

유근피(榆根皮)에 존재하는 matrix metalloproteinase-9 억제 물질의 분리 및 정제

한기정* · 이광수 · 공광훈 · 조성희
중앙대학교 자연과학대학 화학과
(2002. 6. 17 접수, 2003. 5. 27 승인)

Separation and purification of substance having matrix metalloproteinase-9 inhibition effect in *Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* Nakai.

Kee-Jung Han*, Kwang-Soo Lee, Kwang-Hoon Kong and Sung-Hye Cho
Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
(Received Jun. 17, 2002, Accepted May. 27, 2003)

요 약 : 극성이 다른 여러 가지 용매를 사용하여 느릅나무의 뿌리 껍질(이하 유근피)을 추출하였다. MeOH 추출물이 SK-Hep-1에서 분리된 matrix metalloproteinase-9(MMP-9)의 zymography에서 저해능을 나타내었다. 분리 정제한 물질의 분자량은 GC-MS spectrum에서 $M^+ = 281$ 인 것으로 나타났고 MMP-9의 활성은 $314.7 \mu\text{g/g}$ 에서 47% 억제되는 것으로 나타났다. 그리고 SK-Hep-1 세포주는 $31.47 \mu\text{g/g}$ 에서 60%의 생존율을 나타냈다.

Abstract : Root bark of *Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* Nakai was extracted by using several solvents with different polarities. Each extract was treated on the MMPs obtained from SK-Hep-1 in order to investigate inhibition effect. Zymography of MMPs showed that MeOH extract has significant inhibition effect. On the GC-MS analysis the highest mass to charge ratio (m/z) of the purified substance was 281. Also, on zymography of MMPs the substance showed 47% inhibition effect at the concentration of $314.7 \mu\text{g/g}$. Cell viability of SK-Hep-1 was 60% at $31.47 \mu\text{g/g}$.

Key words : Zymography, MMPs, GC-MS,

1. 서 론

암은 세포가 지속적인 자극을 받아 그 형태가 변화되어 비가역적 변화를 일으키는 것으로 종양세포가 침윤성으로 자라는 것 (invasive growth)과 전이 (metastasis)하는 것으로 알려져 있다. 암의 전이는 초기의 종양으로부터 암세포가 신체의 다른 여러 부위로 전파되는 과정을

말하며, 이는 악성 종양의 가장 큰 특징이다. 최근 암은 암 관련 사망의 90% 정도는 이러한 암의 전이로 일어난다. 암의 전이는 암세포와 암세포 주위와의 복잡한 상호작용으로 발생된다. 암세포 주위에는 암세포가 정상적으로는 통할 수 없는 지지구조체인 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)과 기저막 (basement membrane)으로 되어 있다. 이 ECM은 조직의 구조를 지지하고 유지하는 기계적 역할을 수행하는 물리적 구조일 뿐만 아니라, 발달이나 이동, 증식과 같은 많은 생물학적 세포의 기능에 영향을 미치는 복잡하고 역동적인 구조물로 밝혀졌고,¹

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-820-5651 Fax : +82+(0)2-817-9866
E-mail : keejunghan@hanmail.net

