

# 木瓜, 虎杖根 및 乳香 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 MMP-9 의 활성화에 미치는 영향

이태진 · 김연희 · 서성일<sup>1</sup> · 신상우<sup>2</sup> · 김상찬<sup>2</sup> · 권영규<sup>2</sup> · 박종욱 · 권택규\*

계명대학교 의과대학 면역학교실, 1: 계명대학교 의과대학 미생물학교실, 2: 대구한의대학교 한의과대학

## Effects of Water Extracts from *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum* and *Boswellia carterii* on LPS-Induced MMP-9 Activation in Raw 264.7 Cell

Tae Jin Lee, Yeoun Hee Kim, Seong Il Shu<sup>1</sup>, Sang Woo Shin<sup>2</sup>, Sang Chan Kim<sup>2</sup>, Young Kyu Kwon<sup>2</sup>, Jong-Wook Park, Taeg Kyu Kwon\*

Department of Immunology, College of Medicine, Keimyung University.

1: Department of Microbiology, College of Medicine, Keimyung University, 2: College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is considered to be an important component in the progression of inflammation. Monocytes/macrophages are prominent at inflammation sites, and activation of these cells by stimulants such as lipopolysaccharide (LPS) leads to the production of significant amounts of MMP-9. Here, we show that LPS-induced MMP-9 production and activation was inhibited by the water extract from the fruit of *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC), but increased by the extract from *Boswellia carterii* (BC). To investigate the mechanism by which those extracts inhibits MMP-9 activation, we examined the level of MMP-9 mRNA expression. We observed a significant change in the MMP-9 expression between LPS alone and LPS plus *Chaenomeles sinensis* and *Polygonum cuspidatum* extracts-treated cells. In addition, LPS significantly up-regulated MMP-9 promoter activity in Raw 264.7 cells, which was attenuated by the CS and PS extracts. However, water extracts from *Boswellia carterii* increased MMP-9 expression and MMP-9 promoter activity which were induced by LPS treatment in Raw 264.7 cells. These data suggest that water extracts from *Chaenomeles sinensis* and *Polygonum cuspidatum* can modulate anti-inflammatory immune response, which may be in part associated with the regulation of MMP-9 production and/or activation through the regulation of MMP-9 expression in mouse macrophage cells.

Key words : *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum*, *Boswellia carterii*, MMP-9

### 서 론

Macrophage(대식세포)는 자연면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하고, 염증반응 시에는 reactive oxygen species (활성산소종)와 interleukin-1b (IL-1b), tumor necrosis factor (TNF-a) 및 interleukin-6 (IL-6)와 같은 사이토카인을 생산하여

\* 교신저자 : 권택규, 대구시 중구 동산동 194번지 계명대학교 의과대학

· E-mail : kwontk@dsmc.or.kr. · Tel : 053-250-7846

· 접수 : 2006/01/09 · 수정 : 2006/01/31 · 채택 : 2006/02/08

감염초기의 반응에 관여하는 세포로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해 시킬 때 생성되는 IL-1b, TNF-a 및 nitric oxide (NO)는 숙주에 systemic 한 damage를 유발하는 것으로 보고 되었다<sup>3-5</sup>.

대식세포는 외부의 지속적인 염증반응 유발인자들에 의해 활성화되어 결합조직 (connective tissue)의 분해를 촉진하여 관절염 (arthritis), 동맥경화증 (atherosclerosis) 등과 같은 만성 염증 반응을 유발하는 세포이다. 대식세포가 혈관으로부터 기저막을 관통해 다른 조직으로 이동하는데 matrix를 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 분비가 필요하다<sup>6</sup>. MMP는 관절

염 및 압의 진행 등과 같은 다양한 생리적 또는 병리적인 상태에서 조직의 재구성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. MMP는 기질특이성과 구조적 유사성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysins, membrane type MMP 등과 같이 4그룹으로 분류 된다<sup>9)</sup>. MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa type IV collagenase)은 상피 및 기질을 구분하는 type IV collagen을 함유하고 있는 기저막의 파괴를 촉진하여 만성 염증 및 암세포의 침투등과 같은 과정에서 세포의 이동에 관여하는 중요한 역할을 한다<sup>10)</sup>. 또한 MMP는 섬유아세포(fibroblasts), 내피세포(endothelial cells) 및 상피세포(epithelial cells) 등과 같은 구조세포(structural cell) 뿐만 아니라 대식세포, 림프구 세포, 호중성백혈구(Neutrophils), 호산구(eosinophils) 등과 같은 염증반응에 관여하는 세포로부터 생성 된다<sup>11)</sup>.

