

유근피내의 Matrix Metalloproteinase-9

활성 억제제에 관한 연구

공광훈*¹ · 한기정* · 이광수* · 조성희*¹

*중앙대학교 자연과학대학 화학과

*중앙대학교 의과대학 생화학교실

(2004. 12. 27 접수, 2005. 1. 18 승인)

A study of matrix metalloproteinase-9 inhibitor in root bark of *ulmus davidiana planchon*

Kwang-Hoon Kong*¹, Kee-Jung Han*¹, Kwang-Soo Lee* and Sung-Hye Cho*¹

¹Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Department of Biochemisry, Medical School, Chung-Ang University, Seoul, 156-756 Korea

(Received Dec. 27, 2004, Accepted Jan. 18, 2005)

요 약 : 70% 에탄올로 추출한 후 농축한 유근피 추출물을 여러 용매로 분획한 부분들의 MMP-9 활성 저해능 실험에서 ethyl acetate 분획분이 MMP-9 활성 저해능이 있는 것으로 나타났다. 이 분획분에서 MMP-9의 활성에 저해능을 나타내는 물질을 분리 정제하여 분석하였고 이 물질은 catechin 계열로 판명되었다.

Zymography법에 의해 MMP-9의 활성 억제 효과를 관찰하였고 정제된 화합물은 MMP-9을 5 mM 농도에서 48%가 억제하였고 10 mM 에서는 43%를 억제하는 것으로 나타났다.

정상 세포주인 Chang 세포주와 인체 간암세포인 SK-Hep-1 세포주를 동일한 조건으로 배양한 후에 형태학적 변화를 관찰한 결과, 정상 세포주의 핵과 그 주변에서는 변화가 거의 관찰되지 않았으나 SK-Hep-1 세포주는 핵의 주위에 검은 반점이 관찰되었다.

세포의 증식과 살아있는 세포를 측정하기 위하여 MMP-9 억제물질인 정제된 추출물을 투여하고 MTT 검색법에 의해 ELISA reader로의 측정에서 정상세포주인 Chang 세포주에서는 1 mM 에서 세포 활성이 오히려 증가하는 경향(130.77 ± 13.71)을 보인 반면, SK-Hep-1 세포주에서는 세포 증식이 상당히 억제된 것으로 나타났다.

Abstract : Several solvents were used to fractionate an extract obtained from the chapped root bark of *Ulmus davidiana Planchon*. The each fractionary part was condensed under reduced pressure and then examined to investigate the inhibitory effect on MMPs by modified gelatin zymography, where EA fraction showed the inhibition effect on the activity of MMPs.

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-820-5651 Fax : +82+(0)2-817-9866

E-mail : keejunghan@hanmail.net

A compound showing inhibition effect on the MMPs was isolated and purified from EA fraction. Under IR, ^1H - and ^{13}C - NMR analyses it is very close to a catethin.

This substance showed 48% inhibition effect on measurement of MMP-9 activity at 5 mM and 43% at 10 mM.

To verify the effect of this substance on cells, human hepatoma, SK-Hep-1 cells as a cancer model, and Chang liver cells as a normal model were selected. MTT assay was performed to examine the cell viability by treatment of 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the purified substance on cells. The purified substance showed negligible toxicity on human liver cell line.

Key words : *Ulmus davidiana planchon*, IR, NMR, MMPs, zymography, SK-hept-1, MTT

1. 서 론

종양세포는 침윤성으로 자라는 것 (invasive growth) 과 전이 (metastasis)하는 것이 있는 것으로 알려져 있고 matrix metalloproteinase (MMP)들은 종양의 침윤성 성장과 전이를 하는데 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹ 그리고 MMP들은 지지구조체인 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 단백질 구성요소들을 가수분해 시킬 수 있어서 재편성 (turnover) 과 재형성 (remodeling)에 있어서 핵심 역할을 한다. 이 ECM의 역할은 조직의 구조를 지지하고 유지하며 발달이나 증식과 같은 생물학적 세포의 기능에도 영향을 주는 구조물로 밝혀졌다.² 또한 그 구성요소들의 합성과 분해의 균형상태는 ECM의 항상성 유지에 필수적인 것으로 알려졌다.³

