생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
33(4) : 343 ~ 351 (2002)

자생식물 추출물의 세포접착인자 저해활성 검색

권오억 · 이승웅 · 정미연 · 김영호[1] · 노문철* · 이현선 · 김영국
한국생명공학연구원 지질대사연구실, [1]충남대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on ICAM-1/LFA-1 Mediated Adhesion of HL-60 Cells

Oh Eok Kwon, Seung Woong Lee, Mi Yeon Chung, Young Ho Kim[1], Mun-Chual Rho*, Hyun Sun Lee, and Young Kook Kim

Laboratory of Lipid Metabolism, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, [1]College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract – Atherosclerosis is a progressive disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the arteries. Monocytes/macrophages are involved in many aspects of the development of atherosclerotic plaques. It is known that the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressed preferentially on endothelial cells of atherosclerotic plaque, promotes local adhesion and transendothelial migration of monocytes, neutrophils, and lymphocytes. Using the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line, we investigated the inhibitory effects of methanol extracts of 175 natural plants on ICAM-1/LFA-1 mediated cell adhesion. Eight kinds of methanol extracts of tested plants inhibited PMA-induced homotypic aggregation of HL-60 cells without cytotoxicity at the concentration of 6.25 μg/ml. They were divided two fractions of $CHCl_3$ and H_2O to use solvent partition. Among them, $CHCl_3$ extracts (1.0 μg/ml) of *Saururus chinensis* and *Chloranthus japonicus* significantly inhibited aggregation of HL-60 cells without cytotoxicity, respectively.

Key words – Cell adhesion molecules, ICAM-1, Atherosclerosis, Plant extracts, HL-60 cells

동맥경화(atherosclerosis)는 어떤 특정원인에 기인되는 단일질환으로 설명하기는 어렵지만, 최근 세포분자생물학의 급속한 발전에 따라 그 발생기전의 이해가 이루어지고 있다. 혈중의 과다한 콜레스테롤 농도나 고혈압 혹은 독소나 병원체에 의해 혈관벽의 내피세포(endothelial cell)에 미세한 손상이 일어나면 만성염증의 형태로 발전하며, 내피세포에서 발현된 세포접착인자에 의해 혈중의 monocyte가 혈관벽으로 침투하고, 혈관벽에서 macrophage로 분화하여 혈중에 유입된 콜레스테롤을 저장하는 foam cell로 변형되면서 혈관세포의 섬유화를 점진적으로 진행시켜 혈관이 좁아지는 비가역적 변성을 일으키게 된다.[1-2] 따라서, 이러한 염증성 동맥경화과정에서 세포접착인자가 중요한 역할을 하고 있으며, monocyte와 내피세포 사이에서 이들의 발현을 차단하는 저해제의 개발이 다양하게 시도되고 있다.

*교신저자(E-mail) : rho-m@kribb.re.kr

Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1; CD54)은 Ig-superfamily에 속하는 adhesion receptor로서, 혈관내피세포와 일부 lymphocyte, monocyte에서 저밀도로 발현된다.[3-4] IL-1, TNF-α, IFN-γ와 같은 염증성 cytokine과 lipopolysaccharide(LPS)를 다양한 세포에 처리했을 때, multiple cell type에서 ICAM-1의 발현은 증가되어진다.[5] Leukocyte function associated antigen-1(LFA-1; CD11a/CD18)은 ICAM-1의 ligand로서 resting leukocyte에서는 불활성이지만, T-cell receptor-mediated signaling이나 phorbolester와 같은 다양한 자극인자에 의해 활성화되어진다.[6-7]

ICAM-1과 LFA-1은 염증부위로 이동하는 antigen-specific T-lymphocyte의 자극과 endothelium-leukocyte adhesion 등을 포함하는 다수의 cellular interaction을 서로 촉진시키는데 관여한다. 특히 동맥경화 병반에서 우선적으로 발현되는 ICAM-1은 국부적인 세포접착과 monocyte, neutrophil, lymphocyte가 혈관 벽에 침투하는 것을 촉진하게 된다.[8] ICAM-1이나, LFA-1에 직접적으로 대응하는 monoclonal

antibody를 동물에 처리한 결과, 동맥경화 병반과 염증반응에서 macrophage의 유입이 현저히 감소되는 연구결과가 보고되어졌다.[9-12] 이러한 결과로 미루어 ICAM-1이나 LFA-1의 저해제는 동맥경화나 염증과 같은 면역관련질환을 위한 잠재적인 치료제로서의 가치가 충분하다고 볼 수 있다.

