

Screening of Natural Product Libraries for the Extension of Cell Life-span through Immune System

Bo-Kyung Yoo^{1†}, Kisang Kwon^{2†}, Young Hwa Ko¹, Hong Geun Kim³, Seokhyun Lee⁴, Kwan-Ho Park⁴, Ji-Young Choi⁴ and O-Yu Kwon^{1*}

¹Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

³Department of Life Sciences, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

⁴Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun 55365, Korea

Received February 4, 2016 / Revised February 12, 2016 / Accepted February 12, 2016

We have screened four natural products against 640 single compounds, which shows more two folds gene expression for both endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) and FOXO-family transcription factor (FOXO1). The results were as follows. (±)-Car-3-ene-2,5-dione from *Asarum sieboldii* Miq. is C₁₀H₁₂O₂ molecular formula and the 164 kDa molecular weight. Cinobufagin from *Bufo venennum* is C₂₆H₃₄O₆ molecular formula and 442 kDa molecular weight. So far reported main biological function is Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. Corilagin from *Euphorbia pekinensis* is C₂₇H₂₂O₁₈ molecular formula and 634 kDa molecular weight. Carbonic anhydrase inhibition is well known its biological function. Corydaline from *Corydalis turtschaninovii* is C₂₂H₂₇NO₄ molecular formula and 369 kDa molecular weight. The main biological function is acetylcholinesterase inhibition. In the short future, four types of natural products will be used in longevity experiments with insects. The results may give one of the clues for studying new drug development candidates of the longevity.

Key words : Cell life-span extension, (±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin, Corydaline

서 론

의약품소재로서 천연물은 동서양을 막론하고 오래 전부터 사용되고 있으며 임상적으로 효과가 증명되고 있다. 그래서 천연물을 그 자체로서 1차 의약품으로 활용하고 있는 나라가 많이 있다. 이런 이유로 글로벌 제약회사들은 천연물을 신약 개발에 중요한 원천소재로서 사용하고 있다. 합성신약은 화합물구조의 다양성에 한계를 가지고 있어 신약개발의 장애가 되고 있다. 그러나, 천연물신약은 경험적인 안정성(stability), 안전성(safety)과 유효성(effectiveness)이 입증된 생약을 사용하기 때문에 부작용이 적어 개발비용과 기간을 줄일 수 있다. 한국도 2001년을 시작으로 천연물신약연구개발촉진계획이 수립되어 만성질환, 난치성질환, 노인성질환을 중심으로 천연물신약개발이 본격화 되었다.

Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1)는 세포 내 소기관인 endoplasmic reticulum (ER) 내에서 최종적으로

활성을 가지는 단백질이 되기 위한 과정과 이동에 관여한다. 그러나 전형적인 ER내 단백질이 가지는 ER retention signal motif인 KDEL sequence는 가지고 있지 않다. ERAP1는 ER을 떠나서 exosome-like vesicle 혹은 extracellular 공간에 존재한다. 그리고 ERAP1는 여러 종류의 cytokine receptor (type 1 tumour necrosis factor receptor; TNF-R1, interleukin-6 receptor a; IL-6Ra, type 2 interleukin-1 receptor; IL-1R2)와 결합하고 있다. ERAP1에 의해서 절단된 receptor ectodomain의 세포외분비에도 중요한 역할을 하며(ectodomain shedding), 세포외로 분비된 ERAP1는 macrophage를 활성화시켜서 phagocytic activity를 촉진시킨다. 또 다른 ERAP1의 면역관련 중요한 기능은 MHC class I ligand 생성을 도와 CD8을 가진 antigen present cell에 의한 인식에 필수적인 역할을 담당한다[2, 5, 6]. FOXO1 (FOXO-family transcription factor)는 insulin signaling을 target으로 하며 oxidative stress에 대응하여 metabolic homeostasis를 조절한다. 특히 *Caenorhabditis elegans* 돌연변이 실험에서 FOXO1는 life-span extension을 조절하는 핵심유전자로 밝혀짐으로 인하여 mammalian longevity와 cancer/diabetes와 같은 age-related diseases측면에서 크게 주목을 받고 있다[4, 8, 9]. 본 연구에서 ERAP1 & FOXO1 유전자발현을 각각의 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) RT-PCR 실험 후에 전기영동하여 생긴 밴드의 강약 정도를 control 과 비교하여 정량화하였다; ERAP1 & FOXO1 유전자가 동시에 1.5배, 2배 이상 상승한 것을 다음 실험을

