리하였을 때 신경세포사(神經細胞死)를 유도하며 그 細胞死의 기전이 알츠하이머병 환자에서 나타나는 apoptosis의 유형과 유사하다는 많은 보고들이 있다. A $\beta$ <sub>1-42</sub> 또는 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 단백질에 의한 신경세포의 손상이 Alzheimer형 질환 유발의 중요한 원인중의 하나로 확인되고 있으며,<sup>15-17)</sup> A $\beta$ <sub>25-35</sub>는 神經細胞의 損傷을 유발하는 A $\beta$ <sub>1-42</sub> or 43의 중요한 toxic fragment로서 알려지고 있다.<sup>17,18)</sup>

치매(癡呆)와 관련하여 현재 약리학적 접근법으로는 acetylcholinestrage inhibitors,<sup>19,20)</sup> nicotinic and muscarinic agonists,<sup>21,22)</sup> estrogen,<sup>23)</sup> nerve growth factor,<sup>24,25)</sup> neurotrophic factor를 활성화시키는 저분자 lipophilic 물질들,<sup>26)</sup> ibuprofen과 COX-2 inhibitors와 같은 비스테로이드성 항염증 치료제<sup>27)</sup> 등이 포함되어 있다. 현재 세계적인 제약회사들이 나서서  $\beta$ -secretase의 작용을 억제하는 약물을 개발해 A $\beta$ 가 생성되는 것을 원천적으로 차단하고자 노력을 기울이고 있다. 최근에는 미국의 제약회사와 대학 및 연구소에서는 癡呆 治療劑의 개발을 위해 약용 식물로부터 항산화 효과를 나타내는 성분을 분리하는 연구가 많이 진행되고 있으며, 이들 중에서 癡呆의 治療劑로서 사용되기 시작한 성분들로는 Ginkgo biloba L(은행나무)<sup>28,29)</sup>과 Huperzia serrata Travis (중국산이끼)<sup>30,31)</sup>들이 대표적인 경우이다. 이외에 Curcuma longa L.(강황)로부터 분리한 curcuminoids 성분 또한 치매의 치료효능이 보고되고 있으며,<sup>32-34)</sup> 아밀로이드 대사물의 독성을 억제하는 것으로 알려진 인삼, tetrandrine, 은행잎 추출물(Egb761)등은 신경세포의 생존을 증가시키거나 알츠하이머 환자의 癡呆症狀의 악화속도를 늦추는 것으로 보고된 바 있다.<sup>32)</sup> 본 연구에서는 국내에 자생하는 백합과에 속하는 원추리의 뿌리로부터 癡呆의 治療劑로서 가능성이 있는 유효성분을 탐색하고자, 원추리 뿌리의 메탄을 추출물로

부터 순차 유기용매법으로 확보한 분획물들을 대상으로 A $\beta$ <sub>25-35</sub>에 의해 유도된 PC12 신경세포의 손상을 억제하는 효능과  $\beta$ -secretase의 활성억제 효능을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 실험 시료: 원추리 宿根類

본 연구에 사용된 원추리 宿根類의 기초 자료는 대한식물도감(이창복 저, 향문사)으로부터 확보하였으며, 원추리 宿根類의 메탄을 추출물은 자생식물이용기술사업단(단장: 정 혁 박사)으로부터 구입하였으며, DMSO에 녹여서 stock solution으로 보관하였고, 본 실험에서도 DMSO를 이용하여 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. 원추리의 메탄을 추출물로부터 3종의 유기용매(chloroform, ethylacetate, butano<sup>1)</sup>)와 증류수를 이용하여 순차 유기용매법으로 원추리의 2차 유기용매 분획물을 만들어서 본 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

본 실험에 이용한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical 사 (USA)로부터 구입하였다. 세포배양에 필요한 fetal bovine serum (FBS), horse serum, L-glutamine, non-essential amino acid, penicillin & streptomycin, 96 well plate, collagen, Phosphate Buffered Saline (PBS), trypsin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Gibco BRL사 (Gland Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Amyloid fragment들인 A $\beta$ <sub>25-35</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>1-43</sub> 등은 Sigma사로부터 구입하였다. 본 실험에 이용한 기기는 CO<sub>2</sub> 배양기, clean bench, 항온수조, 미량원심분리기, UV spectrophotometer, ELISA reader 및 그 밖의 여러 실험기자재 등을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) PC12 Cell culture

본 연구에 사용한 PC12 cell은 collagen을 코팅한 petri dish 또는 96 well plate에서 5% fetal bovine serum, 10% horse serum, penicillin 및 streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 2일에 1회 교체했으며, 세포가 80~90% confluence 정도로 성장하면 계대 배양시켰다.