현재까지 20 종류 이상의 MMP들이 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 대부분의 MMP들은 Hemopexin과 서열 유사성이 있는 C-terminal domain을 가지고 있다. 특히, Gelatinase A (MMP-2)와 gelatinase B (MMP-9)는 catalytic domain이 fibronectin-like domain에 의해 Hemopexin-like domain과 떨어져 있는 점이 다른 MMP들과 다르다.^{4,5} 이 MMP-2와 MMP-9들의 활성 조절 (regulation)은 유전자의 활성화 (gene activation)와 전사 (transcription), 잠재되어있는 효소의 번역 (translation)과 분비 (secretion), 그리고 내인성 억제제들 (endogeneous inhibitors)에 의한 proenzyme의 활성화와 비활성화 등 많은 단계에서 일어난다. 특히, MMP-2와 MMP-9들이 활성 조절을 상실하였을 때는 류마치스성 관절염, 골관절염,⁶ tumor invasion⁷ 및 신경염증 질환에서의 myelin-basic 단백질의 퇴화⁸ 등에 관련이 있다고 알려

져 있다. MMP-9는 분자량이 92 kDa으로 암의 전이를 조절하는 여러 구성물질을 구성하거나 조절하는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.⁹

최근 들어 한방요법이나 천연 식물을 이용하는 방법으로 암이나 이와 관련된 질환들과 관련된 치료법의 해법을 찾으려는 경향이 있다. 본 연구에 사용된 유근피 (root bark of *Ulmus davidiana Planchon*)는 느릅나무과에 속하는 느릅나무 뿌리의 껍질이다. 유근피는 각종 악성 종창과 장폐양, 등창, 후발종, 견창, 둔종, 음낭암 등의 암종과 목창, 순종, 비종, 부종, 지종 등의 질병 치료에 매우 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰

본 연구는 유근피에서 악성질환을 치료할 수 있는 물질들을 분석하고자 본 실험을 하였다. 먼저 유근피를 70% 에탄올로 추출한 후 여러 용매를 사용하여 분획하였다. 그리고 각 분획물들의 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 활성에 대한 저해성 여부를 변형된 gelatin zymography 법으로 판단하고 활성 저해를 나타내는 분획물에서 MMP-9을 억제하는 물질의 분리 및 그 구조를 규명하려고 하였다. 또한 분리 정제된 물질의 인체 암세포인 SK-Hep-1 세포주와 정상 세포인 Chang 세포주의 생존율을 측정하여 인체에 대한 독성 여부를 확인하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 유근피 (*Ulmus davidiana planchon*)는 충청남도 금산에서 채취한 양질의 것을 음지에서 잘 건조하였고 이를 2~3 cm로 잘게 잘라서 추출하는데 사용하였다. 그리고 MMP-9의 분리 및 세포 독성실험에

사용한 세포주는 adenocarcinoma 세포주인 SK-Hep-1을 사용하였다. 또한 정상 세포에의 독성 유무의 확인을 위하여 정상 세포주인 Chang Liver 세포주를 사용하였다. 이들 세포주는 동국대학교 한의과대학 생화학고실에서 분양 받았다. MMP-9은 adenocarcinoma 세포주인 SK-Hep-1을 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였고 그 배양액을 centricon 30으로 농축하여 MMPs의 실험 중에서 MMP-9에 대한 실험에 사용하였다.

2.2. 시약

Glycine, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ammonium persulfate, coomassie blue, triton X-100 등의 시약은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 그리고 tris(hydroxymethyl)-amino-methane (Tris), acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), sodium dodecylsulfate (SDS) 등은 Bio-Rad (Hercules, Co.) 제품을 사용하였다.

또 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), trypsin-EDTA, L-glutamine는 Gibco BRL사 제품을 사용하였고, n-hexan (95.0%), ethanol (99.5%)과 ethyl acetate (99.0%)는 삼진 화학에서 구입하여 정제 없이 사용하였다.

2.3. 실험기기

본 실험의 시료처리 및 효소 활성도 측정에 사용된 기기들은 가시, 자외선 분광광도계 (Varian Cary 3E, Australia), ELISA reader (Spectra Max 340, USA)등을 사용하였다. 그리고 물질의 정제에는 HPLC (Jasco pu-980, Japan)와 MPLC (YAMAZEN, collector: FR 50N, detector: UV-10v, pump: YAMAZEN 540, Japan)를 사용하였고, 전기영동기 (Mighty Small SE250, Hofer, USA) 그리고 냉동 건조기 (Martin Christ Alpha type, Germany)는 시료의 처리 및 분리하는데 사용하였다.

