

## 종양괴사인자에 의하여 유도된 혈관내피세포의 Cell Adhesion Molecules 발현을 억제시키는 플라보노이드 선별

최정숙 · 최연정 · 박성희 · 이용진 · 강영희<sup>†</sup>

한림대학교 생명과학부 식품영양학 전공

### Selection of Flavonoids Inhibiting Expression of Cell Adhesion Molecules Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Human Vascular Endothelial Cells

Jung-Suk Choi, Yean-Jung Choi, Sung-Hee Park, Yong-Jin Lee and Young-Hee Kang<sup>†</sup>

Division of Life Sciences and Silver Biotechnology Research Center, Hallym University,  
Chuncheon 200-702, Korea

#### Abstract

Adhesion of leukocytes to the activated vascular endothelium and their subsequent recruitment/migration into the artery wall are key features in the pathogenesis of atherosclerosis and inflammatory diseases. These features have been mediated by cell adhesion molecules including vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1). This study examined whether flavonoids inhibit the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion via a modulation of the protein expression of VCAM-1 and ICAM-1 of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). TNF- $\alpha$  markedly increased the adhesion of THP-1 monocytes to endothelial cells and induced the expression of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin proteins in HUVECs. Micromolar concentrations of the flavones luteolin and apigenin and the flavonol quercetin near-completely blocked the monocyte adhesion to the activated endothelial cells and the induction of these adhesion molecules. However, equimicromolar catechins of (-)epigallocatechin gallate and (+)catechin, the flavonol myricetin and the flavanones of naringin and hesperidin had no effect on TNF- $\alpha$ -activated monocyte adhesion. (-)Epigallocatechin gallate, (+) catechin, and naringin did not attenuate the TNF- $\alpha$  induction of these adhesion molecules. Furthermore, culture with luteolin and apigenin strongly blocked the expression of TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 mRNA and modestly attenuated ICAM-1 mRNA. Quercetin modestly decreased the TNF- $\alpha$ -activated VCAM-1 and ICAM-1 mRNAs. These results demonstrate that flavonoids classified as flavones and flavonols may inhibit monocyte adhesion to the TNF- $\alpha$ -activated endothelium, most likely due to a blockade of expression of functional adhesion molecules down-regulated at the transcriptional level, indicating a definite linkage between the chemical structure of flavonoids and the expression of cell adhesion molecules. Furthermore, the antiatherogenic feature of flavonoids appears to be independent of their antioxidant activity.

**Key words:** flavonoids, VCAM-1, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , atherogenesis, endothelium

#### 서 론

혈중 고콜레스테롤은 죽상경화증을 발현시키는 핵심요인으로 간주되어 왔다(1-3). 죽상경화과정의 초기단계는 임파구, 다형다핵성 백혈구 및 단핵구가 손상된 혈관 내피조직에 결집되면서 나타나는데, 이것은 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1)과 E-selectin 등의 cell adhesion molecules(CAMs)에 의하여 수반된다고 알려져 있다(4-7). CAMs은 유도성 물질이어서 interleukin-I과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 염증성 cytokines에 의하여 발현이 증가된다고 한다(5,8). 게다가

CAMs의 발현은 다양하게 이루어지며 growth factors, platelet activators 및 chemotactic factor에 의한 복잡한 조절기전이 관여하는 것으로 추정된다. CAMs은 토끼와 생쥐에서 뿐만 아니라, 사람의 관상동맥과 복부대동맥의 죽상경화성 병변부위에서 발견되며 신생혈관 및 염증성 침범부위의 죽상경화성 플라그 형성에 관여하는 것으로 보고되어 왔다(9-12).

플라보노이드는 녹차, 콩류, 포도, 마늘 및 양파류 등의 채소나 과일 등의 식물체에 존재하는 수용성 색소물질로 프랑스인 등이 적포도주의 생리활성작용 효과를 설명한 French Paradox에 잘 나타나 있다(13). 플라보노이드는 다양한 형태로 존재하며 flavonols, flavones, isoflavones, flavonones, flavan-

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: yhkang@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-240-1475, Fax: 82-33-254-1475

3-ols, 그리고 anthocyanidins의 소그룹으로 나누어진다. 그러나 모든 플라보노이드가 같은 생리활성을 갖는다고는 볼 수 없다. 플라보노이드는 세포나 조직에서 활성산소종을 제거하는 자연적인 항산화제의 역할을 지니고 있다고 보고되고 있으며(14-16), CAMs과 matrix proteases를 억제시키는 항염증성 물질로서도 보고되고 있다(17-19). 또한, 플라보노이드는 proanthocyanidins과 phenolic acids 등과 마찬가지로 polyphenolics으로서 현재 순환기 질환의 예방이나 치료에 그 활용성이 제시되고 있다(20,21). 플라보노이드의 생체 이용성이 문제될 수 있기 때문에, 이러한 생리적인 효과가 생체 내에서도 유효한지 확실하지 않으며, 또한 어떠한 작용기작으로 이러한 생리활성이 이루어지는 지에 대해서는 여전히 많은 연구가 필요하다고 본다.

