

산지별 맥문동 부탄올분획물의 신경성장인자 유도 효과에 관한 비교

강동호¹ · 김선여^{2*}

¹남부대학교 한방제약개발학과, ²경희대학교 동서의학대학원

Comparison of Nerve Growth Factor Induction by Butanol Fraction of *Liriope platyphylla* and *Ophiopogon japonicus*

Tong Ho Kang¹, Sun Yeou Kim^{2*}

¹Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea,

²Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Kyunggi 449-701, Korea.

Abstract – Nerve growth factor (NGF) is a protein plays a major role in the development and maintenance of central and peripheral nervous system. Recent data suggest that reduced availability of NGF may play a significant role in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy.¹⁾ In our previous study, steroidal saponin from *Liriope platyphylla* showed neurotrophic effect by stimulation of NGF synthesis and activation of tyrosine kinase signaling.²⁾ In this study, we examined the neurotrophic effect of *Liriope platyphylla* (LP); which was from Mylyang(MYL) and Cheongyang(CHE), and *Ophiopogon japonicus* (CHI) on in vitro and in vivo model for the comparison of their NGF induction. We quantitatively analyzed spicatoside A in the LP and CHI by HPLC. And we investigated the correlation between the contents of spicatoside A and NGF induction efficacy on PC 12 cells and mouse serum. These results suggest that spicatoside A may enhance NGF induction in animal model.

Key words – *Liriope platyphylla*, *Ophiopogon japonicus*, Nerve growth factor (NGF), mouse, spicatoside A

신경세포의 성장, 분화 및 사멸을 조절하는 신경조절인자로서, 중추신경계(central nervous system, CNS)와 말초신경계(peripheral nervous system, PNS)에서 뉴런(neuron)의 성장, 분화 및 생존에 영향을 미치는 단백질을 총칭하여 향신경성인자(neurotrophic factor, NF)라 한다. 향신경성인자는 뇌유래 신경성장인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 신경성인자(neurotrophin-3, NT-3), NT-4, NT-5등이 있다.³⁾ 이러한 신경성장인자들은 그 종류에 따라 합성되는 곳이나 분화, 발현되는 양상이 다르고 표적장소가 다르다. 향신경성인자는 신경세포의 사멸을 억제하며, 향신경성인자의 결핍은 이들의 단백질 합성(cell death related genes)에 의존하는 세포사멸을 발생시킨다.

향신경성인자 중 신경성장인자(NGF)는 뉴런퇴화 사멸을 억제함으로써 뉴런의 감소를 방지하며, 중추신경계에서 신경세포의 손상을 보호하는 작용을 하고, 성숙한 신경원 유지에 중요한 역할을 한다.^{4, 5)} 신경계의 정상적인 발생 과정에서 발생중인 뉴런의 약 50%는 세포사멸에 의해 제거되며,⁶⁾

표적 세포에 의해 분비되는 신경성장인자들이 뉴런의 생존을 결정한다고 알려져 있다. 신경세포가 정상상태에서 생존, 성장, 분화하기 위해서는 신경성장인자와 같은 성장촉진인자들이 필수적으로 요구된다고 할 수 있다

이러한 신경성장인자의 유용성으로부터 당뇨병성 신경병증 치료를 목적으로, 유전자조합 인간 신경성장인자(Recombinant Human Nerve Growth Factor)의 개발이 시도된 바 있으나, 안전성 및 유효성 측면에서 아직 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있다.⁷⁾

저자 등은 이미 C6 glioma와 primary astrocyte 세포에서 맥문동부탄올분획물이 신경성장인자유도 효과가 있음을 보여주었다.²⁾ 맥문동은 전통적으로 양음윤폐(養陰潤肺), 청심제번(淸心除煩), 익위생진(益胃生津) 및 윤장통변(潤腸通便) 등의 효능으로 음허해수(陰虛咳嗽), 불면(不眠), 소갈(消渴), 변비(便秘) 등에 사용되었다.⁸⁾

약리작용으로는 호흡기계에서 기관지 점액의 분비 및 섬모운동을 촉진시키고,⁹⁾ 심혈관계에서는 맥문동의 총 saponin이 심장부정맥을 억제시키는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 항균, 항암 작용과 면역증강 및 혈당 저하 작용도 보고되고 있다.¹¹⁾