Human promyelocytic leukemia cell line인 HL-60 세포는 여러 분화유도인자에 의해 monocyte나 granulocyte로 분화될 수 있는 bipotent cell line으로서 세포분화연구의 유용한 model로 사용된다.[13-14] Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 HL-60 세포의 monocyte/macrophage-like 또는 granulocyte-like differentiation을 유도하고, 그 결과로 세포성장이 정지되고, ICAM-1과 LFA-1에 의한 세포간 접착성을 증가시키게 된다.[15]

본 연구는 동맥경화 발병의 초기 단계인 fatty streak의 형성에 중요한 역할을 하는 ICAM-1/LFA-1 매개성 세포접착 저해제를 개발할 목적으로, PMA에 의해 유도되는 HL-60 세포의 homotypic aggregation을 지표로 하여 국내 식물자원의 MeOH 추출물에 대한 저해활성을 탐색하였고, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 시료로 사용한 식물재료는 자생식물이용기술개발사업단에서 분양 받은 자생식물 MeOH 추출시료를 사용하였고, 용매의 분배를 이용하여 $CHCl_3$, H_2O 분획으로 나누어 조제하였다. 각각의 식물 추출물은 DMSO에 녹여 10 mg/ml의 농도로 stock solution을 제조하였으며 이를 PBS로 1 mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

시약 – RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), kanamycin sulfate, phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco BRL에서 구입하였고, sodium bicarbonate($NaHCO_3$), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), PMA 등은 Sigma Co.에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 특급시약을 구입하여 사용하였다.

세포배양 – HL-60 세포(ATCC; CCL-240)는 10% FBS (v/v)와 60.0 mg/L kanamycin sulfate, 2.0 g/L $NaHCO_3$가 포함된 RPMI-1640을 배양액으로 하여, 37°C, 5% CO_2의 조건으로 배양하였다.

Cell aggregation assay[16] – HL-60 세포는 PMA로 자극하면 ICAM-1과 LFA-1에 의한 세포접착으로 응집을 일으킨다. 이러한 성질을 이용하여 96 well flatted-bottom plate에 HL-60 세포를 1×10^6 cells/ml(200 μl/well)가 되게 분주한 다음, 시료를 30분간 전처리 한다. 농도 의존적인 저해활성을 확인하고자 반응 시료의 최종 농도를 각각 25, 12.5, 6.25 μg/ml로 희석하여 처리하였고, anti-ICAM-1 monoclonal antibody를 positive control로 사용

