creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

지실 열수추출물의 구성 성분에 의한 위장관 운동 촉진 효과의 기전 연구

A Study on the Mechanism of Prokinetic Activity Induced by Compounds in an Aqueous Extract of Poncirus Fructus

2012 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 약제과학 전공

김 수 원

국문초록

Poncirus trifoliate (L.) Raf. (Rutaceae), 일명 Poncirus fructus(PF)로 명명된 지실은 탱자의 미성숙과실로써, 소화 불량이나 건위를 목적으로 사용되어온 생약으로, 위장관 운동 촉진 효과 (prokinetic effect)를 갖는 것으로 알려져 있으며. 5-Hydroxytryptamine$_4$ Receptor (5-HT$_4$R)를 활성화 시켜서 이러한 위장관 촉진 효과가 나타나는 것이 잘 알려져 있다. 그러나, 대표적인 5-HT$_4$R 효능제인 cisapride 와 비교했을 때 5-HT$_4$R 의 활성 정도는 다소 약한 것으로 나타나, 5-HT$_4$R 이외의 다른 기전의 관여 가능성이 제시되었다. 실제로 동 실험실의 후속 연구에서 지실 열수추출물 (PF-W)이 모틸린 수용체 (motilin receptor, MTLR)가 아닌 그렐린 수용체 (ghrelin receptor, GHLR)를 활성화 시킨다는 사실을 새롭게 밝혀낸 바 있다. 하지만, PF-W 에 포함된 어떤 단일 물질이 이러한 기능을 유발하는지에 대해서는 아직까지 알려져 있지 않다. 따라서 이번 연구에서는 다양한 지실 추출물 구성성분 중 어떤 단일 물질이 위장관 운동 촉진 효과 기전을 나타내는지를 밝히는 것을 목표로 하였다.

먼저 지실의 단일구성성분의 GHLR 의 활성화 여부를 확인하였다. G-protein coupled receptor (GPCR)인 GHLR 은 활성화되면 세포 내 칼슘 농도가 증가한다. HEK-293T 세포주에 GHLR 을 과발현시킨 후 PF-W 의 단일 구성 물질로 잘 알려져 있는 12 개의 물질들을 처리한 다음 칼슘 이미징 방법을 이용하여 세포 내 칼슘 농도 변화를 관찰하였다. 측정

결과 12 개의 주요 구성 성분 중 naringin 과 naringenin 이 GHLR 을 활성화 시키는 단일 구성 성분임을 알 수가 있었으며, 동일한 농도에서는 naringin 이 활성이 더 활발한 것을 확인하였다.

또한 5-HT_4R 활성화 여부도 더불어 확인하였다. 5-HT_4R 가 활성화 될 시에는 세포 내에 cAMP 농도가 증가하게 되며, 효소결합 면역흡착 분석법 (Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)을 통해 측정이 가능하다. 측정 결과 PF-W 처리 시에는 cAMP 증가를 확인하였으나, 실험에 사용한 단일 구성 성분들은 cAMP 를 변화시키지 못하였다.

본 연구를 통해 지실을 구성하고 있는 성분 중 naringin 과 naringenin 이 위장관 운동을 촉진시킨다고 알려진 GHLR 를 활성화시킴으로써 위장관 촉진 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었으며. 5-HT_4R 를 활성화 시키는 단일 물질은 찾지 못하였다.

주요어 : Ghrelin 수용체, 5-HT_4 수용체, 위장관 운동 촉진제, Poncirus fructus, Ca^{2+} assay, cAMP assay

학번 : 2010-23655

목 차

국문초록 1
목 차 3
그림 목록 5
1. 서론 8
1.1. 그렐린 수용체 9
1.2. 5-HT_4 수용체 12
1.3. 위장관 운동 촉진제(prokinetics) 14
2. 실험 목적 18
3. Materials 19
3.1. 실험 재료 19
3.2. 실험 기기 22
3.3. Reagent Kit 22
3.4. 프로그램 23
4. Methods 24
4.1. HEK-293T cell culture 24
4.2. Cell seeding 24
4.2.1. Ca^{2+} assay 24
4.2.2. cAMP assay 25
4.3. Transfection 26
4.4. PF-W, 지실 단일구성성분, 시약 preparation 27
4.5. 수용체 활성 측정 28
4.5.1. GHLR_ Ca^{2+} assay 28
4.5.2. 5-HT_4R_ cAMP assay 29
4.6. Data analysis 30
4.6.1. Ca^{2+} assay 30
4.6.2. cAMP assay 30
5. Results 31
5.1. GHLR 과발현 세포에 지실의 단일 구성 성분 스크리닝 31
5.2. Naringin과 naringenin의 농도의존성 40
5.2.1. Naringin의 농도의존성 40
5.2.2. Naringenin의 농도의존성 43

5.3. 5-HT_4R 과발현 세포에 단일구성성분 스크리닝 46
5.3.1. 5-HT_4R 활성화 여부에 대한 단일구성성분 고농도 스크리닝 . 46
5.3.2. 5-HT_4R 활성화 여부에 대한 단일구성성분 저농도 스크리닝 . 48
6. Discussion and Conclusion 50
7, Reference 55
Appendix (논문요지 발표자료)
감사의 글..

그림 목록

그림

[그림 1] 그렐린 수용체의 작용 기전
[그림 2] 그렐린 펩타이드의 기능
[그림 3] 5-HT_4 수용체의 작용 기전
[그림 4] 현재 시장에서 사용되고 있는 위장관 운동 촉진제들의 작용 도식도
[그림 5] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 PF-W 처리 후 Ca^{2+}assay. (A) PF-W 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화. (B) PF-W 10 μg/ml 처리 전 후 cell 내 형광 밝기 변화
[그림 6] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) hesperidin 10 μM, 100 μM 처리, (B) rutin hydrate 10 μM, 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화
[그림 7] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) poncirin 10 μM, 100 μM 처리, (B) neohesperidin 10 μM, 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화
[그림 8] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) umbelliferone 10 μM, 100 μM 처리, (B) citral 100 μM 처리 후 시간대별 F

(약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

[그림 9] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) limonene 100 μM 처리, (B) linalool 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

[그림 10] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) guanidine 100 μM 처리, (B) synephrine 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

[그림 11] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) naringin 10 μM 처리, (B) naringenin 10 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

[그림 12] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 naringin (A) 1 μM, (B) 10 μM, (C) 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

[그림 13] GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 naringenin (A) 1 μM, (B) 10 μM, (C) 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

표

[표 1] 실험에 사용한 시약 및 기자재

[표 2] 실험에 사용된 기타 장비 목록

[표 3] Transfection 에 사용된 시약

[표 4] 5-HT_4R이 발현된 HEK-293T cell에 cisapride 10 μM, 지실의 단일구성성분 100 μM 처리후 cAMP assay

[표 5] 5-HT_4R이 발현된 HEK-293T cell에 PF-W 1 mg/mL, 지실의 단일구성성분 10 μM 처리후 cAMP assay

1. 서론

식도에서 위 · 소장 · 대장 등 소화기관은 규칙적인 연동운동에 의해 소화된 음식을 아래로 내려 보낸다. 그러한 수축과 이완의 리듬이 깨지는 것이 바로 위장관 운동장애다. 음식이 정체되면서 소화기능이 멈추고, 속이 더부룩한 듯 불편한 증상이 계속된다. 2000 년대 들어 현대인들의 스트레스에 따른 기능성 소화불량증이 많아지며 gastrointestinal disorder 관련 의약품 시장은 제약산업 중 최대 규모로 커졌고, 위식도 역류질환 등 위장관 관련 질환 발병률은 계속 상승하는 추세이다. 그 밖에 매우 다양한 분야에 사용될 뿐 아니라 항암제 등 다른 약물의 위장관계 부작용을 줄이기 위해서도 많이 사용되고 있다.

Poncirus trifoliate (L.) Raf. (Rutaceae), 일명 poncirus fructus(PF)로 명명된 지실은 탱자의 미성숙과실로써, 민간에서 소화불량이나 건위를 목적으로 사용되어온 생약이다(Kim, Sin et al. 1997). 선행 연구를 통해 지실의 열수추출물과 에탄올 추출물 모두에 대해 성인 남성과 수컷 랫트 에서 경구투여 시 장관 내 통과 (intestinal transit)를 촉진시킴이 밝혀졌다 (Lee, Seo et al. 2005). 또한 아세틸콜린의 수용체를 차단하여 장관 운동을 저하시킨 병리모델에서 지실을 투여한 경우 장관 내 통과를 효과적으로 회복시켰는데 (Lee, Seo et al. 2005) 이는 지실의 강한

위장관 운동 촉진 효과가 cholinergic pathway 를 따른다는 것을 시사한 바 있다. 더불어 지실이 mosapride, metoclopriamide 등과 같이 현재 사용되는 위장관 운동 촉진 약물의 주요 타겟인 5-HT_4 수용체를 활성화시킨다는 것이 밝혀진 바 있다 (Shim, Back et al. 2010). 그러나, 지실의 5-HT_4 수용체에 대한 활성화 정도가 강력한 위장관 운동 촉진 효과에 비해 상대적으로 다소 미약하다고 생각할 수 있다. 5-HT_4 수용체 이외에 위장관 운동을 촉진하는 다양한 작용 기전이 존재한다는 사실을 감안해 볼 때, 지실의 다른 작용 기전의 관여 여부는 주목할 만한 연구 주제라 생각된다. 이러한 관점에서 최근 새롭게 각광받고 있는 그렐린 및 모틸린 수용체에 주목하게 되었으며 직전 선행 연구를 통해 그렐린 수용체가 지실에 반응한다는 사실이 밝혀진 바 있다. 그러나 지실의 어떤 구성 성분이 지실의 알려져 있는 위장관 운동 촉진 효과에 영향을 미치는지에 대해서는 현재까지 밝혀진 바가 없는 상황이다.

1.1. 그렐린 수용체 (ghrelin receptor, GHLR)

그렐린 수용체는 G-protein coupled receptor family에 속하며 gastric mucosa의 endocrine cell, pituitary, hypothalamus에 주요 분포한다 (Poitras and Tomasetto 2009). 종별로 보았을 때 mouse나 rat, guinea pig같은 rodent와 human에 존재하며 rabbit

이나 dog에는 존재하지 않는다 (Sanger 2008). 수용체가 활성화 될 시에 세포 외부로부터 칼슘을 유입시키며 IP_3는 세포소기관으로부터 칼슘을 내보내서 세포 내 칼슘 농도를 높인다 (Date, Nakazato et al. 2002).

