

## 헛개나무내의 Matrix Metalloproteinase-9 활성 억제제에 관한 연구

김은호\* · 이광수<sup>1</sup>

국립과학수사연구원 법과학부 화학분석과, <sup>1</sup>장안대학교 건강과학부 식품영양과  
(2011. 2. 9. 접수, 2011. 2. 25. 승인)

### A study of matrix metalloproteinase-9 inhibitor in *Hovenia dulcis Thunberg*

Eun-Ho Kim\* and Kwang-Soo Lee<sup>1</sup>

Chemical Analysis Division, National Forensic Service, Seoul, 158-707, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food & Nutrition, Jangan University, Kyenggido, 445-756, Korea  
(Received February 9, 2011; Accepted February 25, 2011)

**요 약:** 세포의 기질의 주요 단백질 구성요소들을 가수분해시켜 재편성(turnover)과 재형성(remodeling)에 핵심 역할을 하는 효소가 matrix metalloproteinases (MMPs)이다. MMPs 중에서 MMP-2와 MMP-9는 catalytic domain이 fibronectin-like domain에 의해 hemopexin-like domain 부위와 떨어져 있는 점이 다른 MMP들과 다르다. MMP-9 억제제의 개발로 간암전이를 막을 수 있다고 보고되고 있다. *Hovenia dulcis Thunberg*에서 MMP-9의 활성을 저해하는 물질을 분리 정제하였고, 분리된 물질에 대한 MMP-9의 활성 억제 여부를 확인하였다. Ethyl acetate (EA)에 의해 용출 분리된 두개의 화합물(화합물 A, 화합물 B)과 MeOH로 용출 분리된 한 개의 화합물(화합물 C)에서 MMP-9의 활성에 저해를 보였고, <sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C NMR, GC-MS 그리고 IR로 이들의 구조를 분석하였다. 화합물 A는 hydroxyl기와 methoxyl기로 치환된 벤젠고리를 함유하는 화합물로 catechine 계열로 추정되었으며, 화합물 B와 C는 hydroxyl기와 methoxyl기로 치환된 벤젠 고리와 분자내 carbonyl기를 갖고 있는 nobiletin 계열의 화합물로 추정되었다. 그리고 화합물 A는 MMP-9 활성을 1.0%농도에서 76% 억제하였으며, 화합물 B는 동일한 농도에서 66% 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 화합물 C는 1.0%농도에서 71% 억제하는 것으로 나타나 화합물 A가 MMP-9의 활성 저해능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

**Abstract:** MMPs (Matrix metalloproteinases) are enzymes playing an important role to turnover and remodel main protein compositions of extracellular matrix. MMP-2 and MMP-9 of MMPs having a catalytic domain which is apart from a hemopexin-like domain part, are different from the other MMPs pertaining fibronectin-like domain close to hemopexin-like domain. It was reported that the development of MMP-9 restrainer can prevent the transfer of liver cancer. In this study, MMP-9 restrainers were extracted and purified from *Hovenia dulcis Thunberg*. The each fractionary part was examined to investigate the inhibitory effect on MMPs. Three

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-2600-4672 Fax : +82-(0)2-2600-4792

E-mail : ehknisi@korea.kr

compounds, compound A and B eluted with ethyl acetate (EA) and compound C with methanol, were identified by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, GC/MS, and FT-IR. Compound A is considered as a kind of catechine type compound having a benzene ring substituted by hydroxyl and methoxyl groups. Compound B and C are nobiletin type compound pertaining a carbonyl group. Compound A, B and C showed 76%, 66% and 71% of inhibition effect on MMP-9 at 1.0% concentration, respectively. Compound A showed the best inhibition effect on MMP-9.

**Key words :** *Hovenia dulcis* Thunberg., MMPs, GC/MS, IR, NMR, Nobiletin

## 1. 서 론

사람의 혈관, 조직 등을 구성하는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 조직의 구조를 지지하고 유지하는 기계적 역할을 수행하는 물리적 구조일 뿐만 아니라, 발달, 이동, 증식과 같은 많은 생물학적 세포의 기능에 영향을 미치는 복잡하고 역동적인 구조물이다.<sup>1</sup> 또한 그 구성요소들의 합성과 분해의 평형상태는 세포외 기질의 항상성(homeostasis) 유지를 위하여 필수적인 것으로 알려져 있다.<sup>2</sup> 세포외 기질은 최하부막(basement membrane)과 막간극(interstitial matrix)의 2개 카테고리 나눌 수 있고, 이들을 구성하는 요소는 세포의 종류, 세포의 분화 상태 및 세포의 대사 등에 따라 구분된다. 이러한 세포외 기질의 주요 단백질 구성요소들을 가수분해시켜 재편성(turnover)과 재형성(remodeling)의 핵심 역할을 하는 효소가 matrix metalloproteinases(MMPs)로 알려져 있다.<sup>3</sup>

