

수종 생약의 Heparinase 저해활성 검색

안순철 · 김보연 · 오원근 · 이명선 · 배은영 · 강대욱 · 안종석*

한국생명공학연구원

Screening of Inhibitory Activity of Medicinal Plants against Heparinase

Soon Cheol Ahn, Bo Yeon Kim, Won Keun Oh, Myung Sun Lee,
Eun Young Bae, Dae Wook Kang and Jong Seog Ahn*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract – The methanol extracts of 132 herbal medicines were screened for the inhibitory activity against heparinase enzyme from *Flavobacterium heparinum*. Eleven medicinal plants, *Amomum xanthioides*, *Agrimonia pilosa*, *Paeonia lactiflora*, *Rubia cordifolia*, *Sanguisorba officinalis*, *Torreya grandis*, *Morus alba*, *Gleditsia sinensis*, *Crataegus pinnatifida*, *Cornus officinalis*, *Paeonia japonica* showed potent inhibition on heparinase activity. The active substituents of those herbal medicine could be extracted into butanol fraction and the inhibitory compounds of *Morus alba* are now isolating.

Key words – heparinase inhibitor; medicinal plants

서 론

Heparin과 heparan sulfate는 N-acetylation 또는 N-sulfation된 glucosamine과 hexuronate의 이당 단위가 연속적으로 결합된 아미노 복합다당(glycosaminoglycan, GAG)으로서 구조적으로 매우 유사하다.¹⁾ 포유류에서 heparan sulfate는 fibronectin이나 collagen 등의 단백질과 결합한 proteoglycan의 형태로 세포외 기저막(extracellular basement membrane)이나 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 구성성분으로 분포한다.²⁾ Heparan sulfate와 heparin은 endoglycosidase인 heparanase와 heparinase 효소에 의해 각각 분해되며, 이때 heparinase는 heparin 뿐만 아니라 선택적 활성에서는 떨어지지만 heparan sulfate도 분해할 수 있다.^{3,4,5)}

암세포가 전이되기 위해서는 초기 암 발생 조직이나 새로운 침윤조직에서 세포간극을 구성하는 세포외 기질이 분해되어 암세포의 이탈이나 침윤이 이루어져야 한다. 이때, 암세포의 혈관 내 침투와 이탈은 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)나 혈관 주변세포를 이루고 있는 세포간의 간극과 세포간 결합을 유지시키는 세포외 기질의 분해가 필

수적으로 수반된다.^{6,7)} 이러한 사실은 최근에 유전자가 분리된 heparanase에 대한 연구 결과를 통해 이 효소가 암세포의 전이에 필수적으로 관여하고 있음이 다시 한번 입증되었다.^{8,9)} 그리고 혈관생성을 위한 내피세포(endothelial cell)의 성장분화에 필요한 염기성 섬유 모세포 성장인자(basic fibroblast cell growth factor, bFGF)나 혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 등은 heparin/heparan sulfate에 포집되어 있어 heparanase에 의해서 분해되어야만 세포외 기질이나 세포외 기질로부터 유리되어 혈관생성에 작용한다. 따라서 heparin/heparan sulfate와 heparanase는 암의 전이뿐만 아니라 암조직의 성장을 위한 혈관생성의 작용에도 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다.^{10,11,12,13,14)}

현재, 생체 내에서의 heparanase 효소 활성을 억제함으로써 세포자체에 대한 세포독성은 없으면서 암세포의 전이와 혈관생성을 억제하는 항암제 혹은 암전이 억제제로 개발하고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 그러나 heparanase 효소의 분리와 활성 측정의 기술적 어려움으로 현재까지 heparanase의 저해제로서 보고된 물질들이 많지 않고 다양한 생물활성을 나타내는 suramin¹⁶⁾과 토양 방선균에서 분리한 A72363A¹⁷⁾ 등이 알려져 있으나 suramin은 독성이 강하고 선택성이 없으며 A72363A는 아직도 생체 내 암전이 억

*교신저자(E-mail) : jsahn@kribb.re.kr

제활성에 관한 보고가 없다. 한편 최근에 heparanase의 저해제로 구조적 유사체인 mannose의 4당체 인산화합물과 sulfated oligosaccharide 등을 합성하여 혈관생성의 억제와 마우스 모델동물에서 암전이 억제 활성이 보고되면서^{18,19,20} 이의 저해제에 대한 중요성이 더욱 부각되고 있다.

