

## The Effect of Natural Compounds on the Longevity Extending in the Insect, *Drosophila melanogaster*

Jeong Hoon Lee<sup>1†</sup>, Kisang Kwon<sup>2\*</sup>, Eun Ryeong Lee<sup>2</sup>, Bo-Kyung Yoo<sup>1</sup>, Young Hwa Ko<sup>1</sup>, Ji-Young Choi<sup>3</sup> and O-Yu Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

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

<sup>3</sup>Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Received November 1, 2016 / Revised November 8, 2016 / Accepted November 8, 2016

A previous study demonstrated that four kinds of natural compounds, Corydaline, ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione, cinobufagin, and corilagin, enhanced the gene expression of ERAP1 and FOXO1 (DFA16) more than two-fold in a cell culture system. In this study, the experimental food was made finally 30 ml in which included 1% agar, 5% sucrose, and each natural compound 20  $\mu$ l. A fruit fly of *Drosophila melanogaster* fed a natural product for 4 hr after 4 hr starvation. Both natural compounds of Cinobufagin and Corilagin induced 6-8 days more survival comparing than it controls group. The resulting fruit flies were estimated the gene expression of ERAP1 and FOXO1 by RT-PCR that also demonstrated meaningful results with the same lifespan results. Cinobufagin from *Bufo venennumis* has C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> molecular formula and 442 kDa molecular weight. Corilagin from *Euphorbia pekinensis* has C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>O<sub>18</sub> molecular formula and 634 kDa molecular weight. The two types of natural products screened in this study will be used in the early diagnosis and treatment of insect industry in the near future. In addition, the natural products will be used in longevity experiments in a mouse model. The results may give one of the clues for studying new drug development candidates of the longevity.

**Key words** : Cinobufagin, Corilagin, *D.melanogaster*, ERAP1, FOXO1

### 서 론

천연물은 오래 전부터 생화학적 기전의 이해 없이도 임상적인 효과가 충분히 입증되어 동양의학과 서양의학에 모두 사용되고 있다. 특히, 아시아 여러 나라국가에서 지금까지도 천연물을 1차 진료 의약품으로서 많이 활용하고 있으며, 많은 다국적 제약회사들은 천연물에 대한 관심과 연구가 진행되고 있다. 천연물이 아닌 유기화합물들은 구조적인 차원에 제약을 받아 신약으로 개발 하는 데에 어려움이 많은 것이 단점인 것에 비하면, 천연물은 오랜 기간의 임상적으로 안정성(stability), 안전성(safety)과 유효성(effectiveness)이 입증되어서 부작용(side effect)이 비교적 덜하여 구조적인 큰 변화를 주지 않고도 신약개발에 근접할 수 있다. 이런 이유로 천연물을 활용한 신약개발은 유기화합에 의한 신약개발보다 적은 비용과 시간을 절감과 함께 최종적인 임상적인 risk를 줄일 수 있다[5].

한국의 미래산업으로서 곤충분야의 시장규모는 약 3,039억~3,193억원 규모이다. 단백질 공급원, 소자본·작은 공간에서 사육가능, 강한 번식력, 상대적으로 쉬운 사육관리, 대량살상의 윤리문제 회피, 온실가스과 자원비용 절감 등의 장점을 가지고 있어 곤충산업은 미래 녹색생명산업으로 주목을 받고 있다. 그러나 곤충의 산업화가 진행되면서 건강한 곤충의 대량사육이 요구되면서 질병발생이 발생하여 대규모 피해가 만성적으로 발생하고 있다. 본 연구팀은 이 문제를 해결하기 위하여 면역강화와 수명을 연장시킬 수 있는 640여개의 천연물을 culture cell system에서 endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1)과 forkhead box protein O1 (FOXO1)의 발현이 동시에 2배이상 상승시키는 것을 screening하였다. ERAP1는 여러 종류의 cytokine receptor (type 1 tumor necrosis factor receptor; TNF-R1, interleukin-6 receptor a; IL-6Ra, type 2 interleukin-1 receptor; IL-1R2)와 결합하고 있다. 특히, 면역 system에서 MHC class I ligand 생성을 도와 CD8을 가진 antigen present cell에 의한 인식에 필수적인 역할을 담당한다[1]. FOXO1은 FOXO-family transcription factor로서 DFA16로도 불리며 insulin pathway을 target으로 하며 oxidative stress에 대응하여 metabolic homeostasis 유지에 중요한 역할을 담당한다. 특히 *C. elegans*의 돌연변이 실험에서 life-span extension을 조절하는 유전자로 밝혀짐으로 인하여 '수명연장유전자'로서 mammalian longevity와 cancer/dia-

