ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2018** Vol. 28. No. 3. 293~299 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.3.293

Anti-invasive Effect of the Solvent-partitioned Fractions from Viticis Fructus in PMA-induced HT-1080 Cells

Jaemin Son[1], Hojun Kim[2], Chang-Suk Kong[3] and Youngwan Seo[1,2]*

[1]*Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea*
[2]*Division of Marine Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 46112, Korea*
[3]*Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea*

Received January 8, 2018 / Revised March 8, 2018 / Accepted March 21, 2018

Viticis fructus (fruits of *Vitex rotundifolia*) is the dried fruit from *Vitex rotundifolia*; is a traditional medicine for treating inflammation, migraines, chronic bronchitis, headaches, eye pain, and gastrointestinal infections; and demonstrates various bioactivities, including anti-allergic, anti-cancer, and anti-inflammatory effects, which are partly due to its phenolic compound content. This study examines the inhibitory effects of viticis fructus (fruits of *Vitex rotundifolia*) on MMP-2 and MMP-9 expression using gelatin zymography and RT-PCR in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced HT-1080 fibrosarcoma cells. Fruits of *Vitex rotundifolia* were extracted twice using dichloromethane (CH_2Cl_2) and methanol (MeOH). The combined crude extracts (CH_2Cl_2 and MeOH) significantly inhibited MMP-2 and MMP-9 activities in gelatin zymography. The combined extracts were fractionated into *n*-hexane, 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH), *n*-butanol, and water, successively according to polarity. Among all solvent-partitioned fractions, 85% aq. MeOH fractions showed the strongest inhibition on the activation of MMP-2 and MMP-9 in gelatin zymography. In PMA-stimulated HT-1080 cells, the expression levels of MMP-2 and MMP-9 mRNA were also greatly inhibited by the 85% aq. MeOH fraction. These results suggest that viticis fructus can be used as an excellent source for anti-invasive agents.

Key words : Anti-invasive, gelatin zymography, HT-1080, MMP inhibition, *Vitex rotundifolia* fructus

서 론

기질 금속단백질분해효소(MMP)는 metzincin superfamily에 속하는 아연 및 칼슘 의존성 펩타이드 내부가수분해 효소로서 현재 인체에서 발견되는 MMP 단백질들은 26개 정도가 알려져 있다[13, 14]. 이들은 세포외기질과 기저막 단백질의 분해와 개조에 관여하며 염증, 면역, 신경돌기 성장, 뼈의 재형성과 같은 생리학적인 과정에 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다[4, 7, 8]. 최근에 MMP들이 펩타이드 성장인자, 타이로신 키나아제 수용체, 세포접합분자, 사이토카인과 케모카인과 같은 다양한 기질에 작용할 수 있다는 것이 보고되었다[2, 6, 12]. MMPs의 조절장애는 폐기관장애, 자가면역질환, 암 등과 같은 다양한 질병에서 보고되고 있다[6, 10, 14]. 지금까지 암에 대한 연구는 주로 이상증식이나 생존제고 효과를 갖게 되는 암세포 변이에 초점을 맞추어져 왔으나 종양 미세환경 특히 세포외기질이 암진행에 주요한 역할을 하는 것으로 나타나 세포외기질에서의 가수분해작용을 조절하는 연구가 진행되고 있다[3]. MMPs는 거의 모든 인체 암세포에 존재하며 이들이 신생혈관, 종양성장, 전이를 촉진시켜 암의 진행이 가속화된다[1]. 인체 암세포에서 거의 모든 MMP에 대한 조절장애가 일어나는데 이 중에서 MMP-2와 MMP-9가 종양의 전이와 침투능력에 가장 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[9, 11].

만형자는 마편초과(Verbenaceae)에 속하는 염생식물 순비기나무(*Vitex rotundifolia* L.)의 열매를 건조한 것으로 순비기나무는 우리 나라 중부 이남의 염분성분이 높은 바닷가 모래땅에 자라는 상록관목으로 중국과 일본에도 자생하는 것으로 알려져 있다. 만형자의 성분으로는 monoterpene, diterpene, flavonoid, phenol, alkaloid 등이 분리 보고되어 있다. 한방에서 만형자는 진통, 진정, 소염의 목적으로 만성중이염, 습진, 이명, 난청, 두통, 신경통 등에 사용되어 왔으며 약리작용으로는 항염증작용, 항암작용, 항알러지, 항돌연변이, 진정효과 등이 보고되어 있다[15, 16].

