

## 낙우송(*Metasequoia glyptostroboides*)으로부터 분리한 flavonoid의 금속단백분해효소-9 발현 억제 활성

양재영 · 이호재 · 고영희 · 권병목 · 전효곤\*

한국생명공학연구원

Received February 2, 2005 / Accepted April 2, 2005

**Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression of Flavonoids from *Metasequoia glyptostroboides*.** Jae-Young Yang, Ho-Jae Lee, Yung-Hee Kho, Byoung-Mok Kwon and Hyo Kon Chun\*. *Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oen-dong, Yosung-gu, Daejeon 305-333, Korea* – Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of structurally and functionally related zinc-dependent enzymes responsible for proteolytic degradation of extracellular matrix components such as base membrane or interstitial stroma. MMPs play an important role in a variety of physiological and pathological tissue remodeling processes, including wound healing, embryo implantation, tumor invasion and metastasis. Since MMP-9 (gelatinase B) has unique ability to cleave type IV collagen, gene expression of MMP-9 has been focused on as a pharmacological target. Flavonoids are a class of compounds that are widely spread in plants. In the courses of screening for the suppressors of MMP-9 gene expression from natural products, *Metasequoia glyptostroboides* was selected. Six flavonoids, sciadopitysin, isoginkgetin, bilobetin, 2,3-dihydrohinokiflavone, luteolin and apigenin were purified as suppressors of MMP-9 gene expression from *M. glyptostroboides*. The suppressing activity of the isolated flavinoids on the MMP-9 gene expression was measured by gelatin zymography and Northern blot analysis.

**Key words** – MMPs, ECM, *Metasequoia glyptostroboides*, Flavonoid

기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase ; MMP)는 아연이온에 의존적이며 기저막이나 간질성 조직 등에 존재하는 세포외기질(extracellular matrix ; ECM)을 분해하는 단백질분해효소로서[18] 정상조직에서는 매우 엄격하게 조절되어 상처 치유, 혈관생성, 월경, 배란, 임신 등 각각의 기능을 정상적으로 유지시키나, 과다하게 분비되면 암의 침윤과 전이, 류마티스성 관절염, 소화기궤양, 동맥경화증 등의 질병을 야기하게 된다[9].

암 환자의 주된 사망요인은 전이(metastasis)에 의한 것으로 밝혀져 있다[7]. 암세포가 침윤되고 전이되는 과정은 세포 표면과 세포외기질과의 접촉, 단백질분해효소의 분비와 그로 인한 ECM 주위의 분해, 세포의 이동 및 ECM과 다른 조직으로의 침입 등 3단계의 과정으로 이루어진다[10,11]. 암세포의 침윤과 전이에는 MMP가 결정적인 역할을 하므로 금속단백분해효소 활성의 억제는 암전이를 예방하고 치료하는 약제 개발의 중요한 수단이 된다[17].

생체 내에서의 MMP의 생성 및 활성의 조절은 proMMP 발현단계, 잠재형 proMMP의 활성화단계, 내인성 저해제인 TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinase)와의 균형 등에 의해서 이루어진다[14]. 대부분의 MMP의 발현은 전사단계에서 일차적으로 조절되며 MMP 유전자 발현 프로모터 부위의 mRNA가 다양한 성장인자와 cytokines, 다른 환경적 요

인과 반응함으로써 조절된다[9]. 즉 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) 등의 다양한 cytokine들과 성장인자, 암 발생 유전자, hormone, tumor promotor 등의 활성에 따라 MMP의 mRNA 발현이 조절되고 있다[2].

MMP의 효소활성저해제를 식물추출물이나 미생물대사산물로부터 탐색하려는 시도는 많이 이루어 졌으나[5] MMP 단백질 발현의 저해를 지표로 한 천연물에서 시도는 많지 않았던 중, 암전이 저해 기작을 연구하는 과정에서 MMP의 발현을 저해하는 물질이 밝혀졌다[14].