<sup>†</sup>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.

betes와 같은 age-related diseases 분야에서 크게 주목을 받고 있다[3, 4]. 본 연구는 선행연구결과에서 PC12 세포를 이용하여 ERAP1/FOXO1 유전자 발현을 동시에 2배 이상 상승시킨 천연물 4종류(Corydaline, (±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin)을 초파리에 먹게 한 뒤에 초파리의 수명과 유전자 발현 정도의 상관관계를 측정하였다.

본 연구의 최종목표는 산업곤충이 대량사육 시 발생하는 각종질환에 근본적으로 대응할 수 있는 방법, 즉, 곤충자체의 면역강화와 수명연장을 도와줄 수 있는 천연물을 찾는 것이다. 이 결과의 발전은 산업곤충의 대량 사육 시 발생하는 각종 질병의 초기대응 방법으로 새로운 기회를 제공할 수 있을 것으로 기대한다. 그리고 안정적인 대량 생산을 통해서 소득증대 효과 및 균일화된 식품원료로 인정받을 수 있을 것이다.

### 재료 및 방법

#### 천연물

본 실험에 사용된 4종류의 천연물[Corydaline, (±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin]은 한약진흥재단(NIKOM)에서 무상으로 제공하였으며, DMSO를 용매로 하여 1 mg/ml의 농도로 제공 되었다.

#### 초파리 사육 및 RNA 분리

초파리(*D. melanogaster*)는 기본적인 사육조건에서 부화된 성충을 사용하였다. 천연물 식이는 총 30 ml에 1% agar와 5% sucrose, 천연물 20 µl를 넣어 제조하였다. 초파리에 적용된 최종 농도는 15 µg/ml-4 hr-4 day로 처리 하였다. 초파리는 5군으로서 control군과 각각의 Corydaline, (±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin를 먹인 처리군이다. 초파리는 각 20마리씩 4 day에 한번 4 hr 공복 후 4 hr 천연물식으로 vial을 바꾸어 주고 다시 일반식으로 바꾸어 주었다. 각종 천연물을 처리한 초파리를 8 hr 간격으로 확인하여 죽은 초파리들을 1.5 ml tube에 담아 DeepFreezer -70°C에 보관하였다. 살아 있는 초파리들은 4 day 간격으로 1.5 ml 튜브에 담아 RNAiso plus (Takara bio INC, Japan) 300 µl를 첨가하여 grind한 뒤 DeepFreezer에 보관하였다. 죽은 초파리들은 천연물을 처리한 후 죽은 날짜를 기준으로 1-5 day, 6 day, 7 day, 8-16 day로 나누고 살아 있는 초파리는 1-5 day, 6-10 day, 11-15 day로 나누었다. Total RNA 분리는 하였다 각각의 초파리들을 1.5 ml tube에 넣고 300 µl의 RNA isolation buffer를 첨가하여 grind 하였다. Lysis 시킨 후 13,000 rpm, 4°C에서 5 min 동안 원심 분리하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮긴 후 60 µl의 chloroform을 넣어 충분히 섞어주었다. 13,000 rpm, 4°C에서 10 min 동안 원심 분리하여 약 150 µl의 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 실온에서 10 min 침전반응을 유도한 후 13,000 rpm, 4°C에서 10 min 동안

원심분리하고, 75% ethanol을 500 µl로 세척하여 total RNA를 얻어 RNase-free water에 녹인 후 Nanodrop (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량하였다. 동일 실험을 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

#### RT-PCR 및 분석

초파리의 ERAP1 & FOXO1에 해당하는 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 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 3 min 열 변성 시킨 후, 10× buffer, dNTP, MML-V, RNase inhibitor 등이 포함된 용액과 혼합하여 42°C에서 90 min 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증폭시키기 위해서 해당 primer를 이용하여 95°C에서 30 sec, 56°C에서 30 sec, 72°C에서 30 sec로 32회 반응하여 전기영동으로 확인하였다. 생성된 PCR 밴드측정의 측정은 모두 3회 반복 실시한 평균값이다.