습지식물 자원으로부터 새로운 생리활성물질을 탐색하는 중에 바닷가 모래밭에서 자라는 순비기나무의 열매인 만형자 추출물이 MMP-2와 MMP-9에 유의적인 억제활성을 나타내는 것이 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 염생식물을 이용한

***Corresponding author**
Tel : +82-51-410-4328, Fax : +82-51-404-4750
E-mail : ywseo@kmou.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.

생리활성 소재 개발 연구의 일환으로 만형자의 유기용매 추출물과 분획물을 제조하고 이 시료들이 인체 섬유육종 암세포의 침투와 전이에 중요하게 작용하는 MMP-2와 MMP-9의 발현 조절에 미치는 영향을 검토하여 암 침윤 억제를 통한 항암소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료추출 및 순차분획

실험에 사용된 만형자는 '옴니허브'에서 건조상태의 만형자(Viticis fructus)를 구입하여 methylene chloride (Duksan, Korea)에 침지시켜 24시간 방치 후 여과하여 추출액을 얻었으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 남은 잔사에 동량의 MeOH (Duksan, Korea)을 첨가하여 동일한 과정으로 추출액을 얻었고, 추출액은 감압농축하여 각각 9.35 g과 9.00 g의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물들은 합한 후에 용매극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Duksan, Korea), 85% aq. MeOH, *n*-BuOH (Duksan, Korea), H_2O 분획물을 각각 6.04 g, 5.94 g, 2.81 g, 3.99 g을 얻었다.

세포배양

HT-1080 인간 섬유육종세포는 5% CO_2, 37°C incubator (Formascientific, Japan)하에서 T-75 조직 배양 플라스크 (Nunc, Roskilde, Denmark)를 사용하여 단층배양 되었다. 배양액으로는 100 unit/ml penicillin-streptomycin (Gibco-BRL, USA)과 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GenDEPOT, USA)이 함유된 RPMI 1640 (GenDEPOT, USA)을 사용하였다. 배양된 세포는 cell culture dish에서 37℃, 5% CO_2 incubator (Formascientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 5~6회 PBS buffer로 세척을 한 후, 배지를 갈고, 0.05% Trypsin-0.02% EDTA (Gibco-BRL, USA)로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하였다.

세포독성

HT-1080 세포의 세포생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다[5]. MTT assay는 탈수소 효과작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT (Sigma aldrich, USA)를 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 검사법이다. 각각 농도별로 준비한 시료를 세포주에 처리하고, 대조군으로 시료대신에 PBS를 처리하였다. 처리 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 동안 배양한 후, 세포를 washing하고 100 μl의 MTT용액(1 mg/ ml)을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 환원되어 생성된 MMT formazan을 100 μl의 DMSO (Duksan, Korea)에 녹여 540 nm에서 ELISA plate reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 구하였다.

Gelatin zymography를 이용한 MMP 활성 측정

HT1080 세포를 serum free medium를 사용하여 24 well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 24시간 동안 고착시키고 일정한 농도의 시료를 처리하여 1시간 동안 배양 후, MMP를 발현시키기 위하여 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10 ng/ml, Sigma aldrich, USA)를 첨가하여 24시간 동안 자극하여 배양액을 얻었다. 얻은 배양액에 함유된 전체 단백질 함량은 Bradford 단백질 결정법에 의하여 정량하여 같은 양의 단백질을 포함하는 조정배지가 되게 하여 1.5 mg/ml gelatin (Sigma aldrich, USA)을 함유한 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (비환원조건, Duksan Korea)에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에 polyacrylamide gel은 실온에서 2.5% Triton X-100 (JUNSEI, Japan)이 함유된 50 mM Tris–HCl (pH 7.5)로 30분씩 2회 세척 한 뒤에 10 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris–HCl 및 150 mM NaCl을 함유한 developing buffer를 이용하여 37℃에서 48시간 배양하여 MMP에 의한 gelatin의 가수분해를 유도하였다. MMP에 의해 가수분해된 gelatin의 영역은 0.5% Coomassie brilliant blue 250 (LPS solution, Korea)로 gel을 30분간 염색한 후 탈색용액 (methanol : acetic acid : water = 50 : 10 : 40)으로 탈색하여 관찰하였으며 gelatin이 분해되어 투명하게 나타나는 band의 크기를 통해 MMP-2와 MMP-9의 활성을 측정하였다. Gelatin zymography에 나타난 전기영동의 band intensity는 Quantity One (Bionner, Daejeon, Korea) 프로그램을 사용하여 밝은 부분의 면적을 측정하여 그래프로 나타내었다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction에 의한 mRNA 분석

