

Screening of Hyaluronidase Inhibitor in Korean Medicinal Plants

Seon Gu Hwang, Anna Yang, Soo Jung Kim, Min Kee Kim, Sung Soo Kim, Hyun Jung Oh, Jung Dae Lee, Eun Ju Lee, Kung-Woo Nam and Man-Deuk Han*

Department of Biology, College of Natural Science, Soochunhyang University, Chungnam 336-745, Korea

Received April 7, 2014 / Revised April 26, 2014 / Accepted April 27, 2014

Mammalian hyaluronidases (HAase, EC 3.2.1.35) are a family of enzymes that hydrolyse *N*-acetyl-*D*-glucosamine (1-4) glycosidic bonds in hyaluronic acid, which is found in skin, cartilage, and the vitreous body. Although HAase is generally present in an inactive form within subcellular lysosomes, it is released in an active form in some types of inflammation and tissue injuries, thereby contributing to the inflammatory response. The HAase inhibitory activity of 500 methanolic extracts of 500 species from medicinal plants was screened using a Morgan microplate assay. The viscosity of the hyaluronic acid was measured with an Ubbelohde viscometer. Three MeOH extracts inhibited more than 50% of HAase activity at a concentration of 2 mg/ml. HAase inhibitory rates (%) of three species of medicinal plant extracts, *Styrax japonica*, *Deutzia coreana*, and *Osmanthus insularis* were 57.28%, 53.50%, and 53.19%, respectively. The rate of HAase inhibition of the extracts was dose dependent. In the HAase inhibitory assay using the Ubbelohde viscometer, the results were in good agreement with the results from the Morgan assay. The results suggest that HAase inhibitory compounds extracted from the stem of *S. japonica*, *D. coreana*, and *O. insularis* might be multifunctional and prevent the degradation of hyaluronic acid and the induction of allergic reactions and inflammation.

Key words : Hyaluronic acid, hyaluronidase, hyaluronidase inhibitor, medicinal plants, *Styrax japonica*

서 론

포유동물 hyaluronic acid (HA)는 소 눈의 초자체에서 최초로 발견된 고분자 다당류로서 *D*-glucuronic acid와 *N*-acetyl-*D*-glucosamine이 배당체 결합된 이당류(disaccharide units)가 β -(1,4) 결합을 반복하는 직선상 구조를 갖고 있다[11, 20]. HA는 인체 안구의 유리체, 연골, 활막액, 태반, 피부 등에 존재하며, 점액 다당류(mucopolysaccharide)의 형태로 세포 외 기질(extracellular matrix)의 수분흡수 및 세포 간 유연성을 부여하는 필수적인 역할을 한다[15, 21, 25]. HA는 구성당의 당쇄 길이에 따라 조직 내에서 그 기능적 차이를 나타낸다. 즉, 고분자 HA의 경우, 대식세포의 식작용(phagocytosis)을 억제하여 항 염증반응을 나타내며, 고분자 HA가 분해된 저분자성 HA 분해산물의 경우 대식세포의 염증반응 촉진, 상처 치유에 관여되는 collagen과 fibrosis를 증가시키는 원인 물질이 된다[9].

HA의 분해효소인 hyaluronidase (HAase)는 연쇄상 구균에서 처음 발견된 효소로서, 세포간극의 구성성분인 HA를 분해하여 약물의 확산을 용이하게 해주는 특징 때문에 주사제,

항바이러스제 등 피하주사 시 주로 사용된다[5, 13, 19]. HAase는 HA를 가수분해하는 기작에 따라 포유류 형 HAase (Mammalian type, EC 3.2.1.35, hyaluronoglucosaminidase), 거머리 형 HAase (Leeches type, EC 3.2.1.36, hyaluronoglucuronidase)와 박테리아 형 HAase (Bacterial type, EC 4.2.2.1, hyaluronate lyase)로 구분된다. 특히 포유류 형 HAase는 인체 내의 고환, 피부, 간, 태반 체액 등에 존재하여 HA의 구성성분인 glucuronic acid와 glucosamine사이의 β -(1,4) 배당체 결합을 가수분해하여 사당류(tetrasaccharide)를 생성하거나, 우리 몸의 관절에 있는 활액 및 연골의 성분인 chondroitin, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate을 가수분해하는 특징이 있다[7, 19]. 이 효소는 류마티스 관절염 같은 염증 질환 시 활성화 되어 혈관계 투과성 및 염증반응에 관여하기도 한다[2, 8, 26, 29]. 또한 신생혈관 형성[31]과 암 전이[12]의 촉진에 관여하고, 배아형성[1, 30] 등과 같은 발생과정과 정자의 접체 부분에 존재하여 수정 시 난자의 막인 난구세포를 분해하는데 관련이 있어 불임과 연관되어 연구되고 있다[22, 23, 27].