그 구성요소들의 합성과 분해의 균형상태는 ECM의 항상성 유지를 위해서 필수적인 것으로 알려졌다.² 많은 protease들이 ECM 분자들을 절단할 수 있지만, 그 중에서도 Zn^{2+} matrix metalloproteinase (MMP) 군과 이들의 저해물질들이 정상 조직의 ECM 분해의 매개자로 알려졌다.³ 이러한 matrix metalloproteinase(MMPs)들은 ECM의 주요 단백질 구성요소들을 가수분해시킬 수 있어서 ECM 재편성(turnover)과 재형성(remodeling)에 있어서 핵심 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴ 현재까지 20 종류 이상의 MMP들이 알려져 있으며, 적어도 19 종류의 서로 다른 human MMP가 클로닝되고 분석되어 그 서열들이 밝혀졌다. 이 MMP들은 구조와 기질 특이성, 그리고 세포내 위치에 따라 5개의 하위 그룹으로 분류되었다.⁵ 이러한 MMPs는 포유류, 조류, 양서류, 식물류, 그리고 예쁜 꼬마 선충(*Caenorhabditis elegans*)에 이르는 넓은 종에서 그 존재가 확인되었고, 이들은 기질 특이성에서는 다르나 많은 면에서 구조적 기능적 유사성을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. Gelatinase A (MMP-2)와 gelatinase B (MMP-9)은 catalytic domain이 fibronectin-like domain에 의해 hemopexin-like domain과 떨어져 있는 점이 다른 MMP들과 다른 것으로 밝혀졌다.⁶ 또한 Membrane-type MMP (MT-MMP)는 혈장막에 효소를 연결시키는 transmembrane domain을 가지고 있다.⁷ 이러한 MMPs는 TIMPs (tissue inhibitor of MMPs)라는 MMPs 조직 억제제에 의해서 특이적으로 저해된다. 즉, TIMP 군은 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 등 4종류로 나눌 수 있으며, TIMP-1과 TIMP-2는 모든 알려진 MMPs의 활성을 억제할 수 있다. 이는 서로 다른 생리학적 과정들에 있어서 ECM의 생성과 분해 사이의 균형을 유지하는데 있어서 주요 역할을 수행한다.⁸ 그리고 MMPs는 모든 종류의 악성 종양이 본질적으로 다른 조직에 침입하고 전이하는 과정에 관여하는 것으로 밝혀졌다.⁹ 대부분의 MMP들은 inactive 형태로 세포에서 분비된다. 이때 효소의 활성화 기작은 일반적으로 zinc-cysteine 결합의 절단을 통해 활성 부위(active site)가 열리며, 단백질 가수분해로 cysteine의 amino side에서 prodomain을 절단한다고 추정된다. MMP-9는 이러한 암의 전이를 조절하는 다양한 물질을 구성하거나 조절하는 역할을 하며, Gelatinase B의 활성은 암의 전이를 여러 단계에서 조절하는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.¹⁰

지금까지 약 90종이 넘는 물질들이 MMP에 억제능이 있는 것으로 알려져 있는데 초기에는 Marimastat의

기본 골격에 succinyl hydroxamates를 α -position (P1, P1', P2' 또는 P3'의 위치 등에 modification 하는 방법으로 유도체를 개발하였으나, 최근에는 non-peptidic succinyl hydroxamates를 치환하거나, non-hydroxamates 들인 carboxylic acids와 N-carboxyalkyl과 그 유도체들, 또는 thiol based, zinc binding group을 차단시키므로 억제시키는 것, 그리고 천연물에서 분리된 것 등 다양하게 개발되고 있다.¹¹

최근 들어 암이나 이와 관련된 질환들의 치료에 한방 요법이나 천연물에서 그 해법을 찾으려는 경향이 증가하고 있다. 유근피(*Ulmus davidiana Plancn. var. japonica Nakai.*)는 우리나라에서 그 자원이 풍부하고 오래 전부터 종양의 치료등 민간 요법으로 많이 이용되어져 왔다. 또 최근에는 유근피에서 항균성을 갖는 물질들이 있는 것으로 밝혀졌다.¹²

본 연구는 유근피의 뿌리에서 MMP-9을 억제하는 물질을 분리하고 분리한 물질이 갖는 생화학적인 효과를 밝히고자 한다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 실험 재료

2.1.1 실험동물 및 실험 재료

본 실험에 사용한 유근피는 충청남도 금산에서 채취한 것을 음지에서 잘 건조하여 사용하였으며, 실험에 사용된 adenocarcinoma 세포주인 SK-Hep-1과 정상 세포주인 Chang Liver 세포주는 동국대학교 한의과대학 김철호교수에게서 분양 받아 사용하였다.