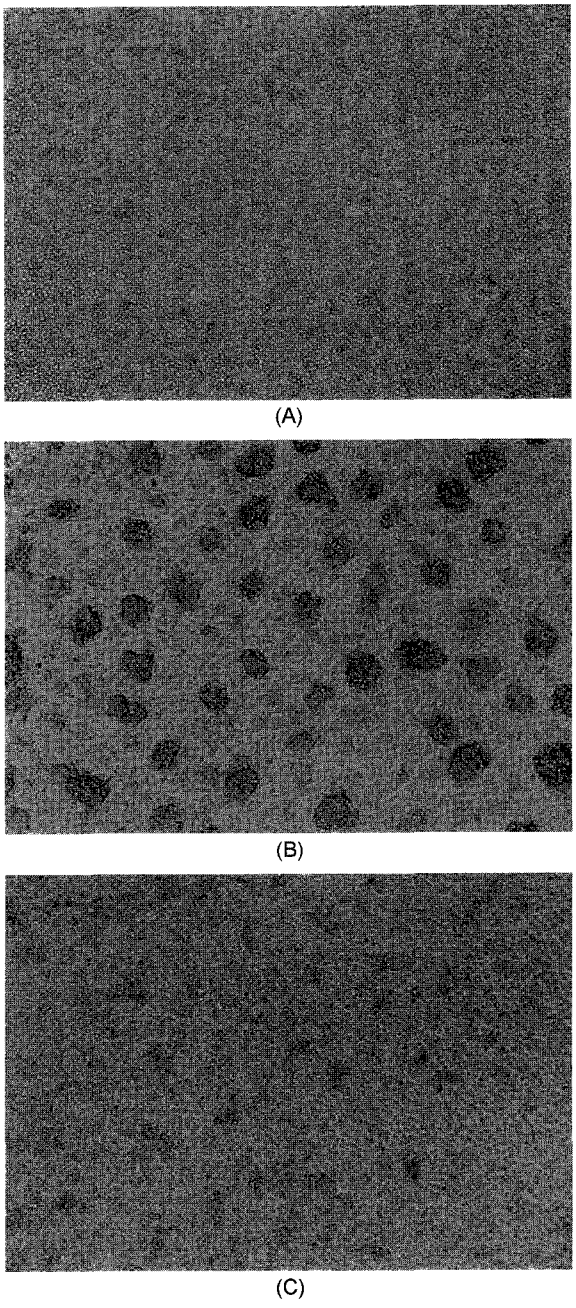

Fig. 1. PMA-induced ICAM-1/LFA-1 mediated aggregation of HL-60 cells.
Cells are non-stimulated (A) or stimulated after 48 hours with 25 nM PMA (B) in the presence of 25ng/ml anti-ICAM-1 mAb (C). Micrographs were created using a Nikon ECLIPSE TS100 microscope. Total magnification is 100×.

Table I. Evaluation of MeOH extracts from natural plants on anti-adhesion and cytotoxicity against HL-60 cells.

Natural Plant samples	Parts	Family	Inhibition	Cytotoxicity
Exochorda serratifolia (가침박달)	stem	Rosaceae	-	*
Rhamnus davurica (갈매나무)	stem	Rhamnaceae	-	*
Quercus aliena (갈참나무)	leaf, stem	Fagaceae	-	**
Chrysanthemum indicum (감국)	whole plant	Compositae	+	-
Ostericum koreanum (강활)	whole plant	Umbelliferae	-	-
Forsythia koreana (개나리)	leaf, stem	Oleaceae	-	*
Ampelopsis brevipedunculata var. *heterophylla* (개머루)	stem	Vitaceae	+	-
Boehmeria platanifolia (개모시풀)	whole plant	Urticaceae	+++	***
Cephalotaxus koreana (개비자나무)	leaf	Taxaceae	+++	***
Lycoris aurea (개상사화)	root	Amaryllidaceae	+++	***
Senecio vulgaris (개쑥갓)	whole plant	Compositae	+++	-
Corylus heterophylla var. *thunbergii* (개암나무)	leaf, stem	Betulaceae	-	**
Rhus trichocarpa (개옻나무)	stem	Anacardiaceae	-	**
Symplocos paniculata (검노린재)	stem	Symplocaceae	+	-
Rhus succedanea (검양옻나무)	fruit	Anacardiaceae	+	*
Cercidiphyllum japonicum (계수나무)	leaf	Cercidiphyllaceae	-	*
Philadelphus schrenckii (고광나무)	leaf, stem	Saxifragaceae	+	-
Acer mono (고로쇠나무)	leaf	Aceraceae	-	*
Ligularia fischeri (곰취)	whole plant	Compositae	++	-
Lonicera maackii (괴불나무)	leaf	Caprifoliaceae	-	***
Abies koreana (구상나무)	leaf	Pinaceae	-	*
Chrysanthemum zawadskii var. *latilobum* (구절초)	whole plant	Compositae	-	**
Platycarya strobilacea (굴피나무)	stem-cortex	Juglandaceae	-	***
Prunus padus (귀룽나무)	flower	Rosaceae	+	-
Sedum kamtschaticum (기린초)	whole plant	Crassulaceae	-	*
Jeffersonia dubia (깽깽이풀)	whole plant	Berberidaceae	-	**
Rubia akane (꼭두서니)	whole plant	Rubiaceae	-	*
Prunella vulgaris var. *lilacina* (꿀풀)	whole plant	Labiatae	+	-
Pleuropterus cilinervis (나도하수오)	whole plant	Polygonaceae	-	**
Kadsura japonica (남오미자)	leaf	Magnoliaceae	-	***
Astilbe chinensis var. *davidii* (노루오줌)	whole plant	Saxifragaceae	-	*
Ulmus davidiana var. *japonica* (느릅나무)	stem	Ulmaceae	-	***
Acer palmatum (단풍나무)	leaf	Aceraceae	-	*
Viburnum erosum (덜꿩나무)	stem	Caprifoliaceae	-	**
Xanthium strumarium (도꼬마리)	leaf, stem	Compositae	-	*
Camellia japonica (동백나무)	fruit	Theaceae	-	**
Ambrosia artemisiifolia var. *elatior* (돼지풀)	whole plant	Compositae	-	*
Majanthemum bifolium (두루미꽃)	whole plant	Liliaceae	++	-
Aralia elata (두릅나무)	leaf	Araliaceae	-	*
Eucommia ulmoides (두충)	stem-cortex	Eucommiaceae	+++	*
Euphorbia helioscopia (등대풀)	whole plant	Euphorbiaceae	-	*
Trachelospermum asiaticum var. *intermedium* (마삭줄)	leaf	Apocynaceae	-	**
Lilium distichum (말나리)	whole plant	Liliaceae	-	-
Cornus walteri (말채나무)	stem	Cornaceae	-	***
Berberis koreana (매자나무)	leaf, stem	Berberidaceae	-	*

