

# 천연 식물 추출물에서 Matrix Metalloproteinase-9 활성 억제제의 분리 및 특성화에 관한 연구

허용철 \*·박성우<sup>1</sup>·김태진

수원대학교 화학공학과

<sup>1</sup>국립과학수사연구소

(2003. 12. 24 접수, 2005. 5. 2 승인)

## A study on separation and characterization of matrix metalloproteinase-9 inhibitors from natural plants

Yong-Chul Hur \*, Sung-Woo Park<sup>1</sup> and Tai-Jin Kim

Department of Chemical Engineering, Suwon University,  
Gyeonggi 445-743 Korea

<sup>1</sup>National Institute of Scientific Investigation,  
Seoul 158-707 Korea

(Received December 24, 2003, Accepted May 2, 2005)

**요약** : 천연 식물 추출물로 처리한 matrix metalloproteinase (MMP)의 저해능 실험에서 귀전우 (*Euonymus alatus*)의 methanol 가용성 분획이 matrix metalloproteinase (MMP-9) 활성에 저해능이 있는 것으로 나타났다. Silica gel column에서 ethyl acetate와 hexane의 혼합비를 달리하는 방법으로 다섯 개의 부분으로 분획하였고 그 중에서 세 개의 분획이 MMP-9 활성에 저해능이 있는 것으로 나타났다.

인체 간암 세포인 Hep3B 세포주와 인체 정상 세포인 Chang 세포주를 같은 조건으로 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과, 귀전우의 메탄올 추출물로 처리한 세포에서만 핵의 주위에 검은 반점이 넓게 분포되어 있는 것이 관찰되었다. 인체 정상 세포주에 대한 독성 확인 실험에서 대부분의 메탄올 가용성 분획은 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

**Abstracts** : Three different oriental natural plants (*Angelicae Dahuricae Radix*, *Sanguisorba Officinalis L*, *Euonymus alatus*) were extracted with 70% methanol under refluxing for 4 hr in order to investigate their inhibitory effect on Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) by a modified gelatin zymography, where only *euonymus alatus* showed the inhibitory effect on the activity of Matrix MMP-9. The fraction was collected by using the mixture of ethyl acetate and hexane on silica gel column. Seven portions were obtained and three fractions of them (first, third and forth) showed inhibitory effect on the zymography. To verify the effect of these substances on cells, human hepatoma, Hep3B cells as a cancer model, and Chang liver cells as a normal model were selected. In order to examine the cell viability, 1 µg/mL of each extract was treated on cells. Most of the methanol soluble fractions showed negligible toxicity on human liver cell line.