최근 HAase는 알레르기 반응유발, 염증유도 및 암 전이 등과의 연관성이 있는 것이 보고된 바 있고[9, 10, 12], HAase의 저해제(inhibitor)에 관한 연구를 통해 항 알레르기 약물, 항염증약물 및 다기능성 물질 개발이 시도되고 있다. 지금까지 연구된 HAase inhibitor의 대표적인 물질로는 항 알레르기 및 항염증 약물제인 tranilast, disodium cromoglycate (DSCG), indomethacin, 및 aspirin 등이 있다. 그러나 이들 물질은 합성

*Corresponding author

Tel : +82-41-530-4702, Fax : +82-41-530-1256

E-mail : mdhan@sch.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

된 항염증약물로서 저해효과는 우수하나 여러 부작용이 있는 것이 단점이다. 따라서 식물과 같은 천연물에서 새로운 HAase의 저해제를 개발하고자 연구를 시도하였으나 아직 상용화될 정도로 우수한 저해제는 개발되지 않았다[10, 24]. 따라서 본 연구는 국내에서 자생하는 500종의 천연물로부터 HAase 저해 활성이 있는 물질을 개발하고자, 천연물에서 methanol (MeOH) 추출물을 얻고, 이를 이용하여 HAase 저해효과를 탐색 및 선별하였다.

재료 및 방법

천연물의 추출물

본 실험에서 사용한 천연물 추출물 500종은 한국식물추출물은행(KRIBB)에서 제공받아 사용하였다. 시료 500종 추출물의 사용된 부위는 Fig. 1과 같이 주로 전초(265종, 53%), 줄기(94종, 18%), 줄기껍질(32종, 6%)등이며 MeOH 추출물이다. 추출방법을 간기하면, 각 부위에 따라 분리하여 음건된 천연물을 각 1 kg씩을 분쇄하여 MeOH을 3배 첨가하고 60°C에서 3시간씩 3회 추출하였다. 수집된 추출액은 3M 여과지로 여과한 후 농축기로 농축하였으며, 실험 시 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)로 10 mg/ml가 되도록 조제하였으며, DMSO의 농도는 최종 0.5%가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

기기 및 시약

HAase (Type I-S, from bovine testis), european pharmacopoeia reference standard hyaluronidase, calcium chloride, cromolyn sodium salt는 Sigma-Aldrich, Chemical Co. (USA)사의 제품을 사용하였고, sodium hyaluronate powder, potassium tetraborate 등 그 외의 시약은 모두 특급을 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 ELISA reader (Fluostar OPTIMA, BMG Labtech, Australia), water bath (BW- 10G, Jeio Tech,

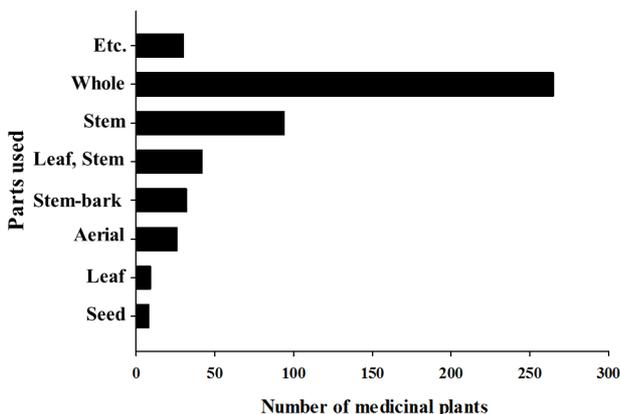


Fig. 1. Classification of 500 medicinal plants on the basis of parts utilized.

Korea), 점도측정용 Ubbelohde viscometer는 Cannon사 (USA) 제품을 사용하였다.