2.1.2 시약

Coomassie blue, Triton X-100, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris), sodium dodecylsulfate (SDS), acrylamide 등은 Bio-Rad (Hercules, Co.)로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Trypsin-EDTA, L-Glutamine는 Gibco BRL사 제품을, 3(4,5-dimethylethiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Glycine, Ammonium persulfate 등은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 국산 특급시약을 더 이상의 정제없이 사용하였다.

2.1.3 실험기기

본 실험에 사용된 기기들은 다음과 같다.

HPLC (Jasco pu-980, Japan), MPLC (YAMAZEN, collector: FR 50 N, Detector: UV-10v, Pump: YAMAZEN 540, Japan), GC-MS spectrometer (Varian Saturn(II), column; DB-5, (5%-phenyl-methylpolysiloxane, diameter; 0.25 mm, film; 0.25 μ m, 30 m, Australia), High-Resolution Autospec HP 6890 GC (column; DB-5, (5%-phenyl-methylpolysiloxane, 30 m), UV/Vis spectrophotometer (U-2000, Hitachi).

2.2 실험 방법

2.2.1 유근피에서 MMP 억제물질의 추출 및 분리

잘 건조된 유근피의 뿌리 껍질(root bark of *Ulmus davidiana Planch. var. japonica Nakai.*)을 잘게 썰어 600 g을 취하였다. 그리고 이것을 1 L 등근 바닥 플라스크에 넣고 70% 에탄올로 4시간 환류하는 방법으로 3회씩 반복하여 추출, 여과하였고 모아진 여과액은 감압 농축하였다. 이 농축액에 200 ml의 증류수를 가한 후에 분액깔대기를 사용하여 methylene chloride (MC)로 여러 번 추출하였다. 모아진 MC 추출액은 감압 농축하였다. MC층과 분리된 상층액은 분액깔대기에서 ethyl acetate (EA)로 추출하였다. 남은 여액은 동결 건조시켰고, 이후에 MeOH에 용해시킨 다음에 여과 후 얻어진 용액은 감압 농축하였다. 여러 용매에서 추출하여 농축된 액들은 감압하에 저온에서 탈수 건조시킨 다음에 일부를 취하여 MMP-9의 저해능 실험에 사용하였다. 이 실험에서 MeOH로 추출한 것이 MMP-9에 탁월한 저해능이 있는 것으로 나타났고 이 부분만을 증류수에 재 용해시킨 다음에 분리에 사용하였고 그 방법은 다음과 같다.

재 용해된 MeOH로 추출한 농축액은 MPLC (Silica gel column, 30 \times 200 mm, at 365 nm)에서 ACN : H₂O = 9 : 1 (v/v)로 용출하여 세개 부분으로 분획하였다. 각 분획은 실리카겔 칼럼 (Kieselgel 60 ASTM, Merck Art. 7734, 30 x 380 mm) 상에서 EA : MeOH = 10 : 0.7 (v/v)로부터 5 : 1 (v/v)로 MeOH의 비율을 증가시키면서 용출하였고, 시험관당 1.5 ml씩 받아서 UV에서 365 nm로 흡광도를 측정하여 분획하였다. 각 분획 부분들을 농축한 후에 MMP-9 실험에서 저해능을 나타내는 분획만을 취하여 flush silica gel column 상에서 EA만으로 용출시켜 분리를 시도하였고 long wave UV에서 보라색을 나타내는 부분만을 모아서 농축하였다. 그리고 이 물질은 25

TLC aluminium sheets (Silica gel 60 F₂₅₄)에서 ACN : H₂O = 10 : 0.2 (v/v)로 전개하여 single spot인 것을 확인하였고 다시 GC-MS (injection temp.; 260 $^{\circ}$ C, oven temp.; 60 $^{\circ}$ C for 1 min., 15 $^{\circ}$ C/min. to 280 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C for 9.5 min.)에서 단일 물질 (23 mg)임을 확인하였고 생화학적 활성에 사용하였다.