2.4. 실험 방법

2.4.1. 유근피에서 MMPs 억제 물질의 추출 및 분리
잘 건조된 느릅나무의 뿌리 껍질을 잘게 썰어서 1 kg을 취하여 1 L round flask에 넣고 70% 에탄올로 4시간 환류하여 3회 추출한 후에 여과하였다. 그리고 모아진 여과액은 감압 하에 농축하였다. 이 농축액에 200

mL의 증류수를 가한 후, 분액깔대기를 사용하여 methylene chloride (MC)로 여러번 추출하였다. 모아진 MC 추출물은 감압하에 농축하여 일부는 MMP-9의 실험에 사용하였고 나머지는 계속 실험에 사용하였다. MC 층과 분리된 상층액은 분액깔대기에서 ethyl acetate (EA)로 여러번 추출하였고 이 EA 추출액은 감압 농축한 후 다음과 같은 방법으로 MMP-9 저해제의 분리를 하였다.

EA 추출물을 실리카겔 칼럼 (30x400 mm)에서 EA : MeOH (10 : 0.7)의 혼합 용매를 사용하여 용출하였다. 그리고 시험관 당 1.5 mL씩 용액을 받아 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 365 nm에서 흡광도를 측정하여 그래프상에서 분획 하였다. 여기서 5개의 분획을 얻었으며 각각의 분획들을 농축한 후에 감압 냉동 건조하였고, 건조된 각 분획들의 MMP-9 실험에서 2개의 분획이 저해능을 나타내었다. 이 2개의 분획은 각각 MPLC (Silica gel column, 30 × 200 mm, at 365 nm)를 사용하여 ACN : H₂O (10 : 1)로 전개하여 3개씩의 분획을 얻었다. 분리된 각 분획들은 flash silica column (30 × 400 mm) 상에서 EA로만 용출하여 UV의 장파장에서 보라색 계통을 나타내는 부분과 연두색 계통을 나타내는 부분으로 분리하였다. MMP-9 실험을 통하여 저해능이 있는 것으로 나타난 UV의 장파장에서 보라색 계통을 나타내는 물질을 FT-IR, ¹H- and ¹³C-NMR을 이용하여 구조 분석에 사용하였다.

2.4.2. 세포주에서 MMP-9의 분리

MMP-9 활성 물질 분리는 MMP-9 활성 물질을 많이 내는 세포주로 알려진 SK-Hep-1을 혈청이 함유된 DMEM 배지로 키운 다음에 MMP-9 활성 억제제로 알려진 혈청을 PBS로 3회 잘 세척하였다. 그리고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배양액으로 24시간 배양시킨 다음 DMEM 배양액을 회수하여 원심 분리하였다. 회수된 DMEM 배양액은 Amicon 30로 농축하여 분획물들의 MMP-9 활성 억제 여부를 판별하는데 이용하였다.

2.4.3. MMP-9 활성도 측정

MMP-9 활성도는 gelatin zymography 방법¹¹⁾을 약간 변형시킨 방법으로 측정하였다. 즉, 0.1%의 gelatin이 함유된 10% acrylamide gel에 전기영동 하였다. 그리고 전기영동이 끝나면 gel을 2.5%의 triton X-100으로 30분씩 2회 잘 세척하여 gel에 존재하는 SDS 성분을 제거하였다. 그리고 이 gel을 incubation buffer에 10분씩 2회 잘 세척하고 37 °C shaking incubator에서 24시간 incubation

시킨 후 coomassie blue로 12시간 염색시킨 다음 탈색시켜 gel 상의 92 kDa 위치에 있는 MMP-9 band의 소실 정도를 densitometer로 활성 억제 정도를 계산하였다.

2.4.4. 세포의 생존률 측정

유근피에서 정제된 물질의 세포에 대한 독성 여부를 확인하기 위하여 96-well plate에 SK-Hep-1 세포주가 well 당 10,000 개씩 존재하게 하였으며, Chang 세포주는 1well 당 20,000 개씩 존재하게 하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 배양시켰다. 그리고 이것에 각 분획에서 분리한 MMP-9 억제 물질을 1배의 PBS에 녹여 농도 구배로 처리하였으며, 이것을 다시 37 °C, 5% CO₂ incubator에 24시간 배양시켜 각 세포주의 성장 억제 정도를 관찰하였다. 그리고 이때 억제 물질을 처리하지 않은 것을 기준으로 각 세포주의 생존율 혹은 성장 억제 정도를 계산하였다. 즉, 세포의 생존율은 100 μL 세포 배양액에 10 μL의 MTT를 넣어 CO₂ incubator에서 5시간 배양한 다음 100 μL의 DMSO를 넣어 갈색의 침전을 녹인 후 ELISA reader로 590 nm에서의 흡광도를 측정하였다.¹² 이 흡광도는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포에서 얻은 흡광도와 비교하여 백분율로 생존도를 표시하였다.