대식세포를 그람음성균의 세포별 성분 중 일부인 LPS (lipopolysacchride)로 자극을 하면 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) 및 MMP-9의 생성 및 분비를 촉진시킨다. 이러한 과정에서 생성된 MMP-9은 세포막의 기저성분인 laminin 과 type IV collagen을 분해하여 결합조직의 손상을 유발하는데 이러한 손상은 천식(asthma), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 만성 폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 및 암의 진행과 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다<sup>12)</sup>.

이에 본 연구에서는 清熱藥, 祛風濕藥, 活血祛瘀藥으로 분류되는 상용한약재들을 대상으로, 만성염증반응에 의한 손상으로 유발되는 천식, 폐섬유증, 만성폐쇄성폐질환, 암의 진행에 관여하는 MMP-9의 활성을 억제하는 한약재들을 검색하여 이들 만성염증반응에 의해 유발되는 질환들을 예방 또는 치료하는데 도움이 되는 새로운 치료제를 찾고자 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

본 연구에 사용한 木瓜, 虎杖根 및 乳香을 포함한 한약재들은 대구한의대학교 附屬 韓方病院에서 구입하였고, 良質의 것을 精選하여 열수 추출한 후 상층액만을 취하여 0.2 um filter (Nalgen, New York, USA)로 여과하였다. 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용할 때까지 -20 °C에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 시약

LPS (E.coli 026:B6, Difco, Detroit, MI, USA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotics는 Gibco-BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

### 3. 세포주 배양

마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포주를 ATCC (Livingstone, MT, USA)로부터 분양받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100

mg/ml streptomycin을 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다. 20 passage를 넘기지 않은 세포만 실험에 사용하였다.

### 4. Zymography

MMP-9의 활성을 측정하기 위해서 Zymography 방법을 이용하였다. 방법을 간단하게 설명하면 아래와 같다. Raw 264.7 세포를 6 well plate에 seeding한 후 serum이 없는 상태에서 drug을 처리하여 세포 배양액을 수확하였다. 세포배양액 20 ml를 1mg/ml gelatin이 함유된 SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gels로 전기영동한 후 2.5% Triton X-100 으로 SDS를 제거하였다. Developng solution (5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>)으로 gel을 24-48 시간동안 반응시킨 후 0.25% Coomassie blue로 염색하고 acetic acid 와 methanol로 destaining 하였다. MMP-9의 proteolytic activity는 gelatin이 분해 되어 투명한 band의 세기를 비교하여 측정하였다.

### 5. Immunoblot analysis

1.5 × 10<sup>6</sup> Raw 264.7 세포에 lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS [4-morpholinepropane-sulfonic acid], 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mM leupeptin, adjusted to pH 7.2)를 첨가하여 세포를 lysis 시켰다. Cell lysate를 10,000 × g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. 단백질을 전기영동한 후 Immobilon-P membranes으로 transfer 하였다. 단백질의 검출은 ECL Western blotting kit (Amersham, USA) 를 사용하여 검출하였다.

### 6. Luciferase Gene Assays

5 × 10<sup>5</sup> Raw 264.7 세포를 6 well plate에 배양한 후 1 mg pGL2B-MMP-9 plasmid와 1 mg pCMV-b-galactosidase plasmid를 함께 transfection 하였다. Transfection 후 정해진 시간동안 drug을 처리한 다음 위에서 설명한 바와 같이 cell lysate를 분리하여 luciferase 활성 및 b-galactosidase 활성을 측정하여 transfection 효율을 계산하여 luciferase 활성값을 normalization 하였다. MMP-9의 luciferase plasmid는 본 연구실에서 제작한 0.7kb 5'-flanking region이 cloning된 pGL-2B-MMP-9를 사용하였다.