Table 1. Continued

Natural Plant samples	Parts	Family	Inhibition	Cytotoxicity
Melia azedarach var. *japonica* (멀구슬나무)	stem-wood	Meliaceae	+	-
Rubus idaeus var. *microphullus* (멍석딸기)	whole plant	Rosaceae	-	**
Magnolia kobus (목련)	stem-cortex	Magnoliaceae	-	*
Ranunculus japonicus (미나리아재비)	whole plant	Ranunculaceae	-	***
Abeliophyllum distichum (미선나무)	leaf	Oleaceae	+	-
Taraxacum mongolicum (민들레)	whole plant	Compositae	-	*
Isodon japonicus (방아풀)	whole plant	Labiatae	-	*
Lycoris koreana (백양꽃)	root	Amaryllidaceae	+++	***
Tetragonia tetragonoides (번행초)	whole plant	Aizoaceae	-	*
Meehania urticifolia (벌깨덩굴)	whole plant	Labiatae	-	*
Bistorta manshuriensis (범꼬리)	whole plant	Polygonaceae	-	*
Weigela subsessilis (병꽃나무)	leaf, stem	Caprifoliaceae	-	*
Elaeagnus umbellata (보리수나무)	leaf, stem	Elaeagnaceae	-	*
Rubus coreanus (복분자딸기)	leaf, stem	Rosaceae	-	-
Prunus persica (복사나무)	stem-cortex	Rosaceae	-	-
Adonis amurensis (복수초)	whole plant	Ranunculaceae	+++	***
Acer triflorum (복자기)	leaf	Aceraceae	-	**
Lythrum anceps (부처꽃)	whole plant	Lythraceae	-	*
Selaginella tamariscina (부처손)	whole plant	Selaginellaceae	-	*
Mirabilis jalapa (분꽃)	root	Nyctaginaceae	-	*
Rhus chinensis (붉나무)	leaf	Anacardiaceae	-	*
Weigela florida (붉은병꽃나무)	leaf	Caprifoliaceae	-	***
Hosta longipes (비비추)	whole plant	Liliaceae	-	*
Youngia japonica (뽀리뱅이)	whole plant	Compositae	-	***
Morus alba (뽕나무)	stem	Moraceae	-	-
Torilis japonica (사상자)	whole plant	Umbelliferae	-	-
Corydalis speciosa (산괴불주머니)	aerial part	Fumariaceae	-	-
Wikstroemia trichotoma (산닥나무)	whole plant	Thymelaeaceae	-	***
Allium grayi (산달래)	whole plant	Liliaceae	-	*
Rubus crataegifolius (산딸기)	leaf, stem	Rosaceae	-	*
Cornus kousa (산딸나무)	leaf	Cornaceae	++	*
Allium victorialis var. *platyphyllum* (산마늘)	root	Liliaceae	-	*
Crataegus pinnatifida (산사)	leaf, stem	Rosaceae	+	*
Hydrangea serrata for. *acuminata* (산수국)	leaf, stem	Saxifragaceae	-	-
Zanthoxylum schinifolium (산초나무)	leaf	Rutaceae	-	-
Saururus chinensis (삼백초)	whole plant	Saururaceae	+++	-
Epimedium koreanum (삼지구엽초)	whole plant	Berberidaceae	-	-
Paris verticillata (삿갓나물)	whole plant	Liliaceae	-	*
Sageretia theezans (상동나무)	leaf, stem	Rhamnaceae	-	**
Lycoris squamigera (상사화)	root	Amaryllidaceae	+++	***
Quercus acutissima (상수리나무)	stem-cortex	Fagaceae	-	**
Lindera obtusiloba (생강나무)	leaf, stem	Lauraceae	-	*
Cinnamomum japonicum (생달나무)	leaf	Lauraceae	+	*
Carpinus laxiflora (서어나무)	leaf	Betulaceae	-	*
Lycoris radiata (석산)	root	Amaryllidaceae	+++	***