획물을 실리카겔 칼럼 (30×400 mm)에서 EA:MeOH (10:0.7)의 혼합 용매를 사용하여 용출하여 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 365 nm에서 흡광도를 측정 후 그래프상에서 분획 하였다. MMP-9 실험에서 저해능을 나타낸 분획을 MPLC (Silica gel column, 30 × 200 mm, at 365 nm)를 사용하여 ACN:H₂O (10:1)로 전개하여 분획을 얻었다. 분리된 각 분획들은 flash silica column (30 × 400 mm)상에서 EA로만 용출하여 UV의 장파장에서 보라색을 나타내는 부분을 분리하였다. 25 TLC aluminium sheets (Silica gel 60 F254)에서 ACN:H₂O = 10:0.2로 전개하여 단일물질인 것을 확인하였고 다시 GC-MS에서 확인하였다. 분리 정제된 물질은 MMP-9의 억제 정도와 구조 분석을 위하여 IR 및 ¹H- and ¹³C-NMR 분석에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유근피에서 MMPs 저해제의 분리 및 정제

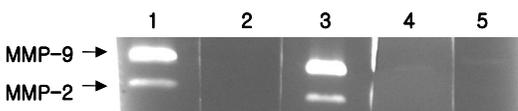


Fig. 1. Zymography of MMPs in the presence of extracts obtained from different solvents.

- Lain 1: Control (MMPs of SK-Hep-1)
- Lain 2: Extrate of *Ulmus davidiana Plancn* with 70% Ethyl alc.
- Lain 3: MC Layer
- Lain 4: EA Layer
- Lain 5: MtOH Layer

유근피의 70% 에탄올 추출물을 여러 용매로 분획한 부분에 대한 MMP-9 활성 실험에서 EA 분획이 상당한 저해능이 있는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 먼저 EA 분

3.2. FT-IR 스펙트럼과 NMR DATA에 의한 MMP-9 저해제의 구조 분석

EA 추출물에서 분획한 MMP-9 저해제의 FT-IR 스펙트럼에서 -OH의 강한 흡수 띠가 3380 cm⁻¹에서 나타나고 방향족의 C=C stretching이 1608, 1518 그리고 1442 cm⁻¹에서 그리고 1036 cm⁻¹에서는 C-O 결합의 흡수 띠가 나타났다.

¹H- and ¹³C-NMR의 data는 Table 1에 나타내었다. ¹H NMR spectrum에 의하면 δ 3.98 에서 OCH₃로 보이는 peak이 보였으며, δ 2.51에서 탄소 고리 화합물의 -CH₂-과 C₄-H가 보였고 δ 3.85에서는 C₃-H를 보이고 있다. 또 δ 5.00 에서 C₂-H가 coupling constant 3.15 Hz를 나타내었다.¹³ 그리고 δ 6.10에서 C₆-H가 보이고 있으며, δ 5.89 에서 C₈-H가 나타나 있다. 그리고 C₂' , C₅' 와 C₆'-H 가 δ 6.61 ~ 6.73에서 나타난 것으로 보인다. 그리고 OH는 δ 8.88과 9.48에서 나타나는 것으로 보인다.

¹³C NMR spectrum과 ¹³C NMR Dept 45 spectrum을 비교해 보면 δ 102.07, 107.19, 130.78, 145.22, 155.63 그리고 156.70의 탄소는 수소를 갖지 않는 것을 알 수 있다. C₁₀과 C₉에 해당하는 peak이 각각 δ 103.58과 107.19 에서 보이고 δ 130.78과 145.22은 각각 C₅와 C₇에 그리고 δ 115.50과 114.72에서는 각각 C₆와 C₉에 해당하는 peak가 보인다. 또한 δ 155.63과 156.70은 각각 C₄' 와 C₃'의 것으로 보이고 δ 118.60, 115.50, 그리고 114.72 에서의 peaks는 각각 C₂' , C₅' , 그리고 C₆'에 해당하는 것으로 나타났다. 탄소 고리화합물의 -CH₂-에 해당하는 (C₄) peak는 δ 27.64 ppm에서, 그리고 OH기

에 의한 shift로 δ 81.24에서 C₃에 해당하는 peak가 나타남을 보였다.¹⁴ δ 78.79에서는 C₂에, δ 95.12와 96.13은 각각 C₈과 C₆에 해당하는 peak으로 나타났다.