따라서 본 연구자들도 heparanase의 중요성을 인식하여 heparanase 저해물질을 개발하고 자 하였으나 heparanase 활성 분석의 어려움과 효소의 확보에 대한 어려움으로 우선 heparinase 저해물질을 탐색하기로 하였다. Heparinase는 세균인 *Flavobacterium*에서 분리된 것을 상업적으로 구입할 수 있어 효소원의 확보가 용이하다는 장점³과 heparin 뿐 아니라 기질로서 효소활성도는 낮지만 heparan sulfate도 분해할 수 있다는 사실과 heparanase 저해화합물은 heparanase 뿐만 아니라 heparinase도 저해한다는 사실²¹에 착안하여 천연자원으로부터 heparinase의 저해물질을 1차로 탐색하여 heparanase의 저해물질로 개발하고자 하였다. 그리고 heparanase/heparinase 활성의 분석은 기질인 heparan sulfate/heparin 이 분해되어 분자량이 작아진 반응생성물을 gel permeation 혹은 HPLC에 의해 분리하고 아울러 이들 기질량의 변화나 반응생성물의 정량을 위해서 기질을 방사성동위원소 표식이나 형광표식에 의한 방법을 사용해야하는 어려움과 번거로움이 존재하여 천연물의 저해활성검정에 직접 적용하기에는 기술적 무리가 따른다.¹⁵ 따라서 저자들은 heparinase 활성을 헤파린 정량법을 이용하여 변형시킨 antithrombin III와 factor Xa의 결합정도를 측정하는 발색법을 사용하여 간편하게 측정할 수 있는 방법을 고안하여 heparinase를 저해하는 활성물질을 토양 미생물 배양액에 대해서 탐색을 시도한 결과, 곰팡이 분리주에서 heparinase를 강하게 저해하는 물질인 CRM-646 화합물을 분리할 수 있었으며 이 화합물이 heparanase도 저해하는 것을 확인하였다.²²

그러나 아직은 heparinase/heparanase 저해물질을 생약식물 등의 천연물을 대상으로 탐색한 결과가 보고되지 않아서 저자들은 국내에서 사용하고 있는 생약식물을 대상으로 heparinase 저해활성을 탐색하고, 이를 토대로 heparanase 저해물질로 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 - Heparinase는 *Flavobacterium heparinum* 기원의 것이며 heparin은 돼지의 내장 점막에서 분리된 것을 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, antithrombin III, Factor Xa 및 Factor Xa의 기질은 Sigma Chemical Co.의 heparin 진단 kit(Catalog No. CRS106-A)을 구입하여 사용하였다. 그리고 그 외의 시약은 고순도 등

급의 것을 사용하였다.

Heparinase assay - 헤파린 10 ng을 포함하는 완충용액 17 μ l(14 mM sodium acetate and 1.4 mM $CaCl_2$, pH 7.0)에 검정할 시료용액 3 μ l를 넣고 heparinase 효소액 10 μ l(0.1 unit)를 첨가한 후 상온에서 15분간 반응을 시킨다. 반응 후의 잔여 heparin의 양을 정량하기 위하여 antithrombin III 용액 20 μ l를 첨가하고 상온에서 2분간 반응시킨 후 factor Xa 용액 20 μ l를 첨가하였다. 첨가 1분 후 factor Xa의 기질 20 μ l를 첨가하여 15분간 반응시키고 acetic acid 20 μ l를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값은 효소활성의 저해율이 50%에 달하는 시료의 농도로 결정하였다.

생약 및 생약시료의 조제 - 본 실험에 이용된 생약은 대전 일신약품(주)에서 구입하여 사용하였다. 건조한 시료 50 g을 methanol(250 ml)로 실온에서 7일간 추출한 후 40°C 이하에서 감압 농축하여 2 mg/ml의 농도가 되도록 70% 또는 100% methanol에 녹여 stock solution을 만들어 일차 탐색의 시액으로 사용했다. 일차 검색 결과, 강한 저해활성을 보여주는 시료에 대해서는 chloroform과 butanol로 용매 분획하여 chloroform, butanol, 수층 분획물을 0.2 mg/ml의 농도로 조절하여 이차 탐색에 적용하였다.

