

아가위 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)로 부터 HS 68세포의 MMP-1에 대한 저해활성 물질의 분리

이세영 · 안정희* · 전혁 · 조홍연

고려대학교 생명공학원

(2003년 1월 14일 접수, 2003년 2월 12일 수리)

피부노화는 크게 생리적 노화(chronological aging)와 광노화(photoaging)로 나누어 진다. 진피세포와 표피세포에서 광노화는 MMP(Matrix metalloproteinase)의 분비량이 증가하면서 MMP와 TIMP(Tissue inhibitors of metalloproteinase)의 균형을 깨뜨려 진피층을 붕괴가 유도된다. 본 연구는 광노화 및 암 전이 과정, 관절염 등 여러 질병에서 주목받고 있는 MMP-1의 생성 억제활성을 물질을 분리, 정제하고 정제물질의 일부 물리화학적 성질을 규명하였다. 표피세포(HaCaT)와 진피세포(HS68) 세포주를 이용하여 다양한 강도의 UVB를 조사하여 생성되는 MMP-1의 양과 감수성을 검토한 결과 HS68에서 UVB의 조사량에 비례하여 MMP 분비량이 증가되는 반면, HaCaT 세포의 MMP 분비량은 유의적 차이를 보이지 않았다. MMP-1 생성량이 가장 높은 UVB 조사량은 35 mJ/cm² 내외이었고, UVB조사 후 분비되는 MMP-1의 양은 36~48시간대에 가장 높게 나타났다. MMP-1의 생성 억제활성을 검색한 결과 아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge)의 냉수분획물(CP)에서 최대활성을 나타내었다. CP를 periodate 산화 처리에서는 변화가 없으나 pronase 처리시 활성이 감소되는 것으로 단백질이 활성의 본체임을 확인하였다. 정제는 CP의 ultrafiltration처리, DEAE-Toyopearl 650C, Butyl-Toyopearl 650M의 이온교환크로마토그래프와 Bio-Gel P-30 젤 여과 크로마토그래프 통해서 MMP-1 억제 활성 분획물 CP-2Va-2를 정제하였다. CP-2Va-2의 MMP-1억제활성은 88.5%이었으며, 분자량은 HPLC로 확인한 결과 19 kDa, SDS-PAGE에서는 20 kDa로 확인됨으로써 monomer구조임을 알 수 있었다.

Key words: 자외선B, HS 68 cell line, MMP-1 억제활성, 아가위

서 론

피부의 노화는 시간의 흐름에 따른 생리적 노화(chronological aging)과정과 외재적 요인에 의한 노화(extrinsic aging)과정으로 나누어 진다.¹⁾ 피부노화에 영향을 미치는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등에 의해서 노화가 일어나며 특히 자외선에 의한 노화를 광노화라고 한다. 태양광선은 크게 감마선, X선, 자외선, 가시광선, 적외선으로 나눌 수 있으며 이중 자외선(ultraviolet radiation, UV)은 파장에 따라 자외선 A(UVA, 320~400 nm), 자외선 B(UVB, 290~320 nm), 자외선 C(UVC, 200~290 nm)로 나뉘어 지며²⁾ 이중 자외선 B가 광노화의 주요 요인으로 보고되었다.³⁾

만성적 일광손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착(solar elastosis)과⁴⁾ proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것이다.⁵⁾ 일반적으로 진피층은 대다수의 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다.⁶⁾ 또한 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차

지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다.⁷⁾

MMP(matrix metalloproteinase)는 ECM(extracellular matrix, 세포외기질)과 BM(basement membrane, 기저막)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP(MT-MMP) 등 네개의 subfamily로 나누어진다.⁸⁾ MMP는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen)형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 α 2-macroglobulin이나 TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinase) 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다.⁹⁾ Fisher 등은 1회의 UV 조사에도 피부내의 MMP활성이 증가되어 피부내 콜라겐을 현저하게 붕괴시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.¹⁰⁾

생활의 질적향상과 물질의 풍요는 여성들의 미적 추구에 대한 욕구를 증가시켰으며 이에 따라 화장품 산업이 급속히 성장하였다. 최근 천연물 소재를 이용한 기능성 제품 있으나 아직 학문적 연구 결과는 미비하며 retinoic acid이 MMP-1 억제 활성이 있는 것으로 보고되었다.^{9,10)} 이에 천연물로부터 MMP-1 억제 활성을 보여주는 물질을 검색하였다. 본 연구에 사용된