### 2) 원추리 宿根의 2차 유기용매 분획이 신경세포의 생존에 미치는 영향 측정

PC12 cell을 Collagen이 코팅되어 있는 96 well plate에 well당 20,000개의 cell이 들어가도록 분주하였다. 하룻밤 동안 배양시킨 후에 원추리 宿根의 2차 용매분획물을 DMSO에 녹여 농도 별 (25, 50, 100, 200 µg/ml)로 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후에 MTT 액(5mg/ml in PBS, pH 7.5)을 20 µl씩 넣고 3시간 동안 배양시킨 다음, 상층액을 모두 제거하고 DMSO와 EtOH을 1:1로 섞은 용액을 100 µl씩 넣고 10분 후에 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 대조군의 생존율을 100%로 하여 계산하였다.

### 3) 원추리 宿根의 2차 유기용매 분획이 Aβ 단백질에 의하여 유발된 신경세포독성의 억제효과 측정

원추리 宿根의 2차 유기용매 분획이 아밀로이드 베타(Aβ)에 의해 유도되는 세포독성을 억제하는 효과를 조사하기 위하여 MTT assay를 이용하여 cell viability를 확인하였다. PC12 cell을 collagen이 코팅된 96 well plate에 well당 20,000개의 cell이 들어가도록 count하여 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 overnight시킨 다음, 1 µg/ml의 Aβ와 원추리 宿根의 2차 유기용매 분획을 농도 별(25, 50, 100, 200 µg/ml)로 함께 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 더 배양하였다. MTT 용

액(5mg/ml in PBS, pH 7.5)을 20 µl씩 넣고 3시간 동안 배양시킨 후에 상층 액을 모두 제거하고 DMSO와 EtOH을 1:1로 섞은 용액을 100 µl씩 넣고 잘 흔들어 주었다. 10분 정도 후에 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 대조군의 생존율을 100%로 하여 계산하였다.

### 4) 원추리 宿根의 2차 유기용매 분획이 아밀로이드 베타단백질 분해효소의 활성억제효과 측정

아밀로이드 베타 단백질 분해효소(β-Secretase)의 활성은 박우진 교수 연구팀이 개발한 Cell-based BACE assay system<sup>36)</sup>을 사용하였으며, assay 원리는 Fig. 1에서 잘 나타나 있다. 즉, 본 assay system에는 Suc2 mutant (MATa leu2 ura3 his3 trp1 lys2 suc2-Δ<sup>9)</sup>인 SEY6210 yeast strain에 protease인 β-secretase expression vector와 alkaline phosphatase (AP) expression vector를 co-transformation하여 만든 recombinant yeast를 이용하였다. 이 recombinant yeast는 성장 과정 중에 지속적으로 생성되고 있는 protease (β-Secretase)가 ER/Golgi compartment에서 생성되고 있는 GM2-AP를 절단함으로써 해리된 AP가 세포밖으로 분비되어 나온다. 분비되어 나온 AP가 배양액에 첨가된 AP의 기질인 NPP를 분해함으로써 발색하게 되는데, 발색정도를 ELISA reader (A<sub>405nm</sub>)로 측정하여 β-Secretase의 활성도로 표시한다. β-secretase 활성 저해물질을 배양액에 첨가하여 recombinant yeast를 배양시키면 성장기간 동안에 protease이 발현이 억제되어 ER/Golgi compartment에서 생성되고 있는 GM2-AP를 절단하지 못함으로써 AP를 세포 밖으로 내보내지 못하여 배양액에 존재하는 NPP를 대사시키지 못하여 발색이 일어나지 않게 된다. 이때의 발색 정도를 ELISA Reader로 측정하여 정상 대비 활성도를 % Inhibition으로 표시하여 BACE의 저해활성으로 나타내게 된다. 본 실험의 세부과정은 다음과 같다. 즉, recombinant yeast를 5ml SD media