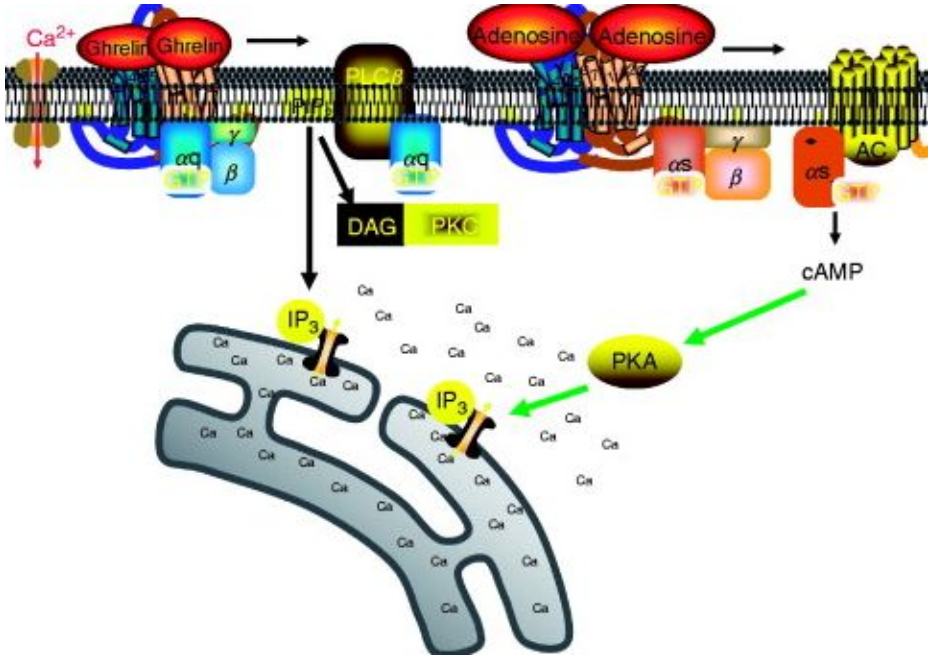


그림 1. 그렐린 수용체의 작용 기전 (Young Cruz and Smith 2007)

수용체에 결합하는 내인성 펩타이드인 그렐린의 경우 작용부위와 농도에 따라 CNS, immune system, adrenal gland, cardiovascular system 등 다양한 영역에 영향을 준다. 또한 osteoblast와 neoplastic cell의 증식에도 영향을 주며, 직접적으로 췌장세포에 작용하여 인슐린 분비를 감소시키고 독특한 식욕촉진 효과를 나타내

기도 한다 (Camilleri, Papathanasopoulos et al. 2009). 특히 위 내용 배출을 가속화시키는 작용에 대해서는 atropine에 의해 그 효과가 차단 되며 cholinergic pathway를 따름이 밝혀졌다 (Sallam and Chen 2010).

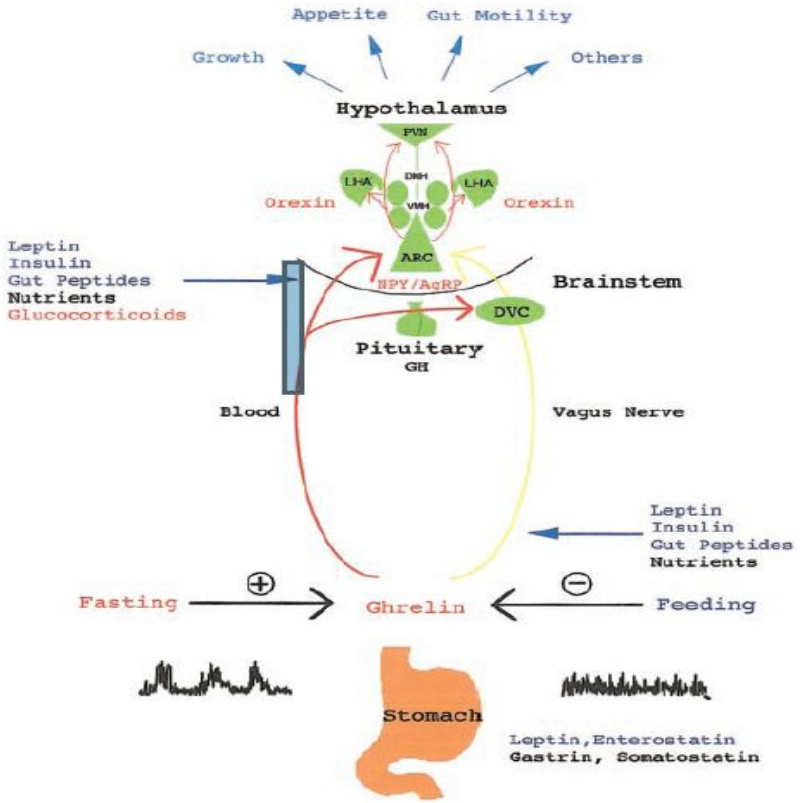


그림 2. 그렐린 펩타이드의 기능 (Inui, Asakawa et al. 2004)

또한 그렐린은 growth hormone secretion receptor 1a에 작용하여 음식물의 소비를 단시간 증가시키기도 한다 (Horvath, Diano et al. 2001). 실제로 비만 환자에게서 비만 수술 후 낮은 그렐린 농도

를 나타내며 위 절제수술이나 bypass 수술과 같은 비만 수술을 하게 되면 그렐린 농도가 낮아지는 것으로 알려져 있다 (Cummings, Weigle et al. 2002).

외인성 그렐린을 physiological dose로 사람에게 투여하게 되면 뚜렷하게 gastric motility를 변화시키지는 않지만 고용량으로 투여하게 되면 gastric motility를 나타내고 소장에서 MMC의 활동을 증가시킨다 (Inui, Asakawa et al. 2004). 이미 임상에서 그렐린 효능제를 장폐색 환자에게 투여 시 위장관 운동성을 자극시켰다는 보고가 있었고 위장관 운동 촉진제로서 가능성을 인정받고 있다 (Poitras and Tomasetto 2009).

1.2. 5-hydroxytryptamine$_4$ 수용체 (5-HT$_4$R)

Serotonin 4 receptor라고도 불리는 5-HT$_4$R는 7 trans-membrane G-coupled receptor family에 속하며 중추와 말초 조직에 광범위하게 분포한다 (De Maeyer, Lefebvre et al. 2008). 소화기관, 방광, 심장, 부신과 같은 기관에 분포하여 여러 기능을 수행한다. 그 중 소화기관에서의 5-HT$_4$R의 역할은 위 배출능 및 식도 운동을 촉진시키고 하부식도 괄약근압을 증가시키며 점막에서 전해질의 분비를 자극하기도 한다 (Hegde and Eglen 1996). 효능제인 cisapride의 경우 심장에도 작용하여 QT interval prolongation을

일으키며 mosapride, metoclopramide, renzapride and zacopride 같은 많은 5-HT_4R 효능제의 경우 5-HT_3R 길항제로서 작용하며 높은 선택성을 가지는 효능제를 찾기 위한 연구가 진행 중이다.

신경 세포 밖에서 5-HT_4R가 5-hydroxytryptamine (serotonin)과 같은 효능제와 결합하게 되면, 기능이 활성화 되어 세포 내에서 일련의 반응이 일어나는데 adenylyl cyclase (AC)가 활성화되어 ATP로부터 cyclic AMP (cAMP)가 만들어진다 (Van Wijngaarden and Soudijn 1997). 이것을 이용하여 cAMP를 정량하면 5-HT_4R의 활성 정도를 측정할 수 있는데 실험과정 중 theophylline과 같은 phosphodiesterase inhibitor를 전처리하여 생성된 cAMP가 분해되는 것을 방지하면 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있다 (Mohler, Shacham et al. 2007).

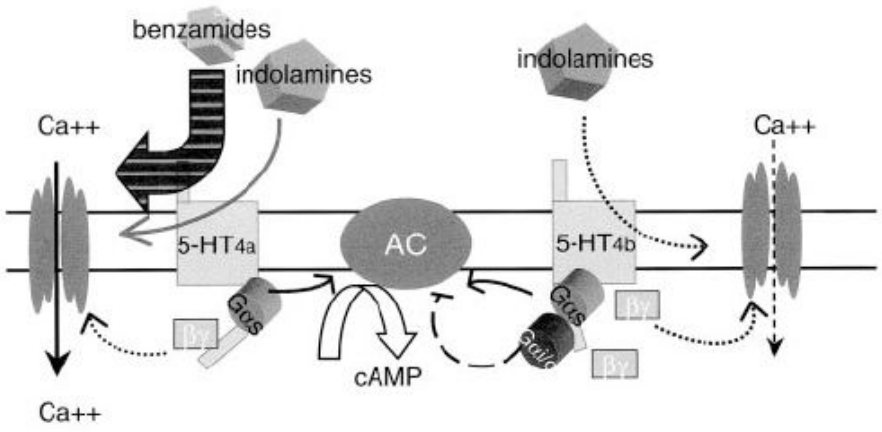


그림 3. 5-HT_4 수용체의 작용 기전(Pindon, Van Hecke et al. 2002)

1.3. 위장관 운동 촉진제 (Prokinetics)

위장관 운동 촉진제는 소장에서의 수축의 리듬을 저해하지 않으면서도 수축의 횟수나 강도를 증가시켜 위장의 운동성을 증가시키는 약제를 말한다. 복부불편감, 변비, 속쓰림, 더부룩함, 오심, 구토 등의 위장관 질환에 사용되며 과민성 장 증후군, 위염, 위식도 역류, 위마비, 기능성 소화불량, 장폐색 등의 다양한 질환에서 사용된다 (De Ponti and Malagelada 1998). 이러한 약들은 5-HT_4R 효능제, dopamine 길항제, motilin 효능제 등이 있으며 아세틸콜린을 직접 증가시키거나 아세틸콜린의 분해효소인 acetylcholinesterase를 억제하기도 하고 아세틸콜린의 분비를 억제하는 D_2 수용체를 차단하는 등의 경로로 효과를 나타낸다. 아세틸콜린의 농도가 증가하면 위장의 연동운동이 증가되고 하부위식도의 괄약근의 압력이 증가한다. 그럼으로써 위장관의 운동을 촉진시키고 위 배출을 촉진하며 위-십이지장의 조화를 호전시킨다 (Buchheit 1993).

가장 많이 사용하고 있는 도파민 길항제의 경우 위장관을 주목적으로 사용하지만 중추신경계에도 도파민 수용체가 있기 때문에 중추신경계 증상이 나타나며 BBB를 통과하지 않더라도 뇌하수체에 작용하여 고프로락틴혈증의 발병 위험을 나타낸다 (Quigley, Judd et al. 1980). 그러나 한편으로는 BBB 바깥에서도 화학수용기촉진

구역 (CRTZ)에 작용하여 오심이나 구토 등의 증세를 억제하는 항구토 위장운동촉진 (antiemetic prokinetic) 효과도 나타낸다 (Tonini, Cipollina et al. 2004).