*연락처

Phone: 82-2-3290-3428, Fax: 82-2-923-8733
E-mail: anjhee@hanmail.net

식물 아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge)는 능금나무과에 딸린 아가위나무의 열매로 산사, 적과자, 산과자, 찔광이, 질구배, 아가배 등의 다른 이름으로 불리기도 한다. 시고 단맛을 내며, 음식을 잘 소화되게 하고 혈압을 낮추는 작용을 한다고 알려져 있으며 있다. 또한 면, 채과 청량음료의 원료로도 이용되고 있다.¹¹⁾

본 연구는 진피세포인 HS68(normal human skin fibroblast)에 자외선 B 조사하여 120여종의 식용식물(edible plants)로부터 용매별로 추출한 분획을 반응시켜 MMP-1 생성을 억제 활성을 지닌 물질을 검색하였다. 그 중 높은 MMP-1 억제 활성을 보인 아가위의 냉수추출분획으로부터 억제활성물질을 분리 정제한 후 정제물질의 물리화학적 성질 및 기능성 화장품 소재로써의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약. 본 실험에 사용한 양념 채소류, 건강 채소류, 차·죽류용 식물 및 향신료는 서울시 소재 경동시장, 남대문 수입상가에서 원산지를 확인한 후 구입하였다. MMP-1의 생성 억제활성을 보인 아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge, 산지: 강원도 홍천)는 경동시장에서 구입하였다. MMP-1 antibody(monoclonal)는 Oncogene research products (MA, USA), Anti-mouse IgG, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), MTT(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide 등은 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을, 그 외의 시약은 시약 일급 또는 특급을 사용하였다. UVB lamp(Model XX-15B, medium wavelength: 312 nm)는 Spectronics Co.(NY, USA)로 사용하였다.

일반성분 분석. 전당은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법¹²⁾으로 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법¹³⁾으로 정량하였다.

HS68 human foreskin fibroblast cell line과 human keratinocyte인 HaCaT cell line 배양액 제조. 인체 진피섬유아 세포주(human foreskin fibroblast) HS68(CRL 1635)세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받았으며 인체 표피세포주인(normal human keratinocyte)인 HaCaT 세포는 독일의 Dr. Fusenig로부터 기증 받았다. 배지는 DMEM medium에 10% FBS, 0.5% antibiotics를 혼합하여 조제하였고, 배양은 37°C, 5% CO₂ incubator를 사용하였다.

UVB 조사 및 시료의 처리. HS68 cell line을 5 × 10⁴ cells/well의 농도로 12 well-plate에 배양, 약80%의 confluence에 도달할 때 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거시킨다. 새로운 serum free DMEM에 시료를 0.1 mg/ml의 농도로 침가하여 37°C CO₂, incubator에서 20시간 배양시켰다. 배양이 끝나면 PBS로 세척 후 cell에 PBS가 잡긴 상태에서 35 mJ/cm²의 dose로 48시간 UVB를 조사하였다. 대조구는 UVB를 조사시키지 않고 형광등 아래에서 동일한 시간을 방치하였다.

MMP-1 저해활성 측정(ELISA법). HS68세포와 HaCaT세포에 UVB를 조사한 후 48시간이 되었을 때 상징액인 배지를 취

하여 ELISA방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Immuno-well plate에 glutaraldehyde를 100 µl(10 µl/ml D.W)씩 well에 분주하여 37°C, 1시간 반응시킨 후 중류수로 well-plate를 세척하고 물기를 제거하였다. 상기의 배지상징액을 100 µl 분주하고 37°C, 1시간 반응시킨 후 MMP-1 antibody(mouse)를 1 : 1000으로 blocking solution(0.5% casein)에 희석하여 100 µl 씩 분주하고 37°C, 1시간 반응시켰다. Anti-mouse IgG peroxidase conjugated를 1 : 5000으로 blocking solution에 희석하여 37°C, 1시간 반응시킨 후 PBS에 녹인 0.1% Tween 20으로 세척하고 물기를 제거한 다음 기질[TMB 10 mg/ml DMSO, 3% H₂O₂, 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.1)]을 well당 200 µl 넣어 15 분간 빛을 차단한 채 반응시켰다. 1 M H₂SO₄ 50 µl를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader (Model 550, BIO-RAD Laboratories, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 MMP-1 생성 억제 활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

$$\text{Inhibitory activity of MMP-1 secretion (\%)} =$$

$$\left[\frac{1 - \frac{\text{As} - \text{Ab}}{\text{Ac} - \text{Ab}} } \right] \times 100$$