1차 스크리닝을 통한 천연물 HAase 저해활성 측정

500종의 천연물 추출물에 대한 HAase 저해활성은 Morgan-Elson assay 방법을 변형하여 사용하였다[18]. 정량원리는 HA가 HAase에 의해 분해되어 생성된 N-acetylglucosamine의 정량을 DMAB solution (p-dimethylaminobenzaldehyde 0.4 g, acetic acid 35 ml, 10 N HCl 5 ml)으로 발색시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 비색 정량하였다. 정량법은 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (10 mg/ml) 6 µl를 천연물 시료 6 µl와 혼합시킨 후 37°C 항온수조에서 20분간 반응 시켰다. 대조군은 천연물 시료 대신 acetate buffer를 사용하였다. HAase를 활성화시키기 위해 혼합액에 12.5 mM CaCl₂ 6 µl를 가한 후 37°C 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 기질용액 hyaluronate (6 mg/ml) 12 µl를 반응액에 첨가하여 37°C 항온수조에서 40분간 반응시켰다. 기질-효소 반응 정지를 위해 0.4 N NaOH 6 µl와 0.4 M potassium tetraborate 6 µl를 반응액에 가하여 100°C에서 3분간 반응시킨 후, 상온에서 완전히 냉각시켰다. 기질-효소 혼합액에 발색제인 DMAB solution 180 µl를 가한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 OD값을 측정하였다. 저해활성은 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition (\%)} = \frac{\text{ODc-ODs}}{\text{ODc}} \times 100$$

ODc는 540 nm에서의 대조군의 흡광도, ODs는 540 nm에서의 시료용액의 흡광도이며, 각 실험은 3회 반복하여 평균값을 계산하였다.

2차 스크리닝을 통한 천연물 농도 별 HAase 저해활성 실험

1차 스크리닝을 통해 50% 이상의 HAase 저해율(%)을 보인 천연물 3종을 선별하여 농도 별 저해활성을 확인하였다. 즉, 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)로 각 천연물시료를 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 희석한 뒤 HAase 저해활성을 측정하여 농도 별 저해율을 계산하였다. 양성대조군인 항알레르기 약물인 DSCG를 동일 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml)로 하여 HAase 저해율 변화를 비교 분석하였으며, 효소활성 저해율을 산출하여 IC₅₀ 값으로 평가하였다. 이때 IC₅₀은 효소 활성을 50% 저해하는 농도이다.

우베로데 점도계(Ubbelohde viscometer)를 이용한 HAase 저해 활성 측정

1차 스크리닝을 통해 50% 이상의 저해율을 보인 천연물 3종을 European Pharmacopoeia 7.0에 명시된 Ubbelohde viscometer방법[4]으로 HAase 저해활성을 측정하였다. 유럽 약전(European Pharmacopoeia) 기준 HAase (1113.17

IU/mg)을 희석액[Gelatin hydrolysate enzymatic 0.7%, 1 M PBS (pH 6.4) 500 ml, 증류수 500 ml]으로 희석한 후 0.66 IU/ml의 농도로 조성하였다. 실험군에는 66 IU/ml의 농도로 희석한 HAase 1 ml와 희석액에 녹인 천연물 시료(10 mg/ml) 2 ml를 증류수 97 ml를 혼합하여 HAase solution을 제조하였다. 기질액은 hyaluronate 0.5 g에 증류수 100 ml 혼합 한 후 12시간 동안 4°C에서 교반하였고, 점도측정은 점도계를 37°C 항온수조 내에 설치하여 측정하였다. 점도측정 방법은 기질액 5 ml와 PBS (pH 6.4) 7.5 ml, HAase solution 2.5 ml를 혼합한 뒤 Fig. 2의 A 부분으로 시료를 넣었다. 그 후 A, B 부분을 공기가 통하지 않도록 막은 뒤 C 부분을 석션(suction)하여 D부분 까지 시료 혼합액에 정지하도록 하였다. A, B 부분을 다시 공기가 통하게 하여 혼합액이 흐르도록 한 뒤 E부분에서 F부분까지 시료가 흐르는 시간을 6회 반복 측정하였다. 즉, 점액성분을 가진 당 복합체인 HA를 기질로 천연물시료와 HAase의 혼합액과 반응시켜 glucuronic acid와 glucosamine 사이의 β - (1,4) 당 결합을 가수분해하는 효소반응에 의해 점도계 내에서 혼합액이 흐르는 시간(t)의 변화와 점성도(η)의 기울기변화를 계산하여 시료의 활성을 다음 식으로 계산하였다.

$$\eta_r = (k \times t) / 0.6915$$

k = 점도계 상수(mm^2/s^2)

t_2 = 용액의 유출 시간(초)

0.6915 = 37°C 에서 buffer solution의 운동 점도(mm^2/s)

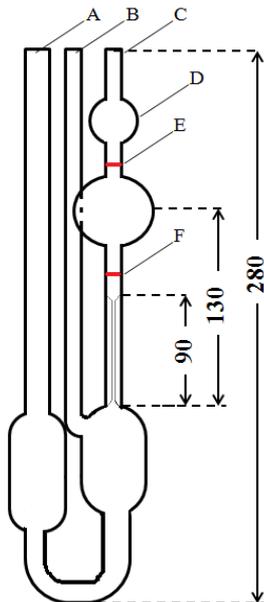


Fig. 2. Structure of Ubbelohde viscometer for measuring viscosity (lengths in mm). Symbol : (A) tube A, (B) tube B, (C) tube C, (D) bulb, (E, F) marking line; to measure the efflux time, allow the liquid sample to flow freely down past mark E, measuring the time for the meniscus to pass from mark E to mark F.

