

Anti-invasive Effect of *Artemisia scoparia* Halophyte Extract and its Solvent-partitioned Fractions in Human Fibrosarcoma Cells

Junse Kim¹, Chang-Suk Kong², Hyun-Bo Sim³ and Youngwan Seo^{1,4*}

¹Ocean Science and Technology School, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea

²Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea

³Incheon Academy of Science and Arts, Incheon 22009, Korea

⁴Division of Marine Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea

Received October 12, 2021 / Revised October 24, 2021 / Accepted October 25, 2021

The halophyte *Artemisia scoparia* is an edible medicinal plant, with insecticidal, anti-inflammatory, anti-cholesterol, antipyretic, and antibacterial effects. The aim of this study was to assess the inhibitory effect of crude extract and solvent-partitioned fractions obtained from *A. scoparia* on MMP-2 and MMP-9 activity in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-stimulated human fibrosarcoma HT-1080 cells using four different activity tests: gelatin zymography, MMP enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), wound healing assay, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and Western blot assay. *A. scoparia* samples were extracted twice with methylene chloride (MC) and twice with methanol (MeOH). After the MC and MeOH crude extracts were combined, the combined crude extracts showed a significant inhibitory effect against MMP-2 and MMP-9 enzymes. They were then fractionated into *n*-hexane, 85% (v/v) aqueous methanol (85% (v/v) aq.MeOH), *n*-butanol, and water according to solvent polarity. Among the four solvent-partitioned fractions, *n*-hexane and 85% (v/v) aq. MeOH fractions significantly inhibited MMP-2 and MMP-9 activity and cell mobility. In addition, the *n*-hexane and 85% (v/v) aq.MeOH fractions effectively inhibited MMP-2 and -9 activity in the gelatin zymography and MMP ELISA assay. In the wound healing assay, RT-PCR, and Western blot assay, all solvent-partitioned fractions, except the H₂O fraction, significantly suppressed cell migration, as well as the expression levels of MMP-2 and -9 mRNA and proteins.

Key words : Anti-invasive, *Artemisia scoparia*, cell mobility, HT-1080, MMP inhibition

서 론

현대의학의 발달로 인간의 수명이 길어지는 반면에 암, 당뇨병, 신경퇴행성 질환과 같은 다양한 성인 만성질환 환자수가 계속해서 증가하고 있다. 통계청에 따르면 암은 현대사회에서 사망원인 중 가장 큰 부분을 차지하며, 대부분의 사람들이 가장 우려하는 문제 중 하나라고 보고했다[10]. 또한 국립암센터(NCC, 2020)는 암은 다른 장기로 전이가 되고 폐암, 간암, 담낭암 환자는 약 30%, 그리고 췌장암 환자는 약 10%의 생존율을 가지고 있다고 보고했다[14]. 현재 항암화학요법에 doxorubicin, paclitaxel, cisplatin 등의 약물이 많은 암환자를 치료하는데 사용되지만, 많은 부작용의 문제가 있으며 이를 해결하기 위해 부작용이 적은 천연소재 약물의 개발이 필요한 상황이다.

암세포의 전이 및 증식에 관여하는 기질금속단백질분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)는 아연 이온 의존성 단백질분해효소로서 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 기질 당단백질(matrix glycoprotein), 그리고 프로테오글리칸(proteoglycan)과 같은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 분해하거나 재생성한다. 또한 MMPs는 혈관신생, 아포토시스, 골형성, 모낭순환, 면역반응, 상처치료와 같은 생리학적 과정뿐만 아니라, 알츠하이머, 류마티스, 심혈관 질환, 피부궤양, 간경변 및 치주 질환과 같은 병리학적 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다[20]. MMPs의 발현은 암세포로부터 분비된 염증성 사이토카인 및 성장인자 등에 의해 조절되고, 비활성 상태의 pro-MMP (zymogen)의 형태로 분비된다. MMPs는 다른 단백질분해효소(proteinase) 및 화학물질들에 의해서 활성화되며, 활성화된 MMPs는 암세포 표면에 부착되어 ECM을 분해하면서 이동능을 가진다[8, 21]. 암세포의 침윤 및 전이에 중요한 역할을 하는 MMPs는 젤라틴분해효소(gelatinase) A와 B라고 불리는 MMP-2 (72 kDa)와 MMP-9 (92 kDa)이 있다[7, 12]. 따라서 이들의 활성 및 발현을 저해함으로써 암세포의 침윤 및 전이를 막을 수 있는 천연소재 약물 개발이 요구된다. 합성소형분자를 이용하여 MMP 저해제를 개발하기 위한 많은 시도가 있었지만 MMP 효소의 생물학적인 작용기작에 대한 이

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4328, Fax : +82-51-404-3538

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.

해도가 낮아 아직까지 선택적인 MMP 저해제가 의약품으로 개발되지는 못하였다. 특히 이러한 작용기작을 밝히기 위해서는 천연자원으로부터 강력한 선택적 저해활성을 가진 MMP 저해제를 탐색하는 것이 매우 중요하다[8].

염생식물은 염도가 높은 토양이나 물가에서 자라는 내염성 식물이며, 강한 바람과 파도, 직사광선, 갯벌 등과 같은 극한의 환경에서 생존하기 위해 육지식물과는 다른 독특한 생리학적 메커니즘을 가진다[9]. 따라서 육상식물과 매우 다른 서식환경에서 자라는 염생식물은 지금까지 육상식물에서 분리되었던 것과 구별되는 새로운 이차 대사산물이 분리될 가능성이 높다. 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 있기 때문에 염생식물 서식지가 매우 잘 발달되어 있으며 약 100여종이 서식하는 것으로 알려져 있다[18]. 특히 우리나라의 서해안은 세계 5대 갯벌 중의 하나로 알려질 만큼 갯벌이 잘 발달되어 있어 염생식물의 좋은 군락지이다.

비쭉(*Artemisia scoparia* Waldst. & Kit.)은 국화과 쑥속에 속하는 다년생 식물이며 러시아, 몽골, 인도, 중국, 유럽 등과 우리나라의 해안가에서 자생하고 있다. 이는 40-100 cm 높이까지 자라며 상부에 많은 가지를 가지고 있다. 그리고 8-9월에 개화하며 9-10월에 열매를 맺는다. 비쭉의 어린 새싹은 발열, 통풍, 황달, 요로 및 피부 질환을 치료하기 위한 민간 의약으로 사용되어 왔다. 비쭉은 살충, 항염증, 항콜레스테롤, 해열, 항균, 지방세포분화와 아토피성 염증억제 등 다양한 생물학적 활성에 대해 보고된 바 있다[1, 4, 6, 15, 19, 22]. 또한, vanillic acid, drupanin, scopariachromane, scopoletin, magnolioside 등이 비쭉으로부터 분리되었다[5].