**Key words** : MMPs, Zymography, SK-Hept-1, MTT

1. 서 론

Matrix metalloproteinase (MMP)들은 종양의 침윤성 성장과 전이를 하는데 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>1</sup> 그리고 MMP는 extracellular matrix (ECM)의 주요 단백질 구성요소들을 가수분해시킬 수 있어서 재편성(turnover)과 재형성(remodeling)에 있어서 핵심 역할을 한다. 현재까지 20종류 이상의 MMP들이 있는 것으로 알려져 있으며, 대부분의 것들은 그 서열이 밝혀져 있다. 그리고 이 MMP들은 포유류, 조류, 양서류, 식물류 및 예쁜 꼬마 선충 등 다양한 종에서 그 존재가 밝혀졌다. 또한 MMP들은 기질 특이성에서는 다르나, 여러면에서 구조적, 기능적, 유사성을 가지고 있으며, 이 MMP들은 구조, 기질, 특이성 및 세포내 위치에 따라 5개의 그룹으로 분류할 수 있다. 그리고 모든 MMP들의 명칭은 일반적으로 번호를 붙여서 부르고 있다. 즉, collagenase-1, 2, 3은 MMP-1, 8, 13으로 gelatinase-A, B는 MMP-2, 9로 stromelysin-1, 2, 3은 MMP-3, 10, 11로 metalloelastase는 MMP-12로 matrilysin은 MMP-7로 붙이고, membrane-type MMP들 (MT-MMPs)은 MMP-14, 15, 16, 17, 24로 enamelysin은 MMP-20, MMP-19 (stromelysin-4), MMP-23 (chicken MMP) 등으로 부른다.<sup>2</sup> 이 효소들은 각각 해당되는 기질 즉, collagen, fibronectin, laminin, proteoglycan, entactin, elastin 등의 단백질을 분해할 수 있다. MMP-9는 분자량이 92 kDa으로 암의 전이를 조절하는 여러 구성물질을 구성하거나 조절하는 역할을 한다.<sup>3</sup> 이 MMP-2와 MMP-9들의 활성 조절 (regulation)은 유전자의 활성화 (gene activation)와 전사 (transcription), 잠재되어 있는 효소의 번역 (translation)과 분비 (secretion), 그리고 내인성 억제제들 (endogeneous inhibitor)에 의한 proenzyme의 활성화와 비활성화 등 많은 단계에서 일어난다. 또한 이 MMP들은 배란,<sup>4</sup> 영양막의 침입,<sup>5</sup> 골격의 진화,<sup>6</sup> 유선의 퇴화<sup>7</sup> 및 혈관형성<sup>8</sup>에서와 같이 다양한 과정들에 연관되어 있다. 특히, MMP-2와 MMP-9들이 활성 조절을 상실하였을 때는 류마치스성 관절염, 골관절염,<sup>9</sup> tumour invasion<sup>10</sup> 및 신경염증 질환에서의 myelin-basic protein의 퇴화<sup>11</sup> 등에 관련이 있다고 알려져 있다.

최근 들어 암이나 이와 관련된 질환들의 치료법으로 한방요법이나 천연 식물을 이용하는 방법에서 그 해법을 찾으려는 경향이 있다. 본 연구에 사용된 백지 (*Sanguisorba Officinalis L*)는 미나리아재비 식물의 구리대 뿌리로 맵고 성온한 성질을 가지며 오래 전부터 양명두통과 풍열소양을 없애는 것으로 알려져 있다. 또한 강한 항암 활성이 있어서 유선암에 복용하는 것으로도 알려져 있고 류마치스, 척수성 신경근염 등에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 지우초 (*Lonicerae Flos*)는 수박 꽃이라고도 불리며 치은염, 편도염, 급성 대장염 등의 염증치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 귀전우 (*Euonymus alatus*, EA)는 약명으로 신전목이라고도 하며 호박 덩굴과에 속하는 잎이 지는 떨기나무이다. 민간에서 위암, 식도암 등 갖가지 암에 효과가 있다고 하여 널리 알려진 나무이다. 그리고 귀전우 추출액은 소화기 궤양 및 종양 등의 치료에 탁월한 효과가 있다고 알려진 민간약으로 효과의 유무가 최근 실험이 되어 일부 밝혀지고 있다.<sup>12,13</sup> 또 귀전우를 사용한 tumor therapy에 관한 연구도 보고되어 있고<sup>14</sup> 그 화학적인 조성에 관한 연구도 보고되어 있다.<sup>15</sup> 특히 귀전우의 어린 잎에서 flavonol 계열의 enzyme<sup>16,17</sup>과 aminopeptidase<sup>18</sup>들을 분리 정제하였고, dehydrodicatichine,<sup>19</sup> alkaloids,<sup>20,21</sup> kaempferol glycosides,<sup>22</sup> alatol,<sup>23</sup> euolalin<sup>24</sup> 등이 귀전우에 존재하는 것으로 밝혀져 있다.