### 결과 및 고찰

1990년에 Johnson에 의해서 age-1유전자 변이가 수명연장과 깊은 관련성을 가지는 것을 보고하였다[3]. 이 논문은 nutritional signal 연구의 시작이 되어, 이후에 수명이 단독유전자의 변이에 의해서 제어된다는 것이 증명되기 시작하였다. 곤충의 대량수요에 부응한 대량사육과정에서 빈번하게 질병이 발생하여 대규모로 폐사피해가 있다. 이 문제를 해결하기 위하여 곤충의 면역력강화와 수명을 연장시키는 대사에 관련한

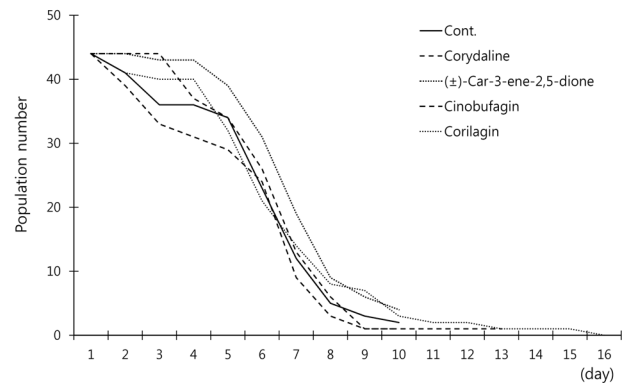


Fig. 1. Test of lifespan extension by natural compounds. Insect divided five groups; control group and four treated group of Corydaline, (±)-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin. Flies were fed 15 µg/ml natural compounds for 4 hr-4 day until the death. N=20 for each group. The result represents the average of 3 experiments, respectively.

유전자의 발현을 상승시킬 수 있는 천연물을 screening 하였다. 정제된 640여개 종류의 단일천연물질을 한약진흥재단 (NIKOM)에서 무상으로 제공받아 PC12세포를 상대로 하여 10  $\mu$ l-ml-day 조건으로 처리 후 RT-PCR 방법으로 유전자 발현을 조사하였다. ERAP1와 FOXO1 유전자 발현이 동시에 2배 증가시키는 것으로 Corydaline, ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin이 확인되었다. Corydaline은 모르핀에 견줄만한 강력한 진통 작용이 있으며 분자식은  $C_{22}H_{27}NO_4$ 이며 분자량은 369 kDa이다. 진통효과는 acetylcholinesterase 저해

기능 때문이며 여러해살이풀인 보물주머니라고 불리는 현호색 (*Corydalis turtschaninovi*)에서 분리되며 한방에서는 덩이줄기를 정혈제·진경제 및 진통제로 사용하며 한국 및 중국 동북부를 거쳐 시베리아까지 분포되어 있다[2]. 세신 (*Asarum sieboldii* Miq.)은 취방울덩굴과에 속하는 다년생 초본식물로, 감기로 인한 고열, 두통에 사용되고 있으며 만성기관지염이나 기관지 확장증으로 인하여 기침을 심하게 할 때에 진해작용도 사용된다. 이 식물에서 분리한 ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione의 분자식은  $C_{10}H_{12}O_2$ 이며 분자량은 164 kDa이다. 최근 연구결과 influen-