Table 1. Continued

Natural Plant samples	Parts	Family	Inhibition	Cytotoxicity
Prunus buergeriana (섬개벚나무)	leaf	Rosaceae	-	*
Sedum takesimense (섬기린초)	whole plant	Crassulaceae	-	**
Thymus quinquecostatus var. *japonica* (섬백리향)	whole plant	Labiatae	++	-
Aster glehni (섬쑥부쟁이)	aerial part	Compositae	+++	-
Acanthopanax koreanum (섬오갈피)	leaf	Araliaceae	-	***
Carpinus coreana (소사나무)	leaf	Betulaceae	-	**
Maackia fauriei (솔비나무)	stem-wood	Leguminosae	++	*
Hedera rhombea (송악)	whole plant	Araliaceae	-	**
Fraxinus sieboldiana (쇠물푸레)	stem-cortex	Oleaceae	-	**
Rumex acetosa (수영)	whole plant	Polygonaceae	-	-
Evodia daniellii (쉬나무)	stem	Rutaceae	+	-
Artemisia princeps var. *orientalis* (쑥)	whole plant	Compositae	-	*
Aster yomena (쑥부쟁이)	whole plant	Compositae	-	*
Ixeris dentata (씀바귀)	whole plant	Compositae	-	*
Spiraea pubescens (아구장나무)	leaf	Rosaceae	-	*
Euphorbia jolkini (암대극)	aerial part	Euphorbiaceae	-	*
Chelidonium majus var. *asiaticum* (애기똥풀)	whole plant	Papaveraceae	-	-
Primula sieboldii (앵초)	whole plant	Primulaceae	++	**
Cirsium japonicum var. *ussuriense* (엉겅퀴)	leaf, stem	Compositae	-	-
Persicaria hydropiper (여뀌)	whole plant	Polygonaceae	-	-
Acanthopanax sessilifolrus (오갈피)	stem	Araliaceae	-	*
Alnus japonica (오리나무)	stem-cortex	Betulaceae	-	*
Schisandra chinensis (오미자)	leaf, flower	Magnoliaceae	-	-
Lonicera vidalii (왕괴불나무)	leaf	Caprifoliaceae	-	-
Prunus yedoensis (왕벚나무)	stem	Rosaceae	-	*
Pourthiaea villosa (윤노리나무)	leaf, flower	Rosaceae	-	**
Akebia quinata (으름)	leaf, stem	Lardizabalaceae	-	-
Clematis mandshurica (으아리)	aerial part	Ranunculaceae	-	-
Convallaria keiskei (은방울꽃)	whole plant	Liliaceae	+++	***
Ginkgo biloba (은행나무)	stem	Ginkgoaceae	-	*
Kalopanax pictus (음나무)	stem-cortex	Araliaceae	-	-
Leonurus sibiricus (익모초)	whole plant	Labiatae	-	-
Lonicera japonica (인동)	whole plant	Caprifoliaceae	-	-
Albizzia julibrissin (자귀나무)	stem	Leguminosae	+++	**
Phytolacca esculenta (자리공)	leaf, stem	Phytolaccaceae	-	*
Callicarpa japonica (작살나무)	stem-cortex	Verbenaceae	-	*
Rubus hirsutus (장딸기)	whole plant	Rosaceae	-	*
Anthriscus sylvestris (전호)	root	Umbelliferae	-	***
Vaccinium oldhami (정금나무)	stem	Ericaceae	-	*
Viola mandshurica (제비꽃)	whole plant	Violaceae	-	*
Lespedeza maximowiczii (조록싸리)	leaf, stem	Leguminosae	-	-
Sasa borealis (조릿대)	leaf	Gramineae	-	*
Spiraea prunifolia var. *simpliciflora* (조팝나무)	flower	Rosaceae	-	-
Amorpha fruticosa (족제비싸리)	leaf	Leguminosae	+++	*
Viola acuminata (졸방제비꽃)	whole plant	Violaceae	-	*