MMP들 중에서 MMP-9은 분자량이 92 kDa으로 암의 전이를 조절하는 여러 물질을 구성하거나 조절하는 역할을 하며,<sup>4</sup> 정상 폐 대식세포, 다형핵성 백혈구, 골모세포, 각질세포, 영양세포, 그리고 변형된 여러 세포들에서 몇 가지 유형들을 만들고 있고, 특히 산성 환경에서 collagen type I 인 N-terminal propeptide로 분열하는 것으로 보고되었다.<sup>5</sup> 이와 같이 MMP-9의 활성 조절(regulation)은 유전자의 활성화(gene activation)와 전사(transcription), 잠재되어있는 효소의 번역(translation)과 분비(secretion), 그리고 내인성 억제제들(endogenous inhibitor)에 의한 proenzyme의 활성화와 비활성화 등 많은 단계에서 일어난다. MMP-9이 활성 조절을 상실하였을 때는 류마치스성 관절염, 골관절염,<sup>6</sup> 암의 전위(tumour invasion)<sup>7</sup> 및 신경염증 질환에서의 myelin-basic 단백질의 퇴화<sup>8</sup> 등에 관련이 있는 것으로 보고되었다.<sup>9,10</sup>

최근에는 천연 식물에서도 여러 종류의 억제제들이 분리되는 등 여러 가지 방법에 의해 MMP 억제제들

이 개발되고 있고<sup>11</sup>, 유근피내에서도 이와 같이 MMP-9에 대한 활성 억제물질이 존재하는 것으로 보고되었다.<sup>12</sup> 그리고 항암세포전이를 억제하기 위한 MMP-9의 저해물질과 활성산소종의 대사에 관련된 효소의 발현을 유도하는 물질을 천연물에서 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에 사용한 *Hovenia dulcis* Thunberg는 일본에서는 Kigushi, Kenponashi, Rhamnaceae라고 불리고 있고, 우리나라에서는 헛개나무, 지구자라 불리고 있으며 갈매나무과에 속하는 식물이다. *Hovenia dulcis* Thunberg에 대한 연구는 그 약성이 말하여 주듯 매우 활발하게 연구되고 있다. *Hovenia dulcis* Thunb.에서 항돌연변이, 항암 활성, 알코올을 분해하는 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성,<sup>13</sup> 숙취의 원인물질인 aldehyde를 분해하는 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성, 간독소 해소물질로 ampelopsin,<sup>14</sup> abtismet 물질로 hoduloside, jujuboside 등<sup>15</sup>이 보고 된 바 있다. 이에 헛개나무가 갖는 또다른 효능에 대하여 관심을 갖게 되었고 본 실험을 행하게 되었다.

본 연구는 *Hovenia dulcis* Thunberg에서 다양한 유기용매를 사용하여 MMP-9의 활성을 저해하는 물질을 분리 정제하고, 분리된 물질에 대한 MMP-9의 활성 억제 여부를 zymography 법으로 확인하였다. 그리고 확인된 MMP-9의 활성 억제물질을 FT-infrared spectrometer, nuclear magnetic resonance spectrometer, gas chromatography/mass spectrophotometer, UV/Visible spectrometer 등의 기기분석으로 구조적인 특성을 규명하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 *Hovenia dulcis* Thunberg는 국내 산으로서 영천의 산지에서 *Hovenia dulcis* Thunb.의 목질 부분만을 구입하여 음지에서 다시 잘 건조하였

다. 잘 건조된 시료는 2~3 cm 크기로 잘라서 추출하는데 사용하였다. MMP-9에 대한 활성도 측정을 위한 adenocarcinoma 세포주인 SK-Hep-1은 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.

## 2.2. 시약

Glycine, ammonium persulfate, 3 (4,5-dimethylethiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), coomassie blue 및 triton X-100 등의 시약은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. 그리고 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)과 acrylamide, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TMEDA) 및 sodium dodecylsulfate (SDS) 등은 Bio-Rad (Hercules Co.) 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), trypsin-EDTA, L-glutamine은 Gibco BRL사 제품을 사용하였다. n-Hexane (Hex, 95.0%), methanol (MeOH, 99.5%), methylene chloride (MC, 99.5%) 그리고 ethyl acetate (EA, 99.0%)는 삼전화학에서 구입하여 정제하여 사용하였다. 분획물의 용해에 사용된 methanol (99.93%, A.C.S. HPLC grade)은 Aldrich사 제품을 사용하였다.

