The Effect of *Brunfelsia grandiflora* Ethanol Extract on the Induction of Autophagy in Human Lung Fibroblasts

Hyang Nam and Moon-Moo Kim*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received April 29, 2014 / Revised July 9, 2014 / Accepted July 9, 2014

The purpose of this study was to investigate the effect of *Brunfelsia grandiflora* ethanol extract (BGEE) on the induction of autophagy via regulation of SIRT1 expression and p53 activation in a human lung fibroblast cell line, IMR 90. BGEE at a concentration of 5 μ g/ml or more exhibited a cytotoxic effect on IMR 90 cells. For the first time, this study showed that BGEE induces autophagy in normal human lung fibroblasts. BGEE also increased the expression level of beclin-1 at 2.5 μ g/ml or less and Atg7 at 5 μ g/ml, both of which are known to be involved in the induction of autophagy. In addition, BGEE modulated the expression of other proteins related to autophagy in normal human lung fibroblasts. The expression levels of p53 and p-p53, an active form of p53, were decreased in the presence of BGEE at a noncytotoxic concentration. In contrast, the expression level of SIRT1 was increased in human lung fibroblasts treated with BGEE at a noncytotoxic concentration. Moreover, SA- β -Gal staining, an aging marker, was reduced in the normal human lung fibroblasts treated with BGEE. These findings suggest that BGEE promotes the induction of autophagy and antiaging through the modulation of p53 and SIRT1 in human lung fibroblasts.

Key words : Autophagy, *Brunfelsia grandiflora*, IMR 90, p53, SIRT1

서 론

노화현상은 외부 자극에 대한 반응성이 저하되고 항상성을 유지할 수 있는 능력이 감퇴되어, 외부 스트레스에 취약해지고 질병에 대한 저항성이 감소하여 만성 질환의 가능성이 높아지는 변화 과정으로 정의될 수 있다[7]. 활성산소는 세포를 손상시켜 노화를 유발시킴과 동시에 우리 몸에서 필요한 에너지를 얻기 위한 대사 과정에서 생성된다[22]. 노화의 자유 라디칼 가설은 최근까지도 지속적인 학문적 관심의 대상으로 많은 연구가 이루어 졌으며, 일부 보고에서 항산화 능력을 증가시킬 때 세포 손상이 줄어드는 긍정적인 결과를 보였다[20]. 즉 체내에서 생성된 산화제(proxidant)와 항산화제가 불균형을 이루었을 때 산화 스트레스에 의한 세포 손상이 초래되고 이것들이 지속적으로 축적될 때 기관의 기능이 저하되고 노화와 관련된 질환들, 즉 심혈관계 질환, 암, 당뇨병, 치매 등의 원인이 된다[12]. 이러한 현상은 자가포식(autophagy)과 연관이 있는 것으로 세포 자가 포식작용이 제대로 작동되지 않으면 노화가 가속되는 것으로 설명하고 있다[18]. Autophagy는 영

양분 고갈 등 세포 스트레스 상황에서 자기 내부 단백질 덩어리나 소기관을 파괴해 생체체의 항상성을 유지하는 현상으로 최근 인체 면역 방어기전에도 매우 중요한 현상으로 보고되고 있다[2]. 최근에 노화진행의 속도를 늦추는데 탁월한 효능이 보고된 식물 중 남미 기원인 가지과의 꽃 관목에 속하는 *Brunfelsia grandiflora*로부터 단일화합물이 screening 되었다[4]. 영국에서 푸른빛이 도는 자주색 나무를 brunfelsia라 하고, 10피트의 높이와 8피트의 너비로 자라는 관목으로 잘 알려져 있다[10]. 외형적으로 보았을 때 번갈아 배열된 각각 12인치 길이의 잎이 밀집되어 있고 거의 매년 향기로운 꽃을 피우며 하얗고 자주 빛을 띤다[11]. 이 식물은 전통적인 약재로 열병, 류머티즘, 매독 그리고 관절염의 치료에 타고난 범위에서 이용되어 왔다[5]. 이러한 약리적 성질 외에는 그 과학적 효능이 검증되어 있지 않아 자체적인 연구를 통해 노화와 관련된 효능을 알아보고자 한다. 결과적으로 현대인의 건강증진과 수명연장에 매우 중요한 노화관련 질환에서 *Brunfelsia grandiflora*의 중요성이 잘 알려져 있지 않아, 이를 바탕으로 향후 과학적인 효능연구 및 기전에 대한 연구가 필요한 것으로 전망된다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.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.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