결과 및 고찰

132종 생약식물의 methanol 추출물을 대상으로 heparinase의 효소 활성에 대한 저해 정도를 조사하였다. 일차적으로 생약 시료를 최종 농도 200 μ g/ml에서 heparinase의 효소에 대한 저해 활성을 검색한 결과, 상백피, 사인, 천마, 황금, 패모, 신이화, 선학초, 적작약, 산사자, 백작약, 천초, 지유, 산수유, 조각자, 비자에서 60% 이상의 저해 활성을 나타내었고, 그 중에서도 특히 선학초, 적작약, 백작약, 천초, 지유, 산수유, 조각자, 비자 등에서는 90% 이르는 강한 저해 활성을 보였다(Table 1). 일차 검색 결과 선정된 생약 중 11종의 methanol 추출물을 각각 chloroform, butanol, 수층으로 용매 분획한 후, 최종 농도 20 μ g/ml에서 heparinase 효소에 대한 각각의 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, 모든 시료에서 chloroform 층으로 이행되는 저해물질이 확인되지 않았고, 상백피에서는 butanol 층으로 저해물질이 이행되었으며, 나머지 생약시료에서는 butanol과 수층에 대부분의 저해활성이 분산되어 존재하였다(Table 2).

1차로 선정된 11종의 생약 중 상백피는 butanol 층으로 활성물질이 대부분 이행되며 그 활성도 상대적으로 강하여 최종적인 후보 생약으로 선정하였다. 그러나 저자들이 사용하는 heparinase 활성검색법에서는 검정시료가 heparinase의

Table 1. Inhibition of heparinase activity by the methanol extracts of medicinal plants.

Sample	생약	Part of plant ^a	Inhibition (%) ^b
<i>Loranthus parasiticus</i>	상기생	ap	-
<i>Lilium distichum</i>	말나리	ap	-
<i>Prunus mume</i>	매실	fr	-
<i>Carthamus tinctorius</i>	홍화	fl	-
<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	형개	ap	-
<i>Cuscuta chinensis</i>	토사자	sm	-
<i>Rehmannia glutinosa</i>	숙지황	ra	-
<i>Lonicera japonica</i>	금잔화	fl	-
<i>Scirpus flaviatilis</i>	삼릉	rh	-
<i>Tribulus terrestris</i>	백질려	fr	-
<i>Aster tataricus</i>	자원	ra	-
<i>Coix lachryma-jobi</i>	의이인	sm	-
<i>Morus alba</i>	상백피	ba	63
<i>Akebia quinata</i>	목통	ra	-
<i>Gardenia jasminoides</i>	치자	fr	-
<i>Lophatherum gracile</i>	죽엽	ap	-
<i>Typha orientalis</i>	포황	po	-
<i>Morinda officinalis</i>	파극	ra	-
<i>Caesalpinia sappan</i>	소목	li	-
<i>Clematis chinensis</i>	위령선	ra	-
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	과루인	ra	41
<i>Torilis japonica</i>	사상자	fr	-
<i>Picrorrhiza kurroa</i>	호황련	rh	-
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	천문동	ra	-
<i>Schisandra chinensis</i>	오미자	fr	-
<i>Coptis japonica</i>	황련	rh	-
<i>Pachyma hoelen</i>	복령	ho	40
<i>Prunus persica</i>	도인	sm	-
<i>Arecae pericarpium</i>	대북피	ba	35
<i>Cistanche deserticola</i>	육종용	ap	-
<i>Liriope graminifolia</i>	맥문동	tu	-
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	rh	-
<i>Aconitum kusnezoffii</i>	초오	ra	-
<i>Anthriscus sylvestris</i>	전호	ra	-
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	천화분	po	-
<i>Phragmites communis</i>	노근	rh	-
<i>Lycium chinense</i>	구기자	fr	-
<i>Atractylodes japonica</i>	백출	rh	-
<i>Amomum xanthioides</i>	사인	sm	80
<i>Rehmannia glutinosa</i>	건지황	rh	-
<i>Gastrodia elata</i>	천마	rh	62
<i>Pinellia ternate</i>	반하	rh	-
<i>Akebia quinata</i>	통초	ap	-
<i>Scutellaria baicalensis</i>	황금	ra	59