본 연구에서는 MMP 발현을 저해하는 활성이 우수한 낙우송에서 분리한 flavonoid 계열의 화합물의 저해효과를 gelatin zymography에 의한 단백질 발현과 Northern blot 분석법에 의한 mRNA 발현을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 실험방법

#### 세포주와 배지 및 배양방법

세포는 Japanese Cancer Research Bank로부터 제공받은 human fibrosarcoma HT1080 세포주를 사용하였다. 배지는 Gibco사에서 구입한 FBS와 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)으로 10% FBS 첨가된 배지에서 배양하였고, CO<sub>2</sub> 배양기를 이용하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-42-860-4356, Fax : +82-42-860-4595

E-mail : hkchun@kribb.re.kr

### M. glyptostorboides로부터 활성물질의 분리

M. glyptostorboides를 대전 일대에서 채취하여 수세한 후 그늘에서 건조하여 메탄올로 7일간 침출하였다. 침출한 메탄올 추출액(260g)을 다시 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 유기용매별로 분획하였고, 그 중 활성이 강하게 나타난 클로로포름층(50g)과 에틸아세테이트층(55g)을 TLC (thin layer chromatography) (Merck), silica gel column chromatography (230~400 mesh, Merck) 및 sephadex LH-20 column chromatography (Pharmacia), HPLC 분석법(YMC Co., Japan) 등을 이용하여 물질을 분리하였다. HPLC는 Hitachi제품으로 L-7100 pump, L-7450A photo diode array detector, L-7000 interface module을 사용하였고, column은 YMC (Co.,Japan, ODS 250mm×10mm)을 사용하였다.

M. glyptostorboides 메탄올 추출물은 에틸아세테이트층과 클로로포름층에서 MMP-9 저해활성을 보이는 것으로 나타났다. 용매분획별로 활성이 있었던 클로로포름층(50g)에서는 두 번의 silica gel column chromatography를 통하여 활성이 있는 분획을 얻어, CH<sub>3</sub>CN 53%조건인 HPLC 방법으로 Met-1을 분리·정제하였다.

강한 활성을 가지고 있었던 에틸 아세테이트층(50g)을 silica gel column chromatography를 하여 활성이 있는 4개 그룹의 분획을 얻어 각각 sephadex LH-20 column chromatography와 silica gel column chromatography를 실시하여 Met-2, Met-3, Met-4, Met-5, Met-6의 화합물을 분리·정제하였다.

### 물질의 기기분석

분리한 물질을 분석하기 위하여 NMR과 MS 등의 광화학 분석기기를 이용하였다. NMR은 Varian UNITY 300, Varian UNITY 500, Bruker DRX 300 spectrometer를, FAB-MS는 Kratos Concept-1S FAB spectrometer, ESI-MS는 Fison VG Quattro 400 Mass spectrometer를 사용하였다. UV 흡광도를 측정하기 위해서 Pharmacia Biochrom 4060 or Shimadzu를 사용하였고, BIO-RAD의 ELISA를 이용하였다.

### Gelatin zymography 분석법

1×10<sup>5</sup> /ml 의 HT1080 인간 섬유육종세포를 10% FBS를 함유한 배지를 이용하여 96-well plate에서 하루 배양한 후, 시료 처리를 하기 전에 무혈청 배지로 바꾸어 주고 시료처리 2시간 후 5 ng/ml의 tumor necrosis factor α (TNF-α) 처리를 하고 16~18시간을 배양하였다. 배양 후 세포의 모양과 세포독성을 확인하고 배양액만을 취하여 전기영동하였고 대조구와 비교하여 활성을 확인하였다. 대조구는 TNF-α를 암세포를 활성화시켜주는 유도제로 사용하여 대조구와 비교구의 유도되는 양상을 확인하였다.

### WST-1 용액을 이용한 세포독성 시험

시료를 처리한 세포에 대한 생존능력 및 세포독성을 알아

보기 위한 실험 방법으로 1×10<sup>5</sup> /ml의 세포를 10% FBS를 함유한 배지를 이용하여 96-well plate (Falcon사)에서 하루 배양하였다. 시료를 처리를 하기 전에 무혈청 배지로 바꾸어주고 다시 하루 처리한 후, 100 μl당 Cell proliferation Reagent WST-1 solution (Roche사) 10 μl을 처리하여 450파장(ref. 595 파장)으로 된 조건의 microplate reader로 각각의 흡광도를 읽고, 60분 후에 다시 흡광도를 측정하여 초기값과 반응후의 값을 각각 측정하여 대조구와 시료처리구의 값을 비교·계산하였다.

$$\text{viability}(\%) = \{(A-B)/(C-B)\} \times 100$$

A=시료구(시료를 처리한 well의 흡광도 수치)

B=비처리구(세포와 배지를 넣지 않고 plate 자체의 흡광도 수치)

C=대조구(시료 처리구와 비교하기 위한 시료 미처리구의 흡광도 수치)