Ac: Mock irradiated medium의 흡광도

Ab: UVB를 조사하고 sample 처리하지 않은 medium의 흡광도

As: UVB를 조사하고 sample 처리한 medium의 흡광도

Cell viability의 측정. 배양이 완료된 상징액을 제거한 후 배지 volume의 10%에 해당하는 MTT(5 mg/ml in PBS)을 넣고 3시간 37°C에서 빛을 차단한 채 반응시킨 다음 형성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Screening시료의 조제. 120종의 식물 시료를 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 시료에 적당량의 중류수를 넣고 7,000 rpm에서 30분간 homogenizer(IKA Labotechnik Co. Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상징액을 동결건조하여 냉수추출물(Fr I)로 하였다. 침전물을 수분을 완전히 제거한 다음 methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III를 얻었다.

아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge)에서 MMP-1 억제활성 물질의 분리 정제. MMP-1 생성 억제에 높은 활성을 보인 아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge)에 대해 아래와 같이 추출 및 분리정제를 실시하였다. 즉 아가위 500 g을 100°C에서 5 분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 hand mixer로 마쇄한 후 시료의 10배의 중류수를 첨가하여 7,000 rpm에서 300분간 homogenize로 파쇄한 후 5,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상징액을 동결건조하여 냉수추출물(CP) 15 g를 얻었다. 이 CP 획분을 Prep/Scale-TFF Cartridges(Millipore, Bedford, USA) 및 10 kDa과 100 kDa regenerated cellulose cartridge(Millipore, Bedford, USA)를 이용하여 10 kDa~100 kDa의 물질(CP-2, 11 g)에서 활성획분을 얻었다. 이것을 중류수에 용해한 다음 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)

로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl⁻ form, 3.5×28.5 cm)에 흡착시킨 후 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 M NaCl 용액을 사용하여 6개의 획분(CP-2I, -II, -III, -IV, -V, -VI)을 얻었다. 이중에서 가장 높은 광노화 억제 활성 획분 CP-2V를 50% 포화 유안용액으로 평형화시킨 Butyl-Toyopearl 650 M column(1.6×30 cm)에 주입한 후 50→0% 포화유안 직선농도 구배를 사용하여 획분을 용출 시켰다. 먼저 50% 포화유안 용액으로 용출 시켜 비흡착획분인 CP-2Va(0.94 g)를 다시 pH 5.2 acetate buffer로 평형화 된 Bio-Rad P-30 column(3.0×91 cm)에서 0.3 mL/min의 유속으로 gel filtration chromatography를 실시하여 4개의 획분(CP-2Va-1, -2Va-2, -2Va-3, -2Va-4)에서 활성 획분은 CP-2Va-2으로 0.32 g을 얻었다.

정제단백질의 순도 및 분자량 측정. Gel filtration chromatography로부터 용출된 CP-2Va2의 순도와 분자량의 확인은 표준단백질(Bio-Rad)은 aprotinin(7.6 kDa), lysozyme(22 kDa), soybean trypsininhibitor(30.1 kDa), carbonic anhydrase (36.8 kDa), ovalbumin(52.3 kDa), bovine serum albumin(98 kDa), β-galactosidase(119 kDa)을 사용하여 측정하였고 HPLC의 조건은 280 nm UV detector, column은 Waters Protein-Pak 300SW(7.8×300 mm) mobile phase은 0.1 M NaCl, 0.02% sodium azide, 10 mM potassium phosphate buffer^o이고 Flow rate은 0.5 mL/min로 실시하였다. 또한 sodium dodecyl sulfate (SDS)/12% polyacrylamide gel 사용하였고 gel의 염색은 0.05% Coomassie Brilliant Blue R, 30% methanol, 10% acetic acid로 실시하였으며, 30% methanol, 10% acetic acid로 탈색하였다. 분자량과 subunit type은 King과 Laemmli법에¹⁴⁾ 준하였다.

MMP-1 억제 활성을 가진 정제단백질의 열안정성. 시료를 60, 70, 80°C에서 10분간과 30분간 가열처리한 후 억제활성의 증감여부를 측정하였다. 또한 Yamada 등의 방법¹²⁾에 따라 MMP-1억제활성의 본체를 확인하기 위해서 CP-2 획분을 pronase digestion과 periodate 산화처리를 각각 실시하였다.