Table 1. Continued

Sample	생약	Part of plant ^a	Inhibition (%) ^b
<i>Alisma orientale</i>	택사	rh	-
<i>Benincasa hispida</i>	동과자	sm	-
<i>Rubus coreanus</i>	북분자	fr	-
<i>Polyporus umbellatus</i>	지령	ho	-
<i>Aralia cordata</i>	독활	ra	-
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충	pc	47
<i>Sophora angustifolia</i>	고삼	ra	-
<i>Trigonella foenumgraecum</i>	호로파	sm	-
<i>Cassia obtusifolia</i>	결명자	sm	-
<i>Forsythia koreana</i>	연교	fr	47
<i>Gentiana scabra</i>	용담초	ra	-
<i>Adenophora tryphylla</i>	사삼	ra	-
<i>Angelica gigas</i>	당귀	ra	-
<i>Perilla frutescens</i>	소자	sm	-
<i>Fritillaria ussuriensis</i>	패모	bu	60
<i>Bambyx mori</i>	백강잠	ap	-
<i>Platycodon grandiflorum</i>	길경	ra	-
<i>Citrus unshiu</i>	진피	pc	-
<i>Evodia officinalis</i>	오수유	fr	-
<i>Poncirus trifoliata</i>	지실	fr	-
<i>Gentiana macrophylla</i>	진교	ra	-
<i>Cyperus rotundus</i>	향부자	rh	34
<i>Chrysanthemum indicum</i>	감국	fl	-
<i>Perilla frutescens</i>	소엽	ap	-
<i>Machilus thunbergii</i>	후박	ba	-
<i>Magnolia liliflora</i>	신이화	fl	59
<i>Zingiber officinale</i>	건강	rh	-
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	승마	rh	-
<i>Foeniculum vulgare</i>	회향	fr	-
<i>Agrimonia pilosa</i>	선학초	ap	92
<i>Nelumbo nucifera</i>	연자육	sm	-
<i>Aconitum carmichaeli</i>	부자	tu	-
<i>Curcuma zedoaria</i>	봉출	rh	45
<i>Ligusticum tenuissimum</i>	고본	ra	-
<i>Ledebouriella seseloids</i>	방풍	ra	-
<i>Phellodendron amurense</i>	황백	ba	-
<i>Arisaema erubescens</i>	남성	rh	-
<i>Paeonia lactiflora</i>	적작약	ra	87
<i>Bupleurum falcatum</i>	시호	ra	-
<i>Hordeum vulgare</i>	맥아	fr	-
<i>Sophora japonica</i>	괴화	fl	-
<i>Crataegus pinnatifida</i>	산사자	fr	80
<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈근	ra	38
<i>Artemisia argyi</i>	애엽	ap	-
<i>Crotot tiglim</i>	파두	sm	-