Table 1. Continued

Natural Plant samples	Parts	Family	Inhibition	Cytotoxicity
Quercus serrata (졸참나무)	stem-cortex	Fagaceae	-	*
Ixeris stolonifera (좀씀바귀)	whole plant	Compositae	+++	-
Callicarpa dichotoma (좀작살나무)	leaf, stem	Verbenaceae	-	*
Acer pseudo-sieboldianum var. *koreanum* (좁은단풍)	leaf, stem	Aceraceae	+	-
Taxus cuspidata (주목)	leaf, stem	Taxaceae	+++	***
Adina rubella (중대가리나무)	stem-cortex	Rubiaceae	-	*
Justicia procumbens (쥐꼬리망초)	whole plant	Acanthaceae	-	***
Actinidia kolomikta (쥐다래)	leaf	Actinidiaceae	-	-
Ligustrum obtusifolium (쥐똥나무)	leaf	Oleaceae	-	-
Aristolochia contorta (쥐방울덩굴)	whole plant	Aristolochiaceae	-	-
Valeriana fauriei (쥐오줌풀)	whole plant	Valerianaceae	-	-
Hemistepta lyrata (지칭개)	whole plant	Compositae	-	**
Rhododendron mucronulatum (진달래)	stem, flower	Ericaceae	-	-
Plantago asiatica (질경이)	whole plant	Plantaginaceae	-	**
Styrax obassia (쪽동백나무)	stem	Styracaceae	-	**
Rosa multiflora (찔레꽃)	leaf	Rosaceae	-	*
Thea sinensis (차나무)	leaf	Theaceae	-	**
Lilium lancifolium (참나리)	aerial part	Liliaceae	-	-
Angelica gigas (참당귀)	whole plant	Umbelliferae	-	-
Euonymus sieboldiana (참빗살나무)	leaf	Celastraceae	+++	**
Cedrela sinensis (참죽나무)	leaf, fruit	Meliaceae	+++	-
Aster scaber (참취)	whole plant	Compositae	-	-
Acorus calamus var. *angustatus* (창포)	whole plant	Araceae	-	-
Heloniopsis orientalis (처녀치마)	whole plant	Liliaceae	-	*
Arisaema amurense var. *serratum* (천남성)	whole plant	Araceae	-	-
Rhododendron schlippenbachii (철쭉)	aerial part	Ericaceae	-	-
Smilax china (청미래덩굴)	leaf	Liliaceae	-	-
Campanula punctata (초롱꽃)	whole plant	Campanulaceae	-	-
Zanthoxylum piperitum (초피나무)	leaf	Rutaceae	-	-
Cornus controversa (층층나무)	stem	Cornaceae	-	***
Pueraria thunbergiana (칡)	leaf	Leguminosae	-	-
Veronica persica (큰개불알풀)	whole plant	Scrophulariaceae	-	**
Actinidia arguta var. *platyphylla* (털다래)	stem	Actinidiaceae	-	**
Sorbus alnifolia (팥배나무)	stem	Rosaceae	-	**
Magnolia sieboldii (함박꽃나무)	stem	Magnoliaceae	+++	***
Rosa rugosa (해당화)	leaf	Rosaceae	+++	-
Chloranthus japonicus (홀아비꽃대)	whole plant	Chloranthaceae	+++	-
Anemone koraiensis (홀아비바람꽃)	whole plant	Ranunculaceae	+++	-
Cardamine flexuosa (황새냉이)	aerial part	Cruciferae	-	**
Euonymus pauciflorus (회목나무)	stem, leaf	Celastraceae	+++	***

Test samples treated at the concentration of 25, 12.5, 6.25 μg/ml and the evaluations were expressed as mean of three replications. Inhibition effects were exhibited to the - : non-inhibition, + : inhibited at 25 μg/ml, ++ : inhibited at 12.5 μg/ml, +++ : inhibited at 6.25 μg/ml. Cytotoxicity was decided to the survival rate that each samples showed below 70% of control, and exhibited to the - : > 25 μg/ml, * : 25 μg/ml, ** : 12.5 μg/ml, *** : 6.25 μg/ml.

하였다. 이후, PMA를 최종 25 nM의 농도로 첨가한 뒤, 48시간 배양한 후, 현미경(Nikon; ECLIPSE TS100)으로 세포의 형태를 관찰하고 필요시 촬영(Nikon; COOLPIX 995)하였다.

MTT based cytotoxicity assay[17] – 세포접착 저해활성과 세포독성의 구별을 위하여 동일 농도조건에서 반응시료의 세포독성 검사를 수행하였다. 96 well round-bottom plate에 HL-60 세포를 2.5×10^4 cells/ml(200 μl/well)가 되게 분주한 다음, 반응시료를 cell aggregation assay와 동일한 농도조건으로 첨가하여 48시간 배양한 후, MTT법을 이용하여 세포의 생존률(%)을 측정하였다. MTT를 각각의 well에 최종농도 0.5 mg/ml로 처리한 후, 4시간 동안 배양한 다음, 500×g, 15분간 원심분리 한다. 배지를 aspiration한 후, 각각의 well에 DMSO를 100 μl씩 첨가하여 formazan 결정을 용해한 다음, microplate reader (Molecular Devices; VERSA max)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 식물시료에 의한 세포의 생존률은 아래의 식을 이용하여 계산하였고, 각각 농도별 실험군에서 대조군에 대하여 70% 이하의 생존률을 나타낸 시료를 세포독성을 나타내는 시료로 판단하였다.