본 연구는 귀전우와 몇 종의 천연 식물 추출물들이 MMP-9 활성에 대한 저해성 여부를 변형된 gelatin zymography 법으로 판단하고 활성 저해를 나타내는 추출물에서 MMP-9를 억제하는 물질의 분리 및 인체 암세포인 SK-Hep-1 세포주와 정상 세포인 Chang 세포주의 생존율을 측정하여 인체에 대한 추출물의 독성 여부를 확인하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 천연 식물들은 동국대학교 한의과대학 생화학교실에서 공급을 받은 것을

음지에서 건조하였고 이를 2~3 cm로 잘라서 추출하는데 사용하였다. Adenocarcinoma 세포주인 SK-Hep-1은 동국대학교 한의과대학 생화학교실에서 분양 받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였고 그 배양액을 centricon 10 (Amicon, USA)으로 농축하여 MMPs의 실험 중에서 MMP-9에 대한 실험에 사용하였다. 또한 세포주에 대한 생존 실험 및 세포주의 형태 변화를 확인하기 위해서 정상세포인 Chang 세포주와 SK-Hep-1 세포주를 사용하였다.

## 2.2. 시약

N,N-diethylnitrosamine (DEN), glycine, 3(4,5-dimethylethiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ammonium persulfate, Coomassie blue, triton X-100, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, gelatin 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 그리고 tris (hydroxymethyl) - aminomethane (Tris), acrylamide, N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine (TEMED), sodium dodecylsulfate (SDS) 등은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 제품을 사용하였다. 또 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), trypsin-EDTA, L-glutamine는 Gibco BRL사 (St. Langley, OK, USA) 제품을 사용하였고, n-hexane (95.0%), methanol (99.5%)과 ethyl acetate (99.0%)는 삼전 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), incubator (Boekel incubator shaker II, Model 136400), 냉동 건조기 (Martin Christ Alpha type, Germany)는 시료의 전 처리 및 분리를 위하여 사용되었다.

## 2.4. 실험 방법

### 2.4.1. 천연 식물에서 MMPs 억제 물질의 추출 및 분리

음지에서 잘 건조된 약재들을 잘게 썰어서 1 kg을 취하였다. 그리고 이것을 1 L 둥근 플라스크에 넣고 70% 메탄올로 환류하는 방법으로 3회씩 반복하여 추출하였다. 추출물은 여과한 후에 감압 농축하였고 농축물은 감압하에 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료들은 여러 번에 걸쳐 메탄올로 추출하는 방법으로 메탄올 가용성 분획 (화70M)과 메탄올 비가용성 분획 (MeOH insoluble)으로 나누었고, 모아진 MeOH soluble은 감압하에 농축하여 MMP-9의 저해능 실험에 사용하였다. 그리고 MeOH insoluble은 소량만을 취하여 물에 용해시킨 다음에 MMP-9의 저해능 실험에 사용하였다. MMP-9의 활성에 저해능이 있는 부분만을 flash silica gel column으로 저해물질의 분리에 사용하였고 그 방법은 다음과 같다.

Silica gel (Kieselgel 60 ASTM, Merck Art. 7734) column (30×400 mm)에서 화70M을 ethyl acetate로 용출하여 먼저 4개의 부분으로 분획하였다. 용출한 분획에서 저해능이 뛰어난 것으로 나타난 분획을 hexane과 ethyl acetate의 혼합비 (v/v)를 달리하면서 용출하는 방법으로 MMP-9 활성 저해물질 분리를 시도하였다.

먼저 silica gel column은 silica를 ethyl acetate에 혼합시켜서 column에 충전하였고 이후에 충분한 양의 hexane을 흘려주는 방법으로 silica gel column을 hexane으로 포화시켰다. 화70M2 농축액을 먼저 hexane으로 용출하여 노란색의 화합물 (화70M2F-1)과 365 nm에서 blue 색의