비쭉의 다양한 생리활성에 대한 연구가 이루어졌지만 압전이 및 침윤에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 비쭉을 유기용매로 추출 및 분획하여 이의 MMP-2와 MMP-9에 대한 저해 효과를 검토하고 새로운 천연물 유래 압전이 저해 소재를 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

시료추출 및 분획

실험 재료로 사용한 비쭉(*Artemisia scoparia*)은 인천광역시 강화군 동검도에서 채집하였고 그늘에서 건조시킨 후에 분쇄하여 사용하였다. 이를 dichloromethane (CH₂Cl₂, Duksan, Korea)에 침지하여 24시간 동안 추출한 후 여과하는 방식을 2회 반복 실시하였다. 이후 잔사에 동일한 양의 methanol (MeOH, Duksan, Korea)을 사용하여 dichloromethane과 같은 방식으로 추출물을 얻었다. 각각의 추출물을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 농축한 후, 이들을 혼합한 조추출물(39.4 g)을 CH₂Cl₂와 H₂O로 분획하였다. 다시 CH₂Cl₂ 분획층은 *n*-hexane (Duksan, Korea)과 85% (v/v) aqueous MeOH (85% (v/v) aq.MeOH)로, H₂O 분획층은 *n*-butnaol

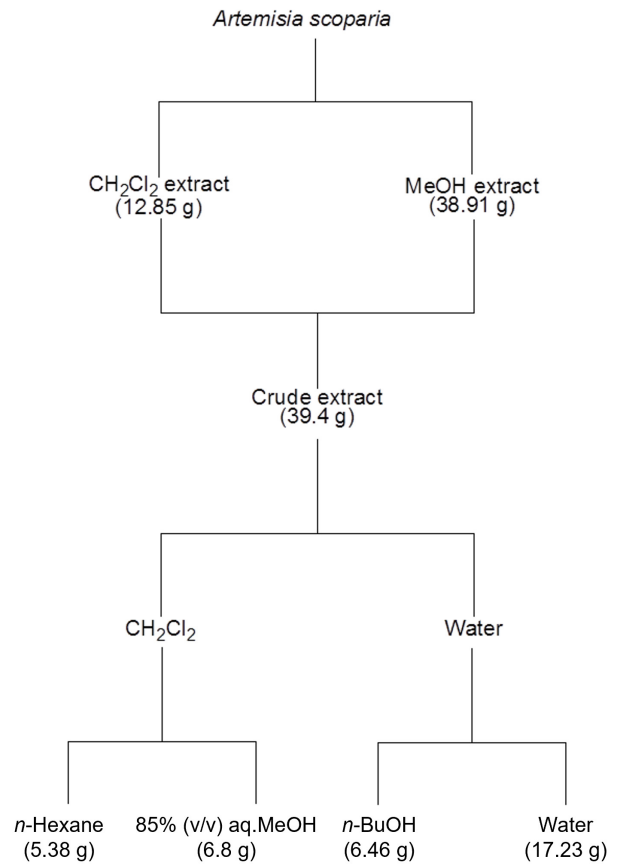


Fig. 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from *A. scoparia*.

(*n*-BuOH, Duksan, Korea)과 H₂O로 분획한 후에 농축하여 *n*-hexane (5.38 g), 85% (v/v) aq.MeOH (6.80 g), *n*-BuOH (6.46 g), H₂O (17.23 g) 분획물을 얻었다(Fig. 1).

세포배양

인간 섬유육종세포(Human fibrosarcoma cell)인 HT-1080은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양을 받아 실험에 사용하였다. Penicillin-streptomycin (100 units/ml) (Gibco, USA), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Korea)을 첨가한 RPMI-1640 배지(WELGENE, Korea)을 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂의 조건에서 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 2-3일마다 1X phosphate buffered saline (PBS, BYLABS, Korea)으로 세척한 후에 배지를 교환해 주었다. 세포의 밀도가 80-90%가 되는 시점에 0.05% (w/v) Trypsin-0.02% (w/v) EDTA solution (Gibco, USA)을 사용하여 부착된 세포를 떼어내고 계대배양하였다.

MTT assay

시료의 세포독성을 측정하기 위해 배양된 HT-1080 세포를 96 well culture plate에 5×10³ cells/well로 분주하여 24시간

동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 새 배지로 교환한 후, 비썬 조추출물 및 분획물들을 처리하여 위와 같은 조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 1 mg/ml, Sigma Aldrich, USA) 용액 100 µl로 처리하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, USA) 100 µl로 처리하여 형성된 formazan crystal을 완전히 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 측정하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \{(\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}) / \text{control absorbance}\} \times 100$$

Gelatin zymography

HT-1080 세포를 24 well culture plate에 2×10^5 cells/well로 분주하여 위와 동일한 배양조건에서 24시간 동안 배양하고 FBS를 포함하지 않은 RPMI-1640배지로 교체한 후, 비썬 조추출물 및 분획물로 처리하였다. 1시간 후, MMP발현을 유도하기 위해 phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA, 10 ng/ml, Sigma Aldrich, USA)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양하여 얻은 상등액은 Bradford 시약(Bio-Rad, USA)으로 단백질을 정량하고, 상등액은 젤라틴(1.5 mg/ml, Sigma Aldrich, USA)을 함유하는 10% (w/v) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (Duksan, Korea)에 loading하여 전기영동하였다. Gel은 2.5% (v/v) Triton X-100 (JUNSEI, Japan)을 함유하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer로 30분간 세척하였다. MMP에 의한 젤라틴(gelatin) 가수분해를 유도시키기 위해 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl을 함유하는 developing buffer를 사용하여 37°C, 48시간 동안 반응시켰다. Gel을 Coomassie brilliant blue 250 (LPS solution, Korea) 용액으로 30분간 염색 시킨 후, destaining 용액 (MeOH : H₂O : acetic acid = 50 : 40 : 10)으로 탈색하였다. MMP에 의해 분해된 젤라틴의 투명한 band의 면적을 구하여 MMP-2와 MMP-9의 효소적 활성도를 수치화하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

