

수종 식물의 Plasmin 저해 활성 검색

김영호*, 박미현, 정현주, 배기환

충남대학교 약학대학

Plasmin Inhibitory Activity of Medicinal Plants

Young Ho Kim*, Mi Hyoun Park, Hyun Ju Jung and KiHwan Bae

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract - Binding of urokinase-type plasminogen activator to its cellular receptor accelerate production of plasmin from plasminogen on the cell surface. Plasmin can digest extracellular matrix components and basement membranes through activating certain proMMPs, which is related to the invasiveness to the cells. Plasmin also acts the regulation of blood coagulation and relates closely to cardiovascular diseases such as stroke and coronary occlusion. Therefore, its inhibitors may be useful as antimetastatic agents and to the treatment of cardiovascular diseases. To search for plasmin inhibitors from plant resources, we screened plasmin inhibitory activities with 76 methanol extract of plant species. Among them, three plant samples showed strong inhibitory activities (>70%) and thirteen plant samples showed more than 50% inhibitory activities of plasmin. Their inhibitory activities were not directly related with uPA inhibitory activities and cell viability.

Key words - screening; plasmin; uPA; viability; medicinal plants.

Plasmin은 혈중에 존재하는 endoprotease의 일종으로서 아미노산 484개와 230개로 구성된 polypeptide H측쇄와 L측쇄가 2개의 disulfide 결합으로 연결된 구조를 갖는 serine protease이다. 혈중에는 전구체인 plasminogen의 형태로 존재하며 plasminogen 활성화인자에 의해 Arg-Val 결합이 절단되어 생성된다.¹⁾ Plasmin은 일련의 promatrix metalloprotease(proMMP)를 활성화시켜 직간접으로 extracellular matrix(ECM)을 분해함으로써 암세포의 침윤을 용이하게 하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 최근에 침윤성이 높은 암세포에 urokinase-type plasminogen activator(uPA)와 그 receptor가

동시에 발현된다는 것이 보고되었으며, uPA가 세포표면의 receptor와 결합하면 plasminogen으로부터 plasmin의 생성이 촉진된다. 이렇게 생성된 plasmin은 직접 ECM을 분해하거나 다른 proMMPs를 활성화시키며, 그 결과 uPA-plasmin system을 갖고 있는 침윤성 암세포는 쉽게 ECM을 분해하여 주변 조직으로 전이된다.³⁾ 한편 plasmin은 혈전용해작용을 가지며, 혈관내에 형성된 fibrin에 작용하여 이것을 분해 용리시켜 fibrin 분해산물을 생성함으로써 뇌졸중이나 관상동맥색색증과 같은 심혈관계 질환에도 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 따라서 천연물로부터 이러한 plasmin의 활성을 저해할 수 있는 약물은 암전이를 억제할 수 있을 뿐만 아니라 심혈관계 질환에도 효과적으로 이용될

*교신저자 : Fax 042-823-6566

수 있을 것으로 생각된다. 본 연구는 국내에서 자생하고 있는 천연물로부터 암전이 조절물질 및 순환계 질환에 유용한 생리활성물질 탐색을 위한 기초연구로서 전국각지에서 채집한 식물추출물의 methanol extract를 이용하여 plasmin활성 억제 효과와 urokinase 저해효과를 조사하고, 마우스의 백혈병 세포주인 L1210를 이용하여 세포독성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 - 본 실험의 screening을 위하여 사용된 76종의 생약은 지리산, 오대산, 계룡산 등지에서 채집하여 식물분류학적인 동정을 거친 후 실험에 사용하였으며, 표본은 충남대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

기기 및 시약 - 실험에 사용한 기기 및 시약은 다음과 같다.

Cell Counting Kit reagent A, reagent B (Dojndo), fetal bovine serum(Gibco), plasmin(Sigma), skim milk(Difco), urokinase(Sigma), Gly-Arg-pNA(Sigma), penicillin G(Sigma), streptomycin sulfate(Sigma), RPMI 1640 medium(Gibco), microplate reader(Molecular Devices), CO₂ incubator(Forma Scientific).

시료의 조제 - 채집한 시료는 즉시 음건한 후 세절하여 실온에서 메탄올로 추출하고, 하룻밤 방치한 후 여과하여 메탄올 엑스를 만들고, 시료의 일정량을 평량하여 최종농도가 20 mg/ml이 되도록 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해하여 assay stock solution으로 사용하였다.