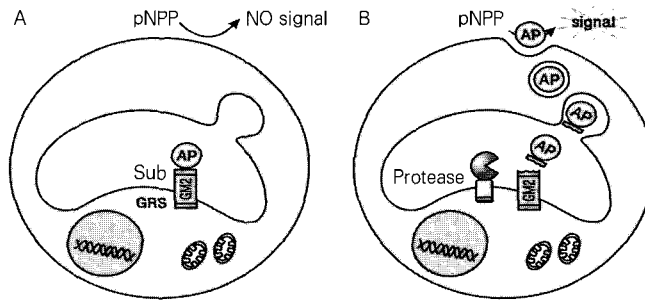


Fig. 1. Diagram of Cell-based assay system for BACE

(Leu-, Trp-, 2% glucose)에서 seed culture 한 다음, 200 ml SD media에 subculture하여 O.D<sub>600nm</sub> ≅ 1.0에 도달할 때 까지 배양한다. 배양된 yeast cell을 원심분리(3,000rpm, 10min)하여 회수한 다음, 멸균된 증류수로 suspension 하여 재 회수 한다. 회수된 cell pellet을 1 ml의 SD media에서 균질화한 다음 O.D<sub>600nm</sub> 를 측정하여 세포수를 결정한다. 백합과 숙근류 용매추출물분획을 농도별로 희석하여 보관하고 있는 각각의 sample tube에 600 μl 씩의 SD media를 넣고 혼합한다. 혼합된 sample tube 각각에 2 x 10<sup>6</sup> cell을 넣은 다음, 150 μl/well (5 × 10<sup>5</sup> cell/well) 씩의 혼합액을 96well plate에 분주한 후 10 °C에서 10-12시간 동안 배양한다. 배양 후 well 당 50 μl 씩을 new plate에 옮긴 다음, 100 μl AP buffer (alkaline phosphatase yellow liquid substrate system for ELISA + L-Homoarginine)를 old plate에 첨가하여 반응시키면서 반응시간별(0, 2, 10, 24 h)로 발색정도를 ELISA reader (A<sub>405nm</sub>)로 측정한다. BACE의 inhibitor인 #190과 #192를 positive control로 사용하였으며, yeast cell membrane을 통과하지 못하는 #202를 negative control로 사용하였다.

## 결 과

원추리 宿根類의 메탄을 추출물로부터 癡呆 예방 및 치료 효능이 있는 단일성분을 탐색하기 위하여 4종의 유기용매를 이용하여 순차 유기용매

법으로 분획한 성분들에 대하여 아밀로이드 베타 단백질에 의하여 유발된 신경세포독성의 억제효능과 β-secretase 활성 억제효능 정도를 측정하였다.

### 1. 원추리 宿根의 용매추출물이 PC12 세포의 생존에 미치는 영향

메탄올로 1차 추출한 원추리 宿根 분획물들을 네 종류의 유기용매를 사용하여 2차 용매 분획한 추출물을 각각 농도별로 PC12 세포에 적용하여 세포독성이 유발되는가를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다(fig. 2). 2차 용매 분획물 중에서 물, butanol, 및 chloroform 분획물은 각각 적용한 최대 농도인 300 μg/ml의 농도에서도 PC12 세포에 대한 독성이 약하거나 나타나지 않았다. 한편, ethylacetate 분획물은 50 μg/ml 농도까지는 세포독성이 나타나지 않았으나, 더 높은 농도에서는 농도 의존적으로 세포독성이 강하게 나타났다. Ethylacetate 분획물의 PC12 세포에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 217 μg/ml로 결정되었다. 여기에서 IC<sub>50</sub> 값은 세포의 생존율을 50%에 도달하게 하는 추출물들의 농도로 정의하였다.

### 2. 원추리 宿根類의 용매분획이 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포독성의 억제효과 측정

원추리 宿根의 2차 유기용매 분획물에 Alzheimer 형 질환 유발의 중요한 원인중의 하나인 Aβ<sub>25-35</sub>에

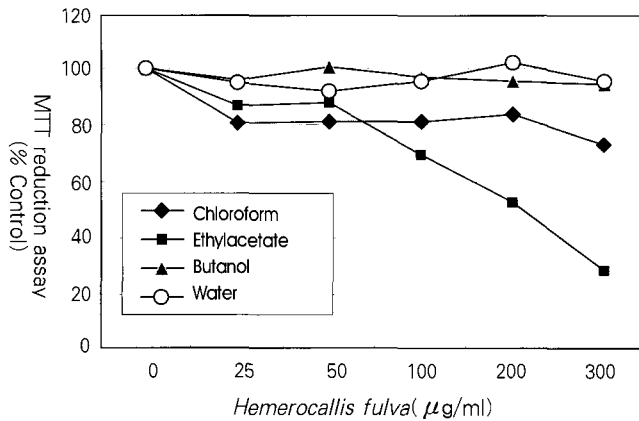


Fig. 2. MTT reduction assay for the measurement of cytotoxicity of organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted by methanol in PC 12 cells.

의하여 유발된 神經細胞의 損傷을 억제하는 효과가 있는지를 탐색하였다. 즉, 원추리 宿根의 2차 유기용매 분획물들을 300 µg/ml의 농도까지 처리하였을 때 1 µg/ml의 Aβ<sub>25-35</sub>에 의하여 유발된 PC12 세포에서의 독성이 억제되는 지를 비교 평가하였다(fig. 3). MTT reduction assay에 의하여 측정된 바와 같이, 원추리 宿根의 chloroform 분획물은 A

β<sub>25-35</sub>에 의하여 유발된 PC12 세포에서의 세포독성을 100 µg/ml의 농도까지는 적용한 농도에 의존적으로 강력하게 억제하는 효과가 있었으며 그 이상의 농도에서는 頂點水準(plateau)에 도달한 상태를 유지하였다. 즉, 원추리의 chloroform 분획물은 1 µg/ml의 Aβ<sub>25-35</sub>에 의하여 유발된 PC12 세포의 50%의 세포 생존율을 90% 수준으로 강하게