MMP-2와 MMP-9 분비의 측정은 제조사의 지침에 따라 DuoSet ELISA kit (R&D Systems Inc., USA)를 이용하였으며 상기의 동일한 조건으로 얻은 세포배양액을 실험에 이용하였다. 요약하면, 96 well plate에 capture antibody (MMP-2: #843027, MMP-9: #844926)를 처리하여 상온에서 overnight로 반응시켰다. 코팅(coating)된 각 well에 Reagent Diluent (1% (w/v) BSA in PBS)를 1시간 동안 처리하여 blocking하였다. 상기와 동일한 방법으로 얻은 세포배양 상등액을 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, detection antibody (MMP-2: #843028, MMP-9: #844927)를 처리하여 상온에서 2

시간 동안 반응시켰으며 streptavidin-HRP와 substrate solution (H₂O₂ : tetramethylbenzidine = 1 : 1)을 순서대로 첨가하여 암실에서 20분간 반응시켰다. Stop solution (2N H₂SO₄)를 첨가한 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Wound healing assay

HT-1080을 세포를 12 well culture plate에 분주하여 well 당 세포 밀도가 80-90%가 되도록 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Yellow tip을 이용하여 well의 가운데를 일자로 scratch를 내준 뒤, FBS를 포함하지 않은 RPMI-1640배지로 교체하였다. 각 well에 비썬 조추출물 및 분획물을 처리하고, 0시간과 24시간 시점의 cell migration 정도를 관찰하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

상기와 동일한 조건으로 배양한 세포에서 Trizol reagent (Ambion, Life Technologies, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 동량의 RNA (2 µg), RNase-free water, oligo dT를 첨가하여 70°C에서 5분간 denaturation시킨 후, M-MLV reverse transcriptase (140 U, Promega, USA)를 사용하여 42°C에서 1시간, 72°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 MMP-2 (Forward: 5'-ATG-GCA-AGT-ACG-GCT-TCT-GT-3', Reverse: 5'-ATA-CIT-CIT-GTC-GCG-GTC-GT-3'), MMP-9 (Forward: 5'-CTC-GAA-CIT-TGA-CAG-CGA-CA-3', Reverse: 5'-GCC-ATT-CAC-GTC-GTC-CIT-AT-3'), β-actin primer (Forward: 5'-AGC-CAT-GTA-CGT-AGC-CAT-CC-3', Reverse: 5'-TCC-CTC-TCA-GCT-GTG-GTG-GT-3')를 사용하여 증폭시켰다. 증폭시킨 DNA는 1.5% (w/v) agarose gel에서 전기영동 하였으며 EtBr (1 mg/ml)로 염색시켜 UV light하에서 band를 확인하였다.

Western blotting

상기와 동일한 조건으로 배양한 HT-1080 세포에서 RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 단백질을 추출하였다. Bradford 시약으로 정량한 후 20 µg의 단백질을 12% (w/v) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하였으며, nitrocellulose transfer membrane (Whatman, UK)에 단백질을 transfer시켰다. 이를 5% (w/v) skim milk로 1시간 동안 blocking하였고, MMP-2, MMP-9, β-actin (Cell Signaling Technology, USA; 1:4,000) primary antibody, HRP-linked anti-mouse와 anti-rabbit (Cell Signaling Technology, USA) secondary antibody를 사용하였다. 단백질 band는 Western blotting detection reagent kit (GE Healthcare, UK)로 반응시킨 후 CAS-400SM Davinch-Chemi imager (Davinch-K, Korea)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 mean ± standard deviation으로 나타냈으며, statistical analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., USA)을 이용하여 결과의 유의성을 검토하였다. ANOVA를 통하여 집단간의 유의성 검토를 하였으며 Duncan's multiple range test를 통해 평균치 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 사후 검증하였다.

결 과

세포생존율 측정 결과

노란색 tetrazole인 MTT는 살아있는 세포에서 보라색의 불용성 formazan crystal로 환원되며, 이를 DMSO로 용해시킨 후 흡광도를 측정하여 처리 시료의 세포독성 정도를 측정할 수 있다. 이와 같이 MTT assay를 통하여 비쭉의 조추출물 및 분획물의 HT-1080 세포주에 대한 세포독성을 확인하였다. 각각의 시료를 10, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리하여 확인한 결과, 모든 시료가 200 µg/ml의 농도에서 강한 세포 독성을 보였으며, 100 µg/ml의 농도에서도 *n*-BuOH 분획물을 제외한 모든 시료가 70% 이하의 세포생존율을 보였다. 50 µg/ml 이하의 농도에서는 70% 이상의 세포생존율을 보여 시료의 세포독성에 의한 효과가 생리활성에 미칠 영향이 크지 않을 것으로 예상되었기 때문에 50 µg/ml 농도의 비쭉 시료를 사용하여 MMP 저해능을 확인하였다(Fig. 2).

Gelatin zymography를 통한 분비된 MMPs의 효소적 활성 측정 결과

Gelatin zymography 젤라틴과 중합된 SDS 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 사용하여 생물학적 시료에서 젤라틴 분해 활성을 식별하는 실험 기법이다. PMA로 유도된 HT-1080 세포에서 분비된 MMP의 효소적 활성을 비쭉 조추출물 및 분획물이 저해하는지 확인하기 위하여 세포배양 배지를 수집하여 MMP 발현정도를 확인하였다. PMA 만을 처리한 세포에서는 MMP-2와 MMP-9의 발현이 유의적으로 증가한

것을 확인하였으나 PMA와 50 µg/ml 농도의 비쭉 조추출물을 처리했을 때 MMP-2와 MMP-9의 발현이 control에 비해서 각각 41.7%와 60.4%씩 감소하였다(Fig. 3A). 동일한 농도에서 비쭉 분획물의 MMP의 효소활성 저해능을 확인해 본 결과, *n*-hexane 분획물은 MMP-2와 MMP-9의 발현을 각각 54.0%와 72.2%씩 감소시켰다. 또한, 85% (v/v) *aq*.MeOH 분획물은 MMP-2와 MMP-9의 발현은 각각 43.7%와 58.0%씩 감소시키며 PMA로 MMP 발현을 유도하지 않은 세포군과 유사하거나 더 적은 MMP 발현량을 보였다. 하지만 *n*-BuOH 과 H₂O 분획물은 MMP 발현을 저해하는데 효과적이지 못하였다(Fig. 3B). 이와 같이 50 µg/ml 농도의 비쭉 용매 분획물 중, *n*-hexane과 85% (v/v) *aq*.MeOH 분획물이 HT-1080 세포주에서 MMP-2와 MMP-9의 발현을 유의적으로 저해시키는 것을 효소적 활성 측정을 통해 확인하였다.