결과 및 고찰

UVB조사량에 따른 HaCaT cell과 HS 68 cell의 MMP-1 분비량. 표피 세포주인 HaCaT 세포와 진피 섬유아 세포주인 HS-68 세포에서 UVB 조사량에 따른 MMP-1분비량과 세포 생존능을 측정한 결과(Fig. 1, 2) HaCaT 세포의 경우 자외선 B 조사량에 따른 MMP-1 분비량이 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 HS 68세포에서는 자외선 B가 30 mJ/cm² 증가하면 MMP-1 분비량이 유의적 증가를 보여주었고 35 mJ/cm² 이상에서는 분비량이 감소되는 것을 보여주었다. 또한 세포 생존능에서는 HS 68 세포는 자외선 B 30 mJ/cm² 조사한 군에서 45% 세포 생존능을 보여 주었고 UVB의 증가함에 따라 감소된 경향을 보여 주었다. 그러나 HS 68 세포는 UVB가 45 mJ/cm²까지 증가하여도 세포의 생존능이 85% 정도로 그다지 크게 감소 되지 않았다. Brenneisen 등은 인체 섬유아 세포주에서 자외선B 조사 후 MMP-1과 MMP-3의 mRNA level이 증가된 결과를 보고하였다.¹⁵⁾ 또한 Airola 등은 표피세포주인

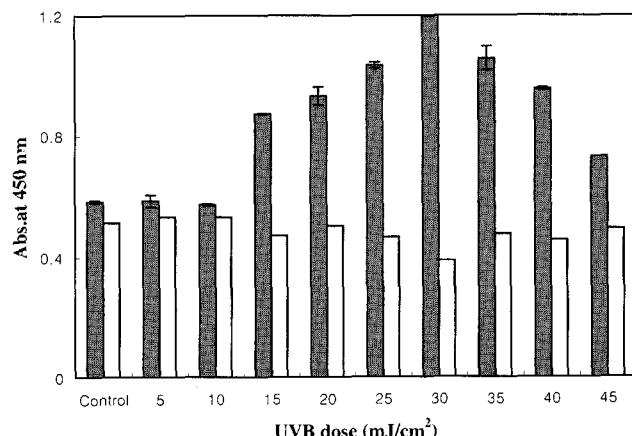


Fig. 1. MMP-1 activity of normal human fibroblast (HS68) and keratinocyte (HaCaT) at various UVB doses. Each assay was triplicated. Control: mock irradiated cells, □: MMP-1 secretion of HaCaT cell line, ■: MMP-1 secretion of HS68 cell line.

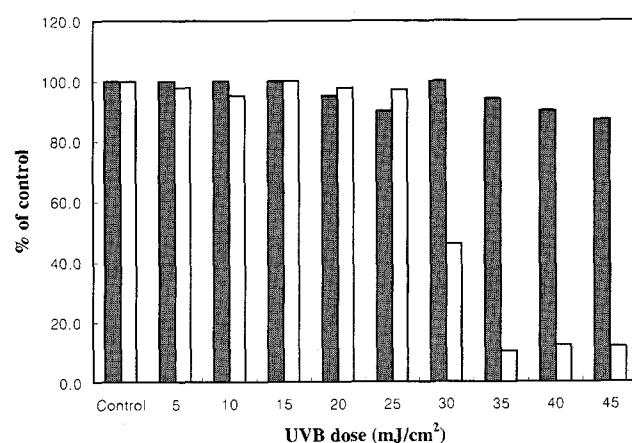


Fig. 2. Cell viability of normal human fibroblast (HS68) and keratinocyte (HaCaT) at various UVB doses. Cell viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Each assay was triplicated. Control: mock irradiated cells, □: Cell viability of HaCaT cell line, ■: Cell viability of HS68 cell line.

HaCaT 세포에서 자외선 B에 의해서 MMP-1 생성이 증가한다고 보고하였다.¹⁶⁾ 그러나 본 실험의 결과에서는 HaCaT cell 보다는 HS 68 cell에 MMP-1의 활성이 더 증가된 결과를 보였다. 따라서 진피 섬유 아세포인 HS 68 cell에 소량의 PBS가 첨가된 상태에서 35 mJ/cm²의 dose로 자외선 B 조사량을 결정하였다. 대조군은 자외선을 조사시키지 않고 형광등 아래에서 동일한 시간을 방치하였다.