배양된 HT-1080 섬유육종세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 Trizol reagent (ambion, life technologies™, USA)로 RNA를 추출 및 정량하였다. 동량의 RNA (2 μg)로부터 components mixture (Invitrogen, life technologies™, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

Target cDNA는 다음 primer들을 사용하여 증폭되었다: MMP-2에 대해서 forward 5′-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GA-3′와 reverse 5′-CAT GTA GCC ATG AGG TCC ACC AC-3′; MMP-9에 대해서 forward 5′-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3′와 reverse 5′-CAC TTG TCG GCG ATA AGG-3′; β-actin에 대해서 forward 5′-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3′와 reverse 5′-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3′.

PCR PreMix (BIONEER, Daejeon, Korea)에 합성된 cDNA와 primer를 반응시킨 다음, T100 Thermal Cycler (Bio-Rad,

CA, USA)을 이용하여 95℃에서 5분간 pre-denature, 95℃에서 45초간 denature, 60℃에서 1분간 annealing cycle, 72℃에서 45초간 extension 과정을 30번 반복함으로써 증폭시킨 후, 72℃에서 10분 동안 마지막 extension을 시키고 4℃에서 종결, 보관하였다. 증폭된 PCR 산물들은 TAE buffer (Biosesang, Kyunggido, Korea)를 전해질로 사용한 1.5% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분간 전기영동시킨 후 ethidium bromide (Bionner, Daejeon, Korea) 용액에서 30분 간 반응시킨 후 UV (Davinch-Chemi imager™, CAS-400SM, Davinch-K, Seoul, Korea) 하에서 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. Gelatin zymography와 마찬가지로 증폭된 PCR 산물들을 이용한 전기영동의 band intensity도 Quantity One (Bionner, Daejeon, Korea) 프로그램을 사용하여 밝은 부분의 면적을 측정하여 그래프로 나타내었다.

통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차(Mean ± Standard deviation, SD)로 표시하였으며, SPSS$^+$/WIN12.0 (Statistical Package for Social Science, version 12.0) 통계프로그램을 이용하여 통계적 유의성을 검토하였다. 집단간의 유의성을 검정하기 위해 일원배치 분산분석(Oneway Analysis Of Variance: ANOVA)을 통해 분석하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 실시하여 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

세포독성에 미치는 효과

만형자의 추출물 및 유기용매 분획물이 HT-1080 섬유육종 세포에 미치는 세포독성 여부는 MTT assay로 확인하였다 (Fig. 1). 추출물 및 유기용매 분획물을 각각 10, 50, 100, 200 μg/ml 농도로 처리하여 세포생존율을 측정한 결과, 모든 시료에서 HT-1080 세포에 대하여 100 μg/ml의 처리 농도까지 80% 이상의 세포생존율을 보여 이 농도에서 추출물 및 유기용매 분획물의 MMP 억제활성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다(Fig. 1). 여기서 사용된 추출물 시료는 dichloromethane과 methanol로 각각 추출한 추출물을 합하여 사용하였다.