*교신저자(E-mail): sunnykim@khu.ac.kr
(FAX) 031-202-7619

맥문동의 성분들은 steroidal saponin으로서 ruscogenin 배당체인 ophiopogonin A, B, C 및 D가 함유되어 있다고 보고되어 있다.¹²⁾ 최근 허등은 steroidal saponin의 하나인 spicatoside A가 맥문동의 신경성장인자 유도 효과의 주요 성분으로 추정하였다.²⁾ 따라서 본 연구는 중국산 소엽맥문동, 국내산 청양 맥문동, 밀양 맥문동의 부탄올 분획과 steroidal saponin인 Spicatoside A의 함량과의 관계를 살펴보고 이들의 신경성장인자 유도 효과를 통하여 *In vitro* 실험과 *In vivo* 동물실험에서 비교하여 그 상관성 여부를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 실험동물 - Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS), penicilline-streptomycin (PS), and NGF는 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였고, NGF mouse antibody는 Chemicon (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. 기타 시약들은 ACS 급 시약을 사용하였다. Spicatoside A는 Kang의 방법¹³⁾으로 분리하여 표준품으로 사용하였다.

모든 동물실험 과정은 Principle of Laboratory Animal Care (NIH publication, #85-23, revised 1985)와 Animal Care and Use Guidelines of Kyunghee University, Korea의 규정에 따라 수행하였다. 실험 동물은 ICR 마우스 웅성 7주령을 중앙 실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용했다. 모든 동물들은 22±2°C으로 조절된 온도에서 12시간 간격으로 조명을 켜 환경에서 사육하였다. 동물들은 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

실험방법

맥문동부탄올분획 제조 - 밀양맥문동, 청양맥문동, 중국산 소엽맥문동은 각각 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 경희대학교 육창수 교수의 감정 후 실험에 사용하였으며, 표품은 경희대학교 동서의학대학원(표본 번호 LP 04-01, 04-02, 04-03)에 보관하였다.

건조 맥문동 1kg을 MeOH로 3회 추출하고 여액을 감압 농축하여 MeOH extract 66.5g을 얻었다. 이를 ethylacetate (EtOAc)와 수포화 Butanol (BuOH)로 단계적으로 용매분획하여 BuOH분획물 3.1g을 얻었다.

산지별 맥문동 Spicatoside A의 HPLC 분석 - 밀양, 청양, 중국 맥문동 부탄올 건조 추출물을 각각 50mg씩 칭량하여 메탄올 5ml에 녹인 후 여과하여 HPLC 분석용 검액으로 사용하였다. Spicatoside A 1mg을 메탄올 1ml에 녹인 후 여과하여 HPLC 분석용 표준액으로 사용하였다. Table

Table I. HPLC analysis condition of Spicatoside A concentration

Mobile Phase	46% Acetonitrile
Column	YMC(ODS), 25cm, 4 μm, temp. 30°C
Injection volume	10 μl of 10 mg/ml
Detection	UV 208 nm

의 조건으로 HPLC 분석을 수행하였다.

PC12 cell 에서 신경돌기 성장 효과 - PC12 세포는 Rat pheochromocytoma cell line이라 하며 크롬친화성 세포종으로 epinephrine, norepinephrine등 신경전달물질의 분비가 활발하여 신경계 연구에 많이 사용되고 있다.¹⁴⁾ PC12 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 말 혈청(Horse serum 10%, v/v), 우태아 혈청(Fetal bovine serum 5%, v/v) 그리고 1% 페니실린 스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 미분화 된 PC12 세포에서 시료의 신경돌기 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, PC12 세포를 폴리-D-라이신(Poly-D-lysine)으로 코팅한 6 웰 플레이트에 2% 말 혈청(horse serum), 1% 페니실린 스트렙토마이신 배지조건으로 웰당 5×10⁴개로 분주하여, 24시간 후에 에탄올 10 μl/ml, 밀양, 청양, 중국산 맥문동 부탄올 분획 추출물을 각각 10 μg/ml 와 NGF 50 ng/ml 을 각각 처리하였다. 신경돌기(neurite)의 길이는 시료 처리 후 48시간 후에 도립 상대비 현미경(CK-2, Olympus, USA)을 이용하여 측정하였다. 신경돌기의 성장은 세포 몸체의 직경에 대한 신경돌기 길이의 비로 환산하였다.