### 7. RNA 분리 및 RT-PCR

RNA 분리는 TRIzol를 이용하여 분리하였다. 간단하게 설명하면, 대식세포에서 RNA를 분리하기위해서 0.1% DEPC가 함유된 PBS로 세척한 후 TRIzol를 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 여기에 클로로포름을 첨가한 다음 원심분리하여 상층액을 수확하고, isopropanol을 이용하여 RNA를 침강시킨 후 건조하여 RNA를 분리하였다. 5x RT buffer 2 ml, 10mM dNTP 1 ml, MMLV reverse transcriptase (200 U/ml, (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 0.25 ml, RNase inhibitor 0.25 ml, 50 mM oligo dT primer 0.5 ml, DEPC-water 4 ml를 PCR tube에 넣어 RT mixture를 만들고 여기에 total RNA 2 mg를 첨가한 후 42

℃에서 1시간동안 cDNA 합성을 수행하였다. 증폭된 PCR산물은 1.2% agarosegel에서 전기 영동하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열은 아래와 같다. MMP-9 sense: 5'-CCATGAGTCCCTGGCAG-3', antisense: 5'-AGTATGGATGTTATGATG-3'; TIMP1 sense: 5'-CTTTCATCTCTGGCATCTGG-3', antisense: 5'-AAGTAGACAGTGTTCAGGC-3'; GAPDH sense: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3', antisense: 5'-GGTAGAACACGGAAGGCCA-3'

## 결과 및 고찰

### 1. Raw 264.7 세포에서 LPS 처리에 의한 MMP-9 활성화를 억제하는 한약재의 검색

대식세포에 의한 MMP-9의 생성은 대식세포의 면역기능 및 골수세포에서 염증반응이 일어난 조직으로의 이동에 중요한 역할을 한다. 그러나, MMP-9이 과발현되면 관절염이나 septic shock를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 조직에 존재하는 MMP는 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)와 균형을 맞추어 존재하며, MMP와 TIMP 사이의 균형이 파괴되면 암과 관절염 등과 같은 임상적인 현상이 나타난다<sup>14)</sup>. 최근에 알려진 바로는 MMP의 발현 또는 활성화와 TIMP의 발현이 상호간에 반대적으로 나타나지 않는다는 보고가 있다<sup>15)</sup>. 즉 MMP-9의 활성이 증가하기 위해서 반드시 TIMP의 발현이 감소해야 된다는 것을 의미하지는 않는다. 최근에 들어서 암의 침윤뿐만 아니라 만성염증 질환에 관여하는 MMP 저해제를 탐색하는 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서도 마우스의 대식세포를 대상으로 기존에 MMP-9의 활성을 증가시킨다고 보고 되어 있는 LPS에 의한 MMP-9의 활성을 억제시키는 MMP-9의 저해제를 검색하고자 실험을 진행하였다. 본 연구에서는 MMP-9을 LPS로 유도 및 활성화 시킨 후 MMP-9의 활성을 억제하는 한약재를 검색하였다. 먼저 Raw 264.7 마우스 대식세포에 각종 열수 추출한 한약재를 전처리한 후 50 ng/ml LPS를 24시간 동안 처리하여 배양액을 수확하여 MMP-9의 활성을 분석하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성은 모과 및 호장근에 의해서 감소되었지만, 흥미롭게도 유향은 오히려 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 활성을 오히려 증가시켰다.

### 2. 木瓜, 虎杖根 및 乳香의 농도별 MMP-9의 활성억제

다음으로 한약재의 농도에 따른 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 활성화에 대한 영향을 조사하였다. 모과는 40 mg/ml 부터 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 억제하였으며, 호장근은 10 mg/ml부터 MMP-9의 활성을 억제하는 것으로 보아 호장근에서 추출된 성분이 모과에서 추출된 성분 보다 낮은 농도에서 효과적으로 MMP-9의 활성을 억제하였다. 모과 및 호장근은 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 유향은 Fig. 1에서 관찰한 바와 같이 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 오히려 증가시켰고

이러한 현상은 농도가 증가하면서 더욱 뚜렷하게 관찰할 수가 있었다(Fig. 2).