2.2.2 세포주에서 MMP-9의 분리

MMP-9이 많이 발생하는 세포주(cell line)로 알려진 SK-Hep-1에서 MMP-9의 분리를 시도하였다. SK-Hep-1을 혈청이 함유된 DMEM 배지로 키운 다음 MMP-9 억제제로 알려진 혈청을 PBS로 3회 잘 세척한 후 무혈청 DMEM 배양액으로 24시간 배양시켰다. 그 다음 무혈청 배양액을 회수하여 amicon 30(Amicon, Inc. USA)을 이용하여 농축하여 각 단계별 유근피 성분의 MMP-9 억제여부를 판별하는데 사용하였다.

2.2.3 MMP-9 활성도 측정

MMP-9 활성도는 Zymography 방법¹³을 약간 변형시킨 방법으로 측정하였다. 0.1%의 gelatin이 함유된 10% Acrylamide gel에서 전기 영동한 후에 2.5%의 Triton X-100으로 30분씩 2회 잘 세척하는 방법으로 SDS를 제거하였다. 그 다음 incubation buffer용액으로 10 분씩 2회 잘 세척한 후 37 $^{\circ}$ C에서 28시간 incubation 시켰다. 그 후 이것을 염색액을 이용하여 12시간 염색시킨 후 탈색시켜 활성도를 확인하였다.

2.2.4 Cell Line에 MMP-9 억제제 처리

SK-HEP-1 와 Chang 세포주는 6well에 세포수 1 \times 10⁶ 개씩 존재하게 하였고 유근피에서 추출하여 정제한 MMP-9를 억제하는 물질을 배지액의 1% 수준으로 처리하였다. 억제물질은 DMEM 배지에 녹여 사용하여 각 세포주의 형태학적 변화를 관찰하였다.

2.2.5 세포의 생존율 (Cell viability) 측정

SK-Hep-1 세포주와 Chang 세포주에 각 분획에서 분리한 MMP-9 억제 물질을 처리하여 각 세포주의 성장 억제정도를 관찰하였으며, 각 세포주의 생존율도 측정하였다.

세포의 생존율은 100 μ l 세포 배양액에 10 μ l의 MTT을 넣어 CO₂ incubator에서 3~5시간 배양한 다음 100 μ l의 10% SDS를 사용하여 각셀의 침전을 녹였고 이후에 ELISA reader (Spectra MAX 340, Molecular Devices USA)로 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁴ 이

흡광도는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포에서 얻은 흡광도와 비교하여 백분율로 생존도를 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유근피에서 MMP-9 저해제의 분리 및 정제

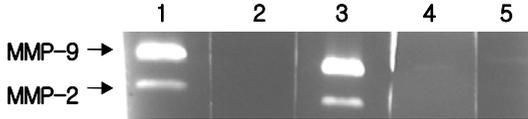


Fig. 1. Zymography of MMPs in the presence of extracts obtained from different solvents.
 Lane 1: Control (MMPs of SK-Hep-1)
 Lane 2: Extract of *Ulmus macrocarpa* Hance with 70% Ethyl alc.
 Lane 3: MC Layer
 Lane 4: EA Layer
 Lane 5: MeOH Layer

Fig. 1 에서 보이는 것과 같이 MC 추출물의 MMPs 에서는 저해능이 없는 것으로 나타났고 MeOH 추출물은 MMP-9에 상당한 저해능이 있는 것으로 나타났다. MeOH 추출물은 여러 번의 column을 다양한 용매로 용출하여 long wave UV에서 보라색을 띠는 부분만을 모아서 농축하였고 TLC에서 single spot으로 나타났다. 이것을 동결 건조하여 회백색의 부드러운 솜 모양인 needle 형태의 고체를 얻었다. 그리고 EI mode에서 측