Table 1. Continued

Sample	생약	Part of plant ^a	Inhibition (%) ^b
<i>Plantago asiatica</i>	차전자	sm	-
<i>Dolichos lablab</i>	백편두	sm	-
<i>Teucrium verinicoides</i>	곽향	ap	-
<i>Polygala tenuifolia</i>	원지	ra	-
<i>Vitex rotundifolia</i>	만형자	fr	-
<i>Dendrobium moniliforme</i>	석곡	ap	44
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	감초	ra	-
<i>Atractylodes japonica</i>	창출	rh	-
<i>Xanthium strumarium</i>	창이자	fr	-
<i>Angelica dahurica</i>	백지	ra	-
<i>Lycium chinense</i>	지골피	ba	-
<i>Corydalis yanhusuo</i>	현호색	tu	-
<i>Mentha arvensis</i>	박하	ap	47
<i>Asiasarum sieboldi</i>	세신	ra	-
<i>Cirsium japonicum</i>	대계	ap	-
<i>Elsholtzia ciliate</i>	향유	ap	-
<i>Paeonia japonica</i>	백작약	ra	90
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	지모	rh	-
<i>Biota orientalis</i>	백자인	sm	-
<i>Rubia cordifolia</i>	천초	ra	88
<i>Dioscorea japonica</i>	산약	ra	-
<i>Areca catechu</i>	빈랑	sm	-
<i>Sinomenium acutum</i>	방기	rh	-
<i>Euphoria longana</i>	용안육	sm	-
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	현삼	ra	-
<i>Piper longum</i>	필발	fr	-
<i>Inula helenium</i>	목향	ra	-
<i>Chelidonium major</i>	백굴채	ap	-
<i>Acorus gramineus</i>	석창포	rh	-
<i>Piper longum</i>	백급	rh	-
<i>Sanguisorba officinalis</i>	지유	ra	88
<i>Rheum palmatum</i>	대황	rh	-
<i>Zizyphus jujube</i>	산조인	sm	-
<i>Angelica koreana</i>	강활	ra	-
<i>Cornus officinalis</i>	산수유	fr	87
<i>Archyranthes japonica</i>	우슬	ra	-
<i>Pueraria thynbergiana</i>	갈화	fl	-
<i>Lunicera japonica</i>	인동	lf	-
<i>Gleditsia sinensis</i>	조각자	fr	90
<i>Aconitum koreanum</i>	백부자	tu	-
<i>Amsonia elliptica</i>	정향피	ba	88
<i>Belamcanda chinensis</i>	사간	rh	-
<i>Torreya grandis</i>	비자	sm	90

^aap. aerial part; ba. bark; bu. bulb; cl. calyx; fl. flower; fr. fruit; hn. hoelen; li. lignum; lf. leaf; pc. pericarpium; po. pollen; ra. radix; rb. root bark; rh. rhizome; sm. seed; tu. tuber, ^bfinal concentrations: 200 µg/ml, ^c- : less than 30% inhibition.

Table 2. Inhibition of heparinase activity by chloroform, butanol and water fraction of primary selected medicinal plants.

Samples	% Inhibition			
	MeOH ext. ^a	CHCl ₃ fr. ^b	BuOH fr. ^b	Water fr. ^b
<i>Amomum xanthioides</i>	80	50	97	89
<i>Agrimonia pilosa</i>	92	31	85	85
<i>Paeonia lactiflora</i>	87	-	96	93
<i>Rubia cordifolia</i>	88	-	45	65
<i>Sanguisorba officinalis</i>	88	-	96	91
<i>Torreya grandis</i>	90	-	87	98
<i>Morus alba</i>	63	-	95	40
<i>Gleditsia sinensis</i>	90	31	70	87
<i>Crataegus pinnatifida</i>	80	-	62	98
<i>Cornus officinalis</i>	87	-	56	61
<i>Paeonia japonica</i>	90	53	98	97

^afinal concentrations: 200 µg/ml, ^bfinal concentrations: 30 µg/ml, ^c- : less than 30% inhibition.

효소활성을 저해하지 않고 heparin 혹은 antithrombin III와 factor Xa에 의한 coagulation의 작용을 저해하여 heparin 정량 분석에서 저해활성을 보일 수도 있는 가능성이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 heparinase를 첨가하지 않은 반응액에 상백피의 시료를 처리한 결과 antithrombin III와 factor Xa에 의한 coagulation의 작용에는 영향이 없음을 알았다. 따라서 상백피는 실제로 heparinase의 효소활성을 저해한다고 판단하여 활성물질을 분리하기로 결정하고 현재 다양한 정제기법을 사용하여 분리를 시도하고 있다.