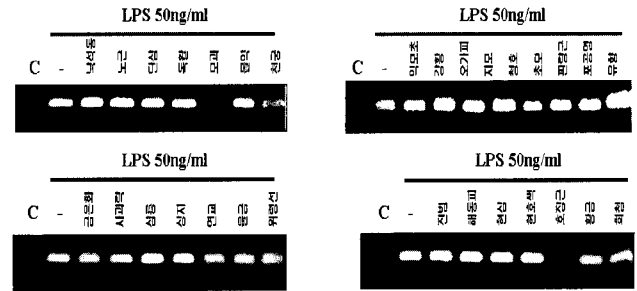


Fig. 1. Effect of water extracts from several plant on MMP-9 activity in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were grown to 70% confluence in DMEM supplemented with 10% FBS and the medium was changed to serum-free medium. Raw 264.7 cells were treated with 80 mg/ml water extracts for 1 hr prior to the addition of LPS (50 ng/ml) and cells were further incubated for 24 hr. Control cell were incubated with vehicle alone. Medium was collected for zymography to detect MMP-9 activity.

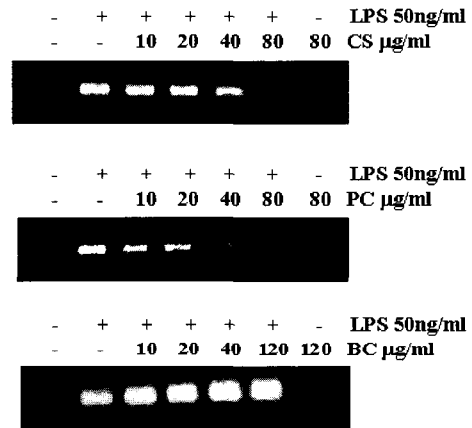


Fig. 2. Inhibition of MMP-9 activity by water extracts from the fruit of *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC), and *Boswellia carterii* (BC) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were grown to 70% confluence in DMEM supplemented with 10% FBS and the medium was changed to serum-free medium. Cells were exposed to *Chaenomeles sinensis* (CS) (A), *Polygonum cuspidatum* (PC) (B), and *Boswellia carterii* (BC) (C) with the indicated concentration of water extracts for 24 hr and then culture supernatants were analyzed zymographically for the MMP activities.

### 3. LPS 처리로 유도된 MMP-9의 발현에 미치는 영향

모과 및 호장근에 의한 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성 저해가 MMP-9의 발현과 관련이 있는지를 조사하기 위해 Raw 264.7 세포에서 RNA를 분리하여 MMP-9 및 TIMP1의 mRNA 발현에 관여하는 TIMP1의 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 50 ng/ml LPS를 처리하였을 경우 MMP-9 및 TIMP1의 mRNA 발현이 유도되었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 모과를 농도별로 전처리 하였을 경우 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 발현이 억제되었으며, 특히 40 mg/ml 이상의 농도에서 MMP-9의 발현을 강하게 억제하는 것을 관찰할 수가 있었다. 또한 TIMP1의 발현도 LPS의 처리에 의해 증가되었고 모과의 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3A). 이 결과로 보아 모과는 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 억제하는 기전으로는 부분적으로

는 MMP-9의 mRNA 발현을 억제하는 전사단계에 작용하리라는 것을 알 수 있었다. 호장근도 위에서 언급한 모과와 비슷한 결과를 관찰 할 수 있었다. 모과보다 비교적인 낮은 농도인 20 mg/ml부터 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 발현이 억제되었다 (Fig. 3B). 모과 및 호장근 등과는 달리 유항은 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 증가시켰는데 이러한 현상이 MMP-9의 발현과 관련이 있는지를 조사하였다. Fig. 3C에서 보는바와 같이 유항은 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 Fig. 2의 Zymography 결과와 유사하였다. Fig. 2와 Fig. 3의 결과들을 종합하여 볼 때, 모과 및 호장근에 의해 유도된 MMP-9의 활성 감소 또는 유항에 의해 증가된 MMP-9의 활성 등은 MMP-9의 mRNA의 발현과 깊은 관련성이 있음을 알 수 있었다. 반면에 MMP-9의 활성을 억제한다고 보고된 TIMP1의 발현은 모과, 호장근 및 유항 등에 의한 MMP-9의 활성조절과는 크게 관련이 없는 것으로 관찰되었다.