5-HT_4R는 위장관 운동의 생리와 병태생리에 모두 중요한 기능을 하는 것으로 생각된다. 따라서 5-HT_4R는 위장관 운동과 관련된 질환에서 중요한 표적으로 여겨졌다 (De Maeyer, Lefebvre et al. 2008). Benzamide인 mosapride나 cisapride와 같은 위장관 운동촉진제들은 5-HT_4R에 중간 정도의 친화성을 가진다. 이러한 종류의 약에서 위험과 이득을 고려할 때 얼마나 선택적인가가 중요한 요소이다. 한때 위장관 운동 촉진제 시장을 대부분 차지했지만 상대적으로 약한 선택성을 가지는 cisapride는 부정맥 유발의 부작용으로 퇴출되었다 (Bran, Murray et al. 1995).

Metoclopramide는 60년대부터 사용되어 온 약으로 도파민 길항제뿐만 아니라 5-HT_4 효능제로 작용할 수 있으며 (Pinder, Brogden et al. 1976), 40% 이상 환자에서 부작용이 발생하여 가장 문제가 되고 있다. 졸음, 흥분과 같은 중추신경계의 부작용이 20%, 추체외로 증상이 10~20% 가량으로 나타났고, 추체외로 증상 중 지연운동이상증 (tardive dyskinesia)이 비가역적 (irreversible) 질환으로 알려져 있다 (Robinson 1973).

Domperidone은 BBB (blood brain barrier)를 통과하지 못하여

metoclopramide보다 부작용은 적지만, 뇌하수체에 작용함으로써 나타나는 부작용이 있다. 하지만 좀더 특수한 상황에서 보면 이 약제는 말초에서 길항하므로 파킨슨 질환 치료제의 위장관계 부작용을 효과적으로 억제한다는 특징이 있다 (Brogden, Carmine et al. 1982). Mosapride는 위장관 상부에서 '선택적인 (selective)' 5-HT_4 효능제로 표현이 되고 있으며, CYP3A4 억제제와 약물 상호작용이 있다. 위산역류와 과민성 장 증후군, 기능성 소화불량에 사용되며 추체외로증상, 심장 부작용이 보고되지 않고 있다. 파킨슨병에서도 안전하고 효과적인 위장관 운동 촉진제로 사용되고 있다 (Liu, Sakakibara et al. 2005).

항생제인 erythromycin이 강력한 위장 운동 촉진작용을 가지는 모틸린 (motilin) 수용체의 효능제로 작용함에 따라 위마비와 같은 질환에 사용되고 있다 (Weber Jr, Richards et al. 1993). 또한 mitemcinal이라 불리는 erythromycin-derived motilin이 발견되었는데 이는 motilin과 유사하게 강한 위장 운동 촉진작용을 가지면서도 항생제 효과는 없다 (McCallum and Cynshi 2007).

이 외에도 환자의 상태나 병명에 따라 다른 약들이 사용되고 있으며 부작용이 적고 상황에 맞게 사용할 수 있게 선택적인 여러 기전의 위장관 운동 촉진제가 끊임없이 개발되고 있다.

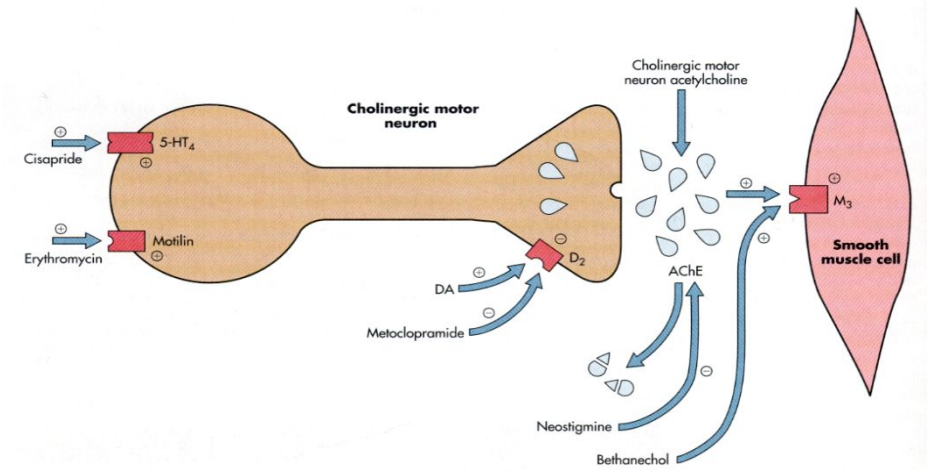


그림 4. 현재 시장에서 사용되고 있는 위장관 운동 촉진제들의

작용 도식도

2. Objective

본 연구는 지실 열수추출물의 여러 구성 물질 중 어떤 단일 성분이 위장관 운동 촉진 효과 (prokinetic effect)를 유발하는지 그 기전을 규명하는 것을 목적으로 한다.

3. Materials

3.1. 실험 재료

지실 열수 추출물 (PF-W)는 이화여자 대학교 천연물 화학 서은경 교수님 연구실에서 추출, 분리되어 제공받았다. Cell line으로는 HEK-293T cell line을 선택하였고, seeding 전에 전처리한 Poly-L-lysine hydrobromide는 Sigma aldrich에서 구입하였다. Transfection 을 위한 Fugene HD는 Roche 에서 구입하였고, Opti mem reduced serum medium은 Gibco에서 구입하였다. Ca^{2+}assay에 사용된 Fluo-3 AM ester와 F-127은 Invitrogen에서 구입하였다. Cell에 receptor gene 발현 여부를 알아보기 위해 사용한 효능제 중 MTLR 효능제인 motilin peptide는 Sigma aldrich에서 구입하였으며 GHLR 효능제인 L-692585와 inhibitor로 사용한 corhistatin-8은 Tocris에서 구입하였다. 5-HT_4 효능제인 cisapride 와 cAMP 분해를 방지하기 위해 사용한 theophylline은 Sigma aldrich에서 구입하였다. 유효 활성 물질 스크리닝을 위한 알려져 있는 지실 내 50여 성분 (Gupta, Mittal et al. 2011) 중 본 실험에서는 주요 12가지 성분을 선택하여 실험하였고, ciral, guanidine HCl, hesperidin, limonene, linalool, naringin, naringenin, neohesperidin dihydrochalcone, rutin hydrate, synephrine, umbellifer

one은 Sigma aldrich에서 구입하였고 poncirin은 LG 생명과학 연구소에서 제공받았다. PF-W나 single compound dilution, Ca^{2+} assay에 사용되는 Ca^{2+}를 포함한 media로는 NBS [140 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, and 5.5 mM HEPES (pH 7.4)]또는 Transport Media (TM) [25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, 5 mM glucose(pH 7.4)]를 사용하였다. pcDNA에 insert된 MTLR과 GHLR gene은 LG생명과학 연구소에서 제공받았으며 이들의 transformation을 위해 E.coli DH5α strain competent cell을 사용하였고 transfection의 여부와 수율을 판단하기 위한 GFP gene과 control군에 사용할 공벡터 pcDNA는 서울대 약대 생리학실 오우택 교수님 실험실로부터 제공 받았다. 이 외 cloning이나 transformation에 사용된 시약이나 kit들은 molecular biology level 이상의 제품을 사용하였다.

종류	판매 회사	Catalog Number
Citral	Sigma Aldrich	W230308-SAMPLE-K(8g)
Guanidin HCL	Sigma Aldrich	G3272-25G
Hesperidin	Sigma Aldrich	H5254-25G
Limonene	Sigma Aldrich	W-263303-SAMPLE-K(8g)
Linalool	Sigma Aldrich	W-263508-SAMPLE-K(8g)
Naringin	Sigma Aldrich	71162-25G
Naringenin	Sigma Aldrich	N5893-5G
Neohesperidin dihydrochalcone	Sigma Aldrich	W381101-SAMPLE-K(10g)
Rutin hydrate	Sigma Aldrich	R5143-50G
Synephrine	Sigma Aldrich	S0752-5G
Umbelliferone	Sigma Aldrich	93979-25G
Poncirin	LG 생명과학 연구소로부터 제공	
L-692-585	Tocris	2261
Cortistatin-8	Tocris	3033
Cisapride	Tocris	1695
GR 125487	Tocris	1658
Fluo-3, AM ester	INVITROGEN	F-1242
Optimem reduced serum medium	GIBCO	31985-070
F-127	INVITROGEN	P3000MP
Fugene HD transfection	ROCHE	04 709 705 001
Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma Aldrich	P6282
Cyclic AMP EIA Kit 96 well	Cayman	581001
Lab-TEK Chambered Coverglass w/cvr #1 German borosilicate sterile 16/CS 8well	Nunc	155411

표 1. 실험에 사용한 시약 및 기자재

3.2. 실험 기기

세포 배양에 필요한 water bath로는 WiseCircu 기기를 사용하였고, 배양을 위한 CO_2 incubator로는 Sanyo CO_2 incubator를 사용하였다. 세포 상태 및 morphology 관찰을 위해 사용했던 광학현미경은 Olympus CKX31을 사용하였다. Centrifuge는 Eppendorf centrifuge 5415R을 사용 하였다. 각종 gene의 농도를 측정하기 위해 Thermo nanodrop을 사용하였고, Ca^{2+} assay를 하기 위한 형광현미경으로 Fluometric NIKON ELCIPS TI를 사용하였다. Nanodrop과 형광현미경은 서울대학교 약학대학 20동 411호 공동기기실에 있는 것을 사용하였다.

3.3. Reagent Kit

Transformation 후 MTLR, GHLR, GFP, pcDNA gene 을 E.coli에서 분리하기 위해 Welgene에서 나온 Welprep Plasmid miniprep kit (Cat.No. PR 001-02) 를 사용하였다. 또한 생성되는 cAMP를 측정하기 위해 Cayman chemical의 cyclic AMP EIA kit 581001을 사용하였다.

3.4. Program

Fluorometic Nikon Eclipse TI으로 형광 사진을 찍고 편집하기 위해 MAG Biosystems software를 사용하였다. 또한 데이터 처리를 위해 ImageJ 와 GraphPad Prism 5 를 사용하였다.

Appliance	Model	Manufacturer
Centrifuge	5417R	Eppendorf (Germany)
CO_2 incubator	MCO-17AI	SANYO (Japan)
Inverted microscope Wisecircu™	CKX 31	Olympus (Japan)
Shaking incubator UV transilluminator	BS-21	Lab companion (Germany)

표 2. 실험에 사용된 기타 장비 목록

4. Methods

4.1. HEK-293T cell culture

액체 질소(−70℃)에 보관중인 HEK−293T cell stock을 37℃ water bath에서 5분간 담궈 해동시킨다. 25T flask에 complete medium (89% DMEM high glucose medium + 10% FBS + 1% penicillin, streptomycin mixture) 7 mL 넣고 cell stock을 pipetting 하여 1mL를 flask에 천천히 넣어주었다. 37℃ incubator에서 이틀 동안 키워 confluency가 70%가 되면 subculture를 해주었다. Seeding 하기 전 두 번의 subculture 과정을 거쳤다.