ELISA를 통한 분비된 MMPs의 단백질 발현량 측정 결과

Sandwich ELISA를 이용하여 PMA로 유도된 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현량을 측정하였으며 비쭉 조추출물 및 분획물이 이를 저해하는 정도를 확인하였다. Gelatin zymography에 사용한 세포배양액을 시료의 억제활성 분석에 사용하였다. PMA 만을 처리한 세포에서 아무것도 처리하지 않은 세포보다 MMP-2와 MMP-9의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었으며 gelatin zymography에서 확인한 것과 같이 비쭉의 *n*-hexane과 85% (v/v) *aq*.MeOH 분획물이 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현을 가장 많이 감소시켰다.

MMP-2와 MMP-9의 발현량이 비쭉 *n*-hexane 분획물에 의해 각각 356.1 pg/ml와 0.52 ng/ml로, 85% (v/v) *aq*.MeOH 분획물에 의해 각각 398.5 pg/ml와 0.53 ng/ml로 감소하였다(Fig. 4). Gelatin zymography와 ELISA를 통하여 비쭉의 *n*-hexane과 85% (v/v) *aq*.MeOH 분획물이 HT-1080 세포의 MMP-2 및 MMP-9의 분비 억제에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

Wound healing assay를 통한 세포이동능 측정 결과

비쭉 조추출물 및 분획물이 인간 섬유육종 HT-1080 세포주

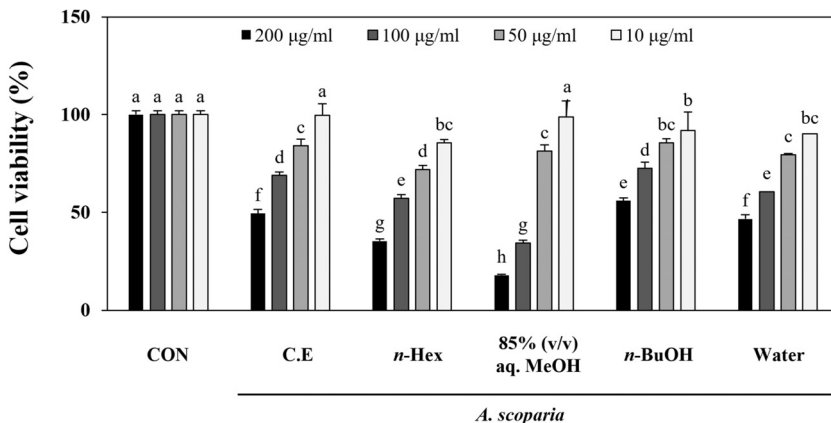
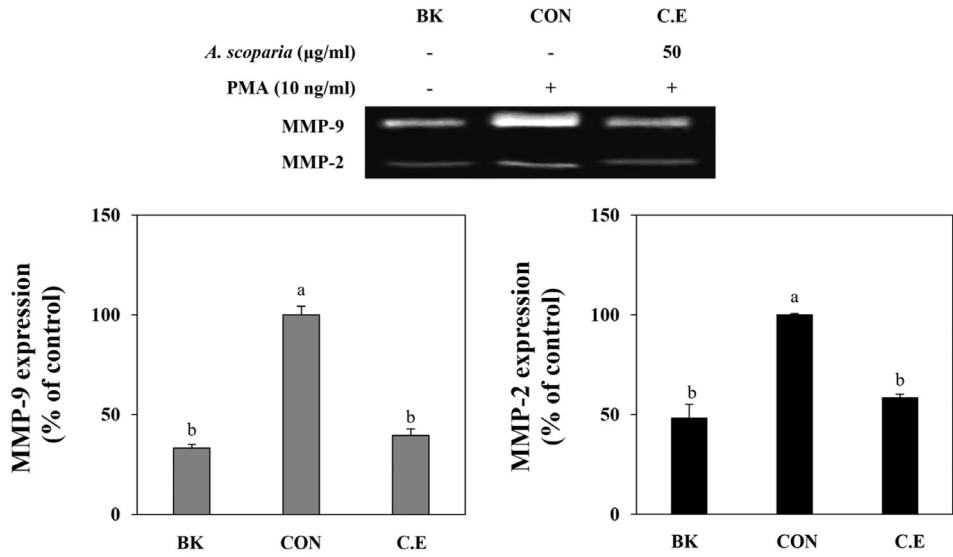


Fig. 2. Effects of crude extract and its solvent fractions from *A. scoparia* on cell viability of HT-1080 cells. CON: control, C.E: crude extract. ^{a-h}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD.

A



B

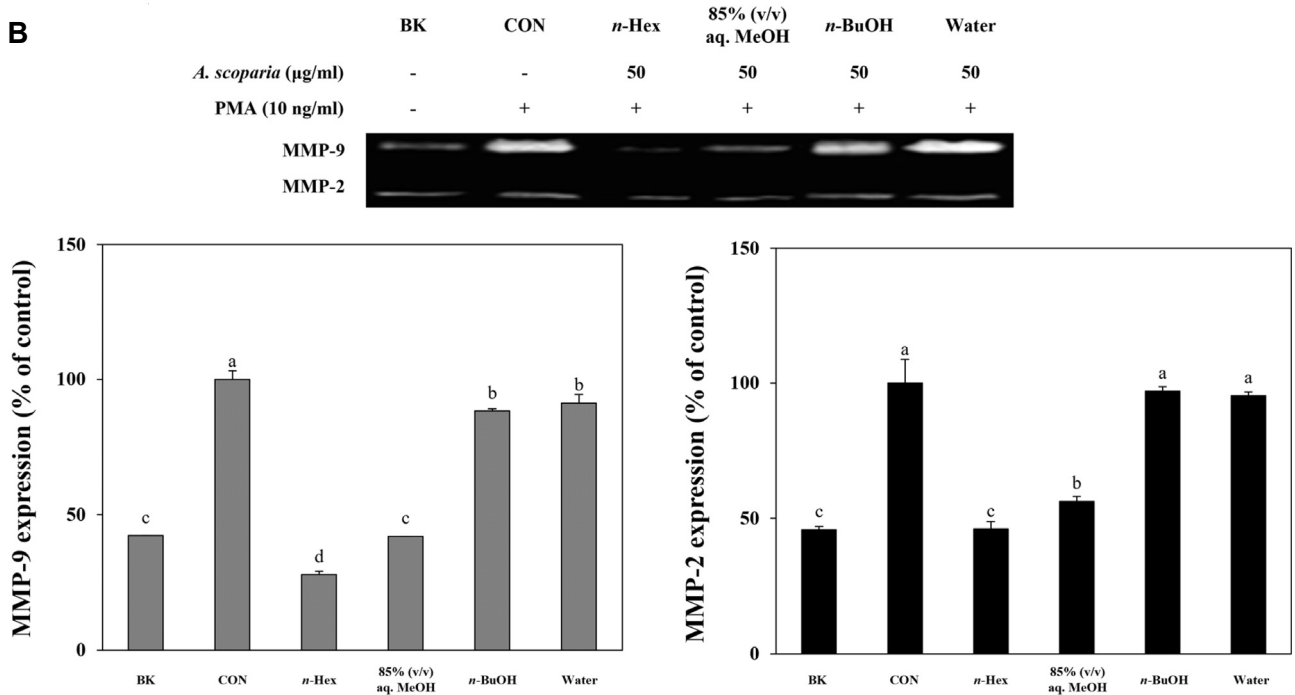


Fig. 3. Effects of crude extract (a) and its solvent fractions (b) from *A. scoparia* on enzymatic activities of MMP-9 and 2 determined by gelatin zymography in HT-1080 cells. BK: blank, CON: control, C.E: crude extract. ^{a-d}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD.