UVB 조사 후 분비되는 MMP-1 양의 시간에 따른 변화량. UVB조사 후 뚜렷한 증가양상을 보여준 HS68 cells를 이용하여, 조사 후 어느 시간대에서 가장 많은 양의 MMP-1이 분비되는지를 검토하였다(Fig. 3). 조사 후 24시간부터 72시간이 경과 후 측정한 결과 36시간, 48시간에서 가장 높은 증가량을 보였다. T-test를 통해 유의적 차이를 검정해 본 결과 36시간과 48시간 사이의 유의적 차이는 없었다. Brenneisen 등은 자외선 B 조사 후 24시간에서 MMP-1 활성이 대조군에 비해서 4.8배 증가된 결과를 보여주었다.¹⁵⁾ 그러나 본 실험에서는 Bernegerg

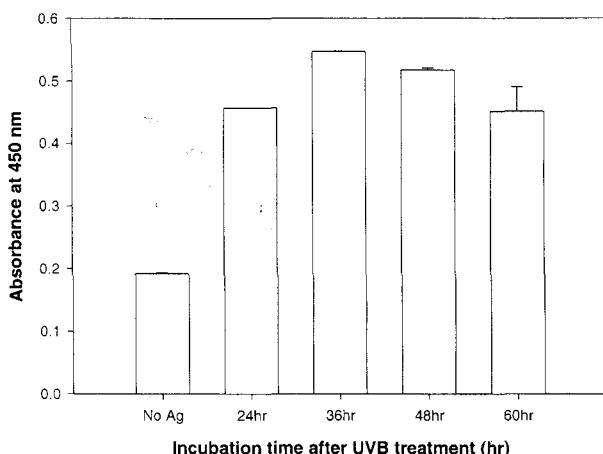


Fig. 3. Effect of MMP-1 secretion in HS68 cell line incubation time after UVB treatment. MMP-1 secretion was determined under assay conditions except for the incubation time. Each assay was triplicated No Ag: No antigen for negative control.

Table 1. Inhibitory effect of various plant on MMP-1

Scientific name	Inhibitory activity (%)*		
	Fr. I a	Fr. II b a	Fr. III c
Platycodon grandiflorum	55	34	43
Angelica gigas	21	43	41
Crataegus pinnatifida Bunge	73	30	52
Allium sativum fir. Pekinense	70	7	48
Dioscorea japonica	51	13	51

The concentration of each sample was 0.1 mg/ml

*: extracted with cold water.

: extracted with methanol.

: extracted with hot water.

동이 보고한 바 있는 가장 안정적인 시간인 48시간을 MMP-1의 측정시간으로 결정하였다.¹⁷⁾

식물로부터의 MMP-1생성 억제활성 물질의 검색. 피부의 광노화에 있어 핵심적인 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 생성 억제물질을 분리하고자 식용식물(edible plants)을 대상으로 MMP-1 생성 억제 활성을 검색한 결과 50% 내외의 높은 활성을 보인 추출물은 아가위(*Crataegus pinnatifida* Bunge), 마늘(*Allium sativum* L.), 녹두(*Phaseolus radiatus* L.) 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC.), 당귀(*Angelica gigas*) 등이었다(Table 1).

아가위로부터 MMP-1생성억제 활성물질의 정체. MMP-1 억제 활성이 가장 높았고 세포 독성이 없는 아가위의 냉수 추출물에서 활성 물질을 정체 하였다. 또한 아가위 냉수 추출물 분획(CP)을 pronase와 peroxidate 처리한 결과 MMP-1 억제 활성에 관여하는 것이 주로 단백질임을 확인할 수 있었다. 이에 아가위 냉수 분획(CP)으로부터 MMP-1억제활성을 지닌 단백질을 정체하고자 하였다.

CP획분을 분자량에 따라 prep-scale-ultrafiltration를 이용하여 분자량 10 kDa 이하(CP-1), 10~100 kDa(CP-2), 100 kDa(CP-3) 이상의 3개 획분으로 분획하였다. 시료를 0.1 mg/ml의 농도로 조제하여 MMP-1생성 억제활성을 측정한 결과 10~100 kDa의 분자량을 가지는 CP-2 분획이 60%로 억제활성이 가장 높았