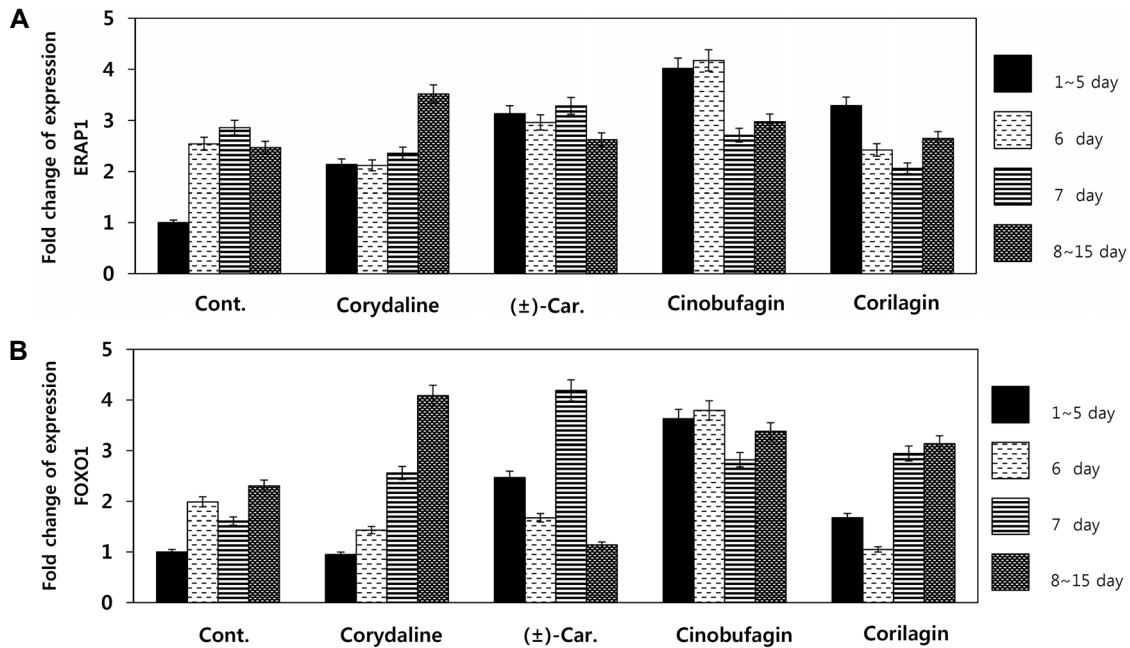


Fig. 2. The impact of natural compounds on the ERAP1 & FOXO1 gene-expression. Flies were fed 15  $\mu$ g-ml natural compounds for 4 hr-4 day until the death. N=20 for each group. RT-PCR conditions are described in *Materials & Methods*. The result of RT-PCR represents the average of 3 experiments, respectively.