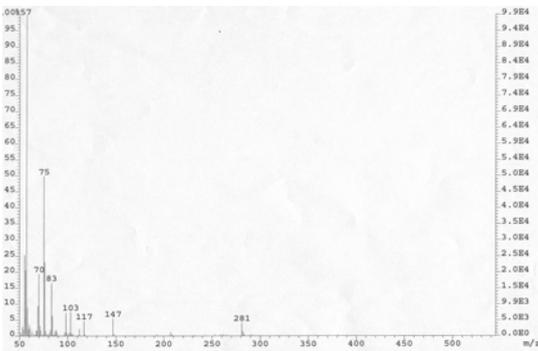


Fig. 2. Mass spectrum of purified substance having MMPs inhibition effect obtained from MeOH extract.

정한 GC-MS (Fig. 2 참조)에서도 단일 물질로 확인되었고 $M^+(m/z)$ 는 281로 추정되었다. 현재 이 화합물의 구조를 규명하는 과정에 있으며 지금까지의 결과로는 unknown compound로 추정된다.

이 물질이 농도별로 갖는 MMP-9 저해효과는 Fig. 3에서 보이는 것과 같다. 31.47 $\mu\text{g/g}$ 의 농도에서 유의적인 저해능이 있는 것으로 나타났다.

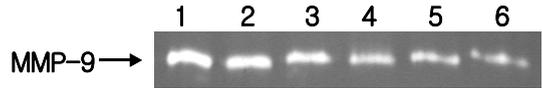


Fig. 3. Zymography of MMPs depending on the concentration of purified substance.
 Lane 1: Control
 Lane 2: 3.147 $\mu\text{g/g}$
 Lane 3: 15.736 $\mu\text{g/g}$
 Lane 4: 39.47 $\mu\text{g/g}$
 Lane 5: 157.36 $\mu\text{g/g}$
 Lane 6: 314.7 $\mu\text{g/g}$

3.2. Cell Line에 MMP-9 억제제 처리

세포의 증식과 살아있는 세포에 대해 MMP-9 억제 물질을 투여하고 그 형태학적 변화 및 괴사를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 정상 세포주인 Chang 세포주는 24 well plate에 40,000개의 세포를 깔아 12시간 후

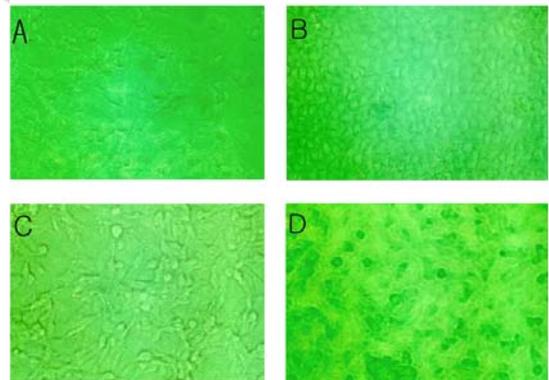


Fig. 4. Effects of purified substance on growth of normal liver cell (Chang) and hepatocellular carcinoma (SK-Hep-1).
 A; Chang cell (control) B; Chang cell (treated with purified substance)
 C; SK-Hep-1 (control) D; SK-Hep-1 (treated with purified substance)

MMP-9 억제 물질을 최종농도 10.0 mM로 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 incubation하여 키운 후에 형태학적 변화를 관찰한 결과 핵과 그 주변의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 SK-Hep-1 세포주에 MMP-9 억제 물질을 처리한 것은 세포의 괴사로 판명되어지는 변화가 나타남을 보였다.