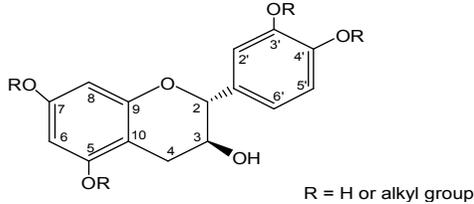


Fig. 2. Structure of catechin.

Table 1. ¹H and ¹³C-NMR spectral data of purified compound

position	¹³ C (δ)	¹ H (ppm)	position	¹³ C (δ)	¹ H (ppm)
2	78.79	4.93(1H, d, 16.84)	1'	102.07	
3	81.24	3.85(1H, q)	2'	118.60	6.68(1H, s)
4	27.64	2.51(1H, q,q)	3'	156.63	
5	130.78		4'	155.70	
6	115.50	6.10(1H, s)	5'	115.50	6.73(1H, d, 2.1)
7	145.22		6'	114.72	6.61(1H, d, 2.1)
8	114.72	5.89(1H, s)	O-CH ₃	76.28	3.98(3H, s)
9	107.19				
10	103.58				

* Recorded in d₆-DMSO, chemical shift values are reported as δ from TMS at 75 MHz for ¹³C and 400 MHz for Dept spectrum; number of protons, signal multiplicity and coupling constants (Hz) are shown in parentheses.

3.3. 유근피에서 정제된 물질의 MMP-9 억제 효과

유근피의 추출물에서 분리 정제된 화합물을 zymography 법에 의해 MMP-9의 활성 억제 효과를 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 이들 그림에서 정제된 화합물은 MMP-9를 5 mM 농도에서 48%가 억제되었고 10 mM에서는 43%가 억제되는 것으로 나타내었다.

Hong¹⁵과 Park¹⁶의 연구에 의하면 느릅나무과의 식물인 유백피에서 분리된 물질들에서 항균활성이 있다고 보고하였다. 그리고 Lee¹⁷의 연구에서는 당느릅나무에서 분리한 (-)Epicatechin도 항미생물 작용이 있는 것으로 나타났었다. 그리고 김¹⁸의 연구에서는 당느릅나무에서 davidianone들을 분리하여 이들의 항균활성 가능성을 예측한바 있다. 이상의 내용으로 미루어 느릅나무과의 여

러 식물들에서 현재까지 7-hydroxycadalene, mansonones, terpenoid 화합물 등 많은 물질들이 분리되었고 이는 암의 전이에 관련되는 MMP-9 활성을 저해하는 물질의 존재를 강하게 뒷받침하여 준다.

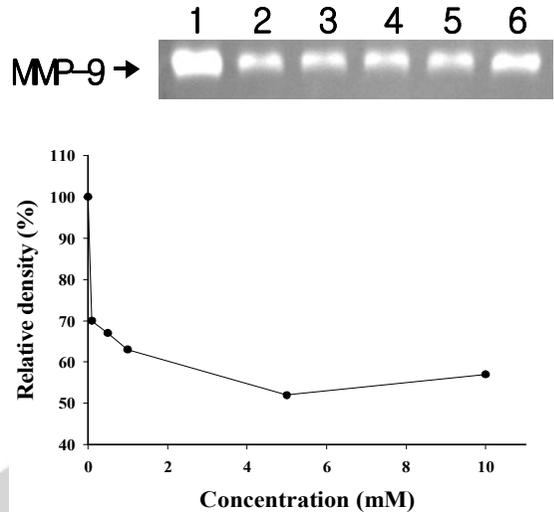


Fig. 3. Effect of MMP-9 in the presence of purified compound.