Plasmin 저해 활성 - Plasmin의 저해 효과는 다음과 같이 측정하였다. 96 well plate에 50 mM Tris-HCl buffer 용액에 녹인 0.1 M NaCl 150 μ l, plasmin solution(1.25 unit/ml) 10 μ l, assay stock solution을 50배로 희석한 test sample solution 10 μ l와 substrate solution으로 1% skim milk solution 30 μ l을 넣고 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군에 대한 탁도를 비교하여 plasmin 저해활성을 측정하였다.

Urokinase 저해활성 - Urokinase 저해활성은 다음과 같이 측정하였다. 96 Well plate에 50 mM

Tris-HCl buffer(pH 7.8) 60 μ l, 0.1 M NaCl 75 μ l, urokinase(50 unit/ml) 5 μ l, assay stock solution을 50배로 희석한 test solution 10 μ l와 substrate solution으로 Gly-Arg-pNA(1.4 mg/ml) 50 μ l를 넣고 2시간동안 37°C에서 반응시킨 후 micro plate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군에 대한 흡광도를 비교하여 urokinase 저해활성을 측정하였다.

L1210세포주에 대한 viability - RPMI 1640 medium을 이용하여 96 well plate에 logarithmic phase에 도달한 L1210세포를 2×10^3 cells/well을 접종하여 24시간 배양한 후 stock solution을 50배로 희석한 시료 10 μ l를 처리하여 최종 volume이 200 μ l가 되도록 하였다. 시료를 처리한 세포주를 48시간 더 배양한 후 WST-1시약을 함유한 Cell Counting Kit의 reagent A와 solution B를 혼합한 용액 10 μ l을 가하여 4시간 더 배양하고 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성의 유무를 판단하였고, 세포독성의 정도를 3등급(75~100% cell death: ++, 50~75% cell death: +, 0~50% cell death: -)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

암세포의 주변조직으로의 침윤은 malignant tumor의 특징적인 성질로서 암세포의 전이를 일으키며, 암세포에 의해 만들어진 많은 단백질 분해 효소가 extracellular matrix(ECM)와 basement membranes(BM)의 성분을 분해한다. 작용부위에 zinc ion을 포함하고 있는 단백질 분해 효소의 일종인 matrix metalloproteases(MMPs)는 native collagen과 ECM, BM의 구성성분인 type IV collagen을 분해하여 암세포의 침윤에 중요한 역할을 한다. 그러므로 type IV collagenase(MMP-2, MMP-9) 활성은 암세포의 전이력과 비례한다. MMP-2, MMP-9와 같은 type IV collagenase의 세포내 저해제인 TIMP-1(tissue inhibitor of metalloprotease), TIMP-2에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있으며, 이들의 균형이 암세포에서 세포의 침윤과 관련이 있다고 생각된다. 대부분의 MMPs는 불활성 전구물질인 proMMPs로 분비되며 이들의

proteolytic activation이 ECM의 분해에 필수적이다.⁵⁾

Plasmin은 proMMP를 활성화시켜 직간접적으로 ECM을 분해하여 암세포의 침윤을 용이하게 함으로서 암의 전이를 일으킨다고 생각되며,^{6,7)} 또한 혈관내에 생성된 fibrin을 제거하는 혈전용해작용을 갖는다. 따라서 천연물로부터 plasmin 저해

활성의 검색은 암전이 저해물질과 순환계 질환에 유용한 생리활성물질 탐색을 위한 기초적인 수단이 될 수 있다.

본 실험에서는 전국 각지의 산야에서 채집한 76종 생약의 MeOH extract를 대상으로 plasmin에 대한 단백질 분해 억제효과를 조사하여 본 결과 Table I에서와 같이 배초향의 지상부, 담배풀의 전초, 오리

Table I. Inhibitory activities of medicinal plants against plasmin and L1210 cell line