3.3. 각 분획물에 의한 각 세포 세포주 생존율

세포의 증식과 살아있는 세포를 측정하기 위하여 MMP-9 억제물질을 투여하고 MTT 검색법에 의해 ELISA reader (Spectra MAX 340, Molecular Devices USA)로 측정하였다. 그리고 아무것도 처리하지 않은 것을 100% 기준으로 하여 상대 %을 구한 결과는 다음과 같다(Fig. 5 참조). Chang cell의 경우에는 MeOH 추출물에서 정제한 물질의 초기 농도가 증가함에 따라서 세포주의 성장이 유의적으로 증가함을 보이고 있으나 농도가 0.05%를 지나면서부터는 세포주의 성장이 감소됨을 보이고 있다. SK-Hep-1 세포주에서는 농도의 증가에 따라서 유의적으로 감소함을 보이고 있다.

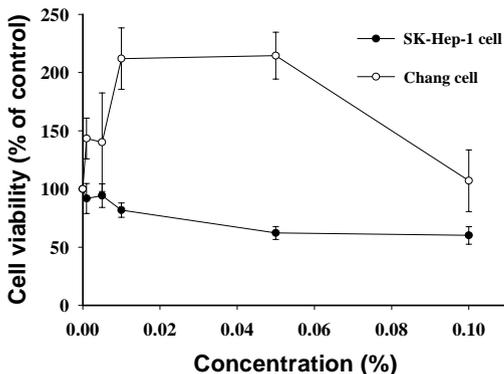


Fig. 5. Cell viability depending on the concentration of purified substance.

4. 결 론

유근피의 MeOH에서 추출한 부분이 MMP-9에 상당한 저해능이 있는 물질이 있는 것으로 판명이 되었고 여러 번의 column을 통하여 정제된 이 물질은 GC-MS spectrum(EI mode)에서 M⁺가 281인 것으로 추정되었다. MMPs의 zymography에서 농도에 따른 저해능의 차이가

있음을 보였고 31.47 µg/g 농도부터 유의적인 저해능이 나타남을 보였다. 그리고 생화학적인 관찰에서도 특정 농도 이하 (0.05%)에서는 Chang cell 세포주의 증식에 크게 기여하는 것으로 나타났고, SK-Hep-1 세포주에서는 40% 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다.

정제 분리된 물질의 구조를 규명하는 것이 앞으로의 과제이다.

감사의 글

본 연구는 중앙대학교 연구비의 지원으로 이루어졌고 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로그램의 도움을 받아 수행한 결과입니다. 그리고 이 논문은 2002학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임. 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. R. Raghov, *FASEB J.*, **8**, 823-831(1994).
2. G. Murphy and A. J. Docherty, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **7**, 120-125(1992).
3. S. D. Shapiro and R. M. Senior, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **20**, 1100-1102(1999).
4. M. Nguyen, J. Arkell and C. J. Jackson, *The Inter. J. of Biochem. & Cell Biol. (IJBCB)*, **33**, 960-970(2001).
5. U. B. Hofmann, J. R. Westphal, G. N. P. van Muijen and D. J. Ruiter, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 337-344(2000).
6. L. M. Matrisian, *Bioessays*, **14**, 455-463(1992).
7. T. Takino, H. Sato, A. Shinagawa and M. Seiki, *J. Biol. Chem.*, **270**, 23013-23020(1995).
8. G. Mautino, F. Capony, J. Bousquet and A. M. Vignola, *J Allergy Clin Immunol.*, **104**, 356-363(1999).
9. D. E. Kleiner and W. G. Stetler Stevenson, *Cancer Chemo. Pharmacol.*, **43**(Suppl) S42-S51 (1999).
10. G. Opdenakker, P. E. Van den Steen and J. Van Damme, *Trends Immunol.*, **22**, 571-579 (2001).
11. R. P. Beckett and M. Whittaker, *Exp. Opin.*

- Ther. Patents*, **8**, 259-282(1998).
12. G. H. Lee, C. J. Shin, Y. I. Chang, S. H. Choi, H. R. Oh and M. H. Oh, *J. Food Sci. Nutr.*, **6**(4), 230-234(2001).
13. C. Heussen and E. B. Dowdle, *Anal. Biochem.*, **102**, 196-202(1980).
14. F. Denizot and R. Lang, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277(1986).