Gelatin zymography를 이용한 MMP-2와 -9의 생성 억제활성 측정

암의 진행과 MMPs의 발현은 직접적인 관계가 있다는 것이 여러 연구에 의해서 보고되어졌으며 그 중에서 gelatinase인 MMP-2와 -9은 종양세포의 전이와 침윤에 특히 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 만형자 추출물 및 용매 분획물들이 HT-1080 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 분비에 미치는 효과를 조사하였다. 이를 위하여 일정한 농도의 시료를 1시간 처리하고 10 ng/ml 농도의 PMA를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 배지의 상층액은 gelatin zymography법을 통해 MMP-2 및 MMP-9 단백질의 활성을 관찰하였다. PMA를 단독 처리한 HT-1080 세포와 비교할 때 만형자 추출물은 100, 50, 10 μg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 MMP- 2와 -9의 gelatin 분해활성을 감소시켰다(Fig. 2, Fig. 3). 따라서 MMP 억제활성성분을 추적하기 위하여 추출물을 용매극성에 따라 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water 분획으로 분획하였다. 이러한 용매 분획들과 PMA를 동시 처리한 HT-1080 세포에서 MMP 억제활성을 측정하였다. 모든 용매 분획들이 control 대비 MMP에 유의적인 억제활성을 나타내었다. MMP-2의 경우에 85% aq. MeOH 분획이 가장 우수한 활성을 나타내어 100, 50, 10 μg/ml의 농도에서 각각 84, 65, 41% 억제효과를 나타내었다. MMP-9의 경우에는 *n*-BuOH과 85% aq. MeOH 분획이 뛰어난 억제활성을 나타내었는데 *n*-BuOH 분획은 100, 50, 10 μg/ml의 농도에서 각각 85, 78, 68%의 억제율을 나타내었고 85% aq. MeOH 분획은 각각 80, 78, 68%의 억제율을

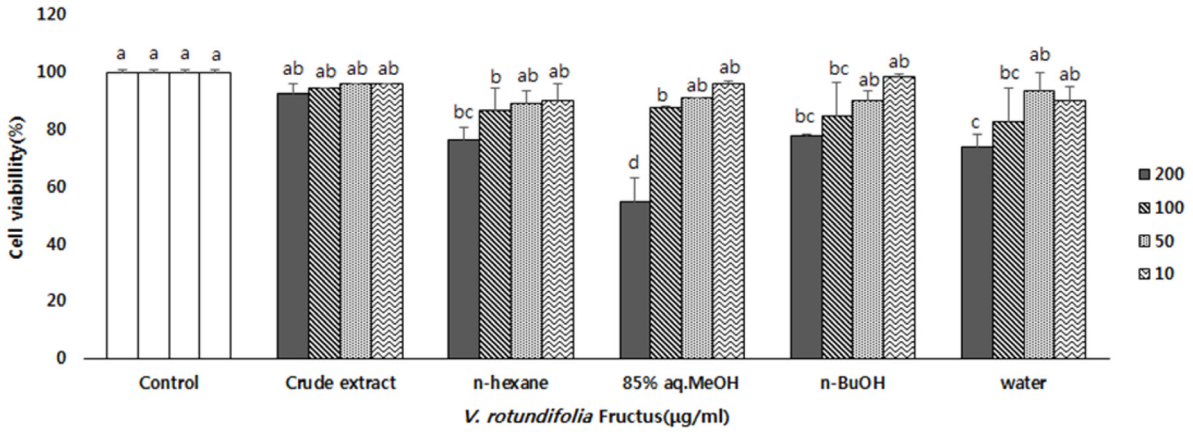

Fig. 1. Cytotoxicity of crude extract and its solvent-partitioned fractions from fruits of *Vitex rotundifolia* in HT-1080 human fibrosarcoma cells. [a-d]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

보여 주었다(Fig. 2, Fig. 3).

HT-1080 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현 측정

추출물 및 유기용매 분획물에 의해 HT-1080 세포내에서 일어나는 MMP-2와 MMP-9 유전자의 발현량을 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. PMA를 단독 처리한 세포에서는 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현이 모두 뚜렷하게 증가하였으나 PMA와 만형자 추출물 및 유기용매 분획물을 동시 처리한 세포에서는 모든 시료들이 MMP의 발현을 유의적으로 억제하였다(Fig. 4, Fig. 5). 특히 85% aq. MeOH 분획이 가장 높은 억제효과를 나타내어 MMP-2의