Scientific Name	Korean Name	Family	Part ^{a)}	Inhibition effect (%)		
				Plasmin	uPA	L1210 ^{b)}
<i>Acanthopanax chiisanensis</i>	지리산오갈피	Araliaceae	Fr	12.2	13.2	-
<i>Acanthopanax koreanum</i>	섬오갈피	Araliaceae	B	62.8	17.6	-
<i>Adenocaulon himalaicum</i>	멀가치	Compositae	W	22.7	44.5	-
<i>Agastache rugosa</i>	배초향	Labiatae	A	73.5	15.5	-
<i>Ainsliae acerifolia</i>	단풍취	Compositae	W	12.5	32.4	-
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	돼지풀	Compositae	W	13.1	49.5	-
<i>Aster koraiensis</i>	별개미취	Compositae	R	46.5	29.8	-
<i>Aster koraiensis</i>	별개미취	Compositae	L	65.5	30.6	-
<i>Aster tataricus</i>	개미취	Compositae	W	15.7	21.5	-
<i>Botrychium virginianum</i>	늑고사리나물	Ophioglossaceae	W	13.9	51.3	-
<i>Brachybotrys paridiformis</i>	당개지취	Borraginaceae	L	18.7	40.7	-
<i>Bupleurum longiradiatum</i>	개시호	Umbelliferae	A	19.0	34.1	-
<i>Carpesium abrotanoides</i>	담배풀	Compositae	W	77.8	30.0	+
<i>Carpesium divaricatum</i>	긴담배풀	Compositae	A	41.1	45.4	+
<i>Chionanthus retusus</i>	이팝나무	Oleaceae	L	19.0	31.9	-
<i>Clematis apifolia</i>	사위질빵	Ranunculaceae	W	22.0	37.4	-
<i>Clematis heracleifolia</i>	조희풀	Ranunculaceae	R	66.5	44.8	-
<i>Clematis heracleifolia</i>	조희풀	Ranunculaceae	A	51.3	18.4	-
<i>Clinopodium chinense</i>	충충이꽃	Labiatae	W	55.6	60.4	-
<i>Corchoropsis tomentosa</i>	수까치깨	Sterculiaceae	W	15.1	34.8	-
<i>Cornus walteri</i>	말채나무	Cornaceae	A	58.3	30.9	-
<i>Crataegus pinnatifida</i>	산사	Rosaceae	S	14.0	51.0	-
<i>Crataegus pinnatifida</i>	산사	Rosaceae	L	43.8	53.4	-
<i>Cirsium japonicum</i>	영경취	Compositae	R	68.7	58.5	-
<i>Cryptotaenia japonica</i>	파드득나물	Umbelliferae	W	49.3	15.5	++
<i>Cuscuta chinensis</i>	토사자	Convolvulaceae	Fr	20.7	21.0	-
<i>Cuscuta japonica</i>	새삼	Convolvulaceae	A	14.1	29.7	-
<i>Diatamnus dasycarpus</i>	백선	Rutaceae	R	57.7	44.4	+
<i>Eriobotrya japonica</i>	비파나무	Rosaceae	S	15.1	38.3	-
<i>Eriobotrya japonica</i>	비파나무	Rosaceae	FL	18.3	41.5	-
<i>Eriobotrya japonica</i>	비파나무	Rosaceae	L	16.8	52.3	-
<i>Euonymus sachalinensis</i>	회나무	Celastraceae	L	12.0	60.2	-
<i>Eupatorium lindleyanum</i>	골등골나물	Compositaceae	A	20.7	32.3	-
<i>Gentiana uchiyamai</i>	칼잎용담	Gentianaceae	W	13.2	35.0	-
<i>Hylomecon hylomeconoides</i>	매미꽃	Papaveraceae	A	61.7	28.5	-
<i>Hylomecon hylomeconoides</i>	매미꽃	Papaveraceae	R	46.1	29.4	-
<i>Isodon excisus</i>	오리방풀	Labiatae	A	72.2	23.0	-
<i>Isodon excisus</i>	오리방풀	Labiatae	R	22.0	33.9	-
<i>Isodon inflexus</i>	산박하	Labiatae	W	16.2	49.5	-