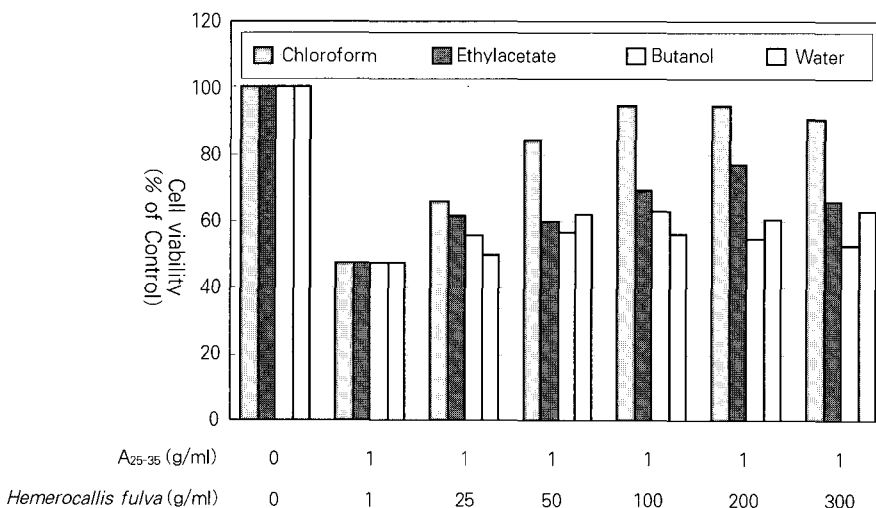


Fig. 3. Protective effects of organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions pre-extracted with methanol on Aβ<sub>25-35</sub>-induced toxicity in PC12 cells.

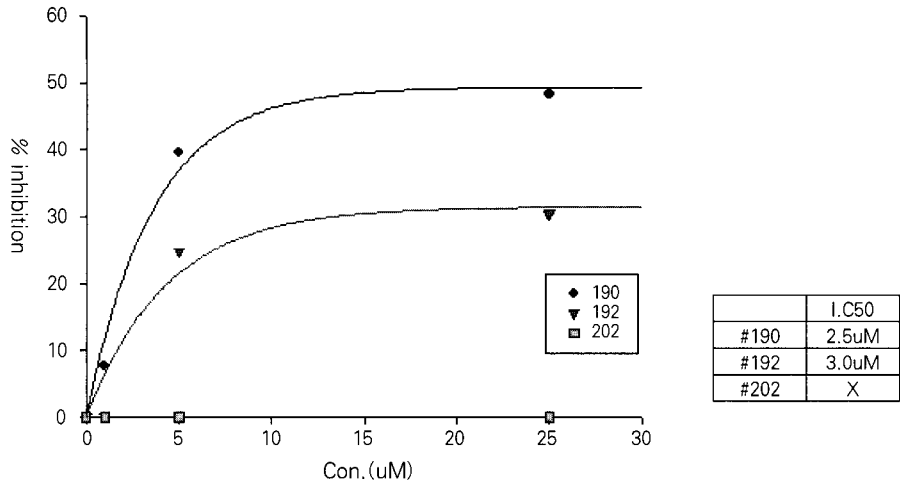


Fig. 4. Dose-dependent inhibition of BACE activity by its inhibitors. The assay for inhibitory activity of BACE was performed three times. The curves were fitted using SigmaPlot, yielding IC50 values.

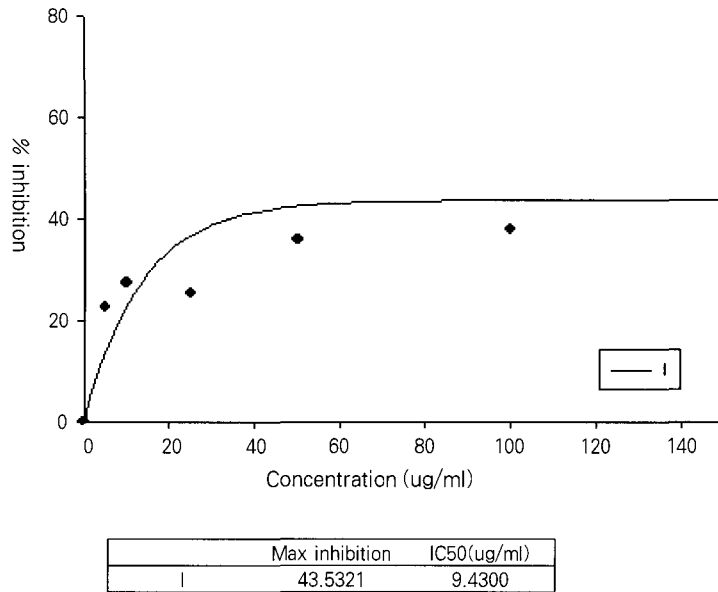
회복하는 효과를 보였다. 이러한 결과는, 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나, 원추리의 chloroform 분획물에는 A $\beta$ <sub>25-35</sub>에 의해 유도된 세포독성을 억제하거나 神經細胞를 보호하는 성분들이 존재함을 의미한다. 원추리 宿根의 ethylacetate 분획물 역시 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 단백질에 의한 神經세포 독성억제효과를 나타냈으나, chloroform 분획물의 억제효과 보다는 약했다. 원추리 宿根의 butanol 분획물과 물 분획물은 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 단백질에 의해 유도된 神經세포 독성을 억제하는 효과가 약했다.