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위한 1차후보군으로 선정하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 RNA 분리

PC12 세포(KCLB 21721, Korean CellLine Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 쥐의 pheochromocytoma로부터 유도된 것을 사용하였다. PC12세포를 25 mM HEPES, 25 mM sodiumbicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 천연물 라이브러리는 한약진흥재단(NIKOM)에서 제공받았으며, 총 640개의 물질을 DMSO를 용매로 하여 1 mg/ml의 농도로 제공되었으며, 각 세포에 적용된 최종 농도는 10 µg/ml/day로 처리되었다. Total RNA분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 각종 천연물을 처리한 PC12세포를 1.5 ml tube에 넣고 500 µl의 RNA isolation buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 100 µl의 chloroform을 넣어 충분히 섞어주었다. 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 약 250 µl의 상등액을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 실온에서 10분 정도 침전반응 유도한 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하고, 75% ethanol을 500 µl로 세척하여 total RNA를 얻어 RNase-free water로 녹인 후 nonodrop (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량하였다.

RT-PCR 및 분석

ERAP1 & FOXO1 유전자에 해당하는 primer를 이용하여

reverse transcription-PCR을 수행하였다. 본 실험에 사용된 primer는 다음과 같다. ERAP1-F 5'-GCC TGA AGA ACC ACT GAA GC-3' & ERAP1-R 5'- AGC AGC TGT GGG TTC AAA CT-3', FOXO1-F 5'-AAC CAG CTC AAA CGC TAG CAC CAT C-3', FOXO1-R 5'-CAG AAG GTT CTC CAT GTT TTC TGG A-3'. Total RNA 3 µg과 oligo-dT를 섞어 80°C에서 3분 동안 열 변성 시킨 후, 10 x buffer, dNTP, MML-V, RNase inhibitor 등이 포함된 용액과 혼합하여 42°C에서 90분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증폭시키기 위해서 해당 primer를 이용하여 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초로 28회 반응하여 전기영동으로 확인하였다. 전기영동 결과 생성된 PCR 밴드측정의 강약측정은 모두 3회 반복 실시한 평균값이다.

결과 및 고찰

한약진흥재단(NIKOM)에서 640개 천연물 라이브러리를 제공받아서 PC12세포에 10 µg/ml/day로 처리하였다. 면역강화에 관여하는 ERAP1와 수명연장에 관여하는 FOXO1 유전자발현을 RT-PCR로 확인하였다. 각각의 유전자발현이 1.5배와 2배 이상 상승한 것을 대상으로 정리하였다. ERAP1유전자를 1.5-2배까지 상승시킨 것은 22개였다. 2배 이상 발현시킨 것은 14개였다. FOXO1 유전자를 1.5-2배까지 상승시킨 것은 총 24개였다. 2배 이상 발현시킨 것은 4개였다(Table 1).

ERAP1와 FOXO1 유전자를 함께 1.5-2배까지 상승시킨 것은 13 개였다(Table 2). (-)-Maackiain은 H1R and IL-4 유전자 발현 억제조절을 통하여 알러지를 완화시키는 생물학적 기능이 보고 되어있다[13]. 23-O-acetylshengmanol-xyloside의 생물학적 기능에 관한 연구는 없지만 C₃₇H₅₈O₁₀의 분자식으로

Table 1. The summary of the NIKOM-natural product libraries for the gene expression of ERAP1 and FOXO1

	Fold	Plate #	Plate ea. #											Total number			
ERAP1	1.5 fold	1	A1	A6	A8	A9	A10	E3	E7	F4	F8	F9	F10	22			
		5	A3	C2	C5	C10	D3	D6	E5	E6	E7	E8	E9				
ERAP1	2 fold	1	A3	E2	E4	E5	E6	E8	E9	E10	F3	F5	14				
		5	C1	C6	C7	D1											
FOXO1	1.5 fold	1	A1	A4	A8	A9	A10	C4	C5	C6	C7	C9	C10	E4	F4	G3	24
		5	A5	A6	A7	A8	A9	H7									
	6	G6	G8	G9	G10												
FOXO1	2 fold	1	A3	E6	E8	E9								4			
ERAP1& FOXO1	1.5 fold	1	A1	A8	A9	A10	E2	E4	E10	F4				13			
		5	A5	A6	A7	A8	A9										
	2 fold	1	A3	E6	E8	E9							4				

PC12 cells were cultured in 96-well plates using RPMI 1640 medium at 37°C/5% CO₂ conditions. Following 24 hr of incubation, they were treated with each natural product (10 µg/ml) for 24 hr. Isolated total RNA was used for the RT-PCR experiments. In this table, it has been only summarized to ERAP1 & FOXO1 gene expression over 1.5 fold.