형광을 나타내는 열은 노란색 계열의 화합물을 분리하였다(화702F-2). 그리고 365 nm에서 pale blue색을 나타내는 화70M2F-3는 ethyl acetate : hexane = 1 : 20인 혼합물로 용출하여 분획하였고 같은 파장의 영역에서 붉은 색을 나타내는 화70M2F-4는 혼합비가 ethyl acetate : hexane = 1 : 15인 용액으로 용출하여 얻었다. 그리고 혼합비가 ethylacetate : hexane = 1 : 8인 혼합물로 용출하여 얻은 화70M2F-5 분획도 365 nm에서 붉은 색을 나타내었다. 이와 같은 방법으로 분리된 분획물들은 MPLC (Silica gel column, 30×200 mm, at 365 nm)에서 ethyl acetate : hexane = 1 : 15로 용출하였고 365 nm에서 흡광도를 보이는 부분만을 모아서 감압하에 농축하였다. 색상의 농도 차이는 있으나 장파장 자외선에서 화70M2F-3는 pale blue 색깔을, 화70M2F-4는 붉은색 그리고 화70M2F-5는 핑크계의 색깔을 나타내었다. 모두 silica gel TLC에서 ethylacetate : hexane = 1 : 4로 전개하여 단일 spot으로 나타났고 이들 각 물질의 구조는 규명 중에 있다.

#### 2.4.2. 세포주에서 MMP-9의 분리

MMP-9 활성물질의 분리는 MMP-9 활성물질을 많이 내는 세포주로 알려져 있는 SK-Hep-1을 혈청이 함유된 DMEM 배지로 키운 다음에, MMP-9 활성 억제제로 알려진 혈청을 1배의 PBS로 3회 잘 세척하였다. 그리고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배양액으로 24시간 배양시킨 다음 DMEM 배양액을 회수하여 원심 분리하였다. 회수된 DMEM 배양액은 Amicon 30 (Amicon, Inc., USA)을 이용하여 농축하여 분획물들의 MMP-9 활성 억제 여부를 판별하는데 이용하였다.

#### 2.4.3. MMP-9 활성도 측정

MMP-9 활성도는 gelatin zymography 방법<sup>25</sup>을 약간 변형시킨 방법으로 측정하였다. 즉, 0.1%의 gelatin이 함유된 10% acrylamide gel [5.08 mL의 증류수, Lower gel buffer (pH 8.8) 3.08 mL (Tris-base 18.15 g과 SDS 0.4 g가 1 L에 녹여 있는 것), 30% acrylamide 4.08 mL, 10% ammonium persulfate 70 µL, TEMED 30 µL 에 전기 영동 (running buffer는 Tris-base, 3.0275 g과 glycine, 14.225 g, SDS, 1 g을 1 L에 녹여 pH를 8.3으로 맞추는 것) 하였다. 그리고 전기영동이 끝나면 gel을 2.5%의 triton X-100으로 30분씩 2회 잘 세척하여 gel에 존재하는 SDS 성분을 제거하였다. 그리고 이 gel을 incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, pH 8.0)에 10분씩 2회 잘 세척하고 37°C shaking incubator에서 24시간 incubation 시킨 후 염색액 (0.25% coomassie blue, 10% acetic acid, 40% methanol)으로 12시간 염색시킨 다음 탈색시켜 (1차 탈색액: 50% methanol, 5% Acetic acid 혼합액으로 30분; 2차 탈색액: 5% methanol, 10% acetic acid 혼합액으로 완전 탈색) gel 상의 92 kDa 위치에 있는 MMP-9 band의 소실 정도를 densitometer (ACDSee v3.0)로 optical density를 측정한 값으로부터 활성억제 정도를 계산하였다.