4.2. Cell seeding

4.2.1. Ca^{2+} assay

세포가 바닥에 잘 부착되도록 하기 위하여 실험에 사용될 8−well에 미리 poly−L−lysine hydrobromide (100 ng/μL in H_20) 200 μL를 넣고 30분간 실온에서 방치하였다. 70%정도 confluency가 되면 cell을 PBS 3 mL로 washing 후 Trypsin−EDTA solution

(TE) 1 mL로 떼어 낸다. 실험에 사용된 8-well (Nunc, Lab-tek chambered cover glass German borosilicate Sterile)한판에 각 well당 HEK-293T cell이 8×10^4개/mL 농도의 2 mL을 seeding 하였다. Hemocytometer를 사용하여 counting 후 농도를 맞춰주고 lysine suction 후 8-well에 각각 200 μL 씩 seeding해준다. 세포가 잘 흩어져있는지 확인한 후 24 시간 incubation 시킨다.

4.2.2. cAMP assay

6-well에 poly-L-lysine hydrobromide (100 ng/μL in H_20) 200 μL를 넣고 30분간 실온에 방치하였다. Hemocyto-meter를 이용하여 cell counting 후 complete media로 희석하여 2.5×10^5개/mL 농도로 맞춰준다. Lysine suction 후 각 well 당 2 mL 씩 넣어주었다. 세포가 잘 흩어져있는지 확인한 후 24 시간 incubation 시킨다.

4.3. Transfection

	cDNA(200ng/ μL)		Optimem	Fugene
한 well당 mix volume	GFP	1 λ	10 λ	0.6 λ
	pcDNA	1 λ	10 λ	0.6 λ
	MTLR	1 λ	10 λ	0.6 λ
	GHLR	1 λ	10 λ	0.6 λ
	$5-HT_4R$	10 λ	100	6 λ

표 3. Transfection에 사용된 시약

HEK-293T cell에 먼저 GFP cDNA를 transfection 시켜보아 잘 되었는지 확인한다. 또한 대조군으로 MTLR, GHLR, $5-HT_4R$이 발현되지 않은 pcDNA를 mock-vector로 사용하였다. Diluent로는 optimem (invitrogen, Carlsbad, CA)를 37℃로 데워 사용하였고 transfection agent로는 Fugene (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하였다. 각 gene마다 위 표대로 mix시킨 후 15분간 실온에 방치하였고, 각 well에는 혼합된 optimem의 양만큼만 실험할 well에 넣어주었다. 그리고 incubator에서 24시간 동안 incubation 시켰다.

4.4. PF-W, 단일구성성분, 시약 preparation

PF-W stock solution (200 mg/mL)은 TM buffer을 이용하여 희석시켜 10 μg/mL 로 만들어준다. 각 수용체들의 효능제들인 motilin peptide (motlin 수용체 효능제), L-692.585 (ghrelin 수용체 효능제), cisapride (5-HT_4 수용체 효능제)는 20 mM stock solution제조 후 TM buffer로 희석하여 사용하였고 antagonist test 에 사용된 cortistatin-8 (Ghrelin 수용체 길항제)은 바로 TM buffer로 희석하여 사용하였다. 단일구성성분 중 naringin, naringenin, guanidine HCl, poncirin, hesperidin, neohesperidin, rutin hydrate, citral, linalool, limonene, umbelliferone, synephrine은 모두 20 mM stock solution (in DMSO) 에서 TM buffer로 희석하여 사용하였고 guanidine은 TM buffer로 20 mM stock 제조 후 희석하여 사용하였다. Final concentration의 2배 농도로 만든 후 각 well에 첨가하여 두 배 희석되어 final concentration이 되도록 하였다.

4.5. 수용체 활성 측정

4.5.1. GHLR_Ca^{2+} assay

Transfection step이 완료된 후 각 well (8-well)을 200 λ TM buffer로 washing해 주고 다시 200 λ TM buffer + 2 λ fluo-3 AM + 2 λ F127 (제조 시엔 master mix 로 제조) 을 넣어준다. 칼슘에 선택적으로 binding 하여 형광을 띄는 Fluo-3 AM은 광분해성이 있어 항상 은박지로 감싸며 빛이 없는 상태에서 실험을 진행하여야 한다. 37℃ incubator에서 40 분간 incubation 후 dye mixture를 suction하고 TM buffer 200 λ 로 한차례 washing해 준다. 그리고 각 well에 TM buffer 150 λ 또는 cortistatin-8 150 λ 를 넣어 주고 10 분간 방치한 후 Ca^{2+} assay를 진행한다.

서울학교 약학대학 20동 411호에 있는 형광현미경 (Fluorometric Nikon Eclipse TI)으로 MAG Biosystems software 프로그램을 이용하여 물질 투여 후 3초 간격으로 사진을 찍었다. 실험에 사용한 Fluo-3 AM이 잘 exciting되는 488 nm (Filter G)으로 파장을 설정한 후 관찰하였다. GFP gene을 transfection시켜 보아 transfection 수율이 40%이상 되는 것을 확인한다. 선행 연구로

이루어진 PF-W의 그렐린 수용체에 대한 경유 여부도 validation해 본 후에 PF-W의 단일구성성분에 대하여 그렐린 수용체에 스크리닝을 해보았다.

4.5.2. 5-HT_4R_cAMP assay

Transfection step이 끝난 후 각 well (6-well)을 TM buffer 1 mL로 2회 washing해 준다. 5-HT_4R 길항제를 처리할 well에는 100 nM의 GR 125487이 포함된 5 mM의 theophylline 1 mL을, 그 외의 well에는 5 mM의 theophylline을 1 mL씩 첨가하여 15분간 37℃에 두었다. Theophylline은 생성된 cAMP가 분해되는 것을 방지하기 위해 전처리 되었다. 약물의 final concentration의 두 배 농도로 TM buffer에 희석된 약물을 준비하여 1 mL씩 첨가하여 처리 후 최종 농도가 되도록 하였다. 이 때에도 길항제 처리시에는 각 약물과 함께 100 nM의 GR 125487이 포함되도록 하였다.

모든 well을 비우고 세척한 후 0.1N HCl을 1 mL 적가하고 실온에 20분간 mild 하게 shaking해주어 cell lysis 시켰다. 6-well용 cell scrapper를 사용하여 plate 바닥에 부착된 cell을 긁어 모으고 1.5 mL tube에 옮겨 담았다. BCA assay용으로 30 λ를 취하고 나머지는 1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다.

Cyclic AMP EIA kit (Cayman chemical, Ann. Arbor, MI)를 이용하여 채취된 sample중의 cAMP들을 정량하였다 (이번 실험에서의 cAMP농도가 매우 낮아 kit의 protocol 중 낮은 농도의 정량에 적합한 acetylation 방법을 이용하였다). 얻어진 cAMP의 양은 well 내의 protein을 BCA assay로 정량한 값으로 보정되었다.

4.6. Data Anlaysis

4.6.1. Ca^{2+} assay

ImageJ 프로그램을 이용하여 얻어진 cell들을 전수 인식시킨 다음 3초마다 찍힌 cell의 형광 변화에 대하여 약물 투여 전의 형광 밝기에 대하여 비율로 나타내며 F/F_0으로 표기한다. X 축은 time (sec), Y축은 F/F_0 (mean±S.E.M)으로 표시하였다.

4.6.2. cAMP assay

각 물질 별로 cyclic AMP EIA kit를 이용하여 얻어진 보정된 cAMP양을 나타내었다. 통계값은 mean을 이용하여 나타내었다.

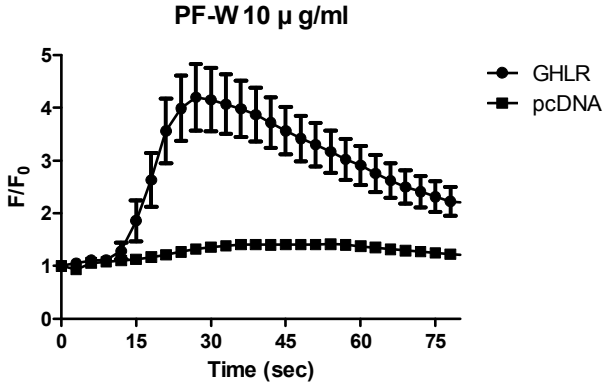
5. Results

5.1. GHLR 과발현 세포에 지실의 단일 구성 성분 스크리닝

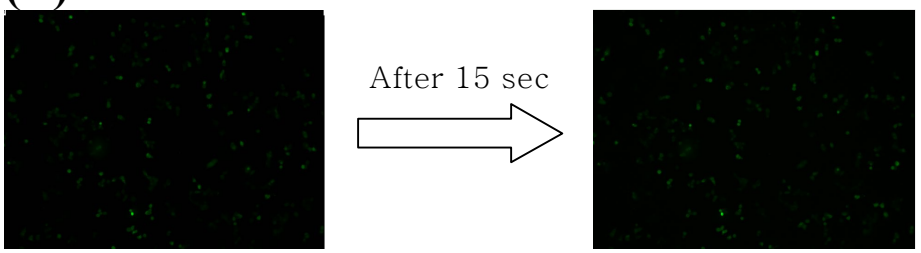
우선 transfection이 잘 되는지 확인하기 위해 형광을 띠는 peGFP-N1 vector를 HEK-293T cell에 transfection을 시킨 후 cell이 형광을 띠는지를 관찰하였다. 그 결과 현미경으로 관찰된 세포 중 40%이상이 형광을 나타내었고, 따라서 HEK-293T cell transfection 이 잘 되었다고 간주하였다.

이후 GHLR-pcDNA를 transfection시킨 후 발현 여부를 GHLR 효능제로 알려져 있는 L-692.585를 통해 확인하였다. 공 vector인 pcDNA만을 발현 시킨 대조군에서는 L-692.585 1 μM 처리 시 형광을 나타내지 않았으나 GHLR-pcDNA를 발현 시킨 군에서는 L-692.585 1 μM 처리 시 형광밝기가 증가하는 것을 관찰하였으며 이를 통해 GHLR이 정상적으로 발현되었음을 알 수 있었다. PF-W (10 μg/mL)를 처리를 하였을 경우에도 GHLR을 발현시킨 군에서만 형광 밝기가 밝아지는 것을 확인하였다(그림 5A, 그림 5B). 이로써 PF-W가 GHLR을 활성화시킨다는 선행 연구를 재차 확인하였다.