### Northern blotting 분석법

HT1080 인간 섬유육종 세포주를 10% 혈청을 함유한 배지를 이용하여 세포를 60 mm 조직배양플레이트에서 1~2일간 배양한 후, 시료 처리를 하기 전 무혈청 배지로 바꾸어 준 후 각각 농도의 시료를 처리해 주었다. 시료처리 2~4시간 후에 TNF-α를 처리하고 16~18시간을 배양한 후, 배양한 세포는 TRIZOL reagent (Life technologies, Inc.)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 15 μg/ml의 RNA를 37% formaldehyde와 capillary transfer로 transferred Hybond-N membranes (Amersham Pharmacia Biotech)이 첨가된 1% agarose gels에 전기영동 하였다. Membrane은 optimized UV cross-linking procedure를 이용하여 고정시켰다.

Prehybridization과 hybridization은 68°C ExpressHyb hybridization solution (CLONTECH)으로 실행하였다. MMP-9과 GAPDH을 보기 위해 cDNA probes는 random primer kit (Takara, Japan)을 이용하여 [<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech)로 제작하였다. Blotting한 다음 25°C에서 0.05% SDS를 함유한 2×SSC (300 nM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0)로 씻어주고, 55°C에서 0.1% SDS를 함유한 0.1×SSC로 씻어 준 다음 -70°C에서 자동방사선사진법을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 활성물질의 분리·정제와 구조결정 및 분석

Metasequoia glyptostroboides로부터 분리한 활성물질은 기기분석과 이화학적 특성을 조사하여 본 결과 구조상 flavonoid 계열에 속하였으며 Met-1은 sciadopitysin, Met-2는 isoginkgetin, Met-3는 bilobetin, Met-4는 2,3-dihydrohinokiflavone

로, Met-5와 Met-6는 각각 luteolin과 apigenin임이 밝혀졌다 (Fig. 1).

**구조의 특성에 따른 물질의 활성**

낙우송과의 식물은 여러 개의 flavonoid를 가지고 있는 것으로 알려져 왔다[14]. 먼저 각각의 6개의 물질을 2, 4 그리고 8 μM의 일정한 농도로 세포에 처리하여 gelatin zymography 결과 농도별로 현저한 활성을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 2). MMP-9의 발현을 현저하게 억제하는 활성을 보이는 것은 isoginkgetin, bilobetin, 2,3-dihydrohinokiflavone, luteolin으로, sciadopitysin은 대조구와 비교하여 그다지 현저한 차이를 보이지 않는 것으로 나타나고 있으나 보다 높은 농도에서 활성을 있는 것을 확인하였다. Apigenin 역시 대조구와 비교하여 농도 의존적으로 활성의 차이를 보이고 있음을 확인하였다.

Sciadopitysin, isoginkgetin, bilobetin은 각각 3개, 2개, 1

개의 methoxy기를 가지는 구조적 특성을 가지고 있는데, 이는 두 개의 monoflavonoid가 연결된 biflavonoid 물질이면서, 강한 활성을 보이는 isoginkgetin과 bilobetin의 구조를 볼 수 있다. 각 3개의 -OCH<sub>3</sub>를 가지고 있는 sciadopitysin보다 높은 활성을 가지는 것을 볼 수 있는데, 구조적인 특성과 활성의 관계를 보면 몇 개의 O-methyl기를 가지고 있는 것 보다는 링 구조에서 -OH의 위치가 활성과 관련되어 있는 것으로 추정된다. sciadopitysin이 I 구조의 7과 4' 위치와 II 구조의 4'' 위치에 3개의 -OCH<sub>3</sub>를 가지고 있는 것과 비교할 때, I 구조의 7 위치에 -OCH<sub>3</sub>를 가지는 대신 -OH를 가지고 있는 isoginkgetin과 I 구조 7 위치와 II 구조 4'' 위치에 역시 -OCH<sub>3</sub>를 가지는 대신 2개의 -OH를 가지고 있는 bilobetin이 높은 역할을 보이는 것을 알 수 있다. 또 같은 biflavonoid 물질이면서 매우 독특한 구조를 가지고 있는 2, 3- dihydrohinokiflavone는 naringenin (I)과 apigenin (II)이 O-linkage로 이루어진 화합물로서 역시 MMP-9의 발현을 억제하는 활성을