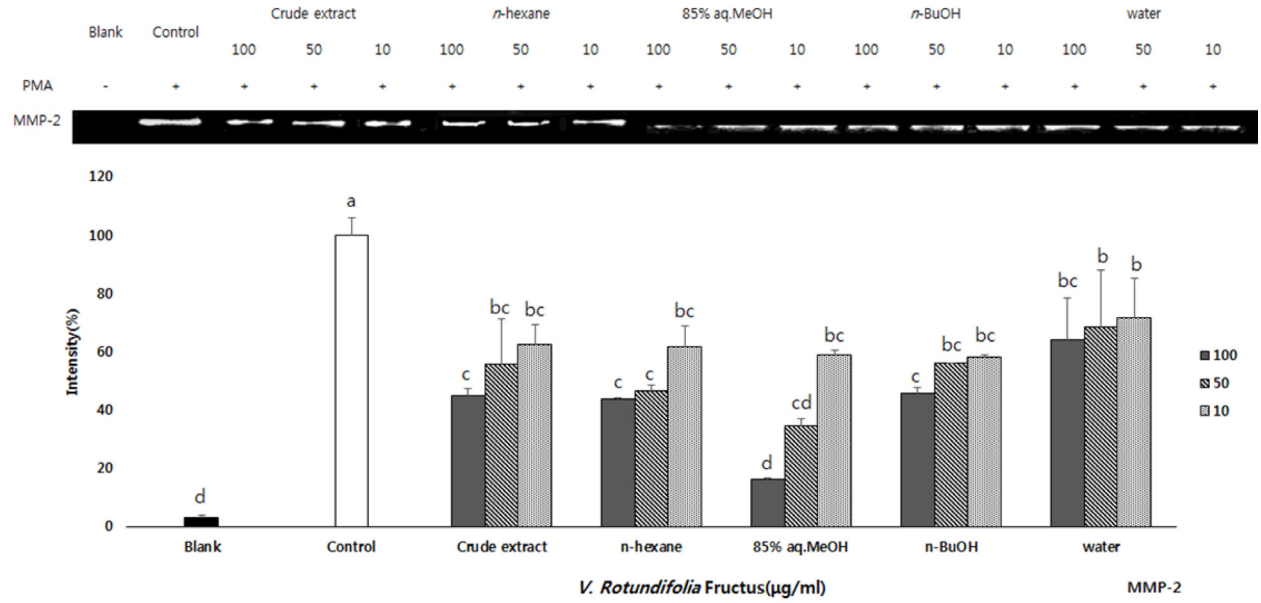

Fig. 2. Effect of crude extract and its solvent fractions from fruits of *Vitex rotundifolia* on enzymatic activity of MMP-2 tested by gelatin zymography in HT-1080 human fibrosarcoma cells. [a-d]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