세포의 생존률(%) = (실험군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

결과 및 고찰

PMA로 자극시킨 HL-60 세포를 이용하여 175종의 자생식물 MeOH 추출물에 대하여 ICAM-1/LFA-1 매개성 세포접착 저해활성을 조사하였고, MTT법을 이용하여 이들 시료의 세포독성을 함께 조사하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이, 무처리구의 HL-60 세포는 48시간 후 아무런 형태적 변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 1, A), 최종농도 25 nM PMA를 처리한 실험군에서는 완전한 homotypic aggregation이 관찰되었다(Fig. 1, B). PMA(25 nM)와 함께 anti-ICAM-1 mAb(25 ng/ml)를 처리한 실험군에서는 세포응집이 완전히 저해됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, C). 이 결과는 HL-60 세포의 homotypic aggregation이 ICAM-1/LFA-1 매개성임을 나타내고 있다.

1차 저해활성 검사의 결과를 Table 1에 요약하였다. 반응시료 중 최종농도 6.25 μg/ml 까지 모두 저해활성을 나타내면서 세포독성이 최종농도 25 μg/ml 이하에서 나타나지 않은 식물자원은 *Senecio vulgaris*(전초), *Saururus chinensis*(전초), *Aster glehni*(지상부), *Ixeris stolonifera*(잎), *Cedrela sinensis*(잎, 열매), *Rosa rugosa*(잎), *Chloranthus japonicus*(전초), *Anemone koraiensis*(전초) 등으로 유의성 있는 저해활성을 나타내었고, *Eucommia ulmoides*(줄기-수피), *Amorpha fruticosa*(잎) 등의 식물시료는 강한 저해활성을 나타낸 반면, 최종농도 25 μg/ml 이상에서는 세포독성을 나타내었다(Table 1). 검색과정에서 결과에 표시되지는 않았으나, 식물의 부위, 채집시기 추출물의 전처리과정 등이 활성물질 검색에 중요한 요소가 되는 것으로 확인되었다.

1차 활성검색결과, 강한 세포접착인자 저해활성을 나타내고, 세포독성이 나타나지 않은 식물시료 8종에 대하여 활성물질의 용매이행성을 조사하였다. 이들 시료의 MeOH 추출물을 $CHCl_3$와 H_2O 분획으로 나누고, 이들에 대한 세포접착인자 저해활성과 세포독성검사를 최종 25, 5, 1 μg/ml의 3단계 농도조건에서 수행하였다. *Saururus chinensis*(전초), *Chloranthus japonicus*(전초)의 경우, 활성물질이 $CHCl_3$ 분획으로 이행하여 최종농도 1 μg/ml 까지 강한 저해활성을

Table II. Inhibition and cytotoxicity of anti-cell adhesion by solvent fractions of natural plant samples

Natural Plant samples	Parts	Inhibition			Cytotoxicity		
		MeOH	$CHCl_3$	H_2O	MeOH	$CHCl_3$	H_2O
Senecio vulgaris	whole plant	+	+	-	-	-	-
Saururus chinensis	whole plant	++	+++	-	-	-	-
Aster glehni	aerial part	+	+	-	-	-	-
Ixeris stolonifera	whole plant	+	+	-	-	-	-
Cedrela sinensis	leaf, fruit	+	++	-	-	-	-
Rosa rugosa	leaf	+	-	-	-	-	-
Chloranthus japonicus	whole plant	++	+++	-	-	-	-
Anemone koraiensis	whole plant	+	-	-	-	-	-

Test samples treated at the concentration of 25, 5, 1 μg/ml and the evaluations were expressed as mean of three replications. Inhibition effects were exhibited to the - : non-inhibition, + : inhibited at 25 μg/ml, ++ : inhibited at 5 μg/ml, +++ : inhibited at 1 μg/ml. Cytotoxicity was decided to the survival rate that each samples showed below 70% of control, - : > 25 μg/ml.