NGF antibody에 의한 맥문동의 신경돌기 성장에 대한 효과 - C6 glioma 세포 (rat astrocyte cell)에 우태아 혈청(Fetal bovine serum 10%, v/v) 그리고 1% 페니실린 스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 포함된 DMEM 배지에 산지별 맥문동 부탄올분획 추출물을 각각 10 μg/ml 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액을 취한 후 NGF antibody를 0.5 μg/ml 농도로 배양액에 가하고 4°C에서 24시간 반응시켰다. PC 12 세포를 NGF antibody를 가한 배양액으로 72시간 배양한 후 신경돌기(neurite)의 길이를 도립 상대비 현미경(CK-2, Olympus, USA)을 이용하여 측정하였다. 신경돌기의 성장은 세포 몸체의 직경에 대한 신경돌기 길이의 비로 환산하였다.

동물모델에서 신경성장인자(NGF) 분비 촉진 검색법 - 마우스의 혈청 중 신경성장인자는 ELISA Kit (R&D system, USA) 방법에 의해 측정하였다.¹⁵⁾ 대조군, 밀양, 청양, 중국산 맥문동 부탄올 분획 추출물을 각각 100 mg/kg, 1 mg/kg 용량으로 웅성 아이씨알 마우스 7주령에 1회 경구투여하고 12시간 후 안정맥에서 혈청을 채취하여 내인성 신경성장인자 양을 측정하였다.

통계처리 - 통계처리는 Prism 4.0 (GraphPad Software,

Inc. USA) 프로그램을 사용하였고, 모든 데이터는 mean± standard error mean (S.E.M.)으로 나타내었고, 유의성 검정은 Student's t-test로 수행하였으며 p<0.05 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

산지별 맥문동중 Spicatoside A의 함량 - 각 산지별 맥문동의 부탄을 분획물을 HPLC Table I의 조건으로 분석하여 spicatoside A의 peak를 얻었다. (data not shown) spicatoside A 표준품으로 calibration curve를 작성하고 correlation coefficient r²=0.999의 직선성을 얻은 후, 산지별 맥문동 중 spicatoside A의 농도를 구하였다. 밀양산(MYL), 청양산(CHE), 중국산(CHI) 맥문동 중 spicatoside A의 함량은 0.02%인 밀양산이 가장 높고 청양산 맥문동은 0.01%를 함유하고 있었으며, 중국산 맥문동은 spshinicoside A가 검출되지 않았다(Table II). 이러한 결과는 shin의 한국산 맥문동과 중국산 맥문동의 사포닌 성분 비교연구에서 중국산 소엽맥문동(*Ophiopogon japonicus*)의 부탄을 분획 추출물을 HPLC분석 하였을 때 Spicatoside A가 검출되지 않았다는 결과와 일치함을 보여주었다.¹⁶⁾ 그리고 맥문동의 기원과 산지의 차이는 사포닌 성분에 차이를 나타내므로 맥문동의 여러가지 약리작용에 영향을 줄 것으로 사료된다.

PC12 cell에서 신경돌기 성장 효과 - 미분화된 PC12 세포에서 시료의 신경돌기 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PC12 세포에 각 산지별 맥문동 부탄을 추출물을 10 µg/ml 농도로 투여한 후 신경돌기의 성장 길이를 측정하여 신경돌기 성장효과를 평가하였다. 신경성장인자(NGF)의 신경돌기 성장효과를 100%라고 하였을 때 밀양산 맥문동은 81%의 신경돌기 성장을 나타내 가장 높은 효과를 보였고, 청양산 맥문동은 54%, 중국산 맥문동은 22%의 신경돌기 성장촉진 효과를 나타냈다. 그리고 대조군과 비교하였을 때 밀양산 맥문동은 225%, 청양산 맥문동은 119% 유의적인 신경돌기 성장효과를 보여주었다. 그러나 중국산 맥문동은 대조군과 비교하여 -11%의 신경돌기 성장을 나타내 비슷한 수준이었다 (Fig. 1). 향신경성 인자중 하나인 NGF는 생체 내에서 생성되는 단백질로서 PC12 세포를 분화시키는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 이미 맥문동의 spicatoside A는 PC12 세포에서 신경돌기 분화에 관여하는 성분이고 이러한 작용이

Table II. Content of spicatoside A in *L. platyphylla* and *O. japonicus*

	MYL (<i>L.platyphylla</i>)	CHE (<i>L.platyphylla</i>)	CHI (<i>O.japonicus</i>)
Contents(%)	0.02±0.001	0.01±0.0003	N.A.