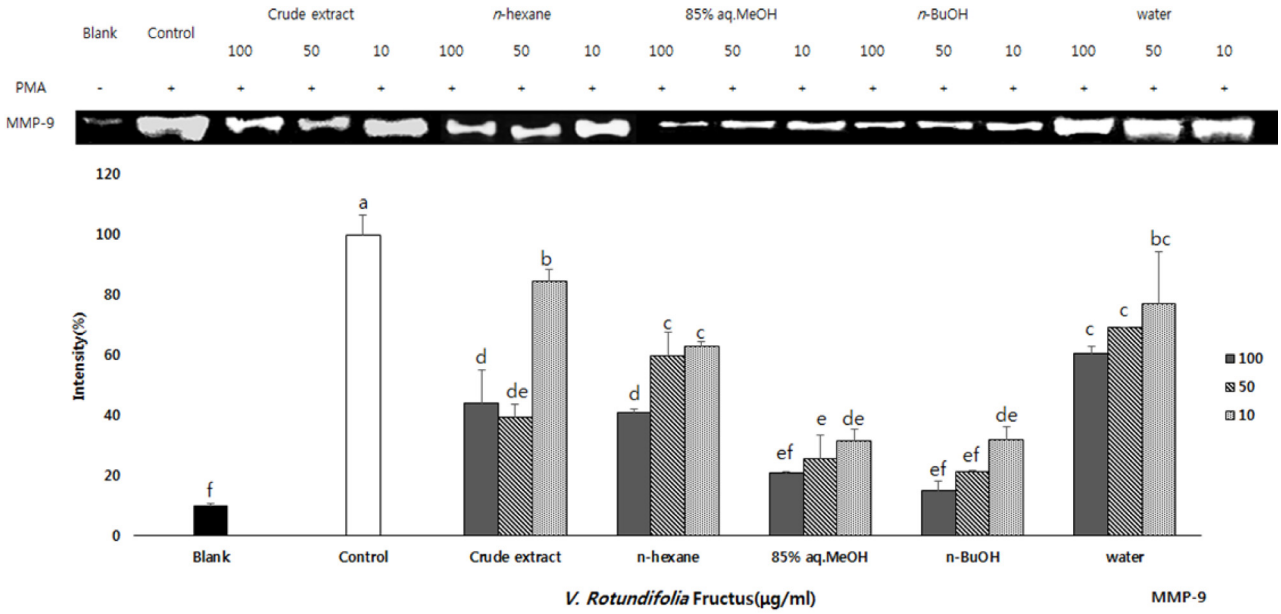

Fig. 3. Effect of crude extract and its solvent-partitioned fractions from fruits of *Vitex rotundifolia* on enzymatic activity of MMP-9 tested by gelatin zymography in HT-1080 human fibrosarcoma cells. [a-f]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

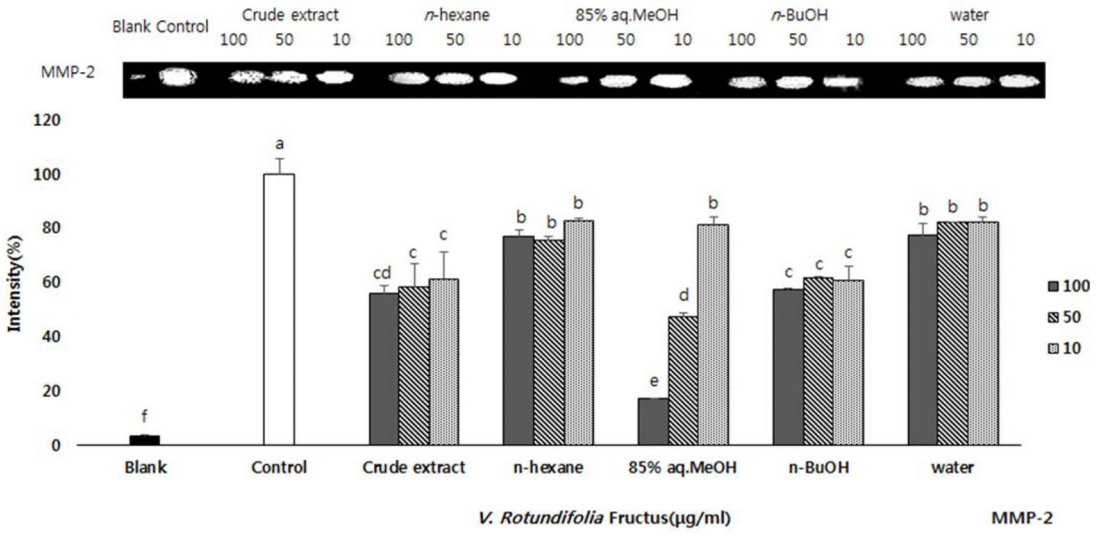

Fig. 4. Effect of crude extract and its solvent-partitioned fractions from fruits of *Vitex rotundifolia* on mRNA levels of MMP-2 observed by RT-PCR in HT-1080 human fibrosarcoma cells. [a-f]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