세포 배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 μ g/ml 및 2,500 μ g/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technology

gies (USA)로부터 구입하였다. IMR 90 cell line (human lung fibroblast)은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하였다. MTT reagent, gelatin, agarose와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용된 *Bruntfelsia grandiflora* 시료는 한국생명 공학 연구원의 해양생물소재허브센터에서 분양을 받아 진행하였다. 95%의 ethyl alcohol 용매에 추출되었으므로 BGEE라 명명하였고, 시험농도로 희석되어 본 연구에 사용되었다.

세포배양

IMR 90 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 5% fetal bovine serum, 2 mM glutamine과 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen [8]의 방법에 IMR 90 세포에 대한 BGEE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

SA-β-Gal staining assay

24 well에 IMR 90 세포를 배양하여 BGEE를 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 처리 후에 35% H₂O₂을 약 100배 정도 희석한 100 mM을 처리하였다. PBS로 2번 세척한 후에, PBS에 용해시킨 고정액인 2% formaldehyde와 0.2% glutaldehyde를 넣고 고정시켰다. 세포를 PBS buffer로 2번 washing 후 staining solution으로 37°C에서 2~4시간 혹은 12~16시간 동안 염색하였다. 염색 후 PBS buffer로 2번 세척 후에 관찰하고 counting하였다. SA-β-gal staining의 수준은 염색된 세포를 dimethyl sulfoxide로 용해 후 620 nm에서 UV spectrophotometer 측정하여 정량하였다.

Autophagy assay

Autophagy 활성측정은 Cayman Chemical의 autophagy/cytotoxicity dual staining kit (Item No. 600140)를 사용하였다. Autophagy 측정은 제조사의 처방에 따라 수행되었다. 96 well plate에 IMR 90 세포를 37°C에서 배양한 후 chemical을 처리하고 양성 대조군으로는 20 µM의 tamoxifen를 사용하였다. 24시간 후 세포를 propidium iodide (PI)와 monodansyl chloride (MDC) 시료를 제조사의 처방에 따라 염색하였다. 자가소화 액포의 염색의 강도는 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria) 335 nm의 excitation 파장에서 자극하고 512 nm의 emission 파장에서 fluorescence를 측정하였다. 죽은 세포는 propidium iodide (PI)에 의해 염색되었고, 540 nm의 excitation 파장에서 자극하고 570 nm의 emis-

sion 파장에서 fluorescence를 측정하였다.

Western blot analysis

IMR 90 세포에 용출완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF과 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 세포 단백질을 추출하기 위하여 세포에 BGEE를 적절하게 처리한 10 µg의 세포의 용출액을 각각 10% Tris-HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리 하고 목적단백질에 대한 1차 항체(anti-Atg7, anti-Becn1, anti-p53, anti-p53, anti-SIRT1, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 결과는 LAS 3000[®] image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의검정은 대조군과 비교하여 Student's *t* test한 후 **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

세포독성에 미치는 BGEE의 영향

BGEE가 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. IMR-90 세포에 대한 BGEE의 세포독성을 측정된 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 IMR-90 세포에서 BGEE 2.5 µg/ml 이하의 농도에서 대조군과 비교 하였을 때 어떠한 독성효과도 없는 것으로 나타났다. 그러나 5 µg/ml 이상에서는 농도가 증가함에 따라 세포독성이 증가하였다.

노화 지표인 SA-β-gal staining에 대한 BGEE의 효과

BGEE가 IMR-90 세포의 노화를 억제하는지의 여부를 확인하기 위하여 노화마커로 잘 알려진 SA-β-gal staining assay를 수행하였다. Fig. 2A와 같이 1 µM의 H₂O₂을 처리한 control 군은 blank군에 비하여 SA-β-gal staining이 증가하여 H₂O₂가 세포노화를 일으킬 수 있음을 확인하였다. BGEE이 처리된 군은 blank군 및 control군에 비하여 SA-β-gal staining이 감소함을 확인하였다. Fig. 2B에서는 SA-β-gal staining을 정량하여 blank군의 SA-β-gal staining 수준을 100%로 하여 상대적인 값을 그래프로 나타내었는데, BGEE는 농도 의존적으로 IMR

Fig. 1. Viability of IMR 90 cells treated with BGEE. The cells were treated with BGEE at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/ml. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values $\pm$ S.D. from three independent experiments (* p <0.05, *** p <0.001).