### 3. 원추리 宿根類의 용매분획에 의한 아밀로이드 베타단백질 분해효소의 활성억제 효과 측정

원추리 宿根의 2차 유기용매 분획물이 아밀로이드 베타 단백질 분해효소( $\beta$ -secretase)의 활성을 억제하는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 cell-based  $\beta$ -secretase assay를 수행하였다. BACE에 대하여 阻害活性을 가지고 있으며, peptidomimetic compounds로서 알려져 있는 물질(#190, #192, #202)들을  $\beta$ -secretase의 표준 저해물질로 사용하였으며, 이를 원추리 宿根의 용매분획물에 의한  $\beta$ -secretase의

阻害活性을 비교 평가하는데 활용하였다(fig. 4). #190와 #192가  $\beta$ -secretase의 활성을 억제하는 정도는 2.5와 3.0  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub>값으로 나타났다. 한편, #202의 경우에는 적용한 범위의 농도 이내에서는 전혀  $\beta$ -secretase의 阻害活性을 나타내지 않았는데, 이 결과는 #202가 세포막을 통과하지 못하는 성질에 기인한 것으로 확인되었다.

Cell-based  $\beta$ -secretase assay system을 사용하여 원추리 宿根의 유기용매 분획물들의 BACE 阻害活性을 측정하였다. Fig. 5와 Fig. 6은 원추리 宿根의 메탄올 추출물로부터 순차 유기용매법으로 분획한 chloroform 분획물과 기타 유기용매 분획물들의 BACE 阻害活性을 나타낸 결과들이다. 원추리 추출물 역시 저 농도 범위 내에서 BACE에 대하여 강한 阻害活性을 나타내었으며, 이들의 IC<sub>50</sub> 값은 2.42~9.43  $\mu$ g/ml로서 용매 추출물들별로 BACE에 대한 阻害活性 효과는 차이를 나타내었다. 즉, 원추리 宿根의 순차 유기용매 분획들은 BACE에 대하여 비슷한 阻害活性을 보였으며, 이들 중에서 증류수로 분획한 물질이 BACE에 대하여 최고의 阻害活性을 보였으며, IC<sub>50</sub> 값은 butanol 분획물에서 가장 낮았다. 이 중에서 원추리 宿根



**Fig. 5.** Dose-dependent inhibitory potency of chloroform-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions to BACE. The assay for inhibitory activity of BACE was performed three times. The curves were fitted using SigmaPlot, yielding IC<sub>50</sub> values. Sample 1 corresponds to chloroform-extracts of *Hemerocallis fulva* root fraction pre-extracted with MeOH.

의 chloroform 추출물 분획물질의 경우는 다른 3종의 추출물에 비하여 다소 높은 IC<sub>50</sub> 값(9.43 μg/ml)을 나타내었으나, 적용한 농도의 전체 범위에서 농도 의존적으로 BACE 阻害活性을 나타내었음은 특이적인 현상이었다. 나머지 세 종류의 분획물들에는 본 실험에서 β-secretase의 標準阻害劑로서 사용한 #190 또는 #192의 阻害活性과 대등한 수준의 β-secretase의 阻害活性을 가지고 있는 물질이 존재함을 알 수 있었다. 특이적인 현상은 원추리 宿根의 메탄올 추출물로부터 분획한 용매별 2차 분획물의 높은 농도(50 μg/ml 이상의 농도)에서는 β-secretase의 阻害活性이 줄어드는 즉, 농도 의존적인 biphasic effect를 가지고 있었다. 이와 같이 원추리 宿根의 2차 용매분획물들은 BACE 阻害活性에 대하여 모두 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타낸 결과는 2차 유기용매 분획물 중에는 β-secretase의 활성을 효율적이면서 강력하게 阻害하는 成分이 존재함을 暗示한다.