A. Zymography analysis B. Densitometric analysis

Lain 1: MMPs of SK-Hep-1 Lain 2: 10 mM
Lain 3: 5 mM Lain 4: 1 mM
Lain 5: 0.5 mM Lain 6: 0.1 mM

3.4. MMP-9 억제 물질의 각 세포주의 형태적 변화에 미치는 영향

세포의 증식과 살아있는 세포에 대해 정제된 MMP-9 억제물질을 투여하고 그 형태학적 변화를 관찰한 결과를 Fig. 4와 5에 나타내었다. 즉, 정상 세포주인 Chang 세포주는 24-well plate에 50,000개의 세포를 seeding하고 12시간 후 MMP-9 억제 물질을 최종농도 1 mM로 처리하여 48시간 37 °C, 5% CO₂ incubation 조건에서 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과 핵과 그 주변의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 24-well plat에서 30,000개의 세포를 seeding하고 12시간 후 MMP-9 억제 물질을 최종농도 1 mM로 처리하여 48시간 37 °C, 5% CO₂ incubation 조건에서 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과 SK-Hep-1 세포주에서 핵의 주위에 검은 반점이 발견되었으며, 핵이 검은 형태로 넓게 분포되어 있었다.

이는 Lin¹⁹의 연구에 의하면 항산화제나 항염증제, 항암제로 많이 쓰이는 curcumin (diferuloylmethane)을 SK-Hep-1에 투여한 결과 10 μM에서 17.4%의 억제효과를 보였으며, 70.6%가 세포에 전이되었다고 한 결과와 같다. 또한 Kim²⁰ 등의 연구에서 인삼의 ginsenoside-R4 (G-Rs4)를 SK-Hep-1에 처리하였을 때 고사 (apoptosis)가 일어나 세포를 파괴시킨다는 보고와 같은 경향을 나타내었다. 이와같은 결과로 보아 본 연구에 나타난 핵주위의 반점은 정제된 물질의 투여에 의한 것으로 생각되며, 이러한 현상이 세포의 고사에 의한 것인지 괴사 (necrosis)에 의한 것인지는 앞으로 연구해 보아야 할 것으로 생각한다.

3.5. 분획물에 의한 각 세포 세포주 생존율

세포의 증식과 살아있는 세포를 측정하기 위하여 MMP-9 억제물질인 정제된 화합물을 투여하고 MTT 검색법에 의해 ELISA reader로 측정하였다. 그리고 이때 아무 것도 처리하지 않은 것을 100% 기준으로 하여 상

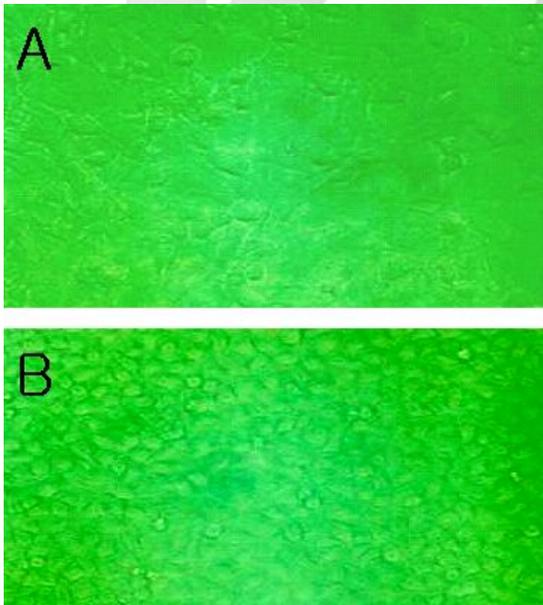


Fig. 4. Effects of purified compound on growth of normal liver cell (Chang).
 A. Normal
 B. Treated with purified compound
 The Chang cells were treated with 10 mM of purified compound for 48h and the morphology of the cells was examined microscopically (40X)