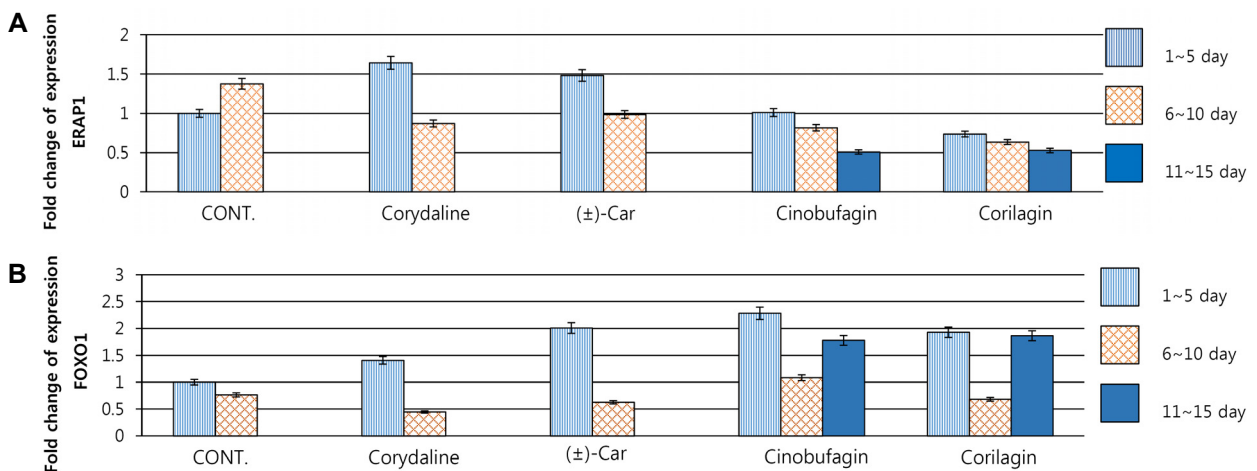


Fig. 3. The impact of natural compounds on the ERAP1 & FOXO1 gene-expression. Flies were fed 15  $\mu$ g-ml natural compounds for 4 hr-4 day until the indicated day. N=20 for each group. RT-PCR conditions are described in *Materials & Methods*. The result of RT-PCR represents the average of 3 experiments, respectively.

za virus replication 기능이 보고되었다[7]. Cinobufagin은 섬수(*Bufo venennum*), 두꺼비과에 속한 두꺼비의 분비물로서 cardiotoxic bufanolide steroid이다. 주로 외용하며 해독작용과 종기를 삭히는 효능이 있어서 종창이나 종독에 사용된다. 이 동물에서 분리된 Cinobufagin의 분자식은  $C_{26}H_{34}O_6$ 이며 분자량은 442 kDa이다. 지금까지 알려진 주된 생물학적 기능은  $Na^+/K^+-ATPase$  저해제이다[8]. Corilagin은 대극(*Euphorbia pekinensis*)이라는 여러해살이풀의 일종으로 우독초에서 분리되는 흰 유액으로서 맹독성의 극약이다. Corilagin의 분자식은  $C_{27}H_{22}O_{18}$  분자량은 634 kDa이다. 보고된 생물학적 기능은 carbonic anhydrase 저해제이다[6].

각각의 천연물을 사용하여 초파리의 수명에 관한 실험을 하였다(Fig. 1), 자연적인 사육상태에서는 부화 후 성충은 7-10일 생존한다. 각각 5개의 group으로 나누어 4종류의 천연물을 먹게 하였다. Corydaline을 먹은 초파리는 대조군 보다 1일정도 짧은 수명을 보였다. ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione의 경우는 대조군과 동일한 수명을 보였다. Cinobufagin은 초파리수명을 대조군에 비교하여 3일을 연장시키는 것이 확인되었다. Corilagin은 초파리수명연장을 가장 길게 연장하여 대조군에 비하여 6일이 연장되었다. 대조군이 10일인 것을 고려한다면 무려 6일 더 수명 연장되는 것은 표준적인 수명을 60% 연장시키는 것이다. 대조군이 10일 생존한 것을 인간나이 60세로 환산하면 Cinobufagin은 18년, Corilagin은 36년 정도 생존수명이 연장된 것으로 볼 수 있다.

이와 같이 수명연장을 보일 때에 각각의 ERAP1와 FOXO1 유전자발현을 조사하였다(Fig. 2A, Fig. 2B). 각각의 천연물을 먹게 한 다음에 1-5일째에 죽은 것들의 ERAP1의 유전자발현을 조사한 결과 control에 비하여 2-4배 정도 높았다. 그러나 6-15일까지 조사한 결과 control은 2배 이상을 유지하는 반면에 Corydaline은 처음 2배 상태가 유지되다가 8-15일에 약 3.5배 정도 높아졌다. 그리고 ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione의 경우는 처음 1-5일간에는 약 3배의 유전자발현이 15일까지 유지되었다. Cinobufagin은 1-5일간에 약 4배의 유전자발현을 보이다가 8-15일에는 약 3배로 떨어졌다. Corilagin을 처리하였을 때에는 유전자발현은 1-5일째에는 3배를 조금 넘지만 조금씩 하강하여 8-15일에는 2.5배 정도를 보였다. FOXO1 유전자발현은 1-5일동안 Cinobufagin은 약 3.5배의 상승발현을 보였다. Corydaline은 8-15일 까지 지속적으로 상승하여 약 4배의 발현을 보였다. ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione은 7일째에 약 4배의 가장 강한 발현을 보인 반면 Corilagin의 발현은 1-5일째에 1.5배로 시작하여 8-15일째는 약 3배의 발현을 보였다. 결국 각각의 천연물처리하는 초파리의 ERAP1와 FOXO1 유전자발현을 control에 비하여 높은 상태를 유지시켰다. 그러나 정해진 날짜에 살아있는 초파리의 ERAP1와 FOXO1 유전자발현은 전체적으