## 고찰

최근에 발표된 연구논문에 의하면 神經細胞에 Aβ에 의해 유도된 산화적 스트레스가 癡呆發生의 중요한 원인 중의 하나로 밝혀졌다. 그래서 Aβ의 공격을 차단하는 것이 치매의 증상을 조절하고 치료하는 중요한 접근법으로 생각하고 있다. 최근에는 제약회사와 대학 및 연구소에서 치매 치료제의 개발을 위해 약용식물로부터 항산화 효과를 나타내는 성분을 분리하는 연구가 많이 진행되고 있다. 이들 중에서 癡呆의 治療劑로서 사용되기 시작한 성분들로는 *Ginkgo biloba* L<sup>28,29</sup>과 *Huperzia serrata* Travis<sup>30,31</sup>이 대표적인 경우이다. 이외에 *Curcuma longa* L로부터 분리한 curcuminoids 성분<sup>34</sup> 또한 치매의 치료효능이 있음이 보고되고 있다.

백합과 식물들 중에는 食用은 물론이며 민간 및 韓方療法에 사용되고 있는 많은 식물들이 존재한다. 본 연구에서도 이와 같은 연구추세를 반영

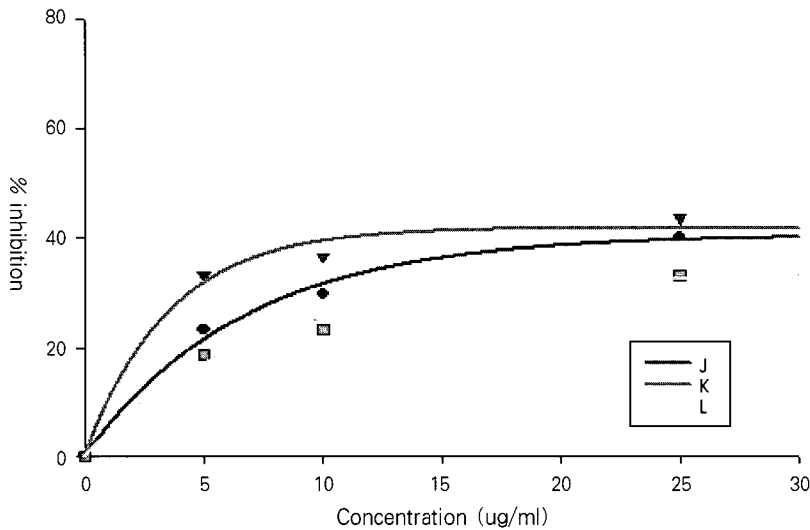


하여 이미 여러 가지 효능이 알려져 있는 국내에 자생하는 백합과 宿根類로부터 癡呆의 治療劑로서 가능성이 있으며 부작용이 없는 성분을 탐색하였다<sup>35)</sup>. 본 실험에서는 이들 식물들 중에서 원추리를 대상으로 癡呆 豫防 또는 치료효능물질을 탐색하기 위하여 A $\beta$  단백질에 의하여 유발된 PC12 cell에서의 독성을 억제하는 효능을 비교 검토하였다. 백합과 추출물들 중에서 애기원추리, 죽대 및 각시원추리 추출물은 200  $\mu$ g/ml 까지의 농도에서 SK-N-MC cell의 생존율이 100 - 120%를 유지함을 확인하였는데, 이러한 결과는 神經細胞의 성장과 분화를 촉진하는 효과가 이들 성분에 존재하기 때문인 것으로 판단된다. 이 분야에 관하여는 신경세포의 성장과 분화와 관련있는 호르몬의 분비와 전사인자 및 수용체들의 발현에 미치는 백

합과 추출물들의 효능연구 등 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구팀에서는 백합과 식물들 중에서 소엽맥문동, 각시원추리, 애기원추리, 하늘말나리 및 진황정의 메탄올 추출물에는 A $\beta$  peptide에 의해 유도된 신경세포의 손상을 억제하는 효능이 있음을 보고했다<sup>35)</sup>. 이러한 결과는 이들 백합과 추출물들에는 산화적 손상을 억제하는 효과에 의하여 신경세포를 보호할 가능성이 있는 성분들이 많이 존재할 것으로 예상하게 한다. 이를 위하여 이들 추출물들에 의한 지질 과산화 억제, 활성산소종의 제거, DNA 손상회복 및 세포사멸 억제효능 등을 확인함으로써 신경세포를 보호하는 기작이 규명될 수 있으리라 사료된다.

뇌에서의 老人斑 (amyloid plaque) 생성은 Alzheimer's



	Max inhibition	IC50(ug/ml)
J	40.4784	4.5813
K	41.8149	2.4244
L	33.5109	4.9369

**Fig. 6.** Dose-dependent inhibitory potency of organic solvent-extracts of *Hemerocallis fulva* root fractions to BACE. The assay for inhibitory activity of BACE was performed three times. The curves were fitted using SigmaPlot, yielding IC50 values. Samples J, K, and L correspond to butanol-, and water-extracts of *Hemerocallis fulva* fractions pre-extracted with MeOH, respectively.