다음 식으로 Specific activity (IU/mg)를 계산하였다.

$$\text{Specific activity (IU/mg)} =$$

$$\frac{\text{기준 HAase의 평균 기울기}}{\text{천연물 시료액의 평균 기울기}} \times \frac{\text{기준 HAase의 양}}{\text{천연물 시료액의 양}} \times A$$

A = 유럽약전 기준 HAase activity (IU/mg)

결과 및 고찰

천연물의 HAase 저해 활성(1차 스크리닝)

현재 HAase의 기능 가운데 염증반응, 암 전이의 촉진과 관련된 연구가 보고됨에 따라[10, 12], 이를 저해하는 HAase inhibitor의 소재 탐색에 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서 우선 천연물 500종 가운데 HAase저해 활성이 우수한 50종의 천연물을 선별한 결과, Table 1과 같다. 그 가운데 HAase 저해활성이 가장 우수한 천연물 3종은 때죽나무 (*Styrax japonica*) 줄기 57.28%, 매화말발도리(*Deutzia coreana*) 줄기 53.50%, 박달목서(*Osmanthus insularis*) 줄기 53.19% 순으로 억제 효과를 보였다. 시험에 사용된 추출물의 기원은 줄기 추출물이 다른 부위 보다 HAase 저해 효과가 크게 나타났다. 이 같이 식물 부위 별 HAase 저해활성의 차이는 Dhananjaya [6]등이 인디카망기페라(*Mangifera indica*)의 줄기껍질의 메탄올 추출물이 HAase에 강력한 저해활성 효과가 있다고 보고한 바 있고, Tarannum [28] 등이 앵무새 나무(*Butea monosperma*)의 줄기껍질 에탄올 추출물에서 HAase 저해효과가 우수하다고 보고한 바 있어, 우리의 연구결과와 유사하였다.

천연물 농도 별 HAase 저해활성(2차 스크리닝)

1차 스크리닝을 통해 선별된 때죽나무, 매화말발도리, 박달목서 추출물들을 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 조성하여 농도 별 HAase 저해활성을 확인하였다(Table 2, Fig. 3). 때죽나무, 매화말발도리의 추출물은 2 mg/ml의 농도에서 양성 대조군인 DSCG과 유사한 저해율을 보였다. 천연물 2 mg/ml 이하의 농도에서는 모든 천연물이 양성 대조군보다 낮은 저해활성을 보였으며, 모든 시료에서 농도 의존적으로 HAase 저해활성이 증가하였다. 이들 추출물에 의한 HAase 저해율을 IC₅₀값으로 계산한 결과, Table 3과 같이 때죽나무 추출물 1.67 mg/ml, 매화말발도리 1.57 mg/ml, 박달목서 추출물 은 2.01 mg/ml에서 각각 IC₅₀값을 나타내었다. 양성대조군으로 사용된 DSCG의 IC₅₀값은 0.22 mg/ml으로 때죽나무 추출물의 IC₅₀값보다 7.59배 높은 억제효과를 보였다. HAase는 신체 내 상해 시 활성화되어 염증반응을 유발하고, 혈관 결합조직을 분해하여 암 전이를 촉진하는 효소로 알려져 있다[9, 12]. 따라서 때죽나무, 매화말발도리의 추출물들은 HAase 저해를 통해 염증유발 및 암 전이를 저해할 수 있다. 이와 유사한 연구로는 Lee 등[16]은 때죽나무 줄기와 잎에서 분리된 성분이 항염증 활성을 가지고 있다고 보고한 바 있고, Kwon 등[14]은 때죽나

Table 1. Hyaluronidase inhibitory rate (%) of 50 plant extracts (2 mg/ml) selected from five hundred different medicinal herbs (primary screening)