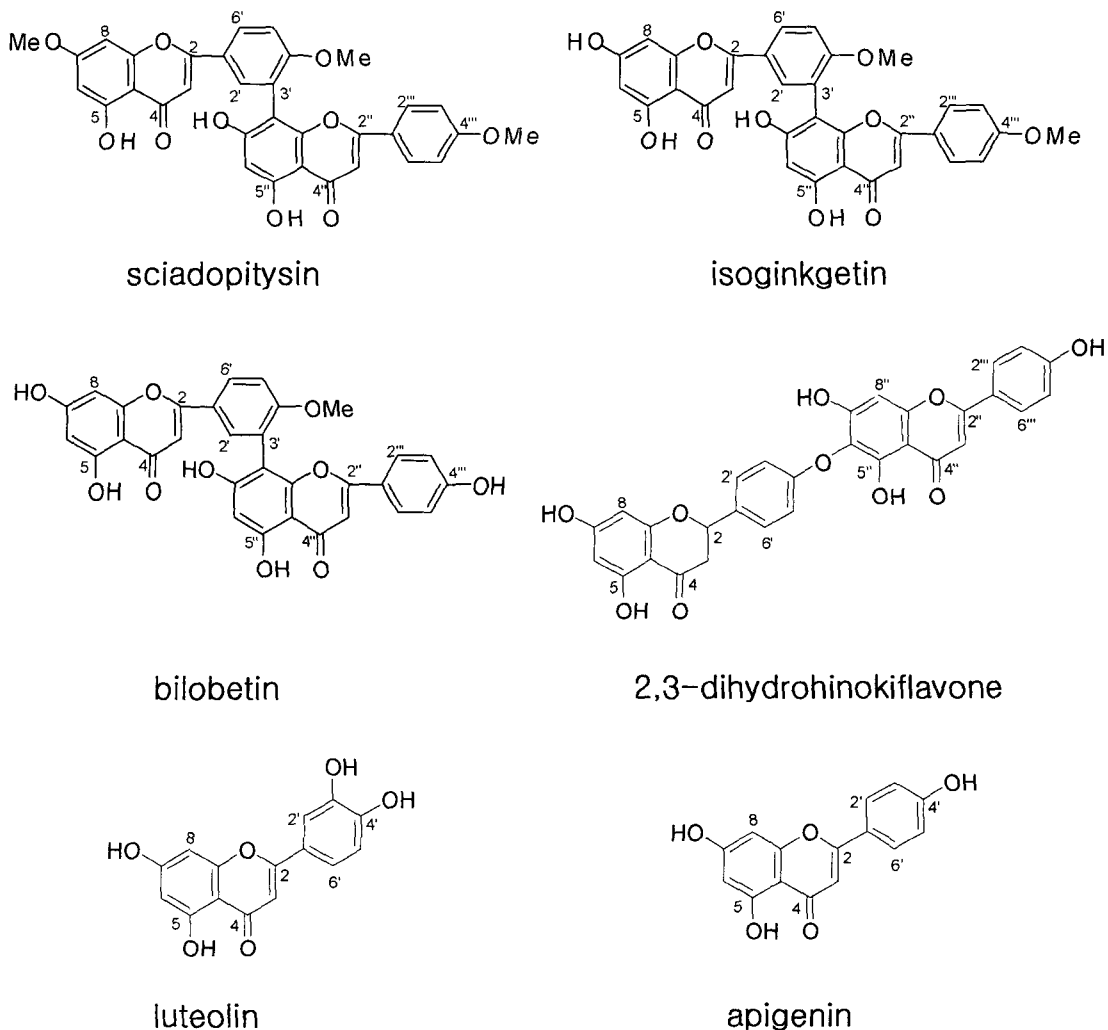


Fig. 1. Six flavonoids isolated from *M. glyptostroboides*.

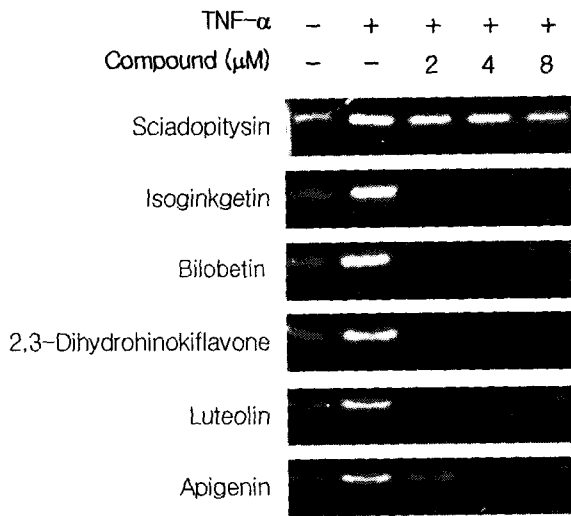


Fig. 2. Effects of isolated flavonoids from *M. glyptostroboides* on MMP-9 production in TNF- $\alpha$ -induced HT1080 fibrosarcoma cells. Conditioned media from HT1080 cells treated with 2, 4, 8  $\mu$ M of flavonoids and 5 ng/ml of TNF- $\alpha$  were analyzed by gelatin zymography.