Table 2. This is summarized that the genes, ERAP1 & FOXO1, is expressed in the 1.5~2 fold in common

No.	Plate #	Library #	Scientific name	Substance
1	A01	1	<i>Sophora flavescens</i>	(-)-Maackiain
2	A08	8	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	23-O-acetylshengmanol-xyloside
3	A09	9	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	27-Deoxyactein
4	A10	10	<i>Scutellariae Radix</i>	2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone
5	E02	42	<i>Acanthopanax Root Bark</i>	Chiisanoside
6	E04	44	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	Cimicifugoside H-1
7	E10	50	<i>Corydalis Tuber</i>	Corynoline
8	F04	54	<i>Curculiginis Rhizoma</i>	Curculigoside
9	A05	999	<i>Pulsatillae Radix</i>	Methyl rosmarinatate
10	A06	1000	<i>Piperis Nigri Fructus</i>	Gibbilimbol A
11	5 A07	1001	<i>Ganoderma</i>	Ganoderic acid C1
12	A08	1002	<i>Ganoderma</i>	Ergosterol peroxidel
13	A09	1003	<i>Caesalpiniae Lignum</i>	3-Deoxysappanchalcone

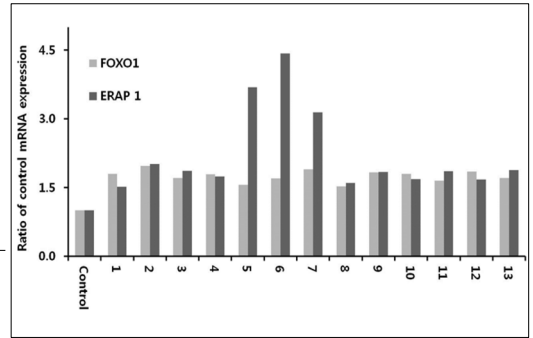
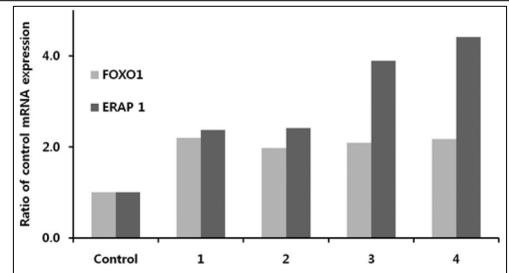


Table 3. It was organized to ERAP1 & FOXO1 genes expressing in common than the height 2 fold

No.	Plate #	Library #	Scientific name	Substance
1	A03	3	<i>Asiasari radix</i>	(±)-Car-3-ene-2,5-dione
2	E06	46	<i>Bufois venenum</i>	Cinobufagin
3	E08	48	<i>Euphorbiae pekinensis</i>	Corilagin
4	E09	49	<i>Corydalis tuber</i>	Corydaline



분자량은 662 kDa이다. 27-Deoxyactein도 생물학적 기능에 관한 연구는 없지만 C₃₇H₅₆O₁₀ 분자식으로 분자량은 660 kDa이다. Cimicifugoside H-1에 관한 생물학적 혹은 구조에 관한 연구결과는 없다. 2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone은 생물학적 기능에 관한 연구는 없지만 C₁₅H₁₂O₇ 분자식으로 분자량은 304 kDa이다. Chiisanoside은 소장(small intestine)에서 지방 흡수를 방해하는 생물학적 기능이 있다[13]. Corynoline의 알려진 생물학적 기능은 세포간 결합을 방해하는 것이다[7]. Curculigoside은 amniotic fluid-derived stem cell의 골화(os-teogenesis)를 개선시키는 기능을 가지고 있다[10]. Methyl rosmarinatate는 matrix metalloproteinase-1의 활성을 저해하는 생물학적 기능을 가지고 있다[18]. Gibbilimbol A는 아주 선택적으로 편충(*Leishmania*)을 죽이는 생물활성물이다[15]. Ganoderic acid C1는 천식(asthma)환자에 처리하면 TNF-α생산이 저해된다[11]. Ergosterolperoxidel는 *E. histolytica* (이질 아메바)를 선택적으로 죽이는 기능이 보고되어있다[12].