포유류의 생체 내 조직과 기관은 세포간의 간극이 세포외 기질(ECM)로 채워져 있으며 ECM은 세포간의 구조와 세포간의 이동을 제지하는 역할을 하여 조직과 기관들을 구성하게 한다. 따라서 세포의 조직에서 이탈과 타 조직으로의 침윤과 접착 등의 과정에는 필연적으로 ECM barrier를 통과해야 한다. 이들 ECM은 collagen type IV, laminin과 heparan sulfate의 proteoglycan 등으로 이루어져 있고 암세포의 전이는 ECM의 분해를 위하여 matrix metalloproteinase(MMP) 등과 heparanase가 작용해야 한다는 것이 잘 알려져 있다. 따라서 암전이 억제제를 위한 약물의 개발을 위해서 이들 효소가 가장 적합한 목표로 인정되고 있다. 최근에는 MMP의 다양한 형태가 이들 ECM의 분해에 관련된다는 사실로 약물작용목표 효소의 다양성에 따른 선택성의 문제가 대두되고 있으나 현재까지 heparanase 유전자는 인간에서 한 종류만이 존재하는 것으로 알려져 암전이를 약물의 목표로 그 중요성이 더욱 인정받고 있다.^{8,9,23)}

혈관은 내피세포(endothelial cell)의 분열과 성장에 의해

서 생성되며 이때에 bFGF나 VEGF가 내피세포의 성장인자로 작용하게 된다. 그러나 초기 내피세포의 분열 시에 필요로 하는 세포성장인자는 기존조직 ECM의 heparan sulfate에 포집되어 있어서 heparanase에 의해서 heparan sulfate로부터 유리된 후에 내피세포의 수용체에 작용하게 된다. 또한 bFGF는 heparin/heparan sulfate 부분단편과 결합하여 활성형의 안정된 형태로 존재하면서 수용체에 효과적으로 작용할 수 있다.^{11,12,13,24} 암 조직의 증식을 위해서는 혈관생성이 필수적으로 요구되므로 혈관생성의 억제가 항암제 개발을 위한 목표 기작으로 새롭게 인식되면서 heparanase 저해제가 혈관생성 저해로 인한 항암제로의 개발가능성이 인정되고 있다. 따라서 heparanase 저해제는 혈관생성 저해에 의한 암조직 증식억제와 암세포의 타 조직으로의 전이를 억제하는 전이억제활성을 갖게 되어 가장 이상적인 항암제로 개발될 가능성 크다. 실제로 heparanase 저해제인 합성화합물 PI-88 등과 suramin이 mouse에서 현저한 항암작용이 관찰된다고 보고하고 있다.^{16,18,19,20}

또한 염증 작용시 leucocyte의 혈관 벽의 침탈과 염증부위의 축적이 이루지는 것은 암세포의 전이시 혈관벽의 침윤과 전이조직에서의 암세포의 집착과 같은 과정으로 일찍부터 염증 발생의 기전에 heparanase가 관여하는 것으로 알려졌다^{25,26,27} pro-inflammatory cytokine에 의해서 neutrophil과 macrophage, lymphocyte에서 heparanase 효소 활성이 급격히 증가한다는 사실 등^{28,29}으로 heparanase 저해제를 항염증제로 개발하는 연구도 시도되고 있다. 이와 같은 heparanase의 중요성으로 이 효소의 저해물질의 개발이 활발하게 진행되고 있으며 주로 heparin/heparan sulfate의 구조적 유도체들로서 다당류의 변환체를 합성하여 시도하고 있다.^{30,31,32}

그러나 이러한 중요성에도 불구하고 heparanase 저해제의 개발이 한정된 연구그룹에서 만 이루어지고 있는 이유는 heparanase의 분리와 효소활성 측정의 어려움 때문이다. Heparanase는 생체 내에서 미량이 생성되고 생체 내에서 분리된 후에는 매우 불안정하여 활성이 소실되는 문제점과 기질로서 heparan sulfate는 인공적인 합성이 불가능하고 동물의 조직이나 세포배양에서 얻어야 하며 아울러 분리시 ECM을 구성하는 다른 구성성분이 혼입되어 순수하게 획득하기가 어렵다. 그리고 기질에 대한 효소반응 후에 생성물도 분자량이 줄어든 heparan sulfate이므로 기질과의 구별이 용이하지 않기 때문에 분자량의 작아진 반응생성물을 gel permeation 혹은 HPLC에 의해 분리해야 하며 이들 기질이나 반응생성물을 정량하기 위해서 세포배양이나 실험동물에 동위원소나 형광물질의 표식에 의해서 기질인 heparan sulfate를 확보해야 하는 등의 어려움이 따른다.¹⁵