확인하였다.

Luteolin과 apigenin은 광범위하게 분포하는 flavonoid로써 화학적 방어에 유용하고 항산화작용을 하여 염증과 관련한 활성을 가지고 있음이 밝혀진 물질로 본 실험에서도 MMP-9의 발현 억제 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 낙우송으로부터 분리한 6개의 flavonoid 물질은 MMP-9 발현을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

**MMP-9 발현 저해 효과**

MMP는 전사수준에서 조절되기 때문에 그 과정에서 만들어지는 mRNA의 발현을 확인하기 위하여 Northern blot으로 분석한 결과는 Fig. 3과 같다.

분리된 6개 물질들이 MMP-9 유전자의 발현을 억제하는 활성을 각각 가지고 있다는 것은 gelatin zymography 등을 통하여 이미 확인하였으나 Northern blot 결과, isoginkgetin과 bilobetin은 4  $\mu$ M의 농도에서 MMP-9의 유전자 발현을 강하게 억제하였다. 2,3-dihydrohinokiflavone, luteolin과 apigenin은 gelatin zymography 결과에서는 강한 활성을 나타내었으나 MMP-9의 유전자 발현에는 큰 영향을 보이지 않았다. 특히 isoginkgetin과 bilobetin은 MMP-9 뿐만 아니라 TIMP-1의 발현도 상당히 억제하는 것으로 나타났다. Fig. 4는 세포증식에 미치는 flavonoid의 영향을 본 것으로 4  $\mu$ M 농도의 isoginkgetin는 세포의 증식에 상당히 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반면에 zymography 결과에서 뚜렷한 활성을 보였던 bilobetin은 세포 증식에 별 다른 영향을 주지 않으면서 MMP-9 유전자 발현에서 강한 활성을 보이는 것으로 나타났다.

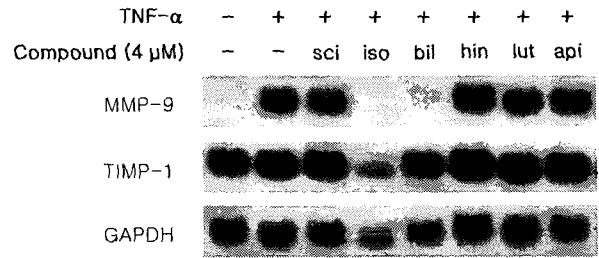


Fig. 3. Effects of isolated flavonoids from *M. glyptostroboides* on the gene expression of MMP-9 and TIMP-1. HT1080 cells were treated with 4  $\mu$ M of each flavonoids for 16~18 hours. Expression of MMP-9 and TIMP-1 was measured by Northern blot analysis. (sci;sciadopitysin, iso;isoginkgetin, bil;bilobetin, hin;2,3-dihydrohinokiflavone, lut;luteolin, api;apigenin).

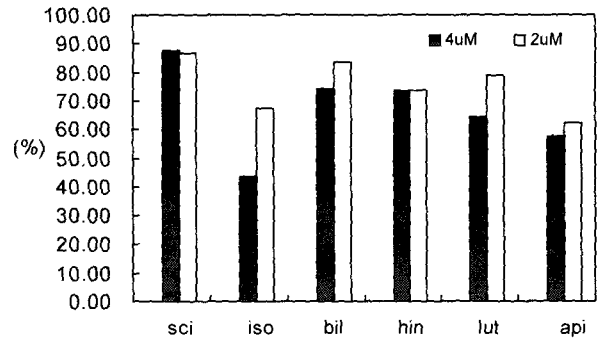


Fig. 4. Effect of isolated flavonoids on cell proliferation of HT1080 fibrosarcoma cells. HT1080 cells were treated with 2, 4  $\mu$ M of flavonoids for 1 day and viability was tested. (sci;sciadopitysin, iso;isoginkgetin, bil;bilobetin, hin;2,3-dihydrohinokiflavone, lut;luteolin, api;apigenin).