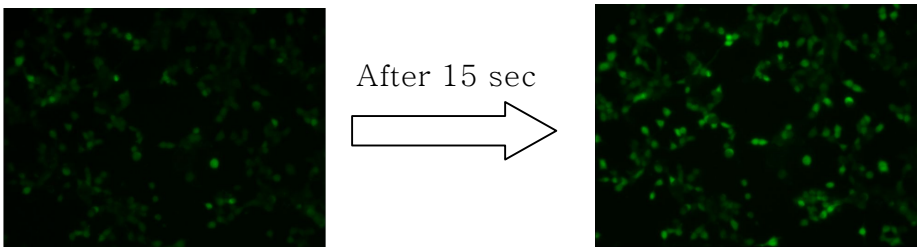
(A)



(B)



Control (pcDNA)

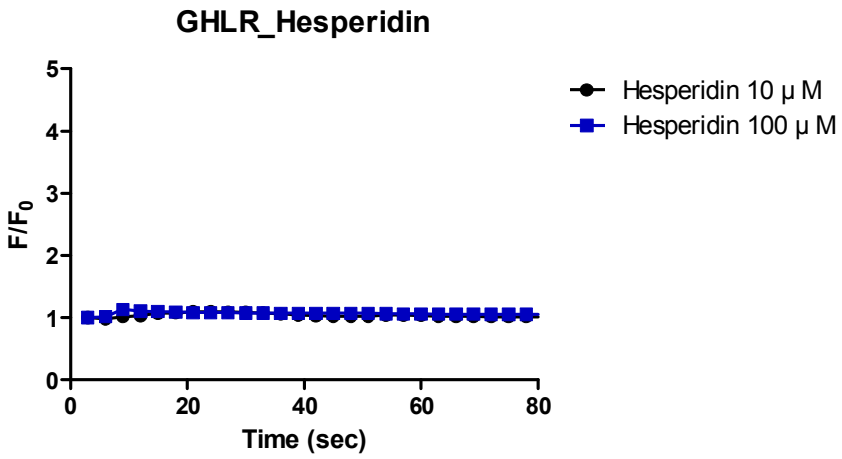


GHLR

그림 5. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 PF-W 처리 후 Ca^{2+}assay. (A) PF-W 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화. (B) PF-W 10 μg/ml 처리 전 후 cell 내 형광 밝기 변화

이후 PF-W의 단일구성성분들인 naringin, naringenin, guanidine HCl, poncirin, hesperidin, neohesperidin, rutin hydrate, citral, linalool, limonene, umbelliferone, synephrine 을 각각 최종 농도가 100 μM가 되도록 well에 넣어 준 후 변화를 관찰하였다. 그 결과 hesperidin, rutin hydrate, poncirin, neohesperidin, umbelliferone 의 경우에는 형광 밝기 변화가 나타나지 않았고, 10 μM의 농도를 처리하였을 때도 역시 변화가 나타나지 않았다 (그림 6A, 그림 6B, 그림 7A, 그림 7B, 그림 8A). 정유 성분인 citral, linalool, limonene은 1.3 ± 0.1배의 약한 반응을 보였고 (그림 8B, 그림 9A, 그림 9B), guanidine의 경우에는 1.5±0.1배의 반응을 보였으나 대조군에서도 같은 반응을 보였다 (그림 10A). Synephrine 같은 경우에는 2.1±0.1배의 수용체 효능제와 비슷한 양상의 반응을 보였으나 control에서도 2.0배±0.1배의 반응을 나타내었다 (그림 10B). 그러나, 다른 물질들과는 달리 naringin과 naringenin 처리시에는 대조군과 비교하여 뚜렷한 밝기 변화를 보였다 (그림 11A, 그림 11B).

(A)



(B)

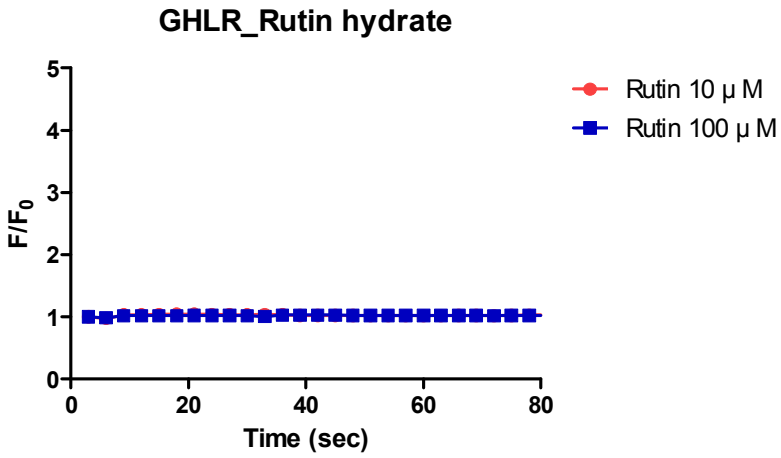
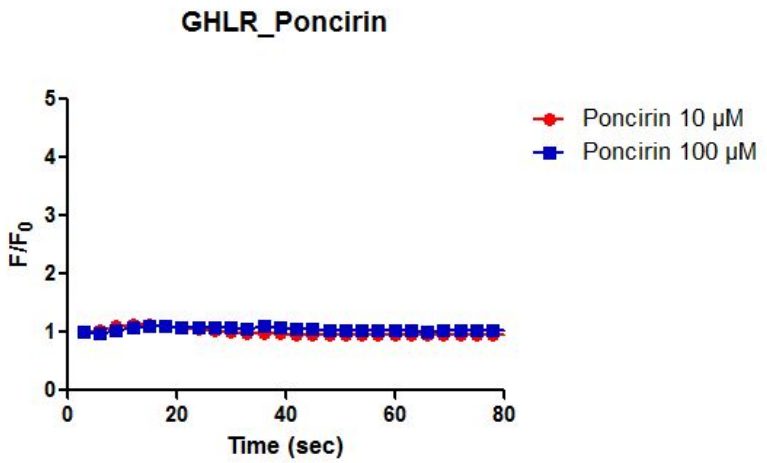


그림 6. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 (A) hesperidin 10 μM, 100 μM 처리, (B) rutin hydrate 10 μM, 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

(A)



(B)

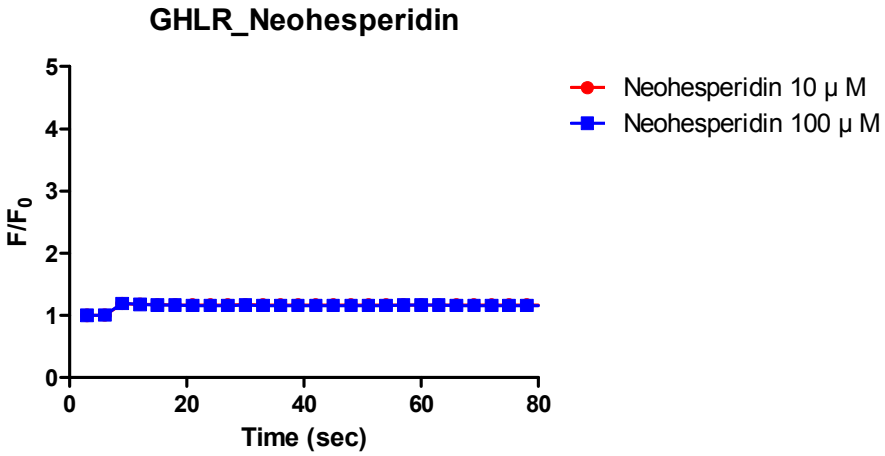
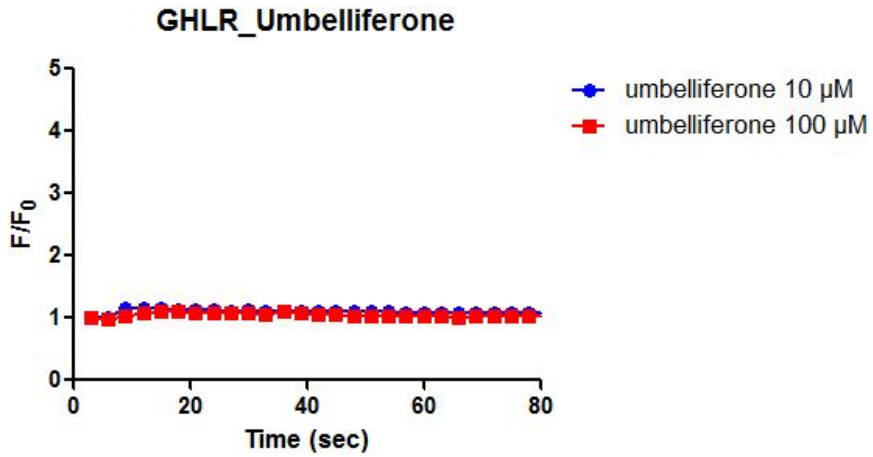


그림 7. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 (A) poncirin 10 μM, 100 μM 처리, (B) neohesperidin 10 μM, 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

(A)



(B)

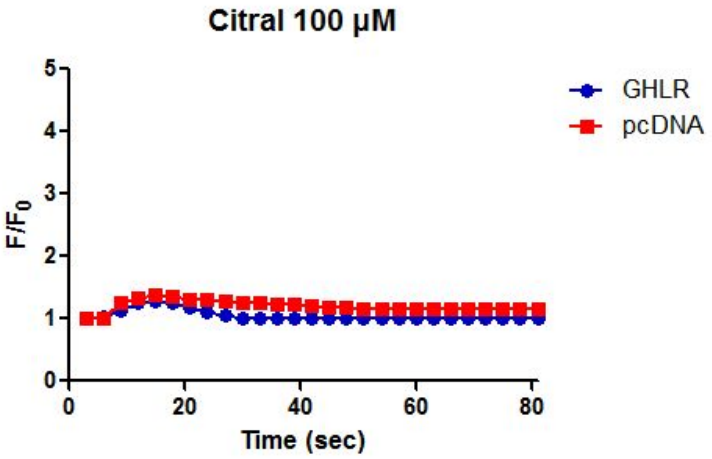
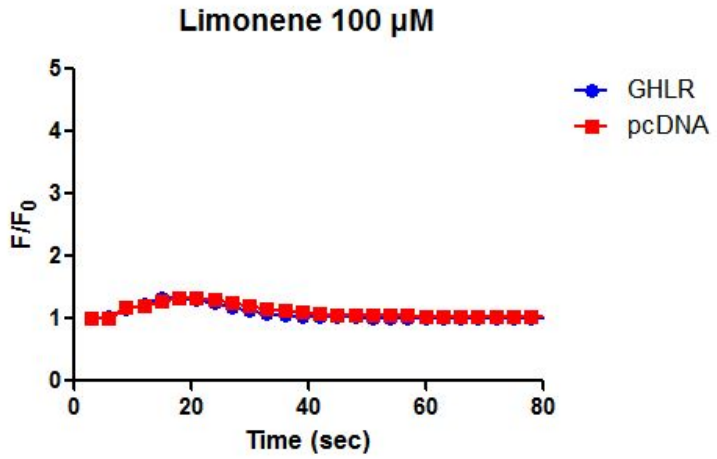


그림 8. GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) umbelliferone 10 μM, 100 μM 처리, (B) citral 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

(A)



(B)