Table I. Continued

Scientific Name	Korean Name	Family	Part ^{a)}	Inhibition effect (%)		
				Plasmin	uPA	L1210 ^{b)}
<i>Lactuca raddeana</i>	산고들빼기	Compositae	W	21.3	17.6	-
<i>Leonurus sibiricus</i>	익모초	Labiatae	W	12.3	26.7	-
<i>Lespedeza cuneata</i>	비수리	Leguminosae	W	21.7	15.7	-
<i>Lespedeza tomentosae</i>	개싸리	Leguminosae	L	38.0	50.3	-
<i>Lindera erythrocarpa</i>	비목나무	Lauraceae	L	54.6	3.6	-
<i>Lindera glauca</i>	감태나무	Lauraceae	L	17.1	38.3	-
<i>Meehania urticifolia</i>	벌개덩굴	Labiatae	W	15.2	40.4	-
<i>Melampyrum roseum</i>	알머느리밥풀	Scrophulariaceae	W	42.2	31.8	-
<i>Melandryum seoulensis</i>	가는장구채	Cargophyllaceae	A	19.6	24.3	-
<i>Melilotus suaveolens</i>	전동싸리	Leguminosae	W	13.5	36.8	-
<i>Mosla punctulata</i>	들개풀	Labiatae	W	22.9	44.8	++
<i>Ostericum koreanum</i>	강활	Umbelliferae	A	13.5	48.7	-
<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	마타리	Valerianaceae	W	26.2	33.2	-
<i>Patrinia villosa</i>	뚝갈	Valerianaceae	A	13.6	52.2	-
<i>Patrinia villosa</i>	뚝갈	Valerianaceae	W	54.3	40.6	-
<i>Pedicularis resupinata</i>	송이풀	Scrophulariaceae	W	46.8	18.1	-
<i>Persicaria fauriei</i>	가시여뀌	Polygonaceae	W	42.2	53.4	++
<i>Persicaria tinctoria</i>	쪽	Polygonaceae	W	15.1	49.8	-
<i>Peucedanum terebinthaceum</i>	기름나물	Labiatae	A	16.6	38.1	-
<i>Physaliastrum japonicum</i>	가시과리	Solanaceae	A	16.7	15.1	-
<i>Phyteuma japonicum</i>	영아자	Campanulaceae	A	12.6	48.4	-
<i>Rodgersia podophylla</i>	도깨비부채	Saxifragaceae	R	14.1	56.7	-
<i>Sapium japonicum</i>	사람주나무	Euphorbiaceae	L	39.6	32.6	-
<i>Saussurea pulchella</i>	각시취	Compositae	W	66.7	12.5	++
<i>Serratula coronata</i> var. <i>insularis</i>	산비장이	Compositae	W	14.7	26.5	-
<i>Senecio argunensis</i>	쑥방망이	Compositae	W	18.6	50.7	-
<i>Siegesbeckia pubescens</i>	털진득찰	Compositae	W	54.8	49.5	-
<i>Sorbaria sorbifolia</i> var.	쉬땅나무	Rosaceae	A	59.1	33.5	-
<i>Sorbus commixta</i>	마가목	Rosaceae	S	35.5	35.3	-
<i>Sorbus commixta</i>	마가목	Rosaceae	L	55.8	18.8	-
<i>Stewartia koreana</i>	노각나무	Theaceae	S	12.3	33.4	-
<i>Stewartia koreana</i>	노각나무	Theaceae	L	12.9	41.5	-
<i>Symplocarpus renifolius</i>	얇은부채	Anaceae	R	14.6	40.1	-
<i>Tilia amurensis</i>	피나무	Tiliaceae	L	14.9	50.1	-
<i>Veronica linariaefolia</i>	꼬리풀	Scrophulariaceae	A	12.1	36.5	-
<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	겨우살이	Loranthaceae	W	32.4	50.5	-
<i>Youngia chelidoniifolia</i>	까치고들빼기	Compositae	A	58.9	40.9	-

^{a)} A: aerial part, W: whole plant, L: leaf, Fr: fruit, Fl: flower, S: stem, R: root, B: bark

^{b)} ++: 75.1~100.0% cell death, +: 50.1~75.0% cell death, -: 0~50.0% cell death

방풀의 지상부에서 70% 이상의 저해활성을 나타내었으며 섬오갈피의 수피, 벌개미취의 잎, 조희풀의 뿌리, 영경귀의 뿌리, 매미꽃의 지상부, 각시취의 전초에서 60% 이상의 저해활성을 나타내었다. 50% 이상의 저해활성을 나타낸 생약으로는 조희풀의 지상부, 말채나무의 지상부, 백선의 뿌리, 비목나무의 잎, 뚝갈의 전초, 층층이꽃의 전초, 털진득찰의 전

초, 쉬땅나무의 지상부, 마가목의 잎, 까치고들빼기의 지상부 등이었다. 한편 각 생약들의 human uPA에 대한 저해활성을 조사하여 본 결과 층층이꽃의 전초와 회나무의 잎이 60% 이상의 저해활성을 나타내었고, 늦고사리나물의 전초, 산사의 줄기와 잎, 영경귀의 뿌리, 쑥방망이의 전초, 피나무의 잎과 겨우살이의 전초 등이 50% 이상의 저해활성을 나타