## 2.3. 실험기기

물질의 정제에는 HPLC (Jasco pu-980, Japan)와 MPLC (YAMAZEN, collector: FR 50N, detector: UV-10v, pump: YAMAZEN 540, Japan)를 사용하였고, HPTLC (CAMAG TLC scanner 3, Switzerland), FT-IR spectrometer (Perkin Elmer Spectrum One with Automag FT-IR Microscope, USA), GC/MS spectrometer (Varian saturn(II), column; DB-5, (5%-phenylmethylpolysiloxane, diameter; 0.25 mm, film; 0.25  $\mu$ m, 30 m, Australia), NMR spectrometer (Lambda 400 MHz JEOL, Japan 및 Varian Gemin: 2000 operating at 300 MHz, Australia) 등을 이용하여 물질의 분석 및 구조 결정에 사용하였다. 그리고 시료를 동결 건조하기 위해 냉동 건조기 (Martin Christ Alpha type, Germany)를 사용하였다.

세포주의 배양과 시료의 전처리에는 조직 파쇄기 (Utra-Turrax T25, Germany), 초음파 파쇄기 (Sonic and Materials VC-375, USA), 전기 영동기 (Mighty Small SE250, Hofer, USA)와 ELISA reader (Spectra Max 340, USA), incubator (Boekel incubator shaker II, Model

136400) 및 UV/Visible spectrometer (Varian Cary 3E, Australia)를 이용하였다.

## 2.4. 실험 방법

2.4.1. 헛개나무에서 MMP-9 저해제의 추출 및 분리  
MMP-9에 대한 활성 억제 물질의 분리를 위해 음지에서 건조시킨 *Hovenia dulcis Thunb.*을 2~3 cm 크기로 썰어 1 Kg을 취한 다음 5 L round flask에 넣고 70% methanol (MeOH)로 4 시간 환류하는 방법으로 3 회씩 반복하여 추출하였다. 추출물은 여과하여 부유물을 제거한 후에 감압 농축하였고, 농축물은 감압하에 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료는 상온에서 MeOH에 용해시켜 30 분간 저어 주었고 이 후 감압하에 여과하는 방법을 여러 번 시행하여 MeOH에 용해되는 부분과 MeOH에 녹지 않는 부분으로 나누었다. MeOH에 용해되는 부분은 감압하에 완전히 MeOH를 제거시킨 후에 10 mL의 MeOH에 다시 용해시켜 MMP-9의 저해 활성 측정에 사용하였다. MeOH에 녹지 않는 부분은 5 mL의 증류수에 용해시켜서 MMP-9의 활성 저해 여부에 대한 측정에 사용하였다.

MMP-9의 활성에 저해성을 보인 MeOH에 용해되는 용액은 silica gel (Kieselgel 60 ASTM, Merck Art. 7734) column (30  $\times$  400 mm)에서 극성이 다른 용매를 사용하여 용출하는 방법으로 분획하였다. 먼저 column (30  $\times$  400 mm)에 EA:hexane=0.1:8의 혼합 용매에 혼합된 silica gel을 300 mm 높이로 충전하였다. 그리고 MeOH에 용해되는 분획분을 column에 loading 한 후 500 mL의 n-hexane으로 용출한 후에 EA로 용출하였고, 마지막으로 MeOH로 용출하는 방법으로 세 개의 부분으로 분획하였다. 세 개의 분획분들은 감압하에 농축하여 MMP-9의 활성 저해능 실험에 사용하였고, EA와 MeOH로 용출한 분획분에서 MMP-9의 활성에 저해능이 있음을 보였다. 이 두 분획분들은 각각 다음과 같은 방법으로 MMP-9 활성 저해물질의 분리를 시도하였다.

EA로 용출한 분획분은 감압하에 EA를 완전히 휘발시킨 후에 5 mL의 MeOH를 사용하여 다시 용해시켰다. 이 시료는 silica column상에서 open column으로 MC와 MeOH의 혼합용액에서 MeOH의 농도를 증가시키는 방법으로 다시 네 개의 부분으로 분획하였다. 첫 번째 전개 용매는 MC:MeOH=10:0.1의 혼합 용매를 사용하여 용출하였다(E1). 2 L로 용출시킨 후에, 두 번째 전개 용매인 MC5:MeOH=10:0.5를 사용하여 용출하였다(E2). 이 혼합용매에서는 녹색 계열의 화합

물들이 분리되어 용출됨을 UV의 365 nm로 확인하였다. 세 번째 전개 용매는 MC:MeOH=10:1인 혼합 용매를 사용하였다. 이 혼합 용매에서는 보라색 계열의 화합물이 용출됨을 UV의 365 nm로 확인할 수가 있었다. 마지막 분획본은 MC:MeOH=10:4의 혼합 용매로 용출하여 얻었고, 각 분획본들은 감압하에 농축한 후에 5 mL의 MeOH에 다시 용해시켜서 MMP-9의 활성 저해능 실험에 사용하였다.