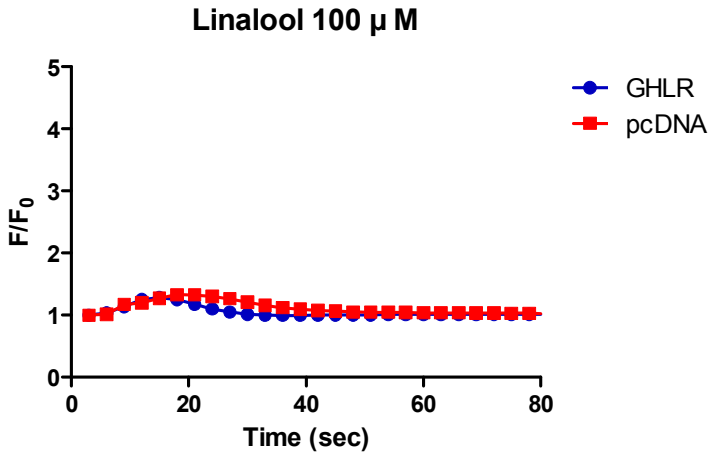
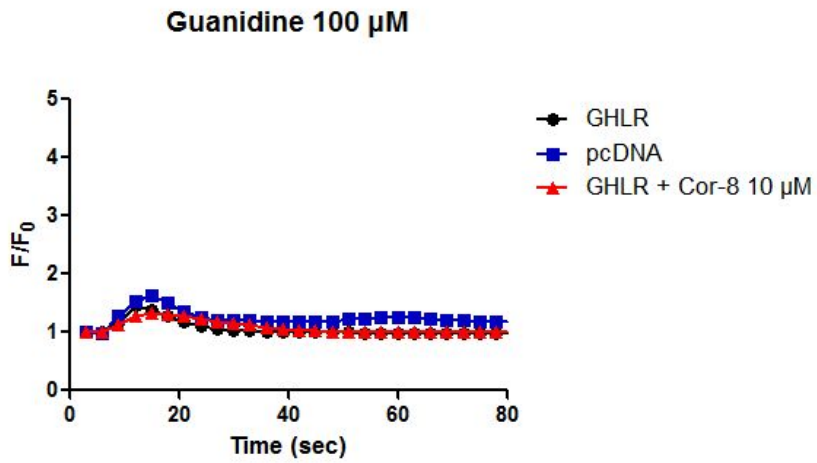


그림 9. GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) limonene 100 μM 처리, (B) linalool 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

(A)



(B)

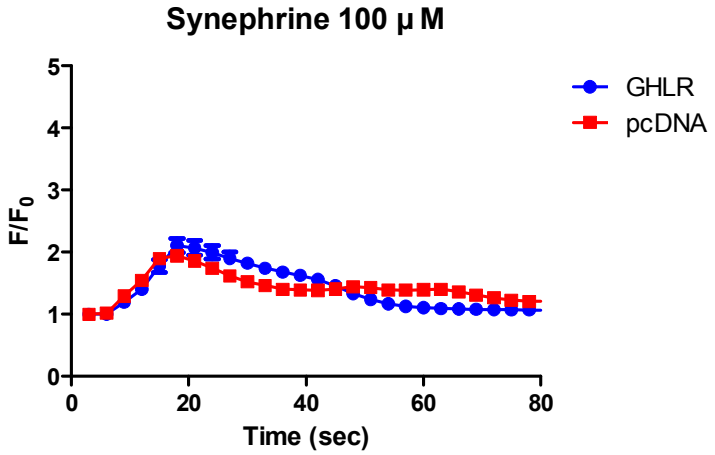
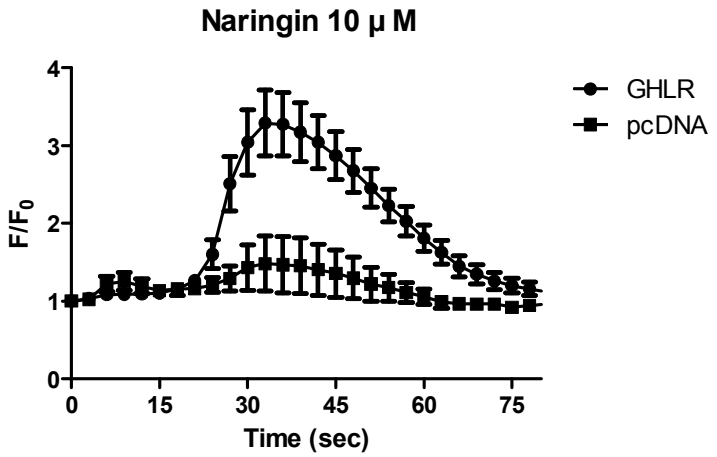


그림 10. GHLR 이 발현된 HEK-293T cell 에 (A) guanidine 100 μM 처리, (B) synephrine 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t 초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

(A)



(B)

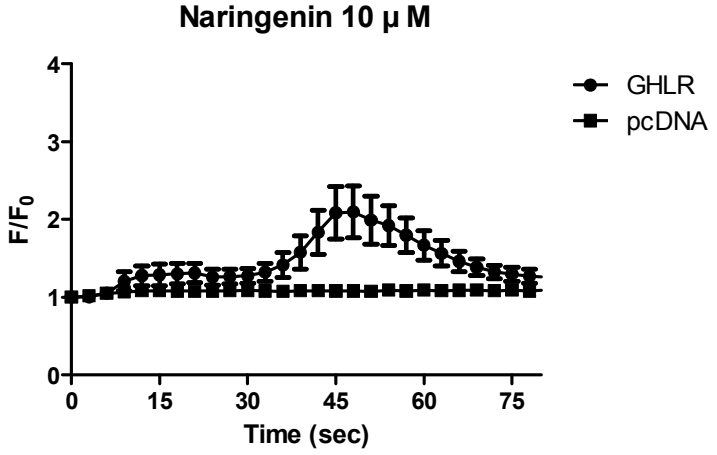


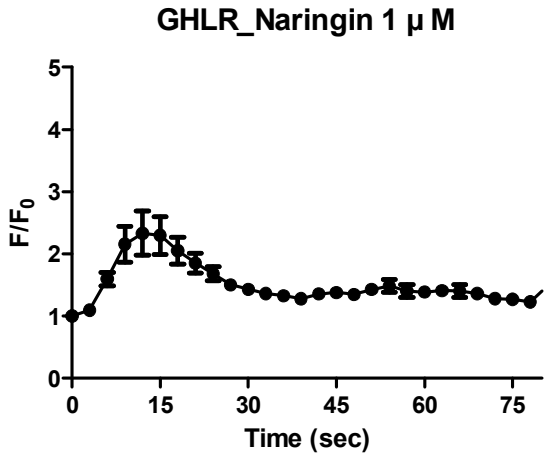
그림 11. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 (A) naringin 10 μM 처리, (B) naringenin 10 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

5.2. Naringin 과 naringenin 의 농도의존성

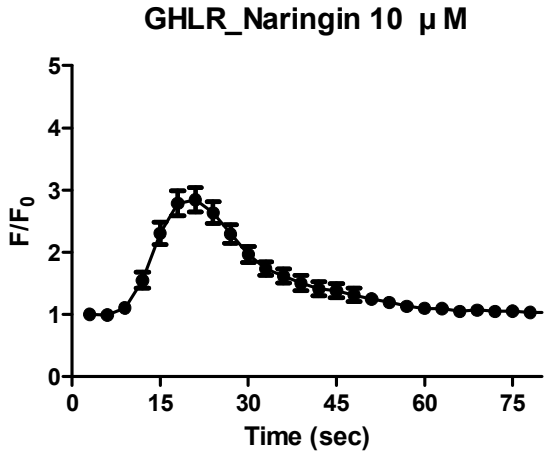
5.2.1. Naringin 의 농도의존성

위 실험 결과를 바탕으로 대조군 대비 GHLR transfection 군에서 뚜렷한 차이를 보인 naringin 에 대해 보다 정확한 활성화 여부를 확인하기 위해 다양한 농도 조건에서 실험을 진행하였다. 농도를 제외하고 동일한 날짜와 조건에서 같은 과정으로 Ca^{2+} assay 를 진행하였고 각각 1 μM, 10 μM, 100 μM 의 농도를 처리하였다. 그 결과, 1 μM 의 농도에서는 최대 밝기가 약 2.3 배까지 증가하였고 (그림 12A), 10 μM 의 농도에서는 약 2.9 배까지 증가하였다 (그림 12B). 100 μM 의 농도에서는 약 4 배까지 증가하였다 (그림 12C). 결국 naringin 처리 시에 나타나는 형광 밝기 증가 반응은 농도 의존적인 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

(A)


GHLR_Naringin 1 μ M
F/F0
0
1
2
3
4
5
0
15
30
45
60
75
Time (sec)

(B)


GHLR_Naringin 10 μ M
F/F0
0
1
2
3
4
5
0
15
30
45
60
75
Time (sec)

(C)

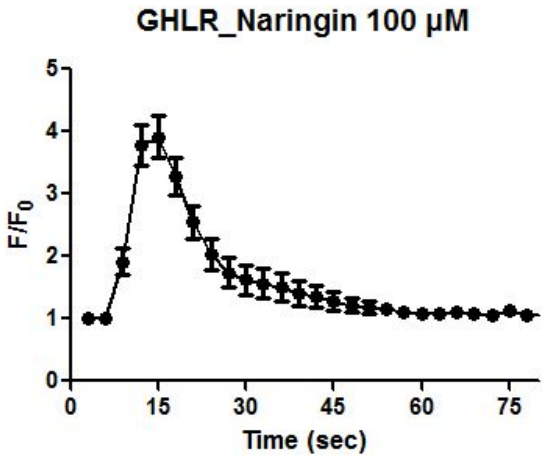
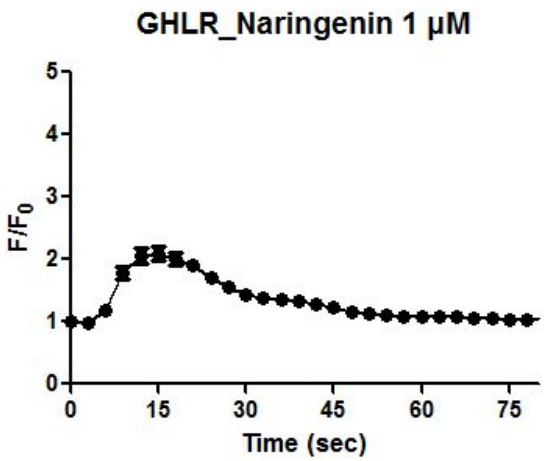


그림 12. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 naringin (A) 1 μM, (B) 10 μM, (C) 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

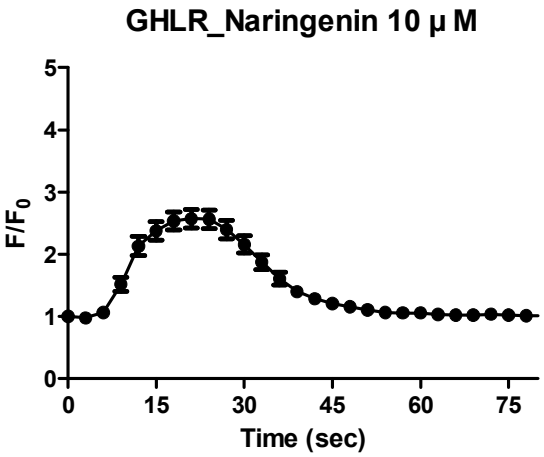
5.2.2. Naringenin 의 농도의존성

마찬가지로 naringenin 에 대해서도 GHLR 에 대한 농도 의존성을 확인해 보았다. 같은 과정으로 Ca^{2+} assay 를 진행하였고 각각 1 μM, 10 μM, 100 μM 의 농도에서 측정되었다. 1 μM 의 농도에서는 최대 밝기가 약 2 배까지 증가하였고 (그림 13A), 10 μM 의 농도에서는 약 2.6 배까지 증가하였다 (그림 13B). 100 μM 의 농도에서는 약 2.8 배까지 증가하였다 (그림 13C). Naringin 과 마찬가지로 농도가 증가할수록 최대 밝기가 증가하는 현상을 보였으나 1 μM 과 10 μM 사이에서의 밝기 차이는 0.6 배, 10 μM 과 100 μM 사이에서의 밝기 차이는 0.2 배로 naringin 의 0.6 배, 1.1 배에 비해 그 차이가 적게 증가하는 경향을 보였다.