Fig. 2. Effect of BGEE on SA-β-Gal staining in IMR 90 cells. IMR 90 cells were treated with BGEE at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/ml. After that, SA-β-gal staining assay was carried out (A). The level of SA-β-gal staining was quantified at 620 nm of wavelength with UV spectrophotometer after solubilization with dimethyl sulfoxide (B). Data are given as means of values $\pm$ S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's *t* test (*, p <0.05, **, p <0.01, ***, p <0.001).

90 세포의 노화를 억제함을 알 수 있었다.

Autophagy유발에 대한 BGEE의 효과

BGEE가 autophagy를 유발시키는지를 조사하기 위하여 형광염색액을 이용하여 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 tamoxifen (TMF) 20 µg/ml을 처리한 positive control군에서

Fig. 3. Effect of BGEE on induction of autophagy in IMR 90 cell line. Autophagy activity was detected using a commercially available autophagy/cytotoxicity dual staining kit according to the manufacturer's protocol. After cells were exposed to BGEE at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/ml, autophagic vacuole staining intensity was detected at excitation wavelength of 335 nm and an emission wavelength of 512 nm. Tamoxifen was used as a positive control. Data represent the mean $\pm$ S.E. of three independent experiments. Results were statistically significant using Student's *t* test (* p <0.05, ** p <0.01).

는 autophagy가 blank군과 비교하여 현저하게 증가되었다. BGEE 처리시에도 5 µg/ml 이상의 농도에서 autophagy가 유발되는 것을 확인하였다. Fig. 4에서는 형광염색을 통한 autophagy의 유도효과를 알아 보았는데, autophagy를 나타내는 autophagosome은 형광화합물인 monodansylcadaverine (MDC)에 의해 검출 하였고, 핵은 propidium iodide로 형광염색되었다. 결과적으로, tamoxifen 뿐만 아니라 BGEE가 autophagy를 유발시킬 수 있다는 것을 유안적으로 확인하였으며, 몇몇 죽은 세포들에서도 autophagosome이 생성됨이 관찰되었다.

Autophagy와 관련된 단백질의 발현에 대한 BGEE의 효과

BGEE의 항노화 효과 및 autophagy에 관여하는 단백질 발현을 조사하기 위하여 Atg7, Beclin-1, p53, p53과 SIRT1 단백질을 발현을 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 BGEE를 사람 정상적인 폐섬유아세포인 IMR-90에서 처리한 결과 autophagy를 나타내는 Beclin-1은 낮은 농도인 2.5 µg/ml이하에서 발현이 blank군에 비하여 증가하고 Atg7의 발현수준은 고농도인 5 µg/ml 이상의 농도에서 증가하였다. Tumor suppressor gene 혹은 노화관련 유전자로 널리 알려진 유전자의 단백질인 p53과 그의 활성화된 형태인 p53 및 수명연장에 관여한다고 알려진 유전자의 단백질인 SIRT1의 발현수준은 세포독성이 없는 2.5 µg/ml 이하에서는 blank군에 비하여 증가하였으나 세포독성이 있는 5 µg/ml 이상의 농도에서 감소함

Fig. 4. Induction of autophagy by BGEE in IMR 90 cells. Panel A-G: MDC staining of IMR 90 cells. There is basal level of autophagy, indicated by blue dot staining of autophagic vacuoles (A). Panel H-N: propidium iodide staining of IMR 90 cells. There are few dead cells with only background staining of propidium iodide (E). Panel O-U: the merged image of panel A and panel B. Panel B,F,H : cell images of IMR 90 cells treated with 20 μ g/ml of tamoxifen as a positive control. The image of cells was observed at 100 X of magnification using fluorescence microscope.

을 확인 할 수 있었다.