ERAP1와 FOXO1 유전자를 함께 2배 이상 발현시킨 것은 4개였다(Table 3). 세신(*Asarum sieboldii* Miq.)은 쥐방울덩굴과에 속하는 다년생 초본식물로, 감기로 인한 고열, 두통에 사용

되고 있으며 만성기관지염이나 기관지확장증으로 인하여 기침을 심하게 할 때에 진해작용도 사용된다. 이 식물에서 분리한 (±)-Car-3-ene-2,5-dione의 molecular formula는 C₁₀H₁₂O₂이며 분자량은 164 kDa이다. 아직 어떤 생물학적인 기능도 보고된 것이 없다. 섬수(*Bufois venenum*)는 두꺼비과에 속한 두꺼비의 분비물을 건조한 것이다. 주로 외용하며 해독작용과 종기를 삭히는 효능이 있어서 종창이나 종독에 사용된다. 이 동물에서 분리된 Cinobufagin의 분자식은 C₂₆H₃₄O₆이며 분자량은 442 kDa이다. 지금까지 알려진 생물학적 기능은 Na⁺/K⁺-ATPase 저해제이다[1]. 대극(*Euphorbia pekinensis*)은 여러해살이풀의 일종으로 우독초라고도 한다. 가지를 자르면 흰 유액이 나오며 맹독성의 극약이다. Corilagin의 분자식은 C₂₇H₂₂O₁₈ 분자량은 634 kDa이다[3]. 보고된 생물학적 기능은 carbonic anhydrase 저해제이다[14]. 현호색(*Corydalis turt-schaninovi*)은 여러해살이풀의 일종으로 보물주머니라고도 한다. 모르핀에 비슷할 정도의 강력한 진통 작용이 있다. Corydaline의 분자식은 C₂₂H₂₇NO₄이며 분자량은 369 kDa이다. 진통효과는 acetylcholinesterase 저해로 인하여 생긴다는 보고가 있다[16].

이상의 실험결과 우선적으로 ERAP1와 FOXO1 유전자를 함께 2배 이상 발현시키는 4종류 천연물[(±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin, Corydaline]은 면역력을 통한 수명 연장 실험에 사용될 것이다. 초파리를 이용한 개체의 수명 연장 실험 후, 유의적인 천연물은 약제화하기 위한 안정성, 안전성과 유효성을 극대화하고 부작용을 최소화할 수 있는 신약개발의 중요한 원천소재로서 사용되어 무병장수 관련 천연물신약으로 발전할 것이다.