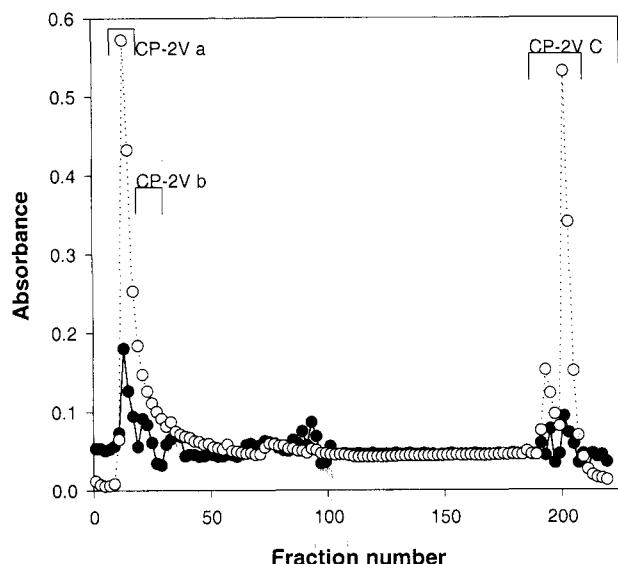


Fig. 4. Elution profile on Butyl-Toyopearl 650M column chromatography. After loading CP-2 fractions, Butyl-Toyopearl 650 M column was washed with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50% saturated ammonium sulfate and then eluted with linear gradient by 50%~0% saturated ammonium sulfate solution. ●: Carbohydrate at 490 nm, ○: UB Absorbance 280 nm.

고, 분자량 10 kDa 이하의 물질분획인 CP-1은 34.6%, CP-3는 42.9%의 활성을 보였다(Table 2). 따라서 아가위로부터 추출한 MMP-1생성억제 활성성분은 비교적 분자량이 큰 물질로 추정되었다. 냉수기용성 분획으로 얻어진 3개의 획분 중 활성이 가장 높았던 10~100 kDa에서 용출된 CP-2에 대하여 음이온 교환 수지인 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl⁻ form)를 이용하여 이온강도에 따라 분획한 결과 1 M NaCl에서 용출된 CP-2V 분획이 69.4%로 가장 활성이 높았으며, 0.75 M NaCl에서 용출된 CP-2-IV 분획과 2 M NaCl 분획은 0.1 mg/ml의 농도에서 각각 26%와 27.8%의 활성을 보였다(Table 2). 그 외의 분획에서는 억제활성이 미미하였다. 수율은 CP-2-II 분획이 36.3%로 가장 높았으며 활성이 높았던 CP-2V 분획은 8.7%의 수율을 보였다. 1 M NaCl의 높은 농도에서 용출된 획분이 높은 활성을 보임으로써 활성물질은 비교적 강한 이온성 물질임을 알 수 있었다. 가장 활성이 높았던 CP-2V를 Butyl-Toyopearl 650 M column을 사용하여 hydrophobic interaction chromatography (HIC)로 분획한 결과(Fig. 4) CP-2Va, -2Vb, -2Vc의 3개의 분획을 분리하였고 각 획분의 억제활성을 측정한 결과 HIC에 비흡착하여 50% 포화유안용액용액의 농도에서 용출된 CP-2-Va 가 MMP-1 억제활성이 84.3%로 가장 높았다. CP-2Vb는 38.1%, CP-2Vc는 11.7%의 활성을 나타냄으로써 CP-2-Va 획분은 친수성이 높은 물질임을 알 수 있었다(Table 2). Butyl-Toyopearl 650 M column에서 가장 활성이 높았던 CP-2V의 소수성 분획을 Bio-Gel P-30 column을 사용하여 gel permeation chromatography를 실시한 결과 4개의 분획(CP-2Va-1, -2Va-2, -2Va-3, -2Va-4)으로 분리되었으며 CP-2Va-2분획이 MMP-1 억제활성이 88.5%로 가장 높았다(Fig. 5).