따라서 저자들은 heparan sulfate와 구조적으로 유사하고 효소 affinity와 선택성은 떨어지나 heparanase에 의해서도 분해되는 heparin을 기질로 하고 효소도 안정하고 상업적으로 쉽게 확보할 수 있는 bacterial heparinase를 사용하여 일차적으로 천연물로부터 탐색하여 저해물질을 분리하고 이를 다시 heparanase 저해제로 개발하고 자 하는 연구를 시도하였다. 한편 heparinase 저해물질은 혈액응고의 과정에서 생기는 동맥경화, 뇌졸중 등의 질병에 대한 예방과 치료에 이용되는 항응고제로서 heparin의 기능을 항진시키므로 이들 질병의 치료에 이용할 가능성도 있다. 또한 heparin의 염증반응 관여가 예견되어 이의 저해물질은 항염증제로의 개발가능성도 제기되고 있다.^{3,32} 이미 저자들은 이러한 방법으로 토양에서 분리한 곰팡이 배양액에서 heparinase 저해물질을 탐색하여 신규물질을 분리하고 이 물질이 heparanase 저해활성도 있음을 확인할 수 있었다.²² 현재 1차적으로 검색이 완료된 생약식물 중에서 저해활성이 강하고 활성물질이 용매층으로 이행되는 상백피를 우선적으로 선정하여 활성물질을 분리 중에 있다.

결 론

천연물로부터 heparinase/heparanase의 저해 물질을 검색할 목적으로 132종의 생약식물 추출물에 대한 heparinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, 선학초, 적작약, 백작약, 천초, 지유, 산수유, 조각자, 비자 등에서는 90%에 이르는 강한 저해 활성을 보였다. 따라서 일차 검색에서 선정된 11종의 생약 식료를 대상으로 용매 이행성을 조사한 결과, 상백피에서는 butanol 층으로 저해물질이 이행되었으며, 나머지 생약식료에서는 butanol과 수층에 대부분의 저해활성이 존재하였다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업의 자생식물이용기술개발사업단의 연구비에 의하여 수행된 결과로 연구비 지원에 감사 드리는 바입니다.

인용문헌

1. Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions, *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 443-475.
2. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulphate proteoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* **68**: 719-777.