Scientific name	Part used	Hyaluronidase inhibitory rate (%) on medicinal plant extracts (2 mg/ml)
<i>Styrax japonica</i>	Stem	57.28
<i>Deutzia coreana</i>	Stem	53.50
<i>Osmanthus insularis</i>	Stem-bark	53.19
<i>Gleditsia japonica</i>	Stem-bark	49.79
<i>Euonymus pauciflorus</i>	Stem	49.21
<i>Geranium knuthii</i>	Aerial	47.17
<i>Syringa reticulata</i>	Stem	46.86
<i>Daphniphyllum macropodium</i>	Stem	46.25
<i>Salix rorida</i>	Stem	45.74
<i>Amaranthus mangostanus</i>	Whole	44.82
<i>Dendranthema zawadskii</i>	Whole	44.21
<i>Spiraea chinensis</i>	Stem	43.60
<i>Lonicera praeiflorens</i>	Stem	40.74
<i>Thalictrum minus</i>	Whole	40.02
<i>Cleyera japonica</i>	Stem-bark	38.80
<i>Quercus dentata</i>	Stem	37.27
<i>Hierochloa odorata</i>	whole	36.86
<i>Synurus excelsus</i>	Whole	36.14
<i>Lobelia sessilifolia</i>	Seed	35.22
<i>Valeriana officinalis</i>	Stem, radix	34.71
<i>Pseudostellaria coreana</i>	Whole	34.51
<i>Stachys riederi</i>	Whole	34.30
<i>Ranunculus cantoniensis</i>	Whole	34.20
<i>Artemisia capillaries</i>	Whole	33.90
<i>Cornus kousa</i>	Stem-heartwood	32.57
<i>Rhamnus koraiensis</i>	Stem	32.36
<i>Chenopodium ficifolium</i>	Whole	31.45
<i>Campanula punctata</i>	Whole	29.40
<i>Juncus papillosus</i>	Whole	29.40
<i>Lonicera vidalii</i>	Stem	29.30
<i>Prunella vulgaris</i>	Whole	28.38
<i>Jeffersonia dubia</i>	Whole	28.08
<i>Hibiscus hamabo</i>	Stem-bark	26.34
<i>Artemisia selengensis</i>	Whole	25.83
<i>Hydrangea petiolaris</i>	Leaf	23.68
<i>Liriope platyphylla</i>	Whole	23.28
<i>Hemerocallis fulva</i>	Whole	22.97
<i>Imperata cylindrical</i>	Leaf	20.83
<i>Ostericum koreanum</i>	Whole	18.68
<i>Vitis coignetiae</i>	Stem	18.37
<i>Boehmeria nivea</i>	Whole	17.86
<i>Themeda triandra</i>	Whole	16.33
<i>Salvia plebeian</i>	Whole	16.13
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Leaf, stem	11.94
<i>Senecio vulgaris</i>	Whole	11.33
<i>Zoysia japonica</i>	Whole	10.51
<i>Hieracium coreanum</i>	Whole	7.86
<i>Paulownia coreana</i>	Leaf, stem	4.39
<i>Pseudixus japonicas</i>	Whole	3.16
<i>Disporum ovale</i>	Whole	-

Symbol; - : no effect

Table 2. Hyaluronidase inhibitory rate (%) on concentration (mg/ml) of three plant extracts selected from fifty medicinal herbs (secondary screening)

Scientific name	Part used	Hyaluronidase inhibitory rate (%) on concentration (mg/ml)			
		0.25	0.5	1	2
<i>Styrax japonica</i>	Stem	22.26±1.32	24.28±2.37	31.03±2.03	57.53±1.48
<i>Deutzia coreana</i>	Stem	25.69±2.11	29.72±1.10	37.29±2.27	57.42±1.78
<i>Osmanthus insularis</i>	Stem-bark	12.09±1.96	14.68±2.44	23.96±1.86	50.19±1.17

Data represent the means ± SD of three independent experiments performed in triplicate.