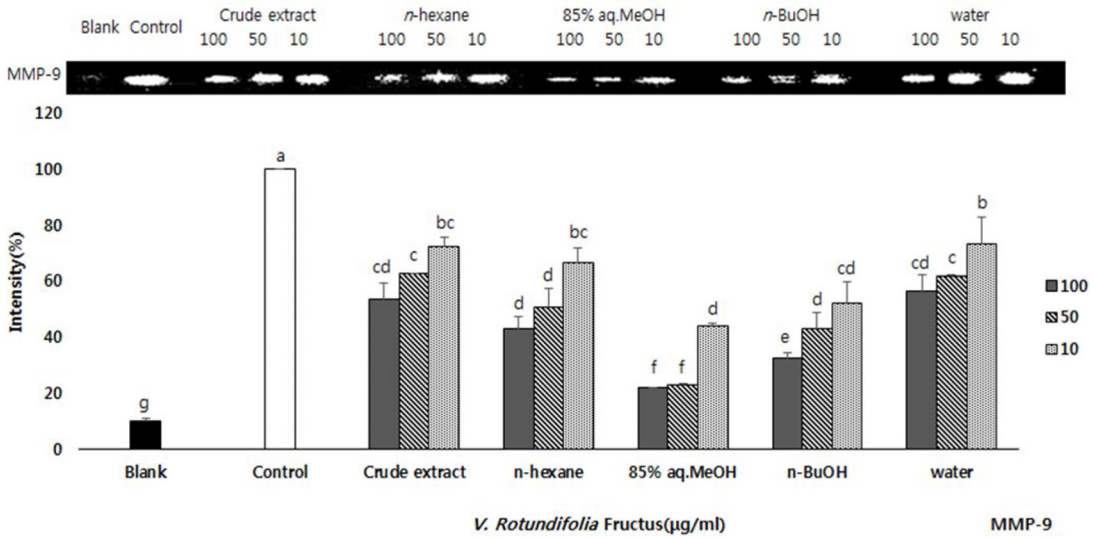

Fig. 5. Effect of crude extract and its solvent fractions from fruits of *Vitex rotundifolia* on mRNA levels of MMP-9 observed by RT-PCR in HT-1080 human fibrosarcoma cells. [a-g]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

경우에는 100, 50, 10 μg/ml의 농도에서 각각 83, 54, 18%의 억제율을 보였으며 MMP-9에 대해서는 78, 77, 56%의 억제율을 보였다. 그 다음으로 *n*-BuOH 분획이 좋은 억제효과를 보였는데 MMP-2의 경우에는 측정된 모든 농도에서 약 40%의 억제율을 나타내었으며 MMP-9의 경우에는 100, 50, 10 μg/ml의 농도에서 67, 57, 48%의 억제율을 나타내었다.

해안가 염분이 높은 염생습지에 서식하는 순비기 나무의 열매인 만형자는 우리나라의 전통적인 한약재로 사용되어 왔으며 이에 대한 항암작용을 포함한 다양한 생리활성이 보고되었지만 암전이와 관련된 연구결과는 아직 보고되지 않았다[15, 16]. 따라서 본 연구에서는 암전이 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려진 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성과 발현에 대한 만형자의 효능을 인간 섬유육종세포를 이용하여 조사하였다. 이미 앞에서 언급한 것처럼 MMP-2와 MMP-9는 종양의 전이와 침투능력에 가장 밀접한 관계가 있으며 주로 세포기저막에 있는 collagen Ⅳ를 포함한 세포외기질 성분을 가수분해하는 효소로 알려져 있다[9, 11]. 그러므로 gelatin zymography와 mRNA 발현을 이용하여 MMP-2와 MMP-9에 대한 만형자 추출물의 억제활성을 검색하였으며 검색결과 만형자 추출물은 MMP-2 및 MMP-9는 농도의존적으로 두 가지

효소를 억제하였다. 만형자의 MMP 억제효과를 나타내는 물질의 특성을 확인하기 위하여 추출물을 용매극성도에 따라 분획하여 water, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 분획물들을 얻었으며 각각의 분획물에 대한 MMP-2와 MMP-9에 대한 억제활성을 검색하였다. 용매분획들중에는 85% aq. MeOH 분획이 가장 우수한 MMP 억제활성을 나타내었으며 그 다음으로 *n*-BuOH 분획이 좋은 억제활성을 보였다. 따라서 85% aq. MeOH과 *n*-BuOH 분획에 MMP 억제활성이 높은 물질이 존재할 것으로 추측되었다. 현재 본 연구팀에서는 만형자의 85% aq. MeOH과 *n*-BuOH 분획들에 대한 일차적인 수소 NMR 분광 스펙트럼을 분석한 결과 알려진 플라보노이드인 vitexicarpin이 함유된 것으로 여겨지나 현재 전체적인 MMP 억제활성물질을 분리하기 위한 연구를 진행 중에 있다[17].