3. Sasisekharan, R., Bulmer, M., Moremen, K. W., Cooney, C. L. and Langer, R. (1993) Cloning and expression of heparinase I gene from *Flavobacterium heparium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3660-3664.
4. Jandik, K. A., Gu, K. and Linhardt, R. J. (1994) Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. *Glycobiology* **4**: 289-296.
5. Bame K.J. (2001) Heparanases: Endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* **11**: 91R-98R.
6. Nakajima, M., Irimura, T., Di Ferrante, N. and Nicolson, G. L. (1983) Heparan sulfate degradation: relation to tumor invasive and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. *Science* **220**: 611-613.
7. Nakajima, M., Irimura, T. and Nicolson, G. L. (1988) Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.* **36**: 157-167.
8. Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J. and Parish, C. R. (1999) Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nature Med.* **5**: 803-809.
9. Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L. and Pecker, I. (1999) Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature Med.* **5**: 793-802.
10. Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C. M., Folkman, J. and Vlodavsky, I. (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* **28**: 1737-1743.
11. Liuzzo, J. P. and Moscatelli, D. (1996) Human leukemia cell lines bind basic fibroblast growth factor (FGF) on FGF receptors and heparan sulfates: downmodulation of FGF receptors by phorbol ester. *Blood* **87**: 244-255.
12. Vlodavsky, I., Miao, H., Medalion, B., Danagher, P. and Ron, D. (1996) Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer and Metastasis Reviews* **15**: 177-186.
13. Herr, B. A., Ornitz, M. D., Sasisekharan, R., Venkataraman, G. and Waksman, G. (1997) Heparin-induced self-association of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* **272**: 16382-16389.
14. Chang, Z., Meyer, K., Rapraeger, A. and Friedl, A. (2000) Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to assemble the fibroblast growth factor receptor complex *in situ*. *FASEB J.* **14**: 137-144.
15. Freeman, C. and Parish, C. R. (1998) Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity. *Biochem. J.* **330**: 1341-1350.
16. Nakajima, M., Dechavigny, A., Johnson, C. E., Hamada, J., Stein, C. A. and Nicolson, G. L. (1991) Suramin: a potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J. Biol. Chem.* **266**: 9661-9666.
17. Takatsu, T., Takahashi, M., Kawase, Y., Enokita, R., Okazaki, T., Matsukawa, H., Ogawa, K., Sakaida, Y., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Nakajima, M. and Tanzawa, K. (1996) A-72363 A-1, A-2, and -C, novel heparanase inhibitors from *Streptomyces nobilis* SANK 60912. I. Taxonomy of producing organism, fermentation, isolation, and structure elucidation. *J. Antibiotics* **49**: 54-60.
18. Parish, R. C., Freeman, C., Brown, J. K., Francis, J. D. and Cowden, B. W. (1999) Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res.* **59**: 3433-3441.
19. Miao, H., Elkin, M., Aingorn, E., Ishai-Michaeli, R., Stein, A. C. and Vlodavsky, I. (1999) Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int. J. Cancer* **83**: 424-431.
20. Takahashi S., Kuzuhara H. and Nakajima M. (2001) Design and synthesis of a heparanase inhibitor with pseudodisaccharide structure. *Tetrahedron* **57**: 6915-6926.
21. Tyrrel, J.D., Kilfeather, S. and Page, P. C. (1995) Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trend in Pharmacol. Science (TIPS)* **16**: 198-204.
22. Ko, H. R., Kim, B. Y., Oh, W. K., Kang, D. O., Ahn, S. C., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. (2000) CRM646-A and B, Novel fungal metabolites that inhibit heparinase. *J. Antibiotics* **53**: 384-387.
23. Kussie, P. H., Hulmes, J. D., Ludwig, D. L., Patel, S., Navarro, E. C., Seddon, A. P., Giorgio, N. A. and Bohlen, P. (1999) Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 183-187.
24. Moscatelli, D. (1988) Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**: 753-759.
25. Savion, N., Vlodavsky, I. and Fuks, Z. (1984) Interaction of T lymphocytes and macrophages with cultured vascular endothelial cells: attachment, invasion, and subsequent degradation of the subendothelial extracellular matrix. *J. Cell Physiol.* **118**: 169-178.
26. Naparstek, Y., Cohen, I. R., Fuks, Z. and Vlodavsky, I. (1984) Activated T lymphocytes produce a matrix-degrading heparan sulphate endoglycosidase. *Nature* **310**: 241-244.
27. Ihrcke, N. S., Parker, W., Reissner, K. J. and Platt, J. L. (1998) Regulation of platelet heparanase during inflammation; role of pH and proteinases. *J. Cell Physiol.* **175**: 255-267.

28. Vaday G. G. and Lider O. (2000) Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J. Leukocyte. Biol.* **67**: 149-159.
29. Ihrcke N. S., Parker, W., Reissner, K. J. and Platt, J. L. (1998) Regulation of platelet heparanase during inflammation: Role of pH and proteinases. *J. Cell. Physiol.* **175**: 255-267.
30. Bartlett, M. R., Cowden, W. B. and Parish, C. R. (1995) Differential effects of the anti-inflammatory compounds heparin, mannose-6-phosphate, and castanospermine on degradation of the vascular basement membrane by leukocytes, endothelial cells, and platelets. *J. Leukocyte. Biol.* **57**: 207-213.
31. Parish, R. C., Hindmarsh, J. E., Bartlett, M.R. Staykova, M.A., Cowden, B. W. and Willenborg, O. D. (1998) Treatment of central nervous system inflammation with inhibitors of basement membrane degradation. *Immunol. Cell Biol.* **76**: 104-113.
32. Lindahl, U., Lidholt, K., Spillmann, D. and Kjellen, L. (1994) More to heparin than anticoagulation. *Thromb. Res.* **75**: 1-32.

(2002년 4월 30일 접수)