고 찰

세포노화(cellular senescence)란 세포 배양시 대략 50번 정도의 분열 후에는 더 이상 세포가 분열하지 않는 현상을 의미

Fig. 5. Effects of BGEE on protein expressions of Atg7, Beclin-1, p53, p-p53 and SIRT1 in IMR 90 cells. The cells were treated with BGEE at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ g/ml. Western blot analyses of cell lysates were performed using antibodies as indicated. The expression level of β -actin was used as a control for normalization of target proteins.

한다[1]. 노화는 유전정보의 손상이 축적됨에 따른 현상으로 설명할 수 있어 유전정보의 안정성을 유지하는 것이 노화의 진행을 막고 수명을 연장하는 데 중요하다[14]. BGEE를 IMR 90 세포에 농도별로 처리하여 노화의 지표를 측정하기 위해 β -galactosidase에 의해 X-gal의 분해가 일어나 파란색을 띄게 되는[6] SA- β -gal assay를 수행한 결과, 농도가 증가 할수록 SA- β -gal 염색이 감소함을 알 수 있었다. 이를 통해 BGEE가 항노화 효과를 가지고 있다는 가능성을 추측해 볼 수 있다. Autophagy는 새로운 형태의 세포 사멸로서 기존에 알려진 세포자멸사(Apoptosis), 괴사(Necrosis) 등이 세포 전체의 사멸만을 다루는 것과 달리[3], 자가포식은 미토콘드리아, 형질그물망(endoplasmic reticulum) 등 세포 내 소기관(organelle)의 사멸 및 재생과 관련이 있다[16]. 세포 내 소기관은 평상시에 정적인 상태를 유지한다고 생각되어 왔으나, 최근의 연구에 의하면 평상시에도 끊임없이 죽고 재생되는 과정을 겪고 있음이 밝혀졌다[13]. 이 과정을 통해 낡고 퇴행성 변화를 겪은 세포 내 소기관은 소멸되어 새로운 세포 내 소기관을 재생하는데 필요한 영양 공급원이 된다[15]. 자가포식은 이러한 세포내 소기관의 사멸 및 재생을 통해 세포 전체를 사멸에서 보호하기도 하고 세포 전체의 사멸을 유도하기도 한다[17]. 그 동안 자가포식에 의한 세포 내 소기관의 끊임없는 사멸과 재생의 생리적 기능 및 임상적 의미가 불분명하였으나, 최근 관련 연구가 진행되면서 자가포식과 각종 질병 또는 노화의 관련성이 제시되고 있다[19]. BGEE를 처리한 세포군에서 autophagy를 유도하였을 뿐만 아니라 몇몇 죽은 세포들은 자주빛을 나타내어 autophagosome이 생성됨을 확인하였다. 단백질 수준에서 BGEE의 항노화 효과 및 autophagy에 관여하는 단백질 발현을 조사한 결과 BGEE를 처리한 사람의 정상적인 폐섬유아세

포인 IMR-90에서 Beclin-1 및 Atg7의 발현수준이 저 농도와 고농도에서 각각 증가하는 것으로 보아 autophagy가 유도 되었음을 확인하였고, p53와 p-p53 및 SIRT1 발현수준은 세포독성이 없는 농도에서 감소한 반면에, 세포독성이 있는 농도에서는 발현이 감소하였다. 이전의 연구에서 세포질내의 p53은 autophagy에 대하여 억제하는 조절작용이 있는 것으로 보고 되어 p53 유전자를 낮아트시키면 autophagy가 자극된다는 보고가 있는데 이러한 보고는 본 연구의 결과와 일치된다[21]. 이러한 단백질의 발현이 autophagy 및 항노화에 영향을 미칠 수 있다고 판단된다. 아직까지 노화의 정도를 손쉽게 측정할 수 있으며 재현성 있게 평가할 수 있는 측정 지표가 마련되지 않았다는 점이 노화 연구를 수행하는 데 한계점으로 임상단계에서 적용할 수 있는 노화의 지표 개발이 필요할 것으로 예상된다[9]. 그러므로 본 결과들은 BGEE가 정상세포인 사람의 폐 섬유아 세포에서 Autophagy활성을 유도하여 노화를 예방하고 젊은 세포 내 소기관은 소멸시키고 새로운 세포 내 소기관을 재생하는데 필요한 영양 공급원으로 autophagy 관련 단백질의 발현을 증가 시켜 여러 질병의 치료의 주성분으로서 잠재적인 가능성이 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음. 그리고 시료를 분양해 준 한국생명공학연구원의 해양생물소재허브센터에 감사드립니다.