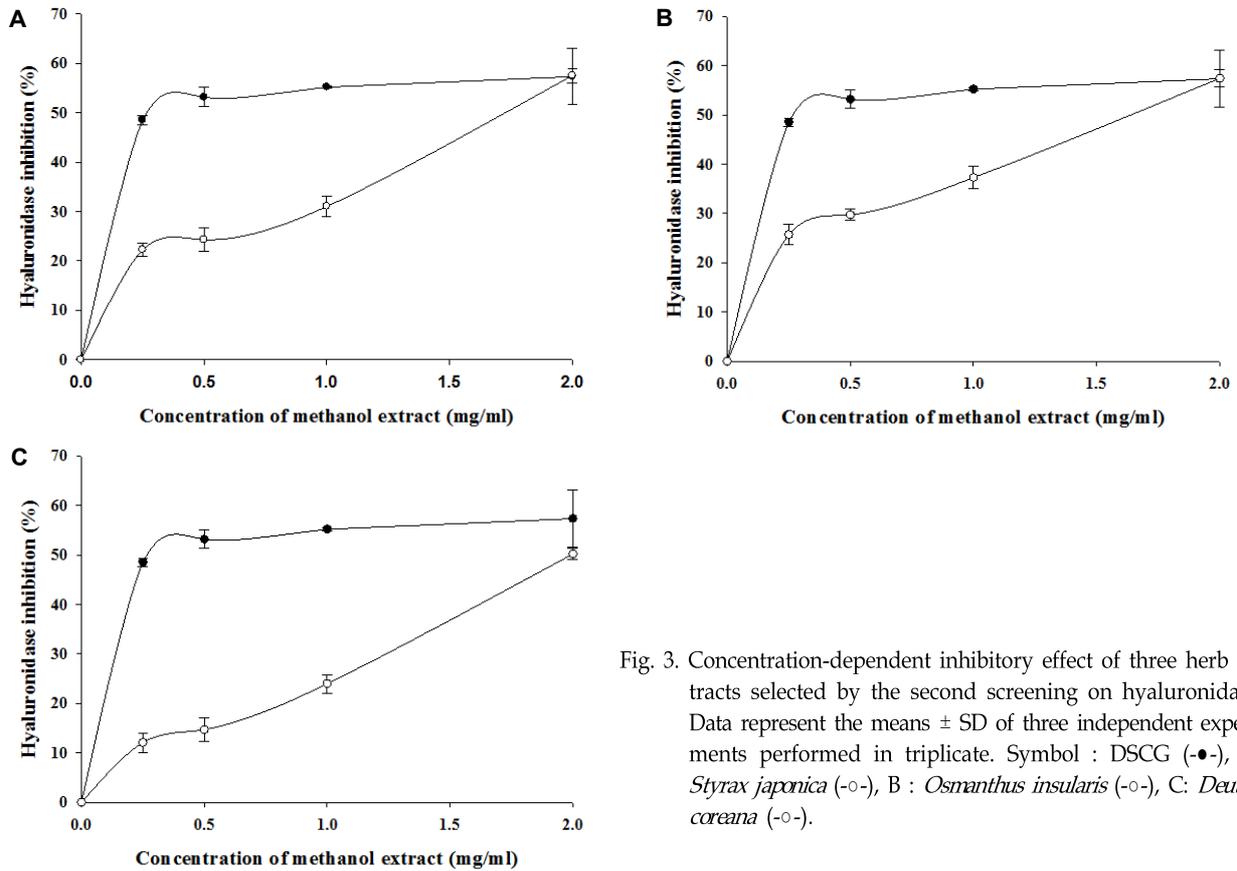


Fig. 3. Concentration-dependent inhibitory effect of three herb extracts selected by the second screening on hyaluronidase. Data represent the means ± SD of three independent experiments performed in triplicate. Symbol : DSCG (-●-), A: *Styrax japonica* (-○-), B : *Osmanthus insularis* (-○-), C: *Deutzia coreana* (-○-).

Table 3. Inhibitory effect [IC₅₀ (mg/ml)] on hyaluronidase activity of three plant extracts and DSCG

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Styrax japonica</i> methanol extract	1.66
<i>Deutzia coreana</i> methanol extract	1.57
<i>Osmanthus insularis</i> methanol extract	2.01
Disodium cromoglycate (DSCG)	0.21

무로부터 분리한 styryxlignolide F를 인간 폐암세포에 적용 시 항암효과가 있는 것으로 보고하였다. 따라서 HAase 저해 활성이 가장 우수한 때죽나무는 항염증, 암 전이의 저해제로서 추가적인 연구가 필요하다. 본 연구 결과 HAase 저해효과가 있는 것으로 처음 알려진 매화말발도리, 박달목서, 주엽나무 추출물에 대한 식물화학적 성분과 효능분석은 지속적으로

연구가 요구된다.

우베로데 점도계(Ubbelohde viscometer)를 이용한 HAase 저해활성 측정

2차 검색결과 HAase 저해율이 50% 이상을 보인 때죽나무, 매화말발도리, 박달목서 추출물을 우베로데 점도계(Ubbelohde viscometer)를 이용한 HAase 저해활성 측정법으로 확인 실험한 결과 Fig. 4와 같다. 효소액 HAase는 유럽약전 기준 효소 활성 수치인 0.667 IU/ml로 조제하고, 여기에 양성대조군인 DSCG와 천연물 추출물(0.2 mg/ml)을 처치하였을 때, DSCG 처치군에서는 음성 대조군(미처치군) 보다 38.1% 활성이 저해되었고, 때죽나무 추출물은 34.8% 저해, 매화말발도리 추출물은 34.8% 저해 및 박달목서 추출물은 5.1%의 효소활성이 각각 저해되었다. 따라서 2차 선발된 천연물을 대상으로