의 이동능에 미치는 영향을 확인하였다. 세포증식(cell proliferation)에 의한 wound healing 효과를 배제하기 위해 혈청 (serum)이 없는 조건에서 세포이동을 관찰하였다. 시료를 처리하고 24시간 후 세포이동을 관찰한 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우에는 처음에 중앙의 경계선 안쪽 영역에 세포들이 존재하지 않지만 24시간 이후에는 세포들이 중앙 안쪽으로 많이 이동되어 있음을 관찰할 수 있다. 하지만 비썬 추출물, *n*-hexane, 85% (v/v)

aq.MeOH, *n*-BuOH 분획물을 처리했을 경우에는 중앙의 경계선 안쪽 영역에 세포이동이 유의적으로 저해된 것을 관찰할 수 있었으며 H₂O 분획물의 경우에는 세포이동 억제에 큰 효과를 보이지 못했다.

RT-PCR 및 Western blotting을 통한 MMPs의 mRNA와 단백질 발현량 측정 결과

PMA로 유도된 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발

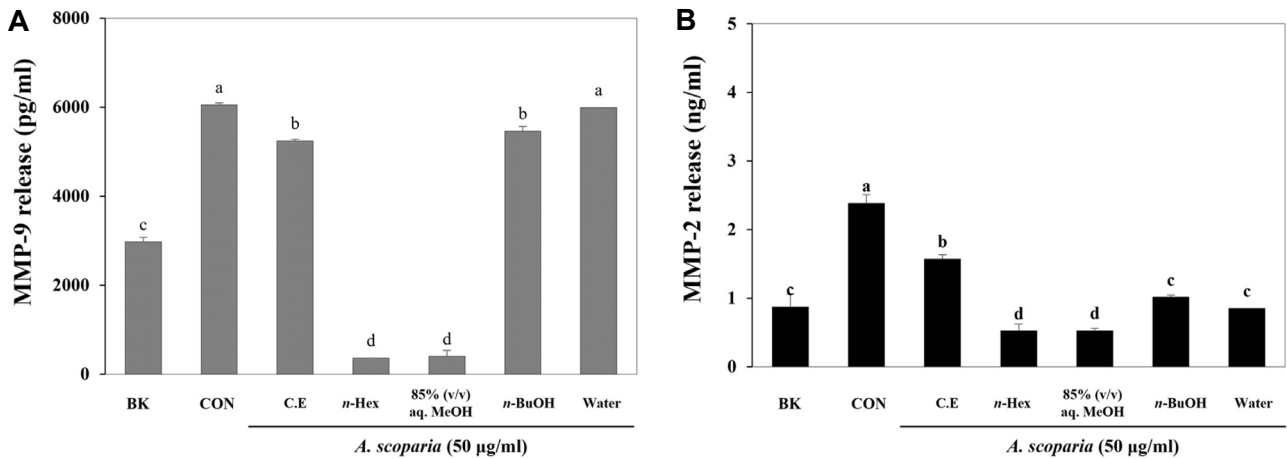


Fig. 4. Effects of crude extract and its solvent fractions from *A. scoparia* on released protein levels of MMP-9 (a) and 2 (b) determined by sandwich ELISA in HT-1080 cells. BK: blank, CON: control, C.E: crude extract. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD.

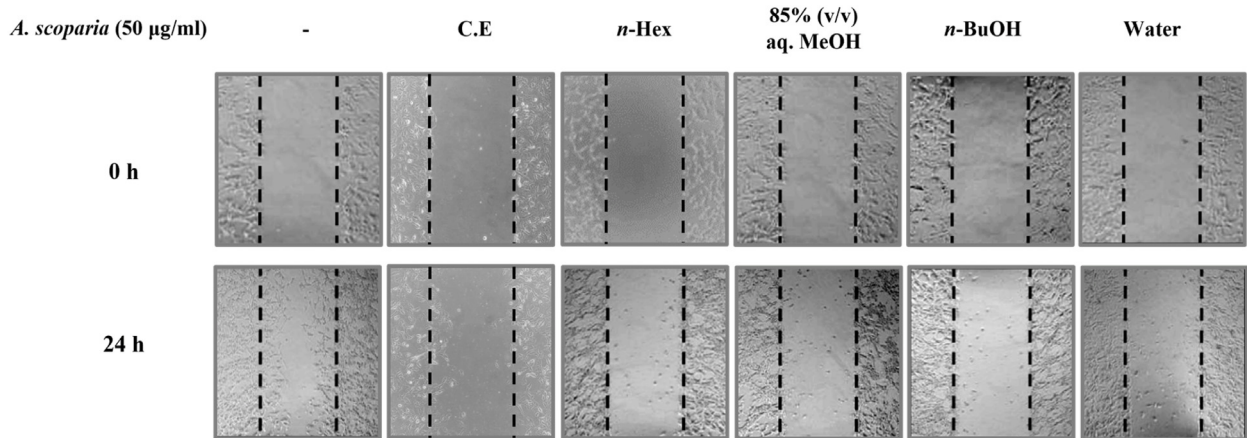


Fig. 5. Effects of crude extract (C.E) and its solvent fractions from *A. scoparia* on migration ability in HT-1080 cells.