MeOH로 용출한 분획본은 EA와 혼합된 상태에서 침전물이 나타났고 여과 후에 분리된 용액만이 MMP-9의 활성 저해능 실험에서 저해능이 있는 것으로 나타났다. 이 용액을 감압하에서 농축하였고 소량의 MeOH을 사용하여 다시 용해시킨 후에 silica column상에서 open column으로 MC와 MeOH의 혼합 비율을 달리하면서 MeOH의 농도를 증가시키는 방법으로 다시 세 개의 부분으로 분획하였다. 먼저 MC:MeOH=10:2의 혼합 용매를 사용하여 연두색 계열의 화합물이 용출되고 있음을 UV의 365 nm로 확인할 수가 있었다(M1). 그 다음 전개 용매는 MC:MeOH=1:1의 혼합 용매를 사용하였고, 보라색 계열의 화합물이 용출됨을 확인할 수가 있었다. 짙은 고동색 계열의 화합물은 MeOH에서만 용출되었다.

MC와 MeOH의 각기 다른 혼합비로 용출시킨 분획본들은 감압하에 농축하여 소량의 MeOH에 다시 용해시켰다. 이들은 25 TLC aluminium sheets (Silica gel 60 F<sub>254</sub>)에서 최소한 두 개 이상의 화합물들이 혼합되어 있는 것으로 나타났다. 이들 중 MMP-9의 활성 저해능 실험에서 저해능이 있는 것으로 나타난 세 개의 분획본(E1, E2 그리고 M1)으로부터 저해물질의 정제를 시도하였다.

#### 2.4.2. 헛개나무에서 MMP-9 저해제의 정제

MMP-9의 활성 저해능 실험에서 저해능이 있는 것으로 나타난 세 개의 분획본(E1, E2 그리고 M1)에서 MMP-9의 활성 저해 물질에 대한 정제는 MPLC (Silica gel column, 30×200 mm, at 365 nm)를 이용하여 MC와 MeOH의 혼합비를 달리하는 방법으로 용출하였다. 그리고 시험관당 1.5 mL씩 용액을 받아서 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 365 nm에서 흡광도를 측정하였고 이를 그래프상에서 분획하였다.

E1 분획본은 MPLC에서 MC:MeOH=10:0.2의 혼합 용매로 용출하여 365 nm에서 흡광도를 나타내는 부분만을 모아서 감압하에 농축하여 다섯 개의 부분으로 분획하였다. 단일 물질로 나타난 두 번째 분획본

(compound A)이 MMP-9의 활성 저해능 실험에서도 저해능이 있는 것으로 나타나 이 물질의 구조 분석을 위하여 IR 및 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR분석에 사용하였다.

E2 분획본은 MPLC에서 MC:MeOH=10:0.4의 혼합 용매로 용출하여 365 nm에서 흡광도를 나타내는 부분만을 모아서 감압하에 농축하여 세 개 부분으로 분획하였다. 단일 물질로 나타난 두 번째 분획본 (compound B)이 MMP-9의 활성 저해능 실험에서도 저해능이 있는 것으로 나타나 이 물질의 구조 분석을 위하여 IR 및 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR분석에 사용하였다.

M1 분획본은 MPLC에서 MC:MeOH=10:1의 혼합 용매로 용출하여 365 nm에서 흡광도를 나타내는 부분만을 모아서 감압하에 농축하여 네 개 부분으로 분획하였다. 단일 물질로 나타난 두 번째 분획본 (compound C)만이 MMP-9의 활성 저해능 실험에서 저해능이 있는 것으로 나타나 이 물질의 구조 분석을 위하여 IR 및 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR분석에 사용하였다.

#### 2.4.3. 세포주에서 MMP-9의 분리

MMP-9 활성 물질의 분리는 MMP-9 활성 물질을 많이 내는 세포주로 알려진 SK-Hep-1을 혈청이 함유된 DMEM 배지로 키운 다음, MMP-9 활성 억제제로 알려진 혈청을 PBS로 3 회 잘 세척하였다. 그리고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배양액으로 24 시간 배양시킨 다음 DMEM 배양액을 회수하여 원심분리하였다. 회수한 DMEM 배양액을 Amicon 30 (Amicon, Inc. USA)을 이용하여 농축한 다음, 각 단계별로 분획한 *Hovenia dulcis* Thumb. 추출물의 MMP-9의 활성 억제 여부를 판별하는데 이용하였다.