감사의 글

본 연구는 2016년 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2016R1D1A1B03932769)의 연구결과입니다.

References

1. Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A. and Cao, J. 2015. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis.* **2**, 26-34.
2. Eugenia Gentile, E. and Liuzzi, G. M. 2017. Marine pharmacology: therapeutic targeting of matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Drug Discov. Today* **22**, 299-313.
3. Gialeli, C., Theocharis, A. D. and Karamanos, N. K. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* **278**, 16-27.
4. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L. and Winberg, J. O. 2011. Regulation of matrix metalloproteinases in health and disease. *FEBS J.* **278**, 28-45.
5. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* **119**, 203-210.
6. Hu, J., Van den Steen, P. E. and Sang, Q. X. A. and Opdenakker, G. 2007. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 480-498.
7. Kieseier, B. C., Seifert, T., Giovannoni, G. and Hartung, H. P. 1999. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination. *Neurology* **53**, 20-25.
8. Mignatti, P. and Fifkin, D. B. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev*. **73**, 161-195.
9. Moss, L. A. S., Jensen-Taubman, S. and Stetler-Stevenson, W. G. 2012. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am. J. Pathol.* **181**, 1895-1899.
10. Sang, Q. X., Jin, Y., Newcomer, R. G., Monroe, S. C., Fang, X. X., Hurst, D. R., Lee, S., Cao, Q. and Schwartz, M. A. 2006. Matrix metalloproteinase inhibitors as prospective agents for the prevention and treatment of cardiovascular and neoplastic diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 289-316.
11. Shay, G., Lynch, C. C. and Fingleton, B. 2015. Moving targets: emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* **44-46**, 200-206.
12. Sternlicht, M. D. and Werb, Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**, 463-516.
13. Stocker, W, Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Ruth. F. X. and Mckay, D. D. 1995. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840.
14. Verma, R. P. and Hansch, C. 2007 Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2223-2268.
15. You, J. S., Chae, B. S., Kim, D. K., Cui, X., Park, J. S., Lee, J. H., Kim, S. H. and Shin, T. Y. 2013. Antiallergic and anti-inflammatory effects of the viticis fructus. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**, 286-290.
16. Yu, J. M., Kim, D. H. and Son, J. H. 2015. Whitening effects of solvent fractions isolated from *Vitex rotundifolia*. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**, 266-271.
17. Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujioka, S. and Kimura, Y. 2004. Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Z. Naturforsch.* **59**, 509-514.

초록 : HT-1080 세포에서 만형자 용매 추출물의 암전이 억제효과

손재민[1] · 김호준[2] · 공창숙[3] · 서영완[1,2]*

([1]한국해양대학교 해양과학기술전문대학원 해양과학기술융합학과, [2]한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경·생명과학부, [3]신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과)

본 연구는 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)에 의해 MMP 활성이 증가된 섬유육종세포에서 MMP-2와 -9의 mRNA 발현 및 단백질 활성에 대한 만형자의 억제 효과를 zymography와 RT-PCR 방법에 의해서 측정하였다. 만형자 시료는 dichloromethane에 의해서 두 번 추출되었으며 동일한 과정을 methanol를 사용하여 반복하였다. 각각의 용매에 의해서 얻어진 추출물을 합한 후에 zymography를 이용하여 이 추출물의 MMP-2와 -9에 대한 억제효과를 측정한 결과 유의적인 억제효과를 나타내었다. 억제활성 성분을 추적하기 위하여 극성에 따른 추출물의 용매분획을 실시하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-butanol, 및 water 분획층을 얻었다. 이 4가지 용매분획에 대한 MMP 억제활성을 측정하였으며 측정한 결과 85% aq. MeOH 분획층이 zymography와 RT-PCR 실험에서 MMP-2와 -9에 대해 가장 강한 억제효과를 나타내었다. 이상의 결과는 만형자 추출물이 암전이 억제제 개발을 위한 좋은 원천이 될 수 있는 가능성이 있음을 제시한다.