현량을 비췁 조출물 및 분획물이 이를 저해하는 정도를 RT-PCR과 Western blotting을 통하여 확인하였다. HT-1080 세포주에 PMA로 단독처리 시, 처리하지 않은 군에 비해 MMP-2와 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 비췁 조출물은 MMP-2와 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현량을 거의 PMA로 MMP의 발현을 유도하지 않은 수준까지 감소시켰다(Fig. 6A, Fig. 6C). 이후에 비췁 분획물에 의한 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현량의 변화를 확인하였다. *n*-Hexane 분획물은 PMA로 단독 처리한 처리군에 비교하여 MMP-2와 MMP-9 mRNA의 양을 각각 42.3%, 36.3%, 단백질 발현량을 각각 56.6%, 63.9%로 가장 큰 폭으로 감소시켰다. 다음으로 85% (v/v) aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획물에 의해서도 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현량이 감소되는 것을 관찰하였으며, 특히 85% (v/v) aq.MeOH 분획물은 *n*-hexane 분획물과 비슷한 수준으로 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현 억제효과를 보였다(Fig. 6B, Fig. 6D).

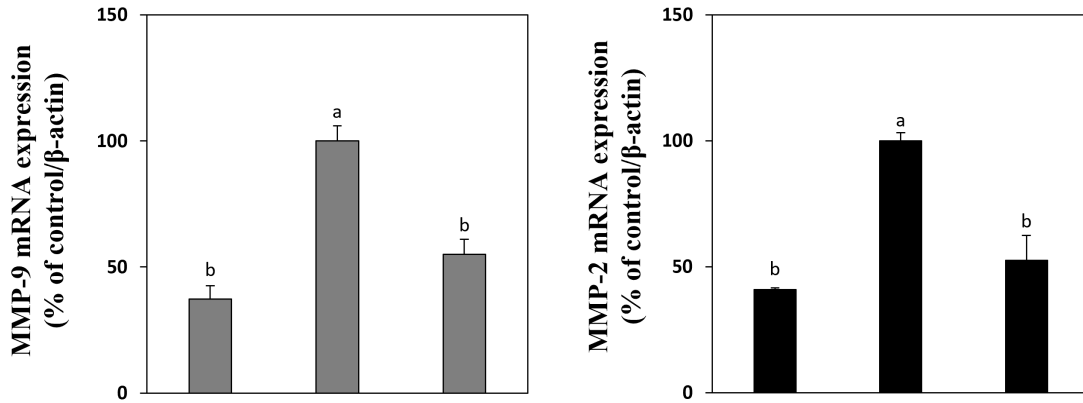
고 찰

암세포는 다른 장기로의 전이를 통하여 암환자의 예후를 더욱 안 좋게 한다. 암세포의 전이, 침투, 혈관신생에는 기질단백분해효소(MMP)라고 하는 세포의 기질(ECM) 분해효소가 크게 관여한다. 따라서 암전이를 억제하는 MMP 억제제에 많은 관심이 집중되어 왔다. MMP 저해제의 개발이 본격적으로 시도된 이후 기질단백분해효소를 치료 표적으로 시도한 초기의 임상시험이 실패적이었기 때문에 MMP 억제제에 대한 부정적인 견해가 생겨나게 되었으나 MMP에 대한 생물학적 이해와 MMP 저해제에 대한 약물동력학적 이해가 증가함에 따라 다시 주목을 받고 있다. 특히, 합성 MMP 억제제는 암세포에 대한 공격의 선택성에 많은 문제가 있어 소형 분자들뿐만 아니라 항체, 단백질 등의 거대분자와 다양한 천연물로부터 MMP 억제제를 찾기 위한 노력이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 우리나라 연안에 자생하는 염생식물인 비췁

A

	BK	Con	C.E
<i>A. scoparia</i> (μg/ml)	-	-	50
PMA (10 ng/ml)	-	+	+



B

	BK	CON	<i>n</i> -Hex	85% (v/v) aq. MeOH	<i>n</i> -BuOH	Water
<i>A. scoparia</i> (μg/ml)	-	-	50	50	50	50
PMA (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+

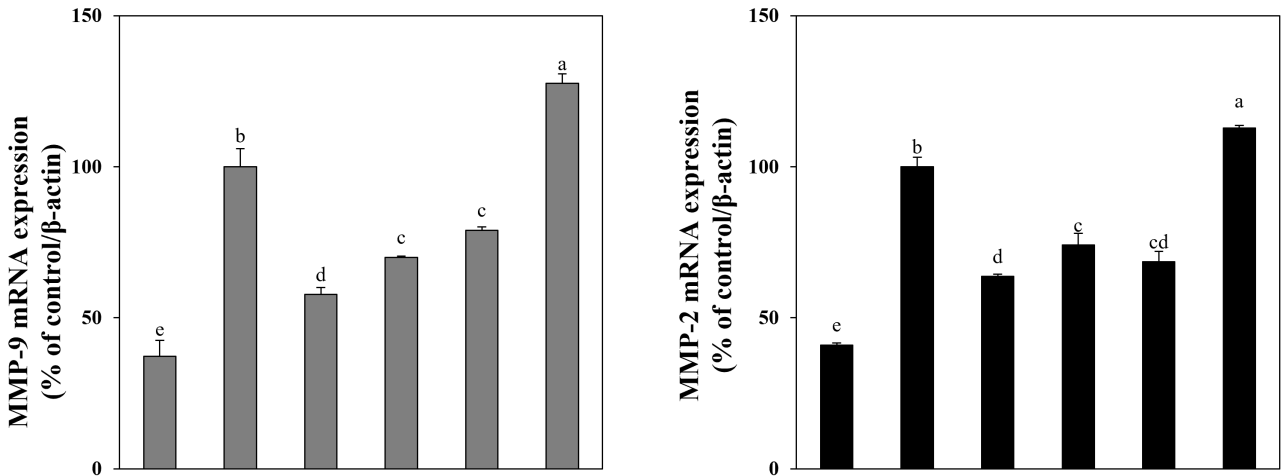
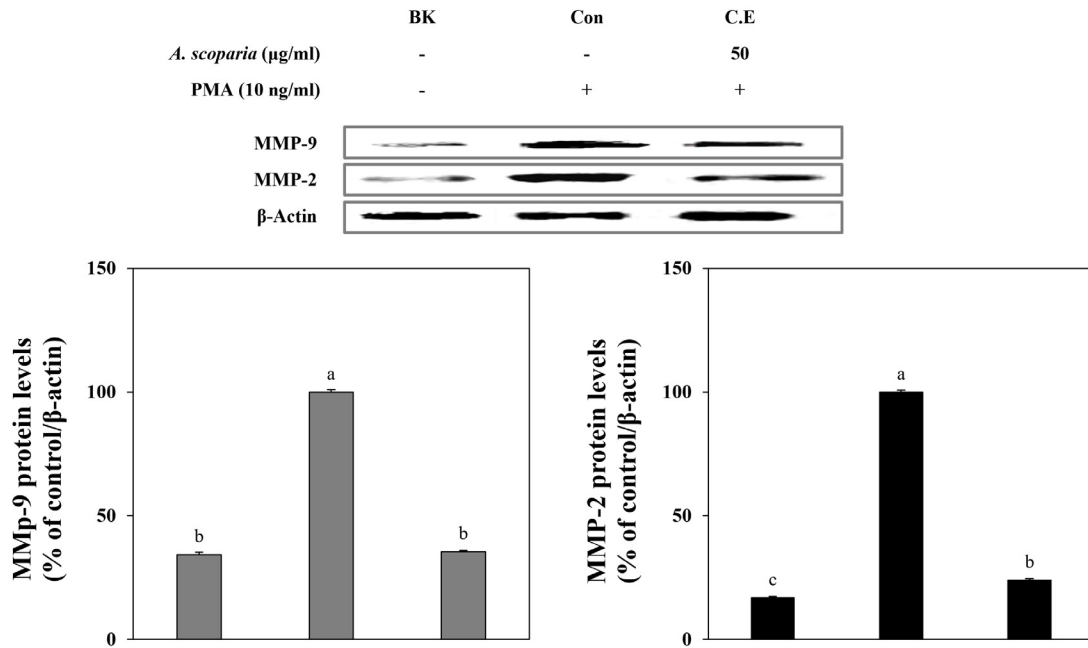