감사의 글

본 연구에 사용된 천연물은 한약진흥재단에서 분양 받아 사용하였으며, 본 성과물(논문)은 농촌진흥청 연구사업(세부 과제번호: PJ01086401)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Akimova, O. A., Bagrov, A. Y., Lopina, O. D., Kamernitsky, A. V., Tremblay, J., Hamet, P. and Orlov, S. N. 2005. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent signaling in C7-MDCK cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 832-839.
- Alvarez-Navarro, C. and López de Castro, J. A. 2014. ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol. Immunol.* **57**, 12-21.
- Boyle, P. H., Cocker, W., Grayson, D. H. and Shannon, P. V. R. 1971. The chemistry of terpenes. Part XII. Oxidation of (+)-car-3-ene with t-butyl chromate and photolysis of the major oxidation product, (-)-car-3-en-5-one. *J. Chem. Soc. C.* **1971**, 1073-1082.
- Fernández-Quintela, A., Churrua, I. and Portillo, M. P. 2007. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.* **10**, 1126-1131.
- Haroon, N. and Inman, R. D. 2010. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biology and pathogenic potential. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 461-467.
- Hattori, A. and Tsujimoto, M. 2013. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. *J. Biochem.* **154**, 219-228.
- Kamigauchi, M., Noda, Y., Nishijo, J., Iwasaki, K., Tobetto, K., In, Y., Tomoo, K. and Ishida, T. 2005. Cell adhesion inhibitory activity of (d)-corynoline, a hexahydrobenzo[c]phenanthridine-type alkaloid, and its structure-activity relationship, studied by X-ray crystal structure analysis and molecular docking study. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1867-1872.
- Landis, J. N. and Murphy, C. T. 2010. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Dev. Dyn.* **239**, 1405-1412.
- Lettieri Barbato, D., Aquilano, K. and Ciriolo, M. R. 2014. FoxO1 at the nexus between fat catabolism and longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**, 1555-1560.
- Liu, M., Li, Y. and Yang, S. T. 2014. Curculigoside improves osteogenesis of human amniotic fluid-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 146-154.
- Liu, C., Yang, N., Song, Y., Wang, L., Zi, J., Zhang, S., Dunkin, D., Busse, P., Weir, D., Tversky, J., Miller, R. L., Goldfarb, J., Zhan, J. and Li, X. M. 2015. Ganoderic acid C1 isolated from the anti-asthma formula, ASHMITM suppresses TNF-α production by mouse macrophages and peripheral blood mononuclear cells from asthma patients. *Int. Immunopharmacol.* **27**, 224-231.
- Meza-Menchaca, T., Suárez-Medellín, J., Del Ángel-Piña, C. and Trigos, Á. 2015. The amoebicidal effect of ergosterol peroxide I isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Phytother. Res.* **29**, 1982-1986.
- Mizuguchi, H., Nariai, Y., Kato, S., Nakano, T., Kanayama, T., Kashiwada, Y., Nemoto, H., Kawazoe, K., Takaishi, Y., Kitamura, Y., Takeda, N. and Fukui, H. 2015. Maackiain is a novel antiallergic compound that suppresses transcriptional upregulation of the histamine H1 receptor and interleukin-4 genes. *Pharmacol. Res. Perspect.* **3**, e00166.
- Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T. and Noro, T. 1993. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 787-790.
- Varela, M. T., Dias, R. Z., Martins, L. F., Ferreira, D. D., Tempone, A. G., Ueno, A. K., Lago, J. H. and Fernandes, J. P. 2016. Gibbilibol analogues as antiparasitic agents-Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 1180-1183.
- Xiao, H. T., Peng, J., Liang, Y., Yang, J., Bai, X., Hao, X. Y., Yang, F. M. and Sun, Q. Y. 2011. Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat. Prod. Res.* **25**, 1418-1422.
- Yoshizumi, K., Murota, K., Watanabe, S., Tomi, H., Tsuji, T. and Terao, J. 2008. Chiisanoside is not absorbed but inhibits oil absorption in the small intestine of rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1126-1129.
- Yuan, H., Lu, W., Wang, L., Shan, L., Li, H., Huang, J., Sun, Q. and Zhang, W. 2013. Synthesis of derivatives of methyl rosmarinate and their inhibitory activities against matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). *Eur. J. Med. Chem.* **62**, 148-157.

초록 : 면역시스템을 통한 세포수명연장 천연물질 스크린

유보경¹ · 권기상² · 고영화¹ · 김홍근³ · 이석현⁴ · 박관호⁴ · 최지영⁴ · 권오유^{1*}

(¹충남대학교 의학전문대학원, ²경운대학교 임상병리학과, ³가천대학교 생명과학과, ⁴국립농업과학원 곤충산업과)

한약진흥재단(NIKOM)의 640-천연물 라이브러리를 PC12세포에 10 µg/ml/day로 처리하였다. 면역강화에 관여하는 ERAP1 (Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase 1)과 수명연장에 관여하는 FOXO1 (FOXO-family transcription factor) 유전자발현을 RT-PCR로 확인하였다. ERAP1 유전자를 1.5-2배까지 상승시킨 것은 22개, 2배 이상 발현시킨 것은 14개였다. FOXO1 유전자를 1.5-2배까지 상승시킨 것은 총 24개, 2배 이상 발현시킨 것은 4개였다. 동시에 ERAP1과 FOXO1 유전자를 2배 이상 상승시키는 것은 족도리풀(*Asiasari radix*)에서 분리된 (±)-Car-3-ene-2,5-dione, 두꺼비(*Bufo venenum*)에서 분리된 Cinobufagin, 대국(*Euphorbia pekinensis*)에서 분리된 Corilagin, 현호색(*Corydalis tuber*)에서 분리된 Corydaline 4종이다. 이들 4종의 천연물은 초파리를 이용한 개체의 수명연장실험에 사용될 것이다.