#### 2.4.4. Cell Line 에 천연 식물 추출물 처리

SK-Hep-1과 Chang 세포주는 6 well에 약 1×10<sup>6</sup>개의 세포주를 배양하였고 추출물들을 배지액의 약 1% 수준으로 처리하였다. 한약재 추출물들은 DMEM 배지에 녹여서 세포에 노출시킨 후 각 세포주의 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 한약재에서 MMP-9 저해제의 분리 및 정제

Fig. 1에서 보는 바와 같이 백지와 지우초의 70% 메탄올 추출물은 MMP-9 활성에 저해능이 없는 것으로 나타났고 *Euonymus alatus* (귀전우)의 70% 메탄올 추출물은 MMP-9에 상당한 저해능이 있는 것으로 나타났다. MMP-9의 활성에 저해를 나타낸 귀전우의 메탄올 분획은 silica gel column에서 ethyl acetate로 전개하여 4개의 부분으로 분획하였고 분획된 부분들은 각각

MMP-9 저해능 실험을 하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이 두 번째 분획에서 그 저해능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

### 3.2. Cell Line에 천연 식물 추출물 처리

천연 식물에서 추출한 것을 각각의 세포에 처리하고 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3 ~ Fig. 5에 나타내었다. 즉, 정상 세포주인 Chang 세포주는 24 well plate에 50,000개를 깔아 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에 12시간 안정시킨 후에 각 추출물들의 최종농도가 1 mg/mL되게 처리하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 48시간 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과 핵과 그 주변의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 SK-Hep-1 세포주를 24 well plate에 30,000개의 세포를 깔아 Chang 세포주와 같은 조건으로 키운 후 형태학적 변화를 관찰한 결과에서는 귀전우의 MeOH soluble 추출물로 처리한 cell에서만 핵의 주위에 검은 반점이 넓게 분포되어 있는 것이 발견되었다. Lin 등의<sup>26)</sup> 연구에 의하면 항산화제나 항염증제 그리고 항암제로도 많이 쓰이는 curcumin (diferuloylmethane)을 SK-Hep-1에 투여한 결과 10 μM에서 17.4%의 세포의 성장억제효과를 보이며, 70.6%가 세포내로 전이되었다고 하였다. 또한 Kim 등의<sup>27)</sup> 연구에 의하면 인삼의 ginsenoside-R4 (G-Rs4) 성분을 SK-Hep-1에 처리하면 세포사멸 (apoptosis)이 일어나 세포를 사멸시킨다고 보고하였다. 이와 같은 결과로 보아 본 연구에 나타난 핵 주위의 반점은 귀전우에서 추출한 물질의 투여에 의한 것으로 생각되었다. 그러나 이러한 현상이 세포의 사멸에 의한 것인지 괴사 (necrosis)에 의한 것인지는 추후 연구해 보아야 할 것으로 생각된다.

## 4. 결 론

70% 메탄올 추출액을 동결 건조하여 메탄올에 용해시켜 각각 soluble과 insoluble 부분으로 분획한 후 MMPs의 저해능 실험 결과는 귀전우의 메탄올 soluble (화70M)분획만이 활성 저해능이 있는 것으로 나타났다. 화70M을 silica gel column에서 ethyl acetate로 용출하여 4개 부분으로 분획한 결과 두 번째 분획 (화70M2)에서 MMP-9의 활성 저해가 가장 뛰어난 것으로 나타났다. Ethyl acetate와 hexane의 혼합비를 달리하는 메탄올로 각각 용출하였다. Ethyl acetate와 hexane의 혼합용액으로 용출한 분획중에서 세 개의 분획이 MMPs 중에서 항암성의 MMP-9 활성에 저해능이 있는 것으로 나타났다.

인체 간암 세포주인 SK-Hep-1은 24 well plate에서 30,000개의 세포를 배양하여 인체 정상 세포인 Chang 세포주와 같은 조건으로 처리한 후 형태학적 변화를 관찰한 결과 귀전우의 메탄올 soluble 추출물로 처리한 세포에서만 핵의 주위에 검은 반점이 넓게 분포되어 있는 것이 관찰되었다.