나타내었고, *Cedrela sinensis*(잎, 열매)는 최종농도 5 μg/ml 까지 활성을 나타내었으며, 이들 시료 모두 세포독성은 나타나지 않았다. *Senecio vulgaris*(전초), *Aster glehni*(지상부), *Ixeris stolonifera*(전초)의 경우는 $CHCl_3$ 분획으로 활성물질의 이행은 나타났지만, 그 활성이 MeOH 추출물과 비교하여 증가되지 않았다. 한편, *Rosa rugosa*(잎), *Anemone koraiensis* (전초)의 MeOH 추출물을 $CHCl_3$로 분획함에 따라 그 활성이 소실되었다 (Table 2).

본 연구는 동맥경화 발생의 초기단계인 fatty streak의 형성에 중요한 역할을 하고있는 ICAM-1이라는 세포접착인자를 target으로 하였기 때문에, 지금까지의 동맥경화와 관련된 치료제의 작용기작과는 다른 약품의 개발이 기대되어진다. 또한 ICAM-1이 염증반응 및 암의 전이에도 관련되어 있기 때문에 동맥경화관련질환 뿐만이 아닌 항염증제, 항암제로서의 응용도 기대되어진다.

현재, 본 연구실에서는 세포간의 응집에 대해 강한 저해활성을 나타낸 시료의 활성물질을 분리하고 그 구조를 규명하는 연구를 진행 중에 있으며 계속된 screening을 통하여 활성후보 자원을 확보하고 있다.

결 론

동맥경화는 만성염증질환의 일종으로 monocyte와 lymphocyte가 혈관벽으로 침투하면서 발병하게 되며, 세포접착인자는 동맥경화병변에서 이들 세포들과 내피세포 사이의 반응에 중요한 역할을 한다. 본 연구는 동맥경화와 염증 등의 치료제를 개발할 목적으로, human promyelocytic leukemia cell line인 HL-60 세포를 이용하여 175종의 자생식물 MeOH 추출물을 대상으로 ICAM-1/LFA-1 매개성 세포접착인자 저해활성검색을 수행하였다. 그 결과, 최종농도 6.25 μg/ml에서 세포독성 없이 강한 저해활성을 나타내는 8종의 식물자원을 검색하였고, 이들에 대한 활성물질의 용매이행성을 조사한 결과, *Saururus chinensis*와 *Chloranthus japonicus*의 $CHCl_3$ 분획이 각각 최종농도 1.0 μg/ml에서 PMA에 의해 유도된 HL-60 세포의 homotypic aggregation에 대한 저해활성이 강하게 나타났으며, 최종농도 25.0 μg/ml 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구지원(과제번호 PDM0020213)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

1. Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* **57** : 791-804.
2. Christoper, K. G. and Joseph, L. W. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**: 503-516.
3. Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434.
4. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. and Springer, T. A. (1986) A human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**: 1270-1274.
5. Hubbard, A. K. and Rothlein, R. (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1379-1386.
6. Dustin, M. L. and Springer, T. A. (1989) T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**: 619-624.
7. Rothlein, R. and Springer, T. A. (1986) The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* **163**: 1132-1149.
8. Thomas, J. and DeGraba, M. D. (1997) Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atheroscleotic plaque. *Neurology* **49**: 15-19.
9. Patel, S. S., Thiagarajan, R., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. (1998) Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation* **97**: 75-81.
10. Nishikawa, K., Guo, Y. J., Miyasaka, M., Tamatani, T., Collins, A. B., Sy, M. S., McCluskey, R. T. and Andres, G. (1993) Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/ lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* **177**: 667-77.
11. Kobayashi, Y., Kawai, K., Honda, H., Tomida, S., Niimi, N., Tamatani, T., Miyasaka, M. and Yoshikai, Y. (1995) Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* **164**: 295-305.
12. Nagase, T., Fukuchi, Y., Dallaire, M. J., Martin, J. G. and Ludwig, M. S. (1995) In vitro airway and tissue response to antigen in sensitized rats. Role of serotonin and leukotriene D4. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: 81-86.
13. Collins, S. J., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-349.
14. Collins, S. J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233-1244.

15. Das, D., Pintucci, G. and Stern, A. (2000) MAPK-dependentexpression of $p21^{WAF}$ and $p27^{kipl}$ in PMA-induced differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett.* **472**: 50-52.
16. Katagiri, K., Katagiri, T., Koyama, Y., Morikawa, M., Yamamoto, T. and Yoshida, T. (1991) Expression of src family genes during monocytic differentition of HL-60 cells. *J. Immunol.* **146**: 701-707.
17. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.

(2002년 8월 12일 접수)