disease의 중요한 病因으로 알려져 있는데, 이는 뇌 세포에서  $\beta$ -secretase가 amyloid precursor protein의  $\beta$ -site를 절단함으로써 membrane-bound carboxy-terminal fragment인 C99를 생성시키며, 이와 동시에  $\gamma$ -secretase가 C99를 또 다시 절단함으로써 생성된 A $\beta$ 가 세포막에 蓄積됨으로써 나타나는 현상이다. 따라서  $\beta$ - 또는  $\gamma$ -secretase 또는 두 효소 모두의 활성도를 억제하면 A $\beta$ 에 기인한 세포독성이 감소되는 機轉이 밝혀졌으며, 궁극적으로는 이 효소들이 Alzheimer's disease의 치료를 위한 주요한 target으로 인식되고 있다. 본 연구실에서는 박우진 교수 연구팀으로부터 분양받은 cell-based  $\beta$ -secretase assay system을 확립하였으며, 확립된 assay system에 우선적으로 BACE에 대하여 저해 활성을 가지고 있으며, peptidomimetic compounds로서 알려져 있는 물질(#190, #192, #202)들을 적용하여  $\beta$ -secretase의 저해활성을 평가함으로써 BACE inhibitor 탐색에 이용가능성을 확인하였다. 실험 결과 #190와 #192는 2.5와 3.0 M의 IC<sub>50</sub>값을 나타내었으며, 이들 두 BACE inhibitor에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 본 실험에서 positive control로서 사용하였다. #202의 경우에는 적용한 범위의 농도 이내에서는 전혀  $\beta$ -secretase의 저해활성을 나타내지 않았는데, 이 결과는 #202가 세포막을 통과하지 못하는 성질에 기인한 것으로 확인되었다.

본 연구결과로부터 백합과 宿根類로부터 癡呆豫防 또는 治療劑로서의 開發 可能性이 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 癡呆豫防 또는 治療劑로 사용되기 위해서는 백합과 宿根類 용매 분획으로부터 유효 단일성분 규명이 필요하고, 비록 癡呆 치료 효능이 좋은 식물성분이라고 할지라도 인체에 有害성을 나타내는지를 규명하기 위한 안전성실험이 반드시 필요하다. 이렇게 더 필요한 연구를 수행하여 알츠하이머병 치료제를 개발할 수 있다면 급증하고 있는 노인들의 삶이 질적으로 향상될 것이고 그로 인해 사회적으로 더 나아가 국가적으로 많은 이익을 가져올 것으로 기대한다.

## 결론

원추리 宿根類의 메탄올 추출물로부터 癡呆 예방 및 치료 효능이 있는 단일성분을 탐색하기 위하여 4종의 유기용매를 이용하여 순차 유기용매 방법으로 분획한 성분들에 대하여 아밀로이드 베타 단백질에 의하여 유발된 신경세포독성의 억제효능과  $\beta$ -secretase 활성 억제효능 정도를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 원추리 宿根의 물, butanol, 및 chloroform 분획물은 각각 적용한 최대 농도인 300  $\mu$ g/ml의 농도에서도 PC12 세포에 대한 독성이 약하거나 나타나지 않았으며, ethylacetate 분획물은 50  $\mu$ g/ml 농도까지는 세포독성이 나타나지 않았으나, 더 높은 농도에서는 농도의 존적으로 세포독성이 강하게 나타났다. Ethylacetate 분획물의 PC12 세포에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 217  $\mu$ g/ml로 결정되었다.
- 2) 원추리 宿根의 chloroform 분획물은 1  $\mu$ g/ml의 A $\beta$ <sub>25-35</sub>에 의하여 유발된 PC12 세포의 50%의 세포 생존율을 90% 수준으로 강하게 회복하는 효과를 보였다.
- 3) 원추리 宿根의 유기용매 분획물들은 50  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서  $\beta$ -secretase의 활성을 강하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아 원추리 宿根의 유기용매 분획물에는 아밀로이드 베타 단백질에 의하여 유도되는 신경세포의 손상을 억제하며  $\beta$ -secretase의 활성을 저해하는 유효성분이 존재할 것으로 추정된다.

## 참고문헌

1. Jiangxi Medical College, Dictionary of Chinese traditional medicine. 1986: 2327-2329.
2. Tobinaga, S., From my ethnopharmacochemical studies. Yakugaku Zasshi. 1999; 119(3): 185-198.
3. Cichewicz, R.H., Nair, M.G. Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant

- naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Hemerocallis*) flowers. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(1): 87-91.
4. Sarg TM., Salem SA., Farrag NM, Abdel-Aal MM, Ateya AM. Phytochemical and antimicrobial investigation of *Hemerocallis fulva* L. grown in Egypt. *Int. J. Crude Drug Res.* 1990; 28(2): 153-1456.
  5. Wang Q, Yang J.-X. Determination of anthraquinones and chrysophanol in radix *Hemerocallis*. *Zhongcaoyao.* 1990; 21(1): 12-13.
  6. Uezu, E. Effects of *Hemerocallis* on sleep in mice. *Psch.Clin.Neurosci.* 1998; 52(2): 136-137.
  7. Inoue T, Iwagoe K, Konishi, T, Kiyosawa S, Fujiwara Y. Novel 2,5-dihydrofuryl-lactam derivatives from *Hemerocallis fulva* L. var. *Kwanzo* Regel. *Chem. Pharm. Bull.* 1990; 38(11): 3187-3189.
  8. Inoue T, Konishi, T, Kiyosawa S, Fujiwara Y. 2,5-dihydrofuryl-lactam derivatives from *Hemerocallis fulva* L. var. *Kwanzo* Regel. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 42(1): 154-155.
  9. Konishi T, Inoue T, Kiyosawa S, Fujiwara Y. A 2,5-dimethoxytetrahydrofuran from *Hemerocallis fulva*, var. *Kwanzo*. *Phytochemistry.* 1996; 42(1): 135-137.
  10. Konishi T, Fujiwara Y, Konoshima T, Kiyosawa S, Nishi M, Miyahara K. Steroidal saponins from *Hemerocallis fulva* var. *Kwanzo*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001; 49(3): 318-320.
  11. Tabaton M, Cammarata S, Mandybur T, Richy P, Kawai M, Perry G, Gambetti, P. Senile plaques in cerebral amyloid angiopathy show accumulation of amyloid precursor protein without cytoskeletal abnormalities. *Brain Res.* 1992; 593(2): 299-303.
  12. Dickinson DW, Ksiezak-Reding H, Liu WK, Davies P, Crowe A, Yen SH. Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to subregions of tau protein; identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site. *Acta Neuropathol (Berl).* 1992; 84(6): 596-605.
  13. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 2000; 95(1): 1-4.
  14. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein, Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 1990; 250: 279-282.
  15. Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Mohanna F, Collison K, Ahu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D. An intracellular protein that binds amyloid-peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1997; 389: 689-695.
  16. Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell.* 1993; 75: 1039-1042.
  17. Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW. Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J. Neurochem.* 1997; 69: 1601-1611.
  18. Lorenzo A, Yankner BA. Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 777: 89-95.
  19. Hoshi M, Takashima A, Murayama M, Yasutake K, Yoshida N, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K. Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2038-2041.
  20. Harkany T, Lengyel Z, Soos K, Penke B,

- Luiten PG, Gulya K. Cholinotoxic effects of beta-amyloid (1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res.* 1995; 695: 71-75.
21. Gooch MD, Stennett D. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 1996; 53: 1545-1557.
  22. Kihara T, Shimohama S, Urushitani M, Sawada H, Kimura J, Kume T, Maeda T, Akaike A. Stimulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.* 1998; 792: 331-334.
  23. Henderson VW. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 48(5 Suppl. 7): S27-S35.
  24. Scott SA, Crutcher KA. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1994; 5: 179-211.
  25. Seiger A, Nordberg A, von Holst H, Backman L, Ebendal T, Alafuzoff I, Amberla K, Hartvig P, Herlitz A, Lilja A, Lundqvist H, Langstrom B, Meyerson B, Persson A, Viitanen M, Winblad B, Olson L. Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav. Brain Res.* 1993; 57: 255-261.
  26. Mattson MP. Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21: 193-206.
  27. Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience.* 1998; 87: 319-324.
  28. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Itil TM, Freedman AM, Schatzberg AF. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia, North American Egb Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* 1997; 278: 1327-1332.
  29. Oken BS, Storzbach DM, Kaye JA. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1998; 55: 1409-1415.
  30. Badia A, Banos JE, Camps P, Contreras J, Gorbis DM, Munoz-Torrero D, Simon M, Vivas NM. Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic. Med. Chem.* 1998; 6: 427-440.
  31. Skolnick AA. Old Chinese herbal medicine used for fever yields possible new Alzheimer disease therapy. *J. Am. Med. Assoc.* 1997; 277: 776.
  32. Bastinnetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by  $\beta$ -amyloid. *European J. Neuroscience.* 2000; 12: 1882-1890.
  33. Andrea Zangara, The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2003; 75: 675-686.
  34. Park SY, Kim DSHL. Discovery of natural products from Curcuma longa that protect cells from beta-amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J. Natural Products.* 2002; 65: 1227-1231.
  35. Kim ES, Choi SJ, Lee CW, Park KT, Moon JY. Protective effect of Liliaceae root extracts on amyloid  $\beta$ -protein-induced death in neuronal cells. *Cancer Prevention Res.* 2005; 10: 242-250.
  36. Oh M, Kim SY, Oh YS, Choi DY, Sin HJ, Jung IM, Park WJ. Cell-based assay for  $\beta$ -secretase activity. *Analytical Biochemistry.* 2003; 323: 7-11.