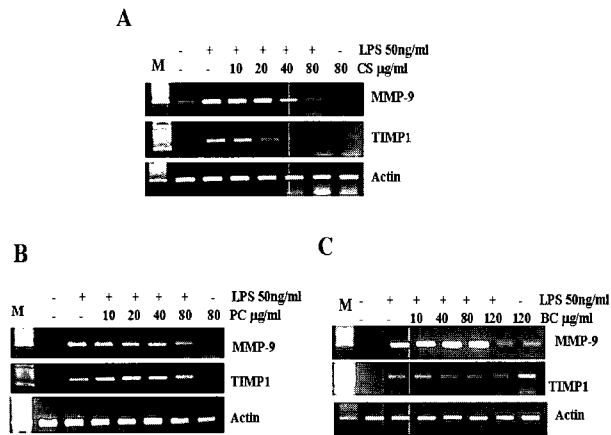


Fig. 3. Effect of water extract from *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC), and *Boswellia carterii* (BC) on LPS-induced MMP-9 and TIMP1 mRNA expression. Raw 264.7 cells pretreated with indicated concentrations of CS, PC and BC before incubation with LPS for 24 hr. Total RNA was prepared and RT-PCR analysis was performed as described in Materials and Methods. (A) *Chaenomeles sinensis* (CS), (B) the root of *Polygonum cuspidatum* (PC), and (C) *Boswellia carterii* (BC)

#### 4. 모과 및 호장근에 의한 LPS에 의해 활성화된 MMP-9의 발현 억제 기전 규명

모과 및 호장근에 의한 MMP-9의 발현억제기전을 규명하기 위해서 전사의 시작에 관련된 promoter의 활성을 측정하는 방법인 luciferase의 활성을 측정하였다. Raw 264.7 세포에 MMP-9 luciferase reporter plasmid를 transfection 한 후 모과 및 호장근을 농도별로 전처리하고 50 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 24 시간 경과 후 세포를 수확하여 luciferase 활성을 측정 한 결과 LPS 단독처리에 의해 대조군에 비해 luciferase 활성이 3배 정도 증가하였고 이러한 증가는 모과 및 호장근의 농도가 증가하면서 luciferase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 MMP-9의 활성을 억제하는 모과 및 호장근의 어떠한 성분이 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 활성을 억제하는

지 또한 어떠한 기전을 통해 억제하는지는 연구가 더 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

木瓜는 모과나무(*Chaenomeles sinensis*)의 성숙한 과실로, 性味는 辛溫하고 肝脾로 歸經하여 舒筋活絡, 和胃化濕하는 효능으로 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 脚氣腫痛을 치료하는 要藥으로 사용되는데<sup>16</sup>, 그 화학성분으로는 정유성분, flavonoid, proanthocyanidin, tannin, 산성 triterpene 등이 보고 되어 있다<sup>17,18</sup>. 이 중 산성 triterpene은 NF-κB의 활성을 억제하여 MMP-9의 활성을 억제한다고 보고 되었다<sup>19</sup>.

虎杖根은 虎杖 (*Polygonum cuspidatum*)의 根莖과 根으로, 性味는 苦微寒하고 肝膽肺로 歸經하여 活血祛瘀, 祛風利濕하는 효능으로 風濕痺痛, 跌打損傷 등에 常用되어 왔는데<sup>16</sup>, resveratrol, lignan sulfate, decursin, piceid, emodin 등 중요한 생리활성을 지닌 물질이 함유되어 있음이 밝혀졌다<sup>20-23</sup>. 지금까지 알려진 바로는 호장근에 존재하는 성분중 MMP-9의 활성을 조절하는 것으로는 resveratrol<sup>24</sup>, emodin<sup>25</sup> 등이 알려져 있다.