Fig. 6. Effects of crude extract (a, c) and its solvent fractions (b, d) of *A. scoparia* on mRNA and protein levels of MMP-9 and 2 determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. β-Actin was used as the internal standard. Band sizes were calculated and depicted as percentage compared to control group. Values were normalized against house keeping β-actin mRNA and protein levels. BK: blank, CON: control, C.E: crude extract.

이 HT-1080 세포의 MMP 활성 및 세포이동에 미치는 영향을 관찰하였다. 비축의 조출물은 MMP-2와 MMP-9의 활성, mRNA

및 단백질 발현량을 감소시켰으며, 세포이동 또한 억제하였다. MMPs 활성을 억제하는 물질을 탐색하기 위해 조출물을

C



D

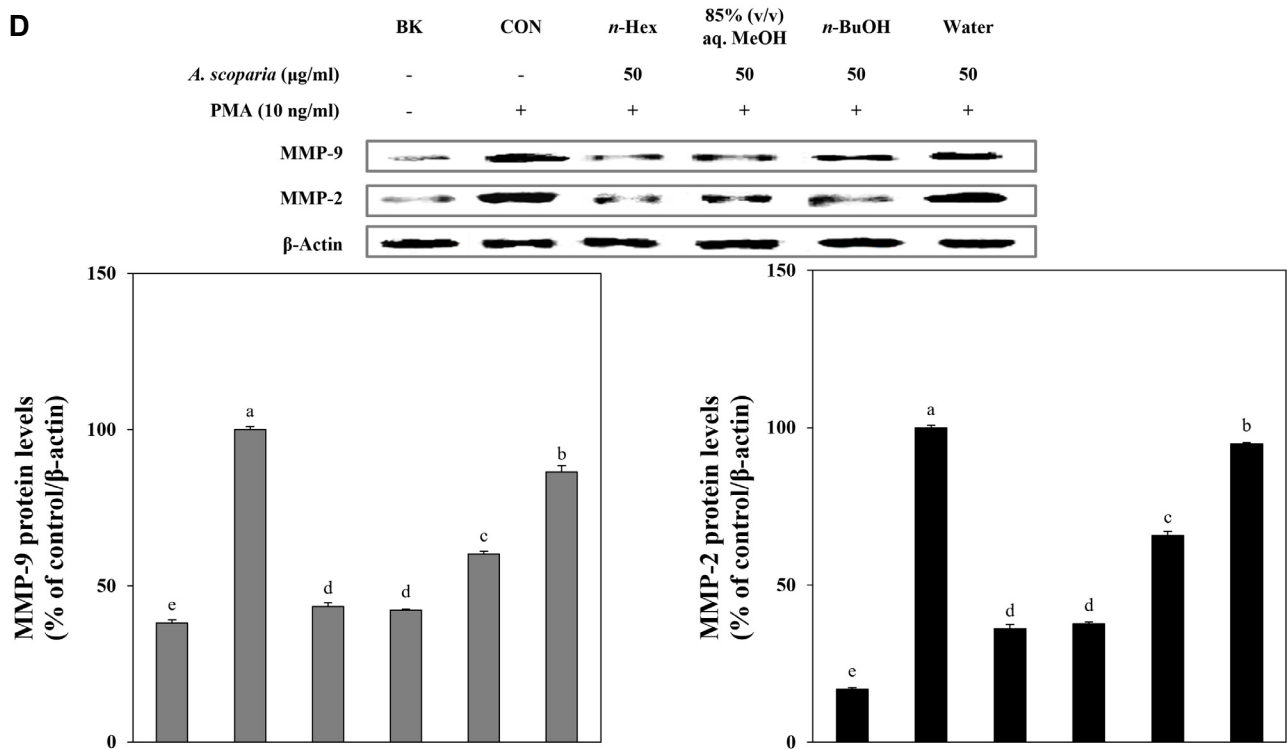


Fig. 6. Continued.

n-hexane, 85% (v/v) aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O로 용매극성도에 따라 분획하였다. 비췌 분획물중 *n*-hexane과 85% (v/v) aq.MeOH 분획물이 MMP-2와 MMP-9의 효소적 활성 및 세포의 분비와 세포이동을 효과적으로 저해하였다. 또한, MMP-2와 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현을 억제하는 것이 관찰되었다. 하지만 50 µg/ml의 농도에서 *n*-hexane과 85% (v/v)

aq.MeOH 분획물이 약간의 독성을 나타내었기 때문에 MMP 저해활성에 약간의 영향을 미쳤으리라 여겨진다. MMP 저해활성의 결과를 보았을 때, 비췌 추출물의 용매분획물 중에 *n*-hexane과 85% (v/v) aq.MeOH 분획물에 MMPs 활성 억제 물질이 있을 것으로 추측된다. *n*-Hexane 분획물이 85% (v/v) aq.MeOH 분획물보다 더 강한 MMP 저해효과를 나타내었

는데 이는 MTT assay에서 관측된 85% (v/v) aq.MeOH 분획물의 세포독성보다 더 강한 세포독성이 영향을 미친 것으로 판단하여 85% (v/v) aq.MeOH 분획물로부터 우선적으로 물질 분리를 진행하였다. 2.52 g의 85% (v/v) aq.MeOH 분획물을 C₁₈ reversed phase vacuum flash chromatography로 추가로 정제한 후, reversed-phase HPLC를 사용하여 15.0 mg의 reynosin을 분리하였다. Reynosin은 이미 이전에 분리된 적이 있는 물질이며[2, 3, 13, 23] 항염증 활성이 있는 것으로 알려져 있다[16, 17]. 이 물질은 *Artemisia* 속에서는 처음으로 분리되었으며 이에 의한 MMPs 활성 및 세포이동능 저해 효과에 대한 연구를 현재 진행중에 있다.