## 참고 문헌

1. U. B. Hofmann, J. R. Westphal, G. N. P. Van Muijen, and D. J. Ruiter, *J. Invest. Dermatol.* **115**, 337-344 (2000).
2. D. E. Kleiner and W. G. Stetler-Stevenson, *Curr. Opinion Cell Biol.* **5**, 891-897(1993).
3. G. Opdenakker, P. E. Van den Steen, and J. Van Damme, *Trends Immunol.*, **22**, 571-579(2001).
4. T. A. Butler, C. Zhu, R. A. Mueller, G. C. Fuller, W. L. Lemaire, and J. F. Woessner, *J. Biol. Reprod.*, **44**, 1183-1188(1991).
5. C. H. Graham and P. K. Lala, *J. Cell Physiol.*, **148**, 228-234(1991).

6. S. Gack, R. Vallon, J. A. Schmidt, J. Tuckermann, J. Schenkel, H. Weiher, and P. Angel, *Cell Growth Differ.*, **6**, 759-767(1995).
7. L. R. Lund, J. Romer, N. Thomasset, H. Solberg, C. Pyke, M. J. Bissell, K. Dano, and Z. Werb, *Development* **122**, 181-193(1996).
8. S. Stetler, *J. Clin. Invest.* **103**, 1237-1241(1999).
9. T. E. Cawston, *Pharmacol. Ther.* **70**, 163-182(1996).
10. L. Liotta, P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **64**, 327-336(1991).
11. S. K. Chandler, R. E. Coates, A. Gearing, J. Lury, and E. A. Bone, *Neurosci. Lett.* **201**, 223-226(1995).
12. 이정호, 김하균, 하대유, *Korean J. Immunol.*, **15**, 243-253(1993).
13. 이정호, 신숙정, 문용, 이동근, *Korean J., Immunol.* **18**, 253-263(1996).
14. Chung, Hwan-Suck, Jeong, Hyun-Ja, etc, *Clinica Chimica Acta*, **318**(1-2), 113-120(2002).
15. He, Lan, Lu, Shu-Ming, Pan, Yuan-Jiang, Chen, and Yao-Zu, *J. of Zhejiang Univ. Science*, **1**, 188-189(2000).
16. Ishikura, Nariyuki and Yang, Zhi-Qing, *Phytochemistry*, **36**, 1139-1145(1994).
17. Ishikura, Nariyuki and Yang, Zhi-Qing, *J. of Biosciences*, **46**, 1003-1010(1991).
18. Tazaki, Kiyoshi and Ishikura, Nariyuki, *Plant and Cell Physiology*, **26**, 721-728(1985).
19. Chen, Ke, Pan, Deji, and Xu, Guangyi, *Zhongcaoyao*, **17**, 97-100(1986).
20. Ishiwata, Hiroyuki, Shizuri, Yoshikazu, and Yamada, Kiyoyuki, *Phytochemistry*, **22**, 2839-2841(1983).
21. K. Yamada, Y. Shizuri, and Y. Hirata, *Tetrahedron*, **34**, 1915-1920(1978).
22. Ishikura, Nariyuki and Sato, Shuji, *Botanical Magazine, Tokyo*, **70**, 83-87(1977).
23. Sugiura, Kimio, Shizuri, Yoshikazu, Yamada, Kiyoyuki, and Hirata, Yoshimasa, *Tetrahedron Letters*, **27**, 2307-2310(1975).
24. Sugiura, Kimio, Shizuri, Yoshikazu, Yamada, Kiyoyuki, and Hirata, Yoshimasa, *Chemistry Letters*, **5**, 471-472(1975).
25. C. Heussen and E. B. Dowdle, *Anal. Biochem.*, **102**, 196-202(1980).
26. L. I. Lin, Y. F. Ke, Y. C. Ko, and J. K. Lin, *Oncology*, **55**, 349-353(1998).
27. S. K. Kim, Y. H. Lee, J. H. Park, and S. K. Lee, Ginsenoside-Rs4, *Eur. J. of Cancer*, **35**, 507-511(1999).

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-211-0011 Fax : +82+(0)31-210-1509

E-mail: yongchur@amorepacific.com