내었다. 층층이 꽃의 전초와 영경귀의 뿌리에서는 plasmin과 uPA에 동시에 높은 저해활성을 나타내었으나, 대체로 plasmin의 저해활성과 uPA 저해활성과는 직접적인 상관성은 보이지 않았다. 일반적으로 약용식물들의 생리활성과 세포독성의 유무는 의약품의 개발에 중요한 요인이 되기 때문에 실험에 사용한 생약들에 대한 세포의 viability를 L1210세포를 이용하여 측정하여 보았다. 일반적으로 *in vitro*에서 세포독성을 조사하는 방법으로는 dye exclusion method,⁸⁾ [³H]-thymidine uptake method,⁹⁾ radiolabeled glucose utilization,¹⁰⁾ MTT method,¹¹⁾ XTT method,¹²⁾ SRB method,¹³⁾ WST-1 method 등이 개발되었다. 근래에 많은 시료를 처리하기 위하여 MTT method와 SRB method가 가장 보편적으로 이용되어진 방법이나 본 실험에서는 suspension cell에 유용한 WST-1 method를 이용하였다. WST-1 method는 tetrazolium salts가 reductive condition하에서 formazan dyes로 발색되는 독특한 성질을 이용한 cell proliferation assay방법으로 [³H]-thymidine uptake assay가 동위원소를 조작하기 위해 요구되는 특별한 설비나, MTT assay에서 formazan 산물의 용해나 원심분리 과정이 요구되지 않으며, 세포배양액에 직접 WST-1 reagent solution을 첨가함으로써 시료의 세포독성을 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 실험에 사용한 생약들은 대체로 plasmin 저해활성과 L1210에 대한 세포독성은 직접적인 관계는 나타내지 않았다. 77.8%의 plasmin 저해 활성을 나타낸 담배풀의 전초의 경우와 57.7%의 저해활성을 나타낸 백선의 뿌리의 경우 증정도(+)의 세포독성을 나타내었고 66.7%의 저해활성을 나타낸 각시취 전초의 경우 강한 세포독성을 나타내었으나, 73.5%의 저해활성을 나타낸 배초향의 지상부를 비롯한 그 외의 생약들은 세포독성을 나타내지 않았다. 이상과 같이 76종의 생약들을 대상으로 하여 실시한 plasmin, uPA 저해활성과 L1210 세포주에 대한 검색결과를 활용하여 천연물로부터 암의 전이를 억제할 수 있는 화합물이나 순환계 질환에 유용한 활성물질을 개발하기 위하여 활성이 관찰된 수종의 식물들에 대한 유효성분의 규명, 약효의 검정 등 구체적인 연구가 요구된다.

인용문헌

1. 今堀和友, 山川民夫 (1984) 生化學辭典, 1082 東京化學同人, 東京.
2. Kawada, M. and Umezawa, K. (1995) Suppression of *in vitro* invasion of human fibrosarcoma cells by a leupeptin analogue inhibiting the urokinase-plasmin system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209:25-30.
3. Mandriota, A. J., Seeghezzi, G., Vassalli, J. D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, R., Mignatti, P. and Pepper, M. S. (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270:9709-9716.
4. Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M. and Yamaguchi, K. (1997) Micropeptides 478-A and -B, plasmin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* 60:184-187.
5. Cha, H. J., Bae, S. K., Lee, H. Y., Lee, O. H., Sato, H., Seiki, M., Park, B. C. and Kim, K. W. (1996) Anti-invasive activity of urosolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* 56:2281-2284.
6. Shi, G. Y., Wang, S. J., Chang, B. I., Tasi, C. F., Lin, M. T., Chang, W. C., Wing, L. Y., Jen, C. J. and Wu, H. L. (1996) Regulation of plasminogen activator inhibitor activity by plasmin in endothelial cells. *Thromb. Res.* 81:75-84.
7. Vassalli, J. D. and Belin, D. (1987) Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Lett.* 214:187-191.
8. Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L. and Macaluso, C. K. (1983) A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.* 43(2):749-757.
9. Twentyman, P. R., Walls, G. A. and Wrigth, K. A. (1984) The response of tumor cells to radiation and cytotoxic drugs; a comparison of clonogenic and isotope uptake assays. *Br. J. Cancer.* 50(5):625-631.
10. Von Hoff, D. D., Forseth, B. and Warfel, L. E. (1986) Use of a radiometric system to screening for antineoplastic agents: Correlation with a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 45(9):4032-4038.

11. Carmichael, J., Degraff, W. G., Gezdar, A. F., Minna, J. D. and Michell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47:936-942.
12. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M.J., fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48:589-601.
13. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. Monks, A., McMagon, J., Vistica, C., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R (1988) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112.

(1998년 5월 28일 접수)