(A)


GHLR_Naringenin 1 μM
F/F0
0
1
2
3
4
5
0
15
30
45
60
75
Time (sec)

(B)


GHLR_Naringenin 10 μ M
F/F0
0
1
2
3
4
5
0
15
30
45
60
75
Time (sec)

(C)

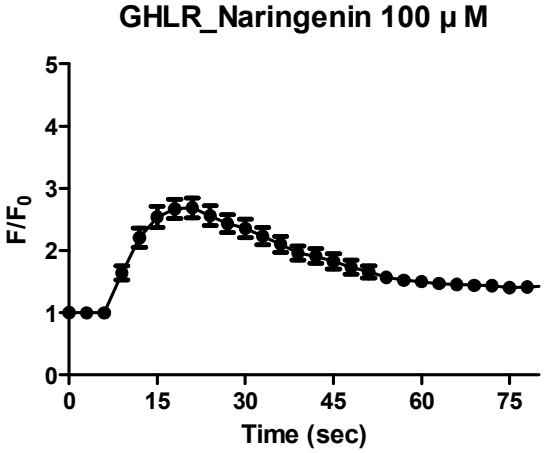


그림 13. GHLR이 발현된 HEK-293T cell에 naringenin (A) 1 μM, (B) 10 μM, (C) 100 μM 처리 후 시간대별 F (약물처리 후 t초 후의 형광밝기)/F_0 (약물처리 전 세포의 형광밝기) ratio 변화

5.3. 5-HT4R 과발현 세포에 단일구성성분 스크리닝

5.3.1. 5-HT_4R 활성화 여부에 대한 단일구성성분 고농도 스크리닝

PF-W가 5-HT_4R을 활성화시킨다는 사실은 이미 이전 연구를통해 밝혀져 있으나, 어떤 단일 물질이 이러한 효과를 유발하는지는 밝혀져 있지 않기에 이를 확인하고자 하였다. 먼저 5-HT_4R 유전자의 발현 및 기능을 확인하였는데 양성 대조군의 경우 뚜렷한 cAMP 증가 양상을 보였으며 처리한 지실의 단일 구성 물질의 cAMP는 다음과 같이 측정되었다.

지실 단일 구성 물질	cAMP농도(pmol/ml)
Cisapride 10 μM	53.432
Poncirin 100 μM	31.893
Naringin 100 μM	31.148
Naringenin 100 μM	28.339
Hesperidin 100 μM	27.940
Guanidin 100 μM	32.349
Rutin hydrate 100 μM	32.044
Citral 100 μM	27.196
Limonene 100 μM	31.743
Neohesperidin 100 μM	28.744

표 4. 5-HT_4R이 발현된 HEK-293T cell에 cisapride 10 μM, 지실의 단일구성성분 100 μM 처리후 cAMP assay

5.3.2. 5-HT_4R 활성화 여부에 대한 단일구성성분 저농도 스크리닝.

앞서 고농도 스크리닝에서 5-HT_4수용체 유전자가 잘 발현됨을 확인하였고, 또 cAMP 생성 증가가 5-HT_4 수용체를 매개로 한다는 것을 확인하였다. 선행 연구로 5-HT_4 수용체를 경유한다고 알려진 PF-W를 1 mg/mL의 농도로 처리하여 보았고 mock vector 군의 cAMP가 17.830 pmol/mg 가 나온데 비해 5-HT_4 수용체 군에서는 18.334 pmol/mg 로 측정되었다. PF-W가 5-HT_4 수용체를 경유한다는 것을 재확인할 수 있었고, 앞서 고농도로 처리한 실험에서 뚜렷하게 5-HT_4 수용체를 경유하는 물질은 없었지만 미세한 증가를 보인 poncirin, naringin, hesperidin, rutin hydrate, limonene에 대해 10 μM 의 농도로 pcDNA (mock vector)군 대비 실험을 진행하였다. 그 결과, 각 지실의 단일 구성 물질을 처리하였을 때 대조군에 비해 cAMP가 뚜렷하게 증가한 물질은 없었다. PF-W가 5-HT_4R을 경유한다는 것은 재확인하였으나 정확히 어떤 단일 구성 물질이 5-HT_4R 의 효능제로 작용하는지는 밝혀내지 못하였다.

지실 단일 구성 물질	cAMP농도 (pmol/mg)	
	pcDNA군	5-HT_4R군
PF-W 1 mg/mL	17.830	19.334
Poncirin 100 μM	17.676	17.660
Naringin 100 μM	17.707	17.662
Hesperidin 100 μM	17.707	17.662
Rutin hydrate 10 μM	17.438	17.347
Limonene 10 μM	16.857	16.751

표 5. 5-HT_4R이 발현된 HEK-293T cell에 PF-W 1 mg/mL, 지실의 단일구성성분 10 μM 처리후 cAMP assay

6. Discussion & Conclusion

본 연구에서는 소화기계 질환에서 널리 이용되어 온 지실 열수 추출물(PF-W)의 구성 성분 중 어떠한 성분이 위장관 운동 촉진에 관여하는 지를 규명하고자 수행하였다.

지실의 위장관 운동 촉진 효과는 이미 잘 알려져 있다. 위장관 운동성을 저하시킨 병리모델 랫트에서 PF-W는 intestinal transit을 효과적으로 회복시킴이 밝혀진 바 있다 (Lee, Seo et al. 2005). 또한 PF-W가 5-HT_4 수용체를 활성화 시킨다는 사실이 밝혀졌다 (Shim, Back et al. 2010). 또한 선행연구에서 PF-W가 5-HT_4 수용체 외에 그렐린 수용체를 활성화시킨다는 사실을 알 수 있었다. 그러나 단일 성분 수준에서는 어떤 물질이 GHLR 및 5-HT_4R을 활성화시키는지 전혀 알려진 바가 없었다. 이러한 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 PF-W의 구성 단일 물질 중 위장관 운동 촉진 효과에 가장 크게 관여하는 물질을 찾고자 하였다.

5-HT_4 수용체의 활성은 cAMP의 생성 양으로 측정하는 5-HT_4 연구에 일반적으로 사용되는 방법을 이용하였고 (Liu, Geddis et al. 2005), 그렐린 수용체의 활성은 세포 내 칼슘 농도가 높아지는 것을 이용하여 Ca^{2+} specific binding dye인 Fluo-3 AM을 이용해 세포 내 칼슘 농도를 측정하는 그렐린 수용체 연구에 많이 사용

되는 칼슘 이미징 (Ca^{2+} imaging) 기법을 사용하였다(Xu, Depoortere et al. 2005).

본 실험에서는 수용체 유전자를 transfection할 시에 대조군 으로써 사용하기 위해 실험될 모든 수용체가 발현되어 있지 않은 세포 중 실험계가 잘 갖추어진 HEK-293T cell을 사용하였다. 여러 단일구성성분들을 처리했을 때 대조군 에서도 약간의 칼슘 유입을 일으키는 물질이 몇 가지 있었다. Guanidine과 정유 성분인 Limonene, Linalool, Citral과 의 경우 약물 처리 초반에 약한 칼슘 유입을 보였으나, 이러한 현상은 pcDNA만을 발현시킨 대조군 에서도 동일하게 관찰되었다. 따라서 이는 GHLR을 활성화시켜서 세포 내 칼슘 변화를 일으키는 것이 아니라, HEK-293T cell에 내생적으로 존재하는 칼슘과 관계된 채널이나 다른 수용체들을 활성화시키는 등의 다른 요인으로 미량의 칼슘 유입을 일으키는 것으로 보인다. 또한 synephrine의 경우에는 GHLR군에서 F/F_0 이 2.1배까지 증가하여 수용체 효능제로서의 양상을 뚜렷이 보였으나, 대조군에서의 F/F_0 역시 2,0배로, 나타난 칼슘 유입이 GHLR 의존적이지는 않음을 보였다. HEK-293T cell에는 또 다른 GPCR인 adrenoreceptor가 발현되어 있는데 (Camilleri, Papathanasopoulos et al. 2009) synephrine이 이 수용체의 효능제로 알려져 있다 (Ma, Bavadekar et al. 2010). 따라서 synephrine의 경우는 이 adrenoreceptor가 활성화되어 형광이 증가한 것으로 유추할 수 있

으나, 추가실험이 필요해 보인다. 결론적으로 본 실험과 관련해, guanidine HCl, limonene, linalool, ciral, synephrine처리시 나타나는 칼슘 유입이 GHLR을 활성화 시켜서 나타나는 반응이 아니라는 사실을 밝혔다.

반면 naringin과 naringenin의 경우에는 대조군 대비 GHLR군에서 F/F_0 의 뚜렷한 변화가 있었다. 그리고 naringin의 경우에는 농도를 1 μM, 10 μM, 100 μM에서 실험하였을 때 농도를 증가시킬수록 F/F_0 가 2.3배, 2.9배, 4배로 계속 증가하는 양상을 보였으나 naringenin의 경우에는 1 μM, 10 μM, 100 μM 에서 실험하였을 때 10μM의 2.8배에서 정체된 양상을 보였다. 이로 보아 PF-W의 여러 단일구성성분들 중 naringin과 naringenin이 GHLR을 활성화시킴을 알 수 있었다. 또한 형광밝기의 peak를 나타내는 지점 또한 30초 전후로 나타남으로 PF-W의 양상과 비슷함을 확인하여 PF-W의 GHLR 경유에 관해 naringin과 naringenin이 그 원인물질일 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

또한 5-HT_4R 활성화 실험에서는 선행연구와 마찬가지로 PF-W 처리 시 cAMP 증가를 확인할 수 있었지만 단일구성성분의 수준에서는 대조군과 대비하여 cAMP 증가 작용을 나타내는 물질을 찾을 수 없었다. 단 역시 GPCR인 adrenoreceptor의 효능제로 알려진 synephrine은 본 screening에서 제외하였다. 이는 실험되지 않은 미지의 물질이 5-HT_4R 효능제로 작용한다고 추론할 수도 있으

며 복합물질 상태에서 미지의 반응을 일으킨다고도 가정해 볼 수 있다.