로 control에 비하여 낮은 각각 유전자발현양상을 보인다(Fig. 3A, Fig. 3B). 이는 초파리가 살아있을 때에는 천연물에 의해서 면역이 안정을 유지하기 때문에 control에 비하여 이들 유전자의 상승발현이 요구되지 않기 때문으로 생각된다. 이상의 실험결과로 2종류 천연물(Cinobufagin, Corilagin)은 본 연구의 최종목표인 산업곤충의 대량 사육 시 발생하는 각종 질병의 초기진단과 치료에 대응할 수 있는 새로운 기회를 제공할 수 있을 것으로 기대한다. 결국 안정적인 양질의 산업곤충의 대량 생산을 통해서 소득증대 효과 및 균일화된 식품원료로 인정받을 수 있을 것이다. 그리고 약제화를 위한 안정성과 안전성이 확보 되면 신약개발의 중요한 원천 소재로 이용되어 천연물 신약이나 건강보조제 등으로 개발할 수 있는 가능성을 보인다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01086401)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

1. 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.
2. Ji, H. Y., Liu, K. H., Lee, H., Im, S. R., Shim, H. J., Son, M. and Lee, H. S. 2011. Corydaline inhibits multiple cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in human liver microsomes. *Molecules* **16**, 6591-6602.
3. Johnson, T. E. 1990. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249**, 908-912.
4. Kitamura, T. and Kitamura, Y. 2015. The roles of FOXO1 in various metabolic organs. *Seikagaku* **87**, 176-182.
5. Lee, J. H., Kwon, K., Lee, E. R., Yoo, B. K., Ko, Y. W., Choi, J. Y. and Kwon, O. Y. 2016. Screening of natural product libraries for the extension of cell life-span through immune system. *J. Life Sci.* **26**, 359-363.
6. 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.
7. Wang, X., Xu, X., Li, Y., Li, X., Tao, W., Li, B., Wang, Y. and Yang, L. 2013. Systems pharmacology uncovers Janus functions of botanical drugs: activation of host defense system and inhibition of influenza virus replication. *Integr. Biol.* **5**, 351-371.
8. Wang, Z. J., Sun, L. and Heinbockel, T. 2014. Resibufogenin and cinobufagin activate central neurons through an ouabain-like action. *PLoS One* **9**, e113272.

**초록 : 천연물에 의한 초파리수명연장 효과**이정훈<sup>1\*</sup> · 권기상<sup>2\*</sup> · 이은령<sup>2</sup> · 유보경<sup>1</sup> · 고영화<sup>1</sup> · 최지영<sup>3</sup> · 권오유<sup>1\*</sup>( <sup>1</sup>충남대학교 의학전문대학원, <sup>2</sup>경운대학교 임상병리학과, <sup>3</sup>국립농업과학원 곤충산업과 )

우리는 이전실험에서 배양세포를 사용하여 4종류의 천연물(Corydaline, ( $\pm$ )-Car-3-ene-2,5-dione, Cinobufagin, Corilagin)이 ERAP1와 FOXO1 (DFA16) 유전자발현을 2배 이상 상승시키는 것을 증명하였다. 본 실험은 1% agar, 5% sucrose, natural compound 20  $\mu$ l를 넣은 먹이를 만들어 4시간 starvation후에 4시간 동안 먹였다. Cinobufagin와 Corilagin를 먹이면 대조군에 비하여 6-8일 정도 더 생존하였다. RT-PCR 실험결과 ERAP1와 FOXO1 유전자 발현을 조절하는 것이 증명되었다. 산업곤충질병 진단과 치료에 사용될 것이며, 초파리를 대신한 생쥐에서도 동일한 결과를 실험하여 수명연장을 위한 신약으로 발전시킬 것이다.