References

- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. -K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T. and Gerald, W. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730.
- Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Dröge, W., Ffrench, M. and Terman, A. 2005. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* **1**, 131-140.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C. and Fan, Y. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51-64.
- Filipowicz, N. and Renner, S. S. 2012. Brunfelsia (Solanaceae): A genus evenly divided between South America and radiations on Cuba and other Antillean islands. *Mol Phylogenet Evol* **64**, 1-11.
- Fuchino, H., Sekita, S., Mori, K., Kawahara, N., Satake, M. and Kiuchi, F. 2008. A new leishmanicidal saponin from Brunfelsia grandiflora. *Chem Pharm Bull* **56**, 93-96.
- Gary, R. K. and Kindell, S. M. 2005. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem* **343**, 329-334.
- Gladyshev, V. N. 2013. The origin of aging: imperfectness-driven non-random damage defines the aging process and control of lifespan. *Trends Genet* **29**, 506-512.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-210.
- Kim, K. I. 2007. Biology of aging: Medical perspective. *J Korean Med Assoc* **50**, 216-220.
- Lehan, N. E., Murphy, J. R., Thorburn, L. P. and Bradley, B. A. 2013. Accidental introductions are an important source of invasive plants in the continental United States. *Am J Bot* **100**, 1287-1293.
- Liberman, R., Shahar, L., Nissim-Levi, A., Evenor, D., Reuveni, M. and Oren-Shamir, M. 2010. Shoot regeneration from leaf explants of *Brunfelsia calycina*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **100**, 345-348.
- Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* **60**, 1-4.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. and Thompson, C. B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248.
- Mair, W. and Dillin, A. 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* **77**, 727-754.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069-1075.
- Ogata, M., Hino, S. I., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I. and Yoshinaga, K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**, 9220-9231.
- Shintani, T. and Klionsky, D. J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-995.
- Signer, R. A. and Morrison, S. J. 2013. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell* **12**, 152-165.
- Terman, A., Gustafsson, B. and Brunk, U. T. 2007. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* **211**, 134-143.
- Ungvari, Z., Csiszar, A., Sosnowska, D., Philipp, E. E., Campbell, C. M., McQuary, P. R., Chow, T. T., Coelho, M., Didier, E. S. and Gelino, S. 2013. Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna derasa*). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**, 359-367.
- Wang, Y., Qin and Z. H. 2013. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 585-594.
- Yaniv, Y., Juhaszova, M. and Sollott, S. J. 2013. Age-related changes of myocardial ATP supply and demand mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 495-505.

초록 : 사람 폐 섬유아 세포에서 *Brunfelsia grandiflora* 에탄올 추출물이 Autophagy에 미치는 영향

남 향 · 김문무*

(동의대학교 화학과)

이 연구의 목적은 사람 폐 섬유아세포인 IMR 90 에서 *Brunfelsia grandiflora* 에탄올 추출물(BGEE)이 SIRT1 및 p53 활성화를 통해 autophagy의 유도에 대한 효과를 조사한 것이다. BGEE는 5 µg/ml 이상의 농도에서 IMR 90 세포에서 세포독성을 나타내었다. 본 연구에서 처음으로 BGEE가 autophagy를 유도 하는 것이 발견되었다. 또한, BGEE는 2.5 µg/ml이하에서 Beclin-1 및 5 µg/ml 이상에서 Atg7 의 활성화가 autophagy의 유도에 관여함을 확인 하였다. 더욱이 BGEE는 autophagy와 관련된 단백질 발현을 조절하였는데 p53 및 p-p53 단백질 발현이 세포독성이 없는 농도의 BGEE존재하에서 감소되었다. 하였다. 반면에, SIRT1의 발현수준은 세포독성이 없는 농도의 BGEE로 처리된 IMR 90 세포에서 증가되었다. 더욱이 BGEE로 처리된 사람 폐 섬유아세포에서 노화 마커의 지표인 SA-β-gal staining이 감소되는 것이 관찰되었다. 이상의 발견들은 BGEE는 사람 폐 섬유아세포에서 p53및 SIRT1의 조절을 통하여 autophagy 및 항노화 유발을 촉진 시키는 것을 시사하고 있다.