감사의 글

연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2019R1F1A1059325)의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adegawa, S., Miyase, T. and Ueno, A. 1987. Sesquiterpene lactones from *Diaspananthus uniflorus* (SCH. BIP.) KITAM. *Chem. Pharma. Bull.* **35**, 1479-1485.
- Al-Attas, A. A., El-Shaer, N. S., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. and Esmat, A. 2015. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Costus speciosus rhizomes*. *J. Ethnopharm.* **176**, 365-374.
- Cho, J. Y., Park, J., Yoo, E. S., Baik, K. U., Jung, J. H., Lee, J. and Park, M. H. 1998. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor- α production in murine macrophage-like cells. *Planta Med.* **64**, 594-597.
- El-Ferally, F. S. and Chan, Y. M. 1978. Isolation and characterization of the sesquiterpene lactones costunolide, parthenolide, costunolide diepoxide, santamarine, and reynosin from *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **67**, 347-350.
- Fang, F., Sang, S., Chen, K. Y., Gosslau, A., Ho, C. T. and Rosen, R. T. 2005. Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *Food Chem.* **93**, 497-501.
- Habib, M. and Waheed, I. 2013. Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Artemisia scoparia* hydromethanolic extract. *J. Ethnopharmacol.* **145**, 18-24.
- Hannocks, M. J., Zhang, X., Gerwien, H., Chashchina, A., Burmeister, M., Korpos, E., Song, J. and Sorokin, L. 2019. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol.* **75-76**, 102-113.
- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M. and Rosochacki, S. 2016. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 177-183.
- Kim, J., Kong, C. S. and Seo, Y. 2018. Inhibitory effect of *Carex pumila* extracts on MMP-2 and MMP-9 activities in HT-1080 cells. *Ocean Polar Res.* **40**, 249-257.
- KIOSTAT. 2021. Press release on the statistical results of the cause of death in 2020. 1-56.
- Kumar, G. B., Nair, B. G., Perry, J. J. P. and Martin, D. B. C. 2019. Recent insights into natural product inhibitors of matrix metalloproteinases. *Med. Chem. Commun.* **10**, 2024-2037.
- McCawley, L. J. and Matrisian, L. M. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 534-540.
- Nam, S. Y., Han, N. R., Rah, S. Y., Seo, Y., Kim, H. M. and Jeong, H. J. 2018. Anti-inflammatory effects of *Artemisia scoparia* and its active constituent, 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid against activated mast cells. *Immunopharm. Immunot.* **40**, 52-58.
- National Cancer Center (NCC). 2020. Annual report of cancer statistics in Korea in 2018. 1-231.
- Negahban, M., Moharrampour, S. and Sefidkon, F. 2006. Chemical composition and insecticidal activity of *Artemisia scoparia* essential oil against three coleopteran stored-product insects. *J. Asia-Pac. Entomol.* **9**, 381-388.
- Oh, J. H., Karadeniz, F., Seo, Y. and Kong, C. S. 2018. *Artemisia scoparia* inhibits adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes by downregulating the MAPK pathway. *J. Life Sci.* **28**, 999-1006.
- Ryu, K. J., Yoou, M. S., Seo, Y., Yoon, K. W., Kim, H. M. and Jeong, H. J. 2018. Therapeutic effects of *Artemisia scoparia* Waltst. et Kitaib in a murine model of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* **43**, 798-805.
- Shim, H. B., Lee, K. M., Kim, W., Nam, G. H., Sim, S. and Lee, B. Y. 2017. Coastal Plants of Korea, pp. 31-33, National Institute of Biological Resources: Incheon, Korea.
- Singh, H. P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D. R. and Kohli, R. K. 2008. Phytotoxicity of major constituents of the volatile oil from leaves of *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. *Z. Naturforsch. C* **63**, 663-666.
- Verma, R. P. and Hansch, C. 2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical - biological functions and (Q) SARs. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2223-2268.
- Visse, R. and Nagase, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827-839.
- Yahagi, T., Yakura, N., Matsuzaki, K. and Kitanaka, S. 2014. Inhibitory effect of chemical constituents from *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. on triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *J. Nat. Med.* **68**, 414-420.
- Yoshikawa, M., Shimoda, H., Uemura, T., Morikawa, T., Kawahara, Y. and Matsuda, H. 2000. Alcohol absorption inhibitors from bay leaf (*Laurus nobilis*): structure-requirements of sesquiterpenes for the activity. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2071-2077.

초록 : 인간 섬유육종세포에서 비썬 추출물과 유기용매 분획물의 암전이 억제 효과김준세¹ · 공창숙² · 심현보³ · 서영원^{1,4*}(한국해양대학교 해양과학기술전문대학원, ²신라대학교 식품영양학과, ³인천과학예술영재학교, ⁴한국해양대학교 해양과학융합학부)

염생식물인 비썬은 식용이 가능한 약용식물로서 살충, 항염, 항콜레스테롤, 해열, 항균 활성 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)로 자극된 인간 섬유육종 HT-1080 세포에서 5가지 활성검색방법 즉 : gelatin zymography, MMPs ELISA, wound healing assay, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot을 이용하여 비썬의 조추출물과 그 용매 분획물의 MMP-2와 MMP-9 효소 활성에 대한 저해 효과를 평가하였다. 비썬 시료들을 메틸렌 클로라이드(MC)와 메탄올(MeOH)로 각각 2번 추출하여 합한 것을 조추출물로 사용하였으며 이 조추출물은 MMP-2와 MMP-9 효소활성에 대해 유의한 억제 효과를 나타내었다. 이 조추출물은 용매극성에 따라 다시 *n*-hexane, 85% *aq.*MeOH, *n*-butanol 및 물 분획층으로 분획되었으며 이렇게 얻어진 4개의 용매 분획물들중에 *n*-hexane과 85% *aq.*MeOH 분획이 gelatin zymography와 MMP ELISA assay에서 MMP-2와 MMP-9의 활성을 효과적으로 억제하였다. 또한 wound healing assay, RT-PCR 및 Western blot assay에서 H₂O 분획을 제외한 모든 용매 분획물들이 세포 이동, 그리고 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.