乳香은 유항나무 (*Boswellia carterii*)의 樹脂로서, 性味는 辛苦溫하고 心肝脾에 歸經하여 活血止痛, 消腫生肌의 효능으로 心腹疼痛, 產後瘀血刺痛 등에 이용되어 왔는데<sup>16</sup>, 박<sup>26</sup> 등에 의하면 혈액압세포에서 항암효과가 있음이 보고 되었으며, 주성분은 수지(樹脂), α-β-보스웰산 (boswellic acids), 오리바노라진, 아라비산 등이 보고 되었다. 그러나 유항의 성분과 MMP-9의 활성과의 상관관계를 연구한 결과는 접하지 못하였다.

지금까지 알려진 MMP-9의 promoter에 존재하는 전사조절 인자 부착 부위는 AP-1, NF-κB, Sp1등이 알려져 있다<sup>27,28</sup>. 이들 전사조절 인자 중 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 증가는 NF-κB와 깊은 관련이 있다는 보고가 있다<sup>29</sup>. 추후 NF-κB luciferase reporter system을 이용한 실험을 통해 모과, 호장근 및 유항 등이 NF-κB의 promoter 활성에 영향을 주어 LPS에 의한 COX-2의 발현을 조절하는지 아니면 AP-1, Sp1등과 같은 다른 전사조절인자를 통해 iNOS의 발현을 조절하는지 검정해야 될 것으로 생각된다.

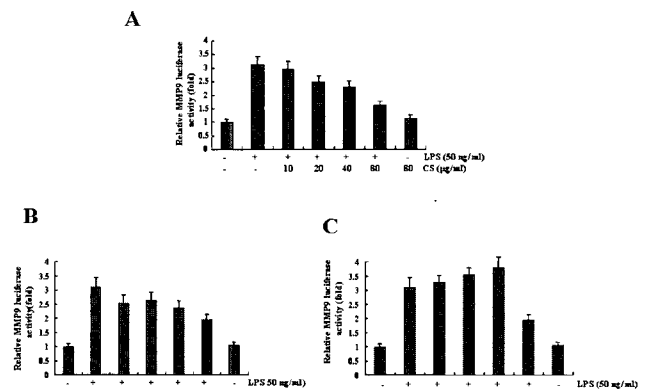


Fig. 4. Effect of water extract from *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC), and *Boswellia carterii* (BC) on LPS-induced MMP-9 promoter activity. To elucidate the effects of water extracts from CS, PC, and BC, MMP-9 promoter plasmid was transfected. Raw 264.7 cells were treated with or without varying concentration of CS (A), PC (B), and BC (C) in the presence of 50 ng/ml LPS. Luciferase activity was measured. Data represents means ± S.D. of at least three independent experiments.

## 결 론

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)은 염증반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 대식세포는 염증부위에 많이 존재하며, LPS 등과 같은 자극원에 의해 활성화된 대식세포 MMP-9의 합성을 유도한다. 본 연구에서는 清熱藥, 祛風濕藥, 活血祛瘀藥으로 분류되는 상용한약재 30종의 열수 추출물 중에서 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등이 LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 활성을 저해 또는 증진시키는 것을 관찰하였다. 모과, 호장근 및 유향 등에서 열수 추출 산물이 어떠한 기전을 통해서 LPS로 유도된 MMP-9의 활성 및 발현을 억제 또는 증진시키는지를 조사하였다. 먼저 MMP-9의 활성을 조사한 결과 모과 및 호장근에서 추출된 산물의 농도가 증가함에 따라 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성이 저해되는 것을 관찰 하였다. 이러한 MMP-9의 활성의 감소기전을 조사하기 위해 RT-PCR과 luciferase assay를 분석한 결과 MMP-9의 mRNA의 감소 및 MMP-9 promoter 활성의 감소를 관찰하였다. 반면에 유향은 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 오히려 증가시켰고, 이러한 MMP-9의 활성 증가는 MMP-9 mRNA 발현 및 promoter 활성의 증가와 관련이 있음을 관찰하였다. 이와 같은 결과를 종합하면, 마우스의 대식세포에서 모과 및 호장근에서 열수 추출된 산물은 LPS에 의해 유발되는 항염증반응을 조절할 수 있으며, 이러한 반응은 부분적으로 MMP-9의 생성 또는 활성의 조절과 관련이 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