MYL: Milyang, CHE: Cheongyang, CHI: China, N.A.: Not available

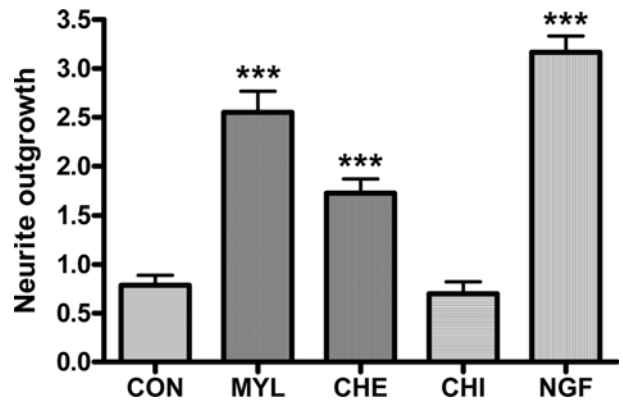


Fig. 1. Effect of MYL, CHE, and CHI on the neurite outgrowth from PC12 Cells

PC12 cells were incubated for 24 h in RPMI1640 containing 10% HS and 5% FBS, and then PC12 cells were cultivated in the sample-treated for 48 h. Randomly selected fields were taken using a camera attached to a microscope. The differentiation of PC12 cells was scored as follows: cells without neurite outgrowth; 0, cells bearing neurite as long as one cell diameter; 1, cells bearing neurite two times longer length than their diameter; 2, and cells which had a synapse-like neurite; 3, Cells were photographed using a phase-contrast light microscope (×100). The results are expressed as the mean ± S.E.M. Three independent experiments were carried out. CON: control sample with EtOH 10 µg/ml, MYL: Milyang 10 µg/ml, CHE: Cheongyang 10 µg/ml, CHI: China 10 µg/ml, NGF: Human beta Nerve Growth Factor 50 ng/ml The asterisks indicate a significant difference from the treatment with media conditioned by vehicle (***)p<0.001.

내인성 NGF 분비에 기인한다고 보고하였다.²⁾ 그래서 산지가 서로 다른 맥문동 부탄을 분획물의 PC12 세포의 신경돌기 성장효과와 spicatoside A 함량과의 상관성을 분석하였다.

따라서 이러한 유의적인 상관계수는 산지별 맥문동 부탄을 분획물의 신경돌기분화능이 서로 상이하며 이러한 원인 중 하나는 Spicatoside A의 함량에 기인한다고 할 수 있을 것이다.

NGF neutralization에 의한 맥문동의 신경돌기 성장에 대한 효과

- 산지별 맥문동 부탄을 분획을 C6 glioma 세포 (rat astrocyte cell)에 가하여 생성된 NGF함유 배지에 NGF antibody 투여한 후 각각 PC12 세포의 신경돌기 성장효과를 비교하였다. 중국산 맥문동 부탄을 분획물(CHI)의 경우 antibody 투여군과 비투여군 모두 신경돌기 성장이 나타나지 않았다. 그러나 청양 맥문동 부탄을 분획물(CHE) 및 밀양 맥문동 부탄을 분획물(MYL)은 NGF antibody 비투여군은 NGF antibody 투여군과 비교하여 각각 366%, 452% 유의적으로 PC12 세포의 신경돌기 성장을 촉진시켰다 (Fig. 2). 이 결과는 청양 맥문동(CHE)과 밀양 맥문동(MYL)의 NGF 분비를 촉진시키는 작용이 PC12 세포의 신경돌기를 성장시키는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 Spicatoside A

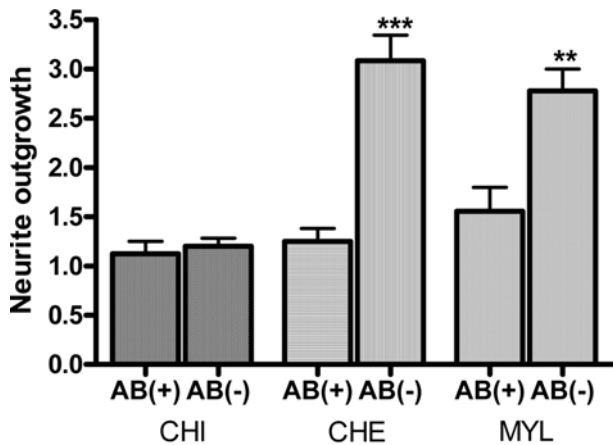


Fig. 2. Effect of NGF Antibody on Neurite Outgrowth in PC12 Cells

After C6 cells were incubated with sample treated media for 24 h, PC12 cells were incubated in the conditioned media in the presence or absence of NGF antibody 0.5 μ g/ml for 72 h. The differentiation of PC12 cells was scored according to the method described in Fig. 1. The results are expressed as the mean \pm S.E.M. Three independent experiments were carried out. MYL: Milyang 10 μ g/ml, CHE: Cheongyang 10 μ g/ml CHI: China 10 μ g/ml, AB(+): Presence of NGF antibody, AB(-): Absence of NGF antibody. The asterisks indicate a significant NGF antibody difference from the treatment with conditioned media plus NGF antibody (** p <0.01, *** p <0.001)