Bio-Rad P-30을 사용하여 gel permeation column

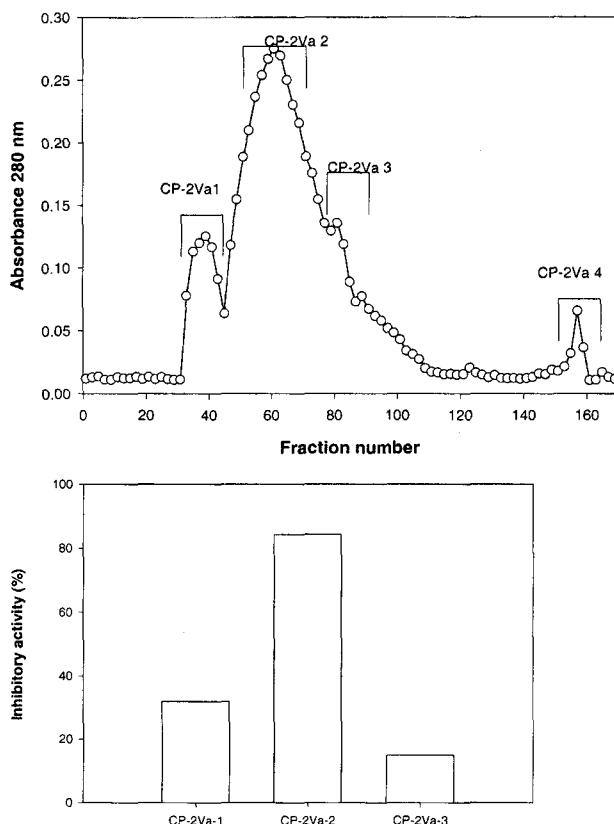


Fig. 5. Size exclusion chromatography and MMP-1 Inhibition activity of Bio-Gel P-30 fractions. CP-2Va was subjected on a column (1.2×94.4 cm) and eluted with pH 5.2 acetate buffer at a flow rate of 0.3 ml/min. Each fraction of 0.8 ml was collected ○: UB Absorbance 280 nm.

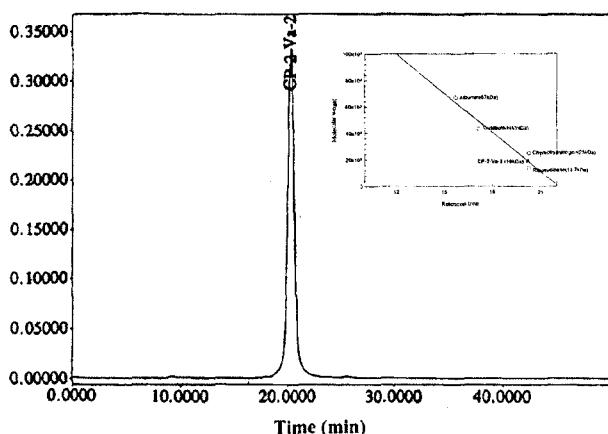


Fig. 6. HPLC chromatogram of CP-2Va-2. HPLC was performed on a Waters Model M680 equipped with Waters protein-pak 300SW column (7.8×300 mm) and tunable absorbance detector and the sample was eluted with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.2 M NaCl and 0.02% sodium azide.

chromatography로부터 얻은 CP-2Va-2는 단백질을 80% 이상 함유되고 있었으며 HPLC 결과 단일 피크로 나타났다. 분자량을 표준 단백질들과 비교 측정한 결과 정제단백질의 분자량은 약 19 kDa의 단백질로 판명되었다(Fig. 6). 또한 전기영동 결과 단일 band였고 표준단백질로 환산한 분자량은 20 kDa이었다.

Table 2. MMP-1 inhibition activity of subfractions obtained from CP on Ultrafiltration, DEAE-Toyopearl ion exchange column chromatography and Butyl-Toyopearl 650 M column chromatography

Sample	Dose mg/ml	Inhibition activity (%)	
Cold water extraction	CP	0.1	65.0
Ultrafiltration	CP-1	0.1	34.6
	CP-2	0.1	66.9
	CP-3	0.1	42.9
DEAE-Toyopearl ion exchange column chromatography	CP-2 I	0.1	21.5
	CP-2 II	0.1	5.0
	CP-2 III	0.1	4.0
	CP-2 VI	0.1	26.0
	CP-2 V	0.1	69.4
	CP-2 VI	0.1	27.8
Butyl-Toyopearl 650M column chromatography	CP-2Va	0.1	84.3
	CP-2Vb	0.1	38.1
	CP-2Vc	0.1	11.7

Table 3. Thermostability, pronase digestion and periodate treatment of CP-2 from *Crataegus pinnatifida* Bunge

Sample*	Time	Inhibitory activity (%)
CP-2		100
Pronase digestion		28.4
Periodate treatment		85.1
60°C	10 min	62
	30 min	45
70°C	10 min	10
	30 min	10
80°C	10 min	10
	30 min	8

*The concentration of each sample was 0.1 mg/ml.

정제단백질의 작용 특성. 최근 MMP-1 억제 활성을 가진 물질로 보고된 것으로는 retinoic acid와 triterpenoide 및 lectin 등이 보고 되었다.¹⁸⁾ 천연 물에 대한 MMP-1의 억제효과는 (2-macroglobulin이나 TIMPs 같은 저해제와 허브추출 물질들)¹⁹⁾ 보고되고 있다. 아가위의 냉수 추출물에서 단백질 활성 획분을 정제 하였으며 그 활성의 본체를 확인하기 위해서 pronase 와 periodate 처리 결과 pronase 처리시 MMP-1 억제 활성이 76% 감소되었으나 periodate 처리시 약 15%만이 감소되어 활성의 본체는 단백질임을 알 수 있었다. 또한 열에 대한 안정성을 확인한 결과 CP-2 획분은 60°C의 경우 대조군에 비해 10 분 처리시 약 48%, 30분 처리시 약 55% 활성이 감소하였으며, 온도가 상승함에 따라 Table 3에서 볼 수 있듯이 억제활성은 협저하게 감소함으로써 활성물질은 고온에서 안정하지 못한 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Claude, S., Manabu, K., Laura, M. and Lester, P. (1999) Antioxidants modulate accute solar ultraviolet radiation