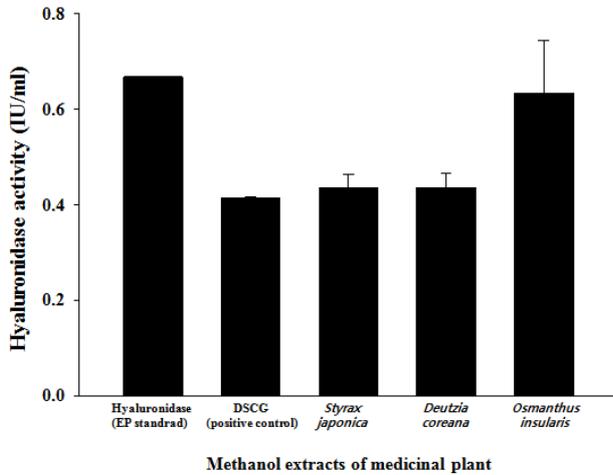


Fig. 4. Determining hyaluronidase inhibitory rate (%) of three herb extracts by Ubbelohde viscometer. Data represent the means \pm SD of three independent experiments performed in triplicate.

HAase 저해효과를 점도측정 법으로 확인한 결과, 때죽나무, 매화말발도리, 박달목서 순으로 저해효과를 보여 1차, 2차 스크리닝 결과와 유의성 있는 연구결과를 보였다.

최근 HAase는 인체 염증 시 고분자 HA의 β -(1,4) 결합을 가수분해하여 생성된 저분자 분해산물들이 염증유발에 관여하는 것으로 보고되고 있다[3, 10]. 따라서 HAase 저해효능은 염증 발현인자와 밀접한 관련이 있다[9]. 이에 따른 연구로, Yun 등[32]이 때죽나무 줄기에서 얻은 MeOH추출물이 염증 관련인자인 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-2 (IL-2)를 발현시키며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK), glycoprotein을 저해하여 항 염증반응 유도를 보고 한 바 있으며, Lee 등[17]이 때죽나무 줄기껍질 추출물을 마우스 간 세포주인 BNL CL. 2 cell에 처리하여 염증관련인자인 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β)를 RT-PCR과 Western blot을 통하여 발현량을 확인하여 항염증 효과를 보고하였다. 결과적으로, 때죽나무 추출물은 HAase를 저해하여 HA 가수분해를 차단하며, 저분자 분해산물에 의한 염증유발을 억제하는 것으로 판단된다. 이상과 같이 HAase 억제효과를 나타내는 천연물 추출물을 바탕으로 효능 물질의 분리와 구조에 관한 연구는 향후 성형외과 분야에서 주입된 필러(filler)의 분해 방지, 항 염증제, 알레르기 저해제를 포함한 다기능성 물질로 개발이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행하였음

References

- Belsky, E. and Toole, B. P. 1983. Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ* **12**, 61-66.
- Bertolami, C. N. and Donoff, R. B. 1978. Hyaluronidase activity during open wound healing in rabbits: A preliminary report. *J Surg Res* **25**, 256-259.
- Borchard, K., Puy, R. and Nixon, R. 2010. Hyaluronidase allergy: a rare cause of periorbital inflammation. *Australas J Dermatol* **51**, 49-51.
- Commission European Pharmacopoeia. 2012. *European Pharmacopoeia 7.0*, pp. 2190-2191, 7th ed., Council of Europe.
- Duran-Reynals, F. 1928. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *Compt rend Soc biol* **99**, 6-7.
- Dhananjaya, B. L., Zameer, F., Girish, K. S. and D'Souza, C. J. 2011. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. *Indian J Biochem Biophys* **48**, 175-183.
- Feost, G. I., Csoka, T. and Stern, R. 1996. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trans Glycosci Glycotech* **8**, 419-434.
- Geggins, J. F., Fullmer, H. M. and Steffik, A. J. 1968. Hyaluronidase activity of human gingiva. *Arch Pathol* **85**, 272-274.
- Girish, K. S. and Kemparaju, K. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase a biological overview. *Life Sci* **80**, 1921-1943.
- Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, T. 1992. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**, 1439-1442.
- KaKehi, K., Kinoshita, M. and Yasueda, S. I. 2003. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **25**, 347-355.
- Kovar, J. L., Johnson, M. A., Volcheck, W. M., Chen, J. and Simpson, M. A. 2006. Hyaluronidase expression induces prostate tumor metastasis in an orthotopic mouse model. *Am J Pathol* **169**, 1415-1426.
- Kreil, G. 1995. Hyalurobidases-a group of neglected enzymes. *Protein Sci* **4**, 1666-1669
- Kwon, O. W., Kim, W. J. and Lee, H. J. 2014. Anti-cancer activity of *Styrax japonica* Bark extracts. *J Korean Wood Sci Tech* **42**, 68-77.
- Laurent, T. C. and Fraser, J. R. 1986. The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found Symp* **124**, 9-29.
- Lee, J. and Lim, K. T. 2010. Apoptotic activity of ethanol extract from *Styrax japonica* Siebold et al Zuccarini in HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* **131**, 210-215.
- Lee, J. and Lim, K. T. 2012. Inhibitory effect of *Styrax Japonica* Siebold et al. Zuccarini glycoprotein (38 kDa) on interleukin-1 β and induction proteins in chromium(VI)-treated BNL CL.2 cells. *Mol Cell Biochem* **367**, 103-111.
- Lee, S. J., Jung, D. S., Bu, H. J., Yang, H. C., Riu, K. Z. and