#### 2.4.4. MMP-9 활성도 측정

MMP-9 활성도 측정은 Zymography 방법<sup>16</sup>을 약간 변형시킨 방법으로 측정하였다. 0.1%의 gelatin이 함유된 10% acrylamide gel을 이용하여 전기 영동하였고, lower gel buffer (pH 8.8)의 조제는 Tris-base 18.15 g과 SDS 0.4 g을 증류수 1 L에 용해시킨 것을 사용하였다. 전기 영동시 running buffer로는 Tris-base 3.0275 g과 glycine 14.225 g, SDS 1 g을 증류수 1 L에 녹여 pH를 8.3으로 맞춘 것을 사용하였다. 그리고 전기영동이 끝나면 gel을 2.5%의 triton X-100으로 30 분씩 2 회 세척하여 gel에 존재하는 SDS 성분을 제거하였다. 그리고 이 gel을 incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 8.0)에 10 분씩 2 회 세척하고, 37°C shaking incubator에서 24 시간 incubation

시킨 후 염색액으로 12 시간 염색하였다. 이때 염색액은 0.25% coomassie blue, 10% acetic acid 및 40% methanol 혼합액을 사용하였다. 염색이 끝난 다음 1 차 탈색액에 30 분 및 2 차 탈색액에 담가 완전 탈색시킨 후 gel 상의 92 KDa 위치의 MMP-9 band의 소실 정도에 따라 densitometer (ACDSee v3.0 제조국)로 활성 억제 정도를 계산하였다. 이때 사용한 1 차 탈색액은 50% methanol과 5% acetic acid 혼합액을 사용하였으며, 2 차 탈색액으로는 5% methanol과 10% acetic acid 혼합액을 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 헛개나무에서 MMPs 저해제의 분리 및 정제

70% MeOH로 추출한 *Hovenia dulcis* Thunb. 추출물을 변형된 Zymography 방법<sup>16</sup>으로 시도한 MeOH에 용해도는 부분과 MeOH에 녹지 않는 부분에서의 MMP-9 활성도 측정에서 MeOH에 용해되는 부분과 부분만이 MMP-9의 활성에 저해능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1).

MeOH soluble은 다시 open SiO<sub>2</sub>-column chromatography에서 n-hexane, EA 그리고 MeOH로 용출시켜 세 개의 부분으로 분획하였다. 각 분획물들의 MMP-9 활성 저해능 실험에서는 EA와 MeOH 분획물만이 저해능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

EA 분획물은 실리카겔 칼럼(30×400 mm)상에서 MC:MeOH (10:0.1 v/v)의 혼합 용매를 사용하여 시험관 당 1.5 mL씩 용액을 받아 UV/Vis spectrophotometer

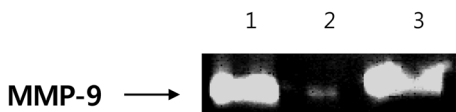


Fig. 1. Zymography of MMP-9 in the presence of MeOH soluble and MeOH insoluble fractions. Lain 1: control (MMPs of SK-Hep-1), Lain 2: MeOH soluble fraction, Lain 3: MeOH insoluble fraction

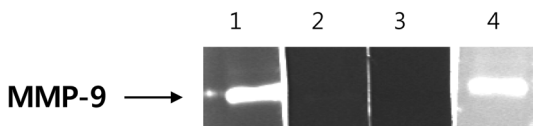


Fig. 2. Zymography of MMP-9 in the presence of fractions obtained from the different solvents. Lain 1: control (MMPs of SK-Hep-1), Lain 2: EA fraction, Lain 3: MeOH fraction, Lain 4: n-Hexane fraction

를 사용하여 365 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그래프상에서 분획 하였다. 이때 4 개의 분획을 얻었으며 각각의 분획들은 농축한 후에 감압 냉동 건조하였고, 건조된 각 분획들의 MMP-9 활성 억제 실험에서 2 개의 분획(E1 and E2)에서 저해능을 나타내었다.

E1 분획은 MPLC (Silica gel column, 30×200 mm, at 365 nm)를 사용하여 MC:MeOH (10:0.2)로 전개하여 분획한 것 중에서 두 번째 분획물(compound A)만이 MMP-9 활성 측정에서 저해능이 있는 것으로 나타났다. 그리고 이 분획물은 TLC (MC:MeOH=10:0.2)와 GC/MS에서 단일물질인 것을 확인하였고, M<sup>+</sup>(m/z)는 214로 추정되었다. FT-IR, <sup>1</sup>H- 그리고 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 구조 분석에 사용하였다.