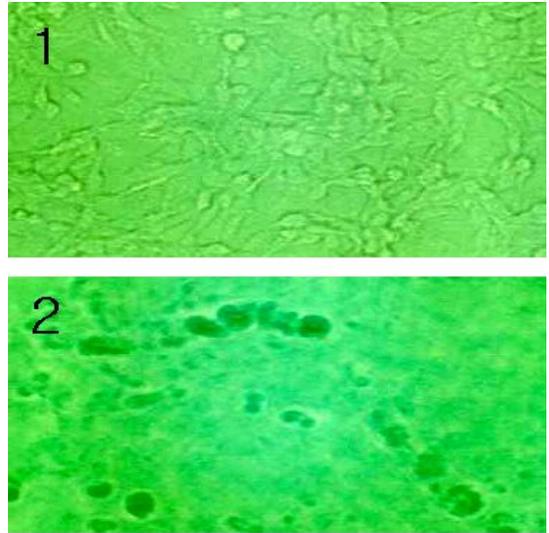


Fig. 5. Effects of purified compound on growth of Hepatocellular carcinoma cell (SK-Hep-1)
 1. Normal
 2. Treated with purified compound
 The SK-Hep-1 cells were treated with 10 mM of purified compound for 48h. and the morphology of the cells was examined microscopically (40X)

대 %을 구한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 이 그림들에서 정상세포주인 Chang 세포주에서는 1 mM에서 세포 활성이 오히려 증가하는 경향 (130.77 ± 13.71)을 보인 반면, SK-Hep-1 세포주에서는 세포의 증식이 상당히 억제된 것으로 나타났다 (16.02 ± 6.08).

이는 Jung²¹ 등의 연구에 의하면 allylthiopyridazine 유도체들을 SK-Hep-1 세포주에 처리할 때 각 유도체에 따라 다르지만 2.5 mM에서 약 100%정도 성장을 억제시켰다고 하였으며, Oh²² 는 SK-Hep-1 세포주에 pentagalloylglucose (PGG)를 3일간 투여했을 때 농도의존적으로 (50μM에서 50% 억제) 세포수가 줄어들었다고 보고하였다. 또한 Yang²³ 등의 연구에 의하면 HL-60 세포주에 1-O-galloyl-castalagin이나 casuarinin을 처리하였을 때 25 μg/mL의 농도에서 100% 억제하였다. 한편 Joshi²⁴는 화학요법제인 idarubicin (Ida)를 30 nM 처리했을 때 Chang 세포주는 35% 성장 감소를 나타냈으며, 4-hydroxyperoxycyclophosphamide (4-HC)를 1 μg/mL 용액을 처리하였을때는 41%의 성장 억제를 보였다고 보고하였다. 그러나 이것들을 포도씨에서 추출한 proanthocyanidin (GSPE)를 Ida와 같이 처리할 때는 85%가

회복되고 4-HC와 같이 처리하면 105%로 세포주가 성장한다고 보고하였다. 이와 같은 결과들로 보아 본 연구를 통하여 얻은 이 compound가 좋은 화학요법제가 될 수 있을 것이라고 생각한다.

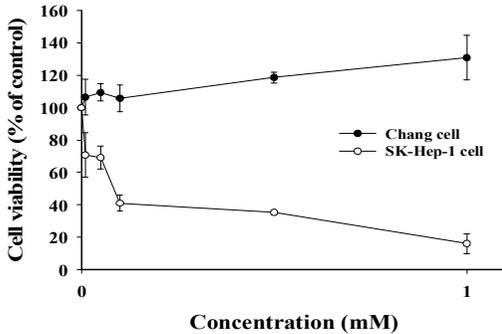


Fig. 6. Cell viability depending on the concentration of purified substance.

4. 결론

잘 건조된 유근피를 70% 에탄올로 추출, 농축한 후에 이를 다시 여러 용매로 분획한 분획물의 MMP-9 활성 실험에서 EA 분획분이 MMP-9의 활성에 상당한 저해능이 있는 것으로 나타났다. 이 EA 분획물은 silica gel column에서 여러 용매를 사용하여 용출하였고 이들 중 장파장 UV에서 보라색을 나타내는 물질을 분리 정제하여 MMP-9의 활성 실험에 사용하였다. 이 실험에서 MMPs 중에서 항암성의 MMP-9 활성에 저해능이 있는 것으로 나타났고 이 물질의 IR과 NMR의 분석에서 catechin 계열인 것으로 확인하였다. 유근피에서 분리 정제된 화합물을 zymography법에 의해 MMP-9의 활성 억제 효과를 관찰하였고 정제된 화합물은 MMP-9을 5 mM 농도에서 48%가 억제 하였고 10 mM에서는 43%를 억제하는 것으로 나타났다.