- induced NF-Kappa-B activation on a human keratinocyte cell line. *Free radical Biol. & Med.* **26**, 174-183.
2. Fisher, G. J. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light *New Engl. J. Med.* **337**, 1419-1428.
 3. Kang, S., Fisher, G. J., Voorhees, J. J. (1997) Photoaging and topical tretinoin: therapy, pathogenesis, and prevention *Arch. Dermatol.* **133**, 1280-1284.
 4. Yaar M. and Gilchrest B. A. (1998) Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J. Investigig. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47-51.
 5. Li, J. J., Dong, Z., Dawson, M. I. and Colburn, N. H. (1996) Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transpress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Research* **56**, 483-496.
 6. Bailly, C., Dreze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapierre, C. M. and Darmon, M. (1990) Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 47-51.
 7. Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A. and Dong, Z. (1997) Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5826-5830.
 8. Fisher, G. L., Kang S. W. and Voorhees, J. J. (1998) Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by Ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **101**, 1432-1440.
 9. Fisher, G. J. and Voorhees J. J. (1999) Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem. Photobiol.* **69**, 154-157.
 10. Lee, K. S., Kim, S. J., Ryoo, Y. W. and Kim, B. C. (1998) All-trans-retinoic acid down-regulates elastin promoter activity elevated by ultraviolet B irradiation in cultured skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 182-189.
 11. Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim, S. U. (1999) Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**, 261-3.
 12. Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Yamada, H. (1989) Relationship between structure and activity of anti-complementary arabinogalactan from the roots of Angelica acutiloba Kitagawa. *Carbohydr. Res.* **193**, 193-200.
 13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
 14. Laemmli, K. U. (1970) Cleavage of structure protein during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 15. Brenneisen, P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci.* **973**, 31-43.
 16. Airola, K. and Fusenig, N. E. (2001) Differential stromal regulation of MMP-1 expression in benign and malignant keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 85-92.
 17. Berneburg, M., Plettenberg, H. and Krutmann, J. (2000) Photoaging of human skin Photodermatol. *Photoimmunol. Photomed.* **16**, 239-244.
 18. Mix, K. S., Mengshol, J. A., Benbow, U., Vincenti, M. P. and Sporn, M. B. (2001) Brinckerhoff CE.A synthetic triterpenoid selectively inhibits the induction of matrix metalloproteinases 1 and 13 by inflammatory cytokines. *Arthritis Rheum* **44**, 1096-1104.
 19. Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A. and Kitajima, M. (2001) The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **92**, 1322-1328.

Isolation and Characterization of MMP-1 Inhibitor Peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in Fibroblast Cell Line HS68 Cells

Se-Young Lee, Jeung-Hee An*, Hyug Chun and Hong-Yun Cho (Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract: MMP-1 inhibitory compounds were isolated from 120 Korean traditional edible plants. MMP-1 activity significantly increased linearly with increasing UVB dose in normal human foreskin fibroblast HS68 cell, showing maximum activity at approximately 35 mJ/cm², whereas in HaCaT cell, normal human keratinocyte, no increase was observed. Maximum secretion of MMP-1 after UVB treatment occurred around 36-48 hr after treatment. MMP-1 inhibitory compound isolated from cold-water fraction of *Crataegus pinnatifida* Bunge showed the most potent activity. The MMP-1 inhibitory compound was deduced as a peptide based on the fact that pronase digestion decreased the activity whereas periodate oxidation did not. The most potent MMP-1-inhibitory protein, CP-2Va-2, showing an activity of 88.5% against MMP-1, was isolated through sequential column chromatography on DEAE-Toyopearl 650C, Butyl-Toyopearl 650M, and Bio-Gel P-30. Molecular weight of CP-2Va-2 determined through high performance liquid chromatography and SDS PAGE was 19 and 20 kDa. respectively, signifying a monomeric structure.

Key words: UVB, HS68 Cells, MMP-1 inhibitory activity, *Crataegus pinnatifida* Bunge

*Corresponding author