E2 분획 또한 MPLC (Silica gel column, 30×200 mm, at 365 nm)를 사용하여 MC:MeOH (10:0.4)로 전개하여 분획한 것 중에서 두 번째 분획물(compound B)이 MMP-9 활성 측정에서 저해능이 있는 것으로 나타났다. 그리고 TLC (MC:MeOH=10:0.4)와 GC/MS에서 단일물질임을 확인하였고, M<sup>+</sup>(m/z)는 267로 추정되었다. FT-IR, <sup>1</sup>H-, 그리고 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 구조 분석에 사용하였다.

M1 분획은 MPLC (Silica gel column, 30×200 mm, at 365 nm)를 사용하여 MC:MeOH (10:1)로 전개하였고, 두 번째 분획물(compound C)만이 MMP-9 활성 측정에서 저해능이 있는 것으로 나타났다. 그리고 TLC (MC:MeOH=10:1)와 GC/MS에서 단일물질임을 확인하였고, M<sup>+</sup>(m/z)는 228로 추정되었다. FT-IR, <sup>1</sup>H- 그리고 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 구조 분석에 사용하였다.

#### 3.2. FT-IR 스펙트럼과 NMR DATA에 의한 MMP-9 저해제의 구조 분석

##### 3.2.1. 화합물 A의 분석

E1 분획물의 FT-IR 스펙트럼에서는 3303 cm<sup>-1</sup>에서 -OH의 강한 흡수띠가 나타났고, 특히 secondary 알콜에 해당하는 흡수 띠가 1369 cm<sup>-1</sup>에서 나타났다. 방향족의 C=C stretching에 해당하는 흡수 띠가 1610 cm<sup>-1</sup>과 1515 cm<sup>-1</sup>에서 보이고 있다. 그리고 1239 cm<sup>-1</sup>과 1100 cm<sup>-1</sup>부근에서의 흡수 띠는 벤젠 고리에 연결된 =C-O-C에 해당하는 것으로 벤젠 고리에 alkoxy group이 있는 것으로 생각되었다. 특히 1700 cm<sup>-1</sup> 부근에서는 어떠한 흡수 띠도 나타나지 않았고 이는 이 화합물이 분자내에 C=O (carbonyl) 작용기를 갖는 nobiletin 계열은 아닌 것으로 추정하였다.

<sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C-NMR의 data는 Table 1에 나타내었다. <sup>1</sup>H

Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum data of compound A

$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	$^1\text{H}$ (ppm)
29.04		115.71	
67.06	2.76 (1H, q,q)	119.57	6.64 (1H, s)
68.46	3.61 (1H, q)	132.41	6.79 (1H, d)
79.52		132.50	6.80 (1H, d)
95.86	3.96 (3H, s)	145.54	
96.34	4.88 (1H, d)	145.45	
99.97	5.88 (1H, s)	157.19	
115.49	6.02 (1H, d)	157.44	

\*Recorded in  $d_6$ -Acetone, chemical shift values are reported as  $\delta$  from TMS at 75 MHz for  $^{13}\text{C}$  and 300 MHz for Dept and Cosy spectrum; number of protons, signal multiplicity and coupling constants (Hz) are shown in parentheses.

NMR spectrum에 의하면  $\delta$  2.76에서 탄소 고리 화합물인 methylene ( $-\text{CH}_2-$ ) 피크를 나타내고,  $\delta$  3.61에서는 탄소 고리 화합물의  $-\text{CH}$ -를 확인하였다.  $\delta$  3.96에서는  $-\text{OCH}_3$ 로 보이는 신호가 나타났고,  $\delta$  6.64, 6.79, 6.80에서 벤젠고리의 Ar-H가 보였다.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum과  $^{13}\text{C}$  NMR DEPT ( $45^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $135^\circ$ )를 비교해 보면  $\delta$  67.06, 79.52, 95.86, 96.34, 115.49, 115.71, 119.57 및 132.41에서 methyne ( $-\text{CH}$ ) 탄소를 보이는 피크가 있음을 알 수 있었다. 탄소 고리화합물의 methylene에 해당하는 피크는  $\delta$  29.04에서 나타났고, OH기로 치환된 탄소에 의한 피크는  $\delta$  79.52에서 보였다. 상기와 같은 결과로부터 화합물 A의 구조는 OH기와  $\text{OCH}_3$ 기로 치환된 벤젠 고리와 헥테로 고리를 갖고 있는 catechin 계열의 화합물로 예상되나 이 물질의 정확한 구조 규명을 위해서는 고분해성 질량분석법과 아울러 보다 정밀한 NMR 연구, 원소 분석 및 X-ray에 의한 구조 결정 등 좀 더 많은 연구가 필요하다.