- Lee, N. H. 2001. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Korean J Pharmacogn* **32**, 175-180.
19. Menzel, E. J. and Farr, C. 1998. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett* **131**, 3-11.
20. Meyer, K. and Palmer, J. W. 1934. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* **107**, 629-634.
21. Meyer, K. 1947. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev* **27**, 335-359.
22. Mohan, J., Panda, J. N., Singh, U. S. and Moudgal, P. P. 1989. Studies on antifertility effect of gossypol acetic acid in domestic cocks. *J Reprod Fertil* **85**, 73-78.
23. McRorie, R. A. and Williams, W. L. 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. *Annu Rev Biochem* **43**, 777-803.
24. Oremosu, A. A., Duru, F. I. and Okanlawon, A. A. 2003. Aspirin augments hyaluronidase induced adhesion inhibition. *Nig J Health Biomed Sciences* **2**, 108-110.
25. Rapport, M. M., Weissmann, B., Linker, A. and Meyer, K. 1951. Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid, from hyaluronic acid. *Nature* **168**, 996-997.
26. Salvati, E. P. and Kratzer, G. L. 1956. Advantages of local over spinal anesthesia in anorectal surgery. *Surg Gynecol Obstet* **103**, 434-436.
27. Storey, B. Y., Lee, M. A., Muller, C., Ward, C. R. and Wirtshafter, D. G. 1984. Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol Reprod* **31**, 1119-1128.
28. Tarannum, S., Mohamed, R. and Vishwanath, B. S. 2012. Inhibition of testicular and *Vipera russelli* snake venom hyaluronidase activity by *Butea monosperma* (Lam) Kuntze stem bark. *Nat Prod Res* **26**, 1708-1711.
29. Thet, L. A., Howell, A. C. and Han, C. 1983. Changes in lung hyaluronidase activity associated with lung growth, injury and repair. *Biochem Biophys Res Commun* **117**, 71-77.
30. Toole, B. P. and Gross, J. 1971. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* **25**, 57-77.
31. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. and Kumar, S. 1985. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324-1326.
32. Yun, K. J., Min, B. S., Kim, J. Y. and Lee, K. T. 2007. Styraxoside A isolated from the stem bark of *Styrax japonica* inhibits lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cells by suppressing nuclear factor-kappa B activation. *Biol Pharm Bull* **30**, 139-144.

초록 : 천연물로부터 히알루로니다아제 저해제 검색

황선구 · 양안나 · 김수정 · 김민기 · 김성수 · 오현정 · 이정대 · 이은주 · 남공우 · 한만덕*

(순천향대학교 자연과학대학 생명과학과)

HAase는 신체의 연골, 피부, 눈의 초자체 등에 포함된 고분자 다당류의 HA를 분해하는 효소로서 상처나 염증 질환 시 활성화되어 염증, 알레르기 유발과 관련된 효소이다. 본 연구는 500종 식물에서 각 종당 한 식물체로부터 한 천연물의 메탄올 추출물(500추출물)을 이용하여 생물학적으로 기능이 다양하고 산업적으로 활용 가능성이 많은 HAase 저해제를 검색하였다. 그 결과 HAase 저해효과가 가장 우수한 천연물 추출물은 매죽나무 줄기 추출물 57.28%, 매화말발도리 줄기 추출물 53.50%의 저해효과를 나타내었다. 이 같은 추출물들의 농도 별 저해효과를 확인한 결과 농도 의존적으로 저해율이 증가하였다. 이 같은 결과로 볼 때 매죽나무, 매화말발도리 추출물은 HAase 효소의 저해효과가 우수하여 향후 HA 분해와 관련된 항염증 및 항 알레르기 연구에 이용될 수 있다.