생약 추출물은 생약의 원산지와 추출자에 따라 다른 성분을 포함한다. 지실 내 어떤 미량 성분이 5-HT_4R에 대해 효능제로서 역할을 하는지 밝혀지지 않았지만 naringin의 경우 식약청에서 지표물질로 지정한 poncirin과 함께 지실 내 주요 성분중 하나로 알려져 있다(Gupta, Mittal et al. 2011). 예로부터 지실을 소화기계 질환 치료를 위해 복용할 때에는 추출의 편의를 위해 열수 추출물을 사용하였으나, naringin과 naringenin이 지용성 분획에 더 많이 포함됨이 예상됨에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 부분으로 보인다.

위의 결과로서 살펴볼 때 PF-W의 위장관 운동 촉진 효과를 주요하게 나타내는 물질은 GHLR을 경유하는 naringin과 naringenin임을 추론할 수 있다. 선행되었던 male rat에서 이루어진 ITR 실험에서, cisapride보다 PF-W의 ITR값이 높은데 비해 5-HT_4R의 경유 정도가 미약함을 뒷받침해준다고 볼 수 있다. 오히려 실험에 사용된 rat에 5-HT_4R 뿐만 아니라 GHLR도 잘 발현되어 있다는 점을 고려해 볼 때 (Sanger 2008) PF-W의 위장관 운동 촉진 효과에 5-HT_4R보다 GHLR의 작용이 클 수 있다고 생각해볼 수 있다. 현재 자세한 역할이 늦게 알려진 GHLR 효능제로서 임상 시험을 받고 있는 약물들은 있지만 (Ejskjaer, Dimcevski et al. 2010) 시장에서 사용되는 약물은 없다. 하지만 심각한 부작용으로 퇴출된

cisapride 등의 위장관 운동 촉진제에 비해 내인성 펩타이드인 그렐린의 수용체가 표적이라는 점과 PF-W 또한 오랫동안 복용되어온 천연물인 점, naringin 역시 고미물질로 많이 섭취되고 있는 물질임을 고려하면 여러 기전의 다양한 약제가 사용되는 위장관 운동 촉진제 시장에서 PF-W의 위장관 운동 촉진제로서의 개발 가능성 뿐 아니라 naringin, naringenin의 단독 개발 가능성 또한 충분하다고 보인다.

7. Reference

Bran, S., W. A. Murray, et al. (1995). "Long QT syndrome during high-dose cisapride." Archives of internal medicine **155**(7): 765.

Brogden, R. N., A. Carmine, et al. (1982). "Domperidone. A review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic." Drugs **24**(5): 360.

Buchheit, K. (1993). Treatment of gastrointestinal disorders using 5-HT3 antagonists, EP Patent 0,189,002.

Camilleri, M., A. Papathanasopoulos, et al. (2009). "Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders." Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology **6**(6): 343-352.

Cummings, D. E., D. S. Weigle, et al. (2002). "Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery." New England Journal of Medicine **346**(21): 1623-1630.

Date, Y., M. Nakazato, et al. (2002). "Ghrelin is present in pancreatic α-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion." Diabetes **51**(1): 124-129.

De Maeyer, J., R. Lefebvre, et al. (2008). "5-HT4 receptor agonists: similar but not the same." Neurogastroenterology & Motility **20**(2): 99-112.

De Ponti, F. and J. R. Malagelada (1998). "Functional Gut Disorders:: From Motility to Sensitivity Disorders. A Review of Current and Investigational Drugs for Their Management." Pharmacology & therapeutics **80**(1): 49-88.

Ejskjaer, N., G. Dimcevski, et al. (2010). "Safety and efficacy of ghrelin agonist TZP-101 in relieving symptoms in patients with diabetic gastroparesis: a randomized, placebo-controlled study." Neurogastroenterology & Motility **22**(10): 1069-e1281.

Gupta, A., A. Mittal, et al. (2011). "Nature's treasurer: plants acting on colon cancer." Journal of Stress Physiology & Biochemistry **7**(4).

Hegde, S. S. and R. M. Eglen (1996). "Peripheral 5-HT4 receptors." The FASEB journal **10**(12): 1398-1407.

Horvath, T. L., S. Diano, et al. (2001). "Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance—a hypothalamic perspective." Endocrinology **142**(10): 4163-4169.

Kim, C., M. Sin, et al. (1997). Dictionary of Chinese Materia Mediaca, Jungdam Publishing, Soeul.

Lee, H. T., E. K. Seo, et al. (2005). "Effect of an aqueous extract of dried immature fruit of< i> Poncirus trifoliata</i>(L.) Raf. on intestinal transit in rodents with experimental gastrointestinal motility dysfunctions." Journal of ethnopharmacology **102**(2): 302-306.

Lee, H. T., E. K. Seo, et al. (2005). "Prokinetic activity of an aqueous extract from dried immature fruit of< i> Poncirus trifoliata</i>(L.) Raf." Journal of ethnopharmacology **102**(2): 131-136.

Liu, M., M. S. Geddis, et al. (2005). "Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **289**(6): G1148-G1163.

Liu, Z., R. Sakakibara, et al. (2005). "Mosapride citrate, a novel 5-HT4 agonist and partial 5-HT3 antagonist, ameliorates constipation in parkinsonian patients." Movement disorders **20**(6): 680-686.

Ma, G., S. A. Bavadekar, et al. (2010). "Effects of synephrine and β-phenethylamine on human α-adrenoceptor subtypes." Planta medica **76**(10): 981.

McCallum, R. and O. Cynshi (2007). "Efficacy of mitemcinal, a motilin agonist, on gastrointestinal symptoms in patients with symptoms suggesting diabetic gastropathy: a randomized, multi-center, placebo-controlled trial." Alimentary pharmacology & therapeutics **26**(1): 107-116.

Mohler, E. G., S. Shacham, et al. (2007). "VRX-03011, a novel 5-HT4 agonist, enhances memory and hippocampal acetylcholine efflux." Neuropharmacology **53**(4): 563-573.

Pinder, R., R. Brogden, et al. (1976). "Metoclopramide: a review of its pharmacological properties and clinical use." Drugs **12**(2): 81.

Pindon, A., G. Van Hecke, et al. (2002). "Differences in Signal Transduction of Two 5-HT4Receptor Splice Variants: Compound Specificity and Dual Coupling with Gαs-and Gαi/o-Proteins." Molecular pharmacology **61**(1): 85-96.

Poitras, P. and C. Tomasetto (2009). "The potential of ghrelin as a prokinetic." Regulatory peptides **155**(1-3): 24-27.

Quigley, M., S. Judd, et al. (1980). "Functional studies of dopamine control of prolactin secretion in normal women and women with hyperprolactinemic pituitary microadenoma." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **50**(6): 994-998.

Robinson, O. (1973). "Metoclopramide--side effects and safety." Postgraduate medical journal **49**: suppl 4: 77.

Sallam, H. S. and J. D. Z. Chen (2010). "The prokinetic face of ghrelin." International journal of peptides **2010**.

Sanger, G. J. (2008). "Motilin, ghrelin and related neuropeptides as targets for the treatment of GI diseases." Drug discovery today **13**(5-6): 234-239.

Shim, W. S., H. Back, et al. (2010). "An aqueous extract of Poncirus fructus activates the prokinetic activity of 5-HT receptor subtype 4 without hERG interaction." Journal of ethnopharmacology **132**(1): 328-333.

Tonini, M., L. Cipollina, et al. (2004). "Clinical implications of enteric and central D2 receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics." Alimentary pharmacology & therapeutics **19**(4): 379-390.

Van Wijngaarden, I. and W. Soudijn (1997). Serotonin receptors and their ligands, Elsevier Science.

Weber Jr, F., R. Richards, et al. (1993). "Erythromycin: a motilin agonist and gastrointestinal prokinetic agent." The American journal of gastroenterology **88**(4): 485.

Xu, L., I. Depoortere, et al. (2005). "Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus." Regulatory peptides **124**(1): 119-125.

Young Cruz, C. R. and R. G. Smith (2007). "The growth hormone secretagogue receptor." Vitamins & Hormones **77**: 47-88.

Abstract

A Study on the Mechanism of Prokinetic Activity Induced by Compounds In an Aqueous Extract of Poncirus Fructus

Su-Won Kim

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

The dried immature fruit of Poncirus trifoliate (L.) Raf. (Ruatceae), Poncirus Fructus (PF), is widely used as a traditional medicine in Eastern Asia, especially as a remedy for digestive diseases. Despite its wide use, only a few studies have been reported for the effects of PF on GI motor functions in terms of its single components. More than 50 chemical components, including hesperidin, naringin, poncirin, citral, synephrine are reported to be present in PF. As prokinetic effect of Poncirus Fructus is known to be through cholinergic pathway, and proved to act on 5-HT_4 receptor and ghrelin receptor, our objective is to do screening single compound of PF on those receptors. We measured there activity with there product when they are activated. We used fluorescence microscope to detect calcium which is influxed from outer membrane and calcium store in cell by activation of ghrelin receptors. And we used ELISA kit to detect cAMP which is released from receptor as messenger when 5-HT_4 receptor is activated. Human Embryonic Kidney (HEK)293T cell is selected as control cell line, and we transfected HEK-

293T cell with ghrelin and 5-HT_4 receptor. HEK-293T cells were grown in DMEM containing 10% FBS, 1% non-essential amino acids, 100U/ml penicillin and 0.1mg/ml streptomycin at 37℃ in an atmosphere of 5% CO_2 and 90% relative humidity. Fluo-3 was used to detect level of calcium in the cell, and used single compound in poncirus fructus were naringin, naringentrin, hesperidin, rutin hydrate, poncirin, neohesperidin, umbelliferone, guanidine, synephrine, citral, limonene, linalool. HEK-293T cell transfected with ghrelin receptor was activated by naringin and naringenin, calcium level was dramatically increased compared with there control group. That activation was blocked by Cortistatin-8, ghrelin receptor antagonist. These result demonstrate that two nature compounds, naringin and naringenin in Poncirus Fructus, act on ghrelin receptor and via such activation, they could have prokinetic effect and have great potential as prokinetics.

Key Words : Poncirus Fructus, naringin, naringenin, prokinetic effect, ghrelin receptor

Student Number **: 2010-23655**