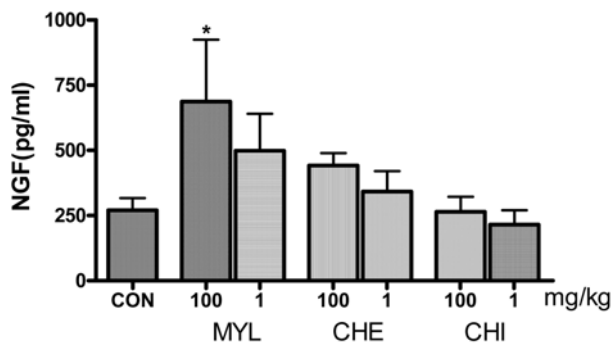


Fig. 3. Effect of MYL, CHE, and CHI on NGF induction in mouse serum

Animal : ICR mouse, male, 7 weeks. CON (n=5): Vehicle 0.1 ml *p.o.*, MYL(n=5): Milyang 100 mg/kg, 1 mg/kg *p.o.*, CHE(n=5): Cheongyang 100 mg/kg, 1 mg/kg *p.o.*, CHI(n=5): China 100 mg/kg, 1 mg/kg *p.o.*, (n=5): 10 mg/kg DG *p.o.* The serum was collected after 12 hour *p.o.* administration of samples. NGF assay was performed by ELISA method (R&D system, USA) The values represent the mean (%) \pm SEM of the each group *Significantly different from the control group (P <0.05)

의 함량과 NGF 분비능력은 용량의존적 상관성을 보여주지 못하였다. 이러한 결과는 아마도 Hur 등의 연구에서 이미 논의한 바와 같이 맥문동 부탄을 분획물 자체가 PC12 세포

에 직접 작용하는 NGF mimic 효과로 기인한다고 생각된다.²⁾

동물모델에서 신경성장인자(NGF) 분비 촉진 검색법 - *In vivo* 마우스 모델에서 산지별 맥문동 부탄을 분획의 NGF 분비 효과를 확인하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 마우스에서 밀양 맥문동 부탄을 분획 투여군은 대조군에 비하여 100 mg/kg와 1 mg/kg의 투여 용량에서 NGF 분비를 각각 154%와 84% 증가시켰으며, 투여 용량에 비례하여 NGF의 분비도 촉진되는 경향을 보여주었다. 청양 맥문동 부탄을 분획 투여군은 대조군과 비교하여 100 mg/kg와 1 mg/kg의 투여용량에서 각각 64%와 27% NGF 분비가 증가하였고 투여용량에 비례하는 NGF 분비 효능을 보여 주었다 (Fig. 3). 중국산 맥문동 부탄을 분획 투여군의 경우 NGF 분비량이 대조군과 차이가 없었으며 투여용량에 따른 NGF분비에도 차이가 없음을 보여 주었다. 그리고 맥문동 부탄을 분획을 경구 투여할 때 NGF 분비능은 중국, 청양, 밀양산 맥문동 순서로 증가하여 Spicatoside A 함량과 용량의존적인 상관성을 보여주었다.

결론

중국산, 청양산, 밀양산 맥문동 부탄을 분획물의 신경성장인자 유도효과를 *In vitro* 실험과 *In vivo* 실험 모델에서 그 효과를 비교 결과를 종합하면 다음과 같다.

1. 각 시료중의 스테로이드성 사포닌의 하나인 Spicatoside A의 함량은 밀양산 맥문동이 청양산 맥문동 보다 2배 많이 높았고, 중국산 맥문동의 경우 Spicatoside A를 함유 하지 않았다.

2. PC12 cell에서 신경돌기 성장 효과는 밀양산 > 청양산 > 중국산 맥문동 부탄을 분획 순서대로 그 효과가 높았다.

3. NGF neutralization에 의한 맥문동의 신경돌기 성장에 대한 효과는 청양산 맥문동과 밀양산 맥문동 부탄을 분획에서 유의적으로 증가하였다.

4. *In vivo* 동물모델에서 신경성장인자(NGF) 분비 촉진 효과는 밀양산 > 청양산 > 중국산 순서로 신경성장인자 분비 유도를 증가 시켰다.