### 3.2.2. 화합물 B의 분석

E2 분획물의 FT-IR 스펙트럼에서는  $3432\text{ cm}^{-1}$ 에서  $-\text{OH}$ 의 강한 흡수 띠가 나타났고  $2936\text{ cm}^{-1}$ 에서 methylene의 C-H간 신축진동의 흡수 띠가 나타났다. 방향족의 C=C stretching이  $1594$ ,  $1514$  그리고  $1461\text{ cm}^{-1}$ 에서 보이고 있고,  $1030\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C-O 결합의 흡수 띠를 보였다.

이 화합물의  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ -NMR의 data는 분리 정제된 이 물질의 양이 적음으로 인하여 얻지 못하였으나 미약하게나마 얻은  $^1\text{H}$ 의 spectrum에서는 화합물 C와 유사한 구조를 갖는 것으로 사료되었다. 이 물질의 정확한 구조 규명을 위해서는 보다 많은 샘플을 정제한 후에 고분해성 질량분석법과 아울러 보다 정밀한

NMR 연구, 원소 분석 및 X-ray에 의한 구조 결정 등 좀 더 많은 연구가 필요하다.

### 3.2.3. 화합물 C의 분석

M1의 분획물의 FT-IR 스펙트럼에서는  $3410\text{ cm}^{-1}$ 에서  $-\text{OH}$ 의 강한 흡수 띠를 보이고 있고, 특히 secondary 알콜에 해당하는 흡수 띠가  $1371\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타났다. 방향족의 C=C stretching에 해당하는 흡수 띠가  $1595\text{ cm}^{-1}$  그리고  $1508\text{ cm}^{-1}$ 에서 보이고 있다.  $1238\text{ cm}^{-1}$ 와  $1123\text{ cm}^{-1}$ 부근에서의 흡수 띠는 벤젠고리에 연결된  $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 에 해당하는 것으로 벤젠 고리에 alkoxy group이 있는 것으로 생각되었다. 특히  $1734\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}=\text{O}$ 에 해당하는 흡수 띠를 나타내었다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에 의하면  $\delta$  2.5에서 탄소 고리 화합물의 methylene ( $-\text{CH}_2-$ ) 피크가 보였고,  $\delta$  3.74에서는 methoxy ( $-\text{OCH}_3$ )로 보이는 피크가 나타났다.  $\delta$  6와  $\delta$  7에서 벤젠고리의 Ar-H를 보이고 있다.

상기와 같은 결과로부터 화합물 C의 구조는 Fig. 3

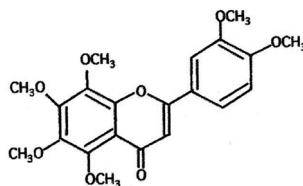


Fig. 3. Chemical structure of nobiletin.

과 같이  $-\text{OH}$ 기와  $-\text{OCH}_3$ 기로 치환된 벤젠 고리와 분자내 carbonyl기를 갖고 있는 nobiletin 계열의 화합물로 예상되나 이 물질의 정확한 구조 규명을 위해서는 고분해성 질량분석법과 아울러 보다 정밀한 NMR 연구, 원소 분석 및 X-ray에 의한 구조 결정 등 좀 더 많은 연구가 필요하다.

### 3.3. 헛개나무에서 정제된 물질의 MMP-9 억제 효과

*Hovenia dulcis* Thunberg의 EA 추출물에서 분리한 화합물 A와 B 그리고 MeOH 추출물에서 분리한 화합물 C의 농도에 따른 MMP-9 활성 억제 효과는 Zymography법<sup>16)</sup>에 의해 관찰하였고, Fig. 4, Fig. 5 그리고 Fig. 6에 나타내었다. 화합물 A는 농도가 증가함에 따라 MMP-9의 활성 억제가 증가됨을 보였고, 0.75%의 농도에서는 69%, 1.0%에서는 76% MMP-9의 활성이 억제되었다. 그리고 화합물 B도 화합물 A와 같이 농도의 증가에 따라 활성이 억제되어 0.75%

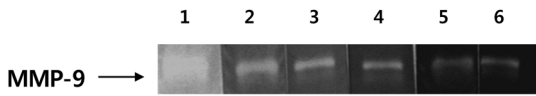


Fig. 4. Inhibition effect on MMP-9 depending on the concentration of compound A.  
Lane 1: MMPs of SK-Hep-1, Lane 2: 0.1%, Lane 3: 0.25%, Lane 4: 0.5%, Lane 5: 0.75%, Lane 6: 1.0%

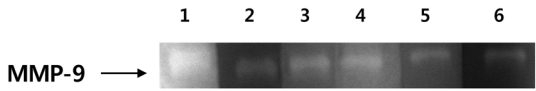


Fig. 5. Inhibition effect on MMP-9 depending on the concentration of compound B.  
Lain 1: MMP-9 of SK-Hep-1, Lain 2: 0.1%, Lain 3: 0.25%, Lain 4: 0.5%, Lain 5: 0.75%, Lain 6: 1.0%