정상 세포주인 Chang 세포주는 24-well plate에 50,000개의 세포를 seeding하고 12시간 후 MMP-9 억제 물질을 최종농도 1 mM로 처리하여 48시간 37 °C, 5% CO2 incubation 조건에서 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과 핵과 그 주변의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 24-well plat에서 30,000개의 세포를 같은 SK-Hep-1 세포주는 핵의 주위에 검은 반점이 발견되었으며, 핵이 검은 형태로 넓게 분포되어 있었고 이러한

현상이 세포의 고사에 의한 것인지 괴사 (necrosis)에 의한 것인지는 앞으로 연구해 보아야 할 것이다.

세포의 증식과 살아있는 세포를 측정하기 위하여 MMP-9 억제물질인 정제된 화합물을 투여하고 MTT 검색법에 의해 ELISA reader로의 측정에서 정상세포주인 Chang 세포주에서는 1 mM에서 세포 활성이 오히려 증가하는 경향 (130.77 ± 13.71)을 보인 반면, SK-Hep-1 세포주에서는 세포의 증식이 상당히 억제된 것으로 나타났다 (16.02 ± 6.08). 이와 같은 결과들로 보아 본 연구에서의 결과는 이 compound가 좋은 화학요법제가 될 수 있을 것이라고 생각하였다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- U. B. Hofmann, J. R. Westphal, G. N. P. van Muijen, and D. J. Ruiter, *J. Invest. Dermatol.* **115**, 337-344 2000.
- R. Raghov, *FASEB J.*, **8**, 823-831 1994.
- G. Murphy and A. J. Docherty, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **7**, 120-125 1992
- L. M. Matrisian, *Bioessays* **14**, 455-463 1992.
- D. E. Kleiner, and W. G. Stetler Stevenson, *Curr. Opinion Cell Biol.* **5**, 891-897 1993.
- T. E. Cawston, *Pharm. Therapeu.* **70**, 163-182 1996
- L. Liotta, P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **64**, 327-336 1991.
- S. K. Chandler, R. E. Coates, A. Gearing, J. Lury, and E. A. Bone, *Neurosci. Lett.* **201**, 223-226 1995.
- G. Opdenakker, P. E. Van den Steen, and J. Van Damme, *Trends Immunol.* **22**, 571-579 2001.
- 박종희 생약학 회지 **24**, 322 -327 1993.
- C. Heussen, and E. B. Dowdle, *Anal. Biochem.*, **102**, 196-202 1980.
- F. Denizot and R. Lang, *J. Immunol. Methods* **89**, 271-277 1986.
- K. M. Jeremy, E. C. Sanders, and B. K. H. Constable,

- Modern NMR spectroscopy, Oxford University press (2nd ed.) 48 p. 1990.
14. H. E. Smith, J. C. D. Brand, E. H. Massey, and L. J. Durham, *J. Org. Chem.* **31**, 690-693 1966.
 15. N. D. Hong, Y. S. Rho, N. J. Kim, and J. S. Kim, *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 217-222 1990.
 16. J. S. Park, C. J. Shim, J. H. Jung, G. H. Lee, C. K. Sung, and M. J. Oh, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1022-1028 1999.
 17. G. H. Lee, C. J. Shim, Y. I. Chang, S. H. Choi, H. R. Oh, and M. J. Oh, *J. Food Sci. Nutr.* **6**, 230-234 2001.
 18. 김종평 당느릅나무 (*Ulmus davidiana Planch*)로부터 분리한 신규 sesquiterpene quinone 화합물의 화학구조 및 항암 활성 서울대학교 대학원 박사학위 논문 1995.
 19. L. I. Lin, Y. F. Ke, Y. C. Ko, and J. K. Lin, *Oncology.* **55**, 349-353 1998.
 20. S. E. Kim, Y. H. Lee, J. H. Park, and S. K. Lee, *Eur. J. of Cancer* **35**, 507-511 1999.
 21. M. Y. Jung, S. K. Kwon, and A. Moon, *Eur. J. of Cancer* **37**, 2104-2110 2001.
 22. G. S. Oh, H. O. Pae, H. C. Oh, S. G. Hong, I. K. Kim, K. Y. Chai, Y. G. Yun, T. O. Kwon, and H. T. Chung, *Cancer Lett.* **174**, 17-24 2001.
 23. L. L. Yang, C. Y. Lee, and K. Y. Yen, *Cancer Lett.* **157**, 65-75 2000.
 24. S. S. Joshi, C. A. Kuszynaki, M. Bagchi, and D. Bagchi, *Toxicology* **155**, 83-90 2000.

K C I