5. 따라서 산지별 맥문동 부탄을 분획의 신경성장인자 분비 효과는 스테로이드성 사포닌의 하나인 Spicatoside A의 함량과 상관성이 있을 것으로 추정되며 명확한 상관성을 확인하기 위해서는 spicatoside A 단일 물질로 연구를 추후 수행함이 필요할 것 이다.

사사

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사 드립니다(KRF-2006-003-E00451)."

인용문헌

1. Steinbacher, B. C., Jr. and Nadelhaft, I. (1998) Increased Levels of Nerve Growth Factor in the Urinary Bladder and Hypertrophy of Dorsal Root Ganglion Neurons in the Diabetic Rat. *Brain Res.* **782**: 255-60.
2. Hur, J., Lee, P., Kim, J., Kim, A. J., Kim, H. and Kim, S. Y. (2004) Induction of Nerve Growth Factor by Butanol Fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and Primary Astrocyte Cells. *Biol Pharm Bull.* **27**: 1257-60.
3. Maness, L. M., Kestin, A. J., Weber, J. T., Banks, W. A., Beckman, B. S. and Zadina, J. E. (1994) The Neurotrophins and Their Receptors: Structure, Function, and Neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* **18**: 143-59.
4. Hefti, F. (1986) Nerve Growth Factor Promotes Survival of Septal Cholinergic Neurons after Fimbrial Transections. *J Neurosci.* **6**: 2155-62.
5. Levi-Montalcini, R. and Booker, B. (1960) Destruction of the Sympathetic Ganglia in Mammals by an Antiserum to a Nerve-Growth Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **46**: 384-91.
6. Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993) Programmed Cell Death and the Control of Cell Survival: Lessons from the Nervous System. *Science.* **262**: 695-700.
7. Apfel, S. C., Schwartz, S., Adornato, B. T., Freeman, R., Biton, V., Rendell, M., Vinik, A., Giuliani, M., Stevens, J. C., Barbano, R. and Dyck, P. J. (2000) Efficacy and Safety of Recombinant Human Nerve Growth Factor in Patients with Diabetic Polyneuropathy: A Randomized Controlled Trial. Rhngf Clinical Investigator Group. *JAMA.* **284**: 2215-21.
8. 김호철 (2001) 한약약리학. 집문당.
9. Tai, S., Sun, F., O'Brien, D. W., Lee, M. S., Zayas, J. G. and King, M. (2002) Evaluation of a Mucoactive Herbal Drug, Radix *Ophiopogonis*, in a Pathogenic Quail Model. *J Herb Pharmacother.* **2**: 49-56.
10. Chen, M., Yang, Z. W., Zhu, J. T., Xiao, Z. Y. and Xiao, R. (1990) [Anti-Arrhythmic Effects and Electrophysiological Properties of *Ophiopogon* Total Saponins]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* **11**: 161-5.
11. Zhu, Y. P. (1998) Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications. Harwood Academic Publishers.
12. Asano, T., Murayama, T., Hirai, Y. and Shoji, J. (1993) Comparative Studies on the Constituents of *Ophiopogonis* Tuber and Its Congeners. VIII. Studies on the Glycosides of the Subterranean Part of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler Cv. *Nanus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **41**: 566-70.
13. Lee, D. Y., Son, K. H., Do, J. C. and Kang, S. S. (1989) Two New Steroidal Saponins from the Tubers of *Liriope spicata*. *Arch. Pharm. Res.* **12**: 295-299.
14. Martin, T. F. and Grishanin, R. N. (2003) Pc12 Cells as a Model for Studies of Regulated Secretion in Neuronal and Endocrine Cells. *Methods Cell Biol.* **71**: 267-86.
15. Zettler, C., Bridges, D. C., Zhou, X. F. and Rush, R. A. (1996) Detection of Increased Tissue Concentrations of Nerve Growth Factor with an Improved Extraction Procedure. *J Neurosci Res.* **46**: 581-94.
16. Shin, J. S. (2002) Saponin Composition of *Liriope platyphylla* and *Ophiopogon japonicus*. *Korean J. Crop Sci.* **47(3)**: 236-239.
17. Levi, A., Biocca, S., Cattaneo, A. and Calissano, P. (1988) The Mode of Action of Nerve Growth Factor in Pc12 Cells. *Mol Neurobiol.* **2**: 201-26.

(2007년 11월 21일 접수)