## 참고문헌

- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol.* 144(4):1425-1431, 1990.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-350, 1997.
- Cetkovic-Cvrlje, M., Eizirik, D.L. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 6(4):399-406, 1994.
- MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N., et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 81(4):641-650, 1995.
- Liu, R.H., Hotchkiss, J.H. Potential genotoxicity of chronically

- elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res.* 339(2):73-89, 1995.
- Watanabe, H., Nakanishi, I., Yamashita, K., Hayakawa, T., Okada, Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci.* 104 (Pt4):991-999, 1993.
- Cheon, H., Yu, S.J., Yoo, D.H., Chae, I.J., Song, G.G., Sohn, J. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol.* 127(3):547-552, 2002.
- Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Kahari, V.M., Pyyrinen, S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 97(4):432-438, 2002.
- Parsons, S.L., Watson, S.A., Brown, P.D., Collins, H.M., Steele, R.J. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg.* 84(2):160-166, 1997.
- McMillan, J.I., Weeks, R., West, J.W., Bursten, S., Rice, G.C., Lovett, D.H. Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion. *Int J Cancer.* 67(4):523-531, 1996.
- Visse, R., Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92(8):827-839, 2003.
- Woo, C.H., Lim, J.H., Kim, J.H. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol.* 173(11):6973-6980, 2004.
- Kishnani, N.S., Tabrizi-Fard, M.A., Fung, H.L. Diethyldithiocarbamate prolongs survival of mice in a lipopolysaccharide-induced endotoxic shock model: evidence for multiple mechanisms. *Shock.* 11(4):264-268, 1999.
- Douglas, D.A., Shi, Y.E., Sang, Q.A. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Protein Chem.* 16(4):237-255, 1997.
- Kallakury, B.V., Karikhalli, S., Haholu, A., Sheehan, C.E., Azumi, N., Ross, J.S. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 7(10):3113-3119, 2001.
- 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 永林社, 서울, pp 272-273, 420-421, 410-411, 2003.
- Lee, M.H., Han, Y.N. A new in vitro tissue factor inhibitory triterpene from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Planta Med.* 69(4):327-331, 2003.
- Hamazu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., Omanyuda, M.

- Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocarya sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *J Agric Food Chem.* 53(4):928-934, 2005.
19. Takada, Y., Aggarwal, B.B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Immunol.* 171(6):3278-3286, 2003.
  20. Chen, L., Han, Y., Yang, F., Zhang, T. High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum*. *J Chromatogr A.* 907(1-2):343-346, 2001.
  21. Yang, F., Zhang, T., Ito, Y. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 919(2):443-448, 2001.
  22. Jayasuriya, H., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., McLaughlin, J.L., Chang, C.J. Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *J Nat Prod.* 55(5):696-698, 1992.
  23. Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y., Bai, D., Zhong, D. Constituents from *Polygonum cuspidatum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 50(5):605-608, 2002.
  24. Woo, J.H., Lim, J.H., Kim, Y.H., Suh, S.I., Min do, S., Chang, J.S., Lee, Y.H., Park, J.W., Kwon, T.K. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene.* 23(10):1845-1853, 2004.
  25. Kim, M.S., Park, M.J., Kim, S.J., Lee, C.H., Yoo, H., Shin, S.H., Song, E.S., Lee, S.H. Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells. *Int J Oncol.* 27(3):839-846, 2005.
  26. 박래길, 오광록, 이광규, 문연자, 김정훈, 우원홍, 유향주출물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸 유도효과. *약학회지* 45(2):161-168, 2001.
  27. Sato, H., Seiki, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene.* 8:395-405, 1993.
  28. Woo, J.H., Park, J.W., Lee, S.H., Kim, Y.H., Lee, I.K., Gabrielson, E., Lee, S.H., Lee, H.J., Kho, Y.H., Kwon, T.K. Dykellic acid inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting nuclear factor kappa B transcriptional activity. *Cancer Res.* 63(12):3430-3434, 2003.
  29. Lu, Y., Wahl, L.M. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKKalpha/NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol.* 78(1):259-265, 2005.