**요 약**

기질 금속단백분해효소(MMP)는 기저막이나 간질성 조직 등에 있는 세포외기질 성분을 분해하여 상처 치유, 태아의 발생, 종양세포의 침윤과 전이 등을 포함하여 조직이 재구성 되는 과정에서 생리학적 및 병리학적인 과정 양쪽 모두에 매우 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 MMP-9 유전자의 발현을 억제하는 물질을 천연물에서 탐색하였고, 탐색된 시료 중에서 높은 역할을 가진 낙우송과의 *Metasequoia glyptostroboides*가 선택되었다. 여러 가지 flavonoid 성분을 가지고 있는 *Metasequoia glyptostroboides*를 이용하여 4개의 biflavonoid와 2개의 monoflavonoid 구조의 물질을 분리하였고, 이 flavonoid 들은 sciadopitysin, isoginkgetin, bilobetin, 2, 3-dihydrohinokiflavone, luteolin, apigenin으로 정제하여 구조를 밝히고 zymography, WST-1을 이용한 세포독성시험, northern blot 등의 실험을 통하여 각 화합물의 구조적인 특성과 함께 MMP-9 유전자 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

본 논문은 과학기술부 21세기프론티어연구개발사업의 자생식물이용사업단 (PFO.20506-00)의 연구비에 의하여 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- Christelle Benaud, Rober B. Dickson, Erik W. Thompson. 1998. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **50**, 97-116.
- Clare M. Dollery, Jean R. McEwan, Adriano M. Henny. 1995. Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* **77**.
- Hee Kee Kim, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam sik Kang, Hyun Pyo Kim. 1998. Amentoflavone, a Plant biflavone : A New Poteintial Anti-inflammatory Agent. *Arch. Pharm. Res.* Vol. **4**, 406-410.
- Hyun Sun Lee, Won Keun Oh, Bo Yeon Kim, Soon Cheol Ahn, Dae Ook Kang, et al., 1996. Inhibition of Phospholipase C $\gamma$ 1 Activity by Amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Medica* **62**, 293-296.
- Ihn rhan Lee et al., 1992 Cytotoxicity of folklorie medicine in murine and human cancer cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **23(3)**, 132-136.
- John A, Manthey et al., 1999. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human monocytes. *J. Nat. Prod.* **62**, 441-444.
- J.M. Ray and W.G. Stevenson. 1994. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J.* **7**, 2062-2072.
- Kyong-joo Cho, Chang-hyun Yun, Do-young Yoon., 2000. Effect of Biflavonoids extracted from the Bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine Interleukin-1 production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicology and Applied Pharmacology* **168**, 64-71.
- Linda L. Johnson, Richard Dyer, Donald J, Hupe. 1998. Matrix metalloproteinases. *Chem. Biol.* **2**, 466-471.
- Min wang et al., 1998. Blocking of collagenase secretion by Estramustin during in vitro tumor cell invasion. *Cancer Res.* **48**, 6262-6271. Nov. 15.
- Marta L. Corcorn et al., 1996. MMP-2 ; Expression, Activation and Inhibition Enzyme. *Protein* ; **49**, 7-19.
- Moon-Taek Park, Hee-Jae Cha, Joo-Won Jeong, Shin-Il Kim, Hae-Young Chung, Nam Deuk Kim. 1999. Glucocorticoid receptor- induced Down-regulation of MMP-9 by Ginseng components, PD and PT contributes to inhibition of the Invasive Capacity of HT1080 Human fibrosarcoma cells. *J. Mol. Cells* vol **9**, 476-483.
- Peter D Brown. 1997. Matrix metalloproteinases inhibitors. *Angiogenesis* **1**, 142-154.
- Sam Sik Kang, Ju Sun Kim et al., 1990. Flavonoids from the Leaves of *Ginkgo biloba*. *Kor. J. Pharmacogn* **21(2)**, 111-120.
- Sang-oh Yoon, Moon-moo Kim, An-sik Chung. 2001. Inhibitory Effect of Selenite on Invasion of HT1080 Tumor cells. *J. Bio Chem.* **276(23)**, 20085-20092. June 8.
- Solomon Habtemariam. 1999. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- $\alpha$  in L-929 tumor cells *J. Nat. Prod.* **60**, 775-778.
- Stetler-Stevenson, W. G. et al., Matrix metalloproteinases and tumor invasion ; from correlation and causality to the clinic. *Semin. Cancer Biol.* **7**, 147-154.
- Steven D shapiro. 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix ; biological consrquences., *Cell biol.* **10**, 602-608.