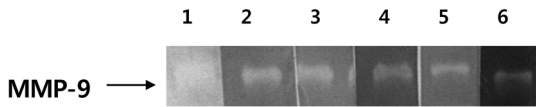


Fig. 6. Inhibition effect on MMP-9 depending on the concentration of compound C.  
Lain 1: MMP-9 of SK-Hep-1, Lain 2: 0.1%, Lain 3: 0.25%, Lain 4: 0.5%, Lain 5: 0.75%, Lain 6: 1.0%

와 1.0%에서 66%의 활성이 억제됨을 보였다. 화합물 C인 경우에도 농도의 증가에 따라서 활성이 억제되는 것으로 나타났고, 0.75%의 농도에서 64%, 1.0%에서 71% 활성이 억제되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 SK-Hep-1에서 추출한 MMP-9 활성의 억제는 화합물 A가 가장 좋은 것으로 나타났다.

#### 4. 결 론

본 연구는 *Hovenia dulcis Thunberg*에서 MMP-9의 활성을 저해하는 물질을 분리 정제하고, 분리된 물질에 대한 MMP-9의 활성 억제 여부를 확인하였다.

EA로 용출한 분획과 MeOH로 용출한 분획에서 MMP-9의 활성을 저해하는 물질이 있는 것으로 판명되었다. MMP-9의 활성을 저해하는 것으로 판명된 EA로 용출 분리된 두 개의 화합물(화합물 A, 화합물 B)과 MeOH로 용출된 한 개의 화합물(화합물 C)의 <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C-NMR, GC/MS 그리고 IR 분석 결과 화합물 A는 OH기와 OCH<sub>3</sub>기로 치환된 벤젠고리를 함유하는 화합물로 catechine 계열로 추정되었으며, 화합물 B와 C는 OH기와 OCH<sub>3</sub>기로 치환된 벤젠 고리와 분자내 carbonyl기를 갖고 있는 nobiletin 계열의 화합물로 추정되었다.

이들 물질의 MMP-9 활성 억제 효과는 화합물 A는

MMP-9 활성을 1.0%농도에서 76% 억제하였으며, 화합물 B는 66% 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 화합물 C는 1.0%농도에서 71% 억제하는 것으로 나타나 화합물 A가 MMP-9의 활성 저해능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

#### 참고문헌

1. R. Raghov, *FASEB J.*, **17**, 15-19(1994).
2. G. Murphy and A. J. Docherty, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 120-125(1992).
3. M. Nguyen, J. Arkell and C. J. Jackson, *Inter. J. Biochem. & Cell Biol.* **33**, 960-970(2001).
4. D. E. Kleiner and W. G. Stetler-Stevenson, **43(Suppl)**, S42-S51(1999).
5. Y. Okada, K. Naka, K. Kawamura, T. Matsumoto, I. Nakanishi, N. Fujimoto, H. Sato and M. Seiki, *Lab. Invest.* **72**, 311-322(1995).
6. T. E. Cawston, *Pharm. Therapeu.* **70**, 163-182(1996).
7. L. Liotta, P. S. Steeg and W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **64**, 327-336(1991).
8. S. K. Chandler, R. E. Coates, A. Gearing, J. Lury and E. A. Bone, *Neurosci. Lett.* **201**, 223-226(1995).
9. S. Kim, H. S. Park, H. J. Son and W. S. Moon, *Korean J. Hepatol.* **10** 62-72(2004).
10. Y. Noji, M. Shimizu, H. Ino, T. Higashikata, M. Yamaguchi, A. Nohara, T. Horita, K. Shimizu, Y. Ito, T. Matsuda, M. Namura and H. Mabuchi, *Circ J.* **68**, 355-360(2004).
11. R. P. Beckett and M. Whittaker, *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**, 259-282(1998).
12. K. H. Kong, K. J. Han, K. S. Lee, S. H. Cho, *Analytical Science and Technology* **18**, 104-111(2005).
13. Y. Okuma, H. Ishikawa, Y. Ito, Y. Hayashi, A. Endo, and T. Watanabe. *日本栄養・食糧學會誌*, **48**(3), 167-172(1995).
14. K. Hase and M. Ohsugi. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **41**: 381-385(1997).
15. M. Yoshikawa, S. Tumura, K. Yamada, and T. Arihara. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **40**, 2287-2291(1992).
16. C. Heussen and E. B. Dowdle, *Anal. Biochem.* **102**, 196-202(1980).