CAMs 발현 억제효과와 관련한 플라보노이드의 항동맥경화작용을 규명하기 위하여 flavanols인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin, flavonols인 quercetin과 myricetin, flavanones인 naringin과 hesperidin 그리고 flavones인 luteolin과 apigenin의 4가지 구조적으로 서로 다른 소그룹의 플라보노이드를 본 실험에 도입하였다. 서로 다른 그룹 간에 또는 같은 그룹내에서 각각의 플라보노이드의 polyphenols들은 항산화능이 다르다고 한다(22,23). 이러한 문헌들의 실험적인 증거들을 근거로 하여, 본 연구에서는 염증성 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ 에 의하여 유도된 CAMs 발현에 있어 다양한 형태의 플라보노이드가 어떠한 효과를 발휘하는지를 비교 분석하여 혈관경화과정의 초기단계에 대한 플라보노이드의 항동맥경화의 활성효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 혈관내피세포

혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells)는 collagenase 효소(collagenase type III, Worthington Biochemicals Co., Lakewood, NJ, USA)를 이용하여 분리하였고, 37°C, 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 배양조건에서 일차배양하였다(24). 혈관내피세포의 전위 판별은 DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)의 형광물질(Molecular Probes Co., Eugene, OR, USA)로 표지된 아세틸화된 저밀도지단백의 uptake 실험을 통하여 이루어졌다(25).

### 세포배양실험

일차배양으로 준비된 미세혈관 내피세포는 10% fetal bovine serum과 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.9 mg/mL bovine brain extract, 0.75 mg/mL human epidermal growth factor, 그리고 0.075 mg/mL hydrocortisone이 첨가되어 있는 25 mM HEPES M199 배지(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에서 배양되었다. Human monocytic leukemic cells인 THP-1 단핵구 세포주는 RPMI-

1640 배지에서 배양되었다.

### 플라보노이드

플라보노이드 소그룹으로 분류되는 4가지 형태인 flavanols인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin, flavonols인 quercetin과 myricetin, flavanones인 naringin과 hesperidin 그리고 flavones인 luteolin과 apigenin은 각각 Sigma Chemical 회사에서 구입되었다. 사용된 플라보노이드는 세포배양실험을 위하여 미리 dimethyl sulfoxid(DMSO)에 녹여서 사용하였는데(26), 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.5% 이하이었고, 예비실험을 통한 각각 플라보노이드의 배양실험을 위한 적정농도는 50 µM이었다.

### In vitro adhesion 실험

TNF- $\alpha$ 에 의하여 활성화된 혈관내피세포에 단핵구의 부착을 플라보노이드가 얼마나 억제시킬 수 있는지를 조사하였다. 플라보노이드 50 µM가 첨가된 M199 배지에서 혈관내피세포를 20분간 전처리하여 10 ng/mL TNF- $\alpha$ 로 6시간 활성화시켰다. Park 등(27)의 예비실험에서 10 ng/mL TNF- $\alpha$ 를 6시간 배양하면 CAMs 발현은 최대 활성을 나타낸다는 것이 구명되었다. 한편, RPMI 1640 배지에서 배양된 THP-1 단핵구를 5 µM calcein-AM(Molecular Probes Co. Eugene, OR, USA)으로 30분간 염색시키고 혈관내피세포와 동시배양시켜 세척한 다음, SPOT II 디지털 카메라가 부착된 형광현미경 상에서 485 nm excitation, 538 nm emission 파장으로 THP-1 단핵구의 혈관내피세포에 부착정도를 측정하였다.

### 단백질 분리와 Western blot 분석

혈관내피세포의 VCAM-1, ICAM-1 그리고 E-selectin의 CAMs 단백질 발현을 측정하기 위하여 Western blot 분석을 시도하였다. Western blot 분석을 위하여 우선 혈관내피세포에서 100% glycerol, 10% SDS, 1%  $\beta$ -glycerophosphate, 0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 M NaF 그리고 protease inhibitor cocktail이 함유된 1.0 M Tris-HCl(pH 6.8) lysis buffer를 사용하여 세포 extracts를 준비하였다. 준비된 세포 extracts의 단백질은 8% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동을 시켰다. Gel 상에 있는 단백질은 nitrocellulose membrane으로 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk와 함께 배양하였다. Blot은 nitrocellulose membrane과 각각의 CAMs 단백질의 일차항체(monoclonal rabbit anti-human antibody, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 배양한 후에, goat anti-rabbit horseradish peroxidase(1:7,500, Jackson Immuno Research Lab., West Grove, PA, USA)의 이차항체로 1시간 배양하였다. Nitrocellulose membrane에 있는 CAMs 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence(Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL, USA)로 검출하여 Konica X-ray 필름으로 촬영하였다.

RNA 분리와 역전사 중합효소 연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR))

배양실험 후에 혈관내피세포의 RNA를 상업용 Trizol 시약(Gibco BRL, Gainsberg, MD, USA)을 제조회사의 사용법에 따라 사용하여 추출하였다. 분리 추출된 RNA (5 µg)를 Tris buffer[50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1 mM dNTP]에서 10,000 units reverse transcriptase(Promega Co., Madison, WI, USA)와 500 µg/mL oligo-(dT)<sub>15</sub> primer (Bioneer Co., Korea)로 42°C에서 50분간 역전사 과정을 실시하였고, 이 과정을 70°C에서 15분간 가열하므로써 중지시켰다. 각 CAMs의 mRNA를 증폭시키기 위하여 적절한 primers를 사용하였는데, VCAM-1 mRNA 증폭을 위한 primer sequences는 sense nucleotides 5'-ATGCC TGGGAAGATGGTTCGTGA-3'와 antisense nucleotides 5'-TGGAGCTGGTAGACCCTCGCTG-3'이었고, ICAM-1 mRNA 증폭을 위한 primer의 sequences는 sense nucleotides 5'-GGTGACGCTGAATGGGGTTCC-3'와 antisense nucleotides 5'-GTCCATCATGGTGGGGCTATGACTC-3'이었다. 뿐만 아니라, β-actin(a housekeeping gene) mRNA 증폭을 위한 primer의 sequences는 sense nucleotides 5'-GACTA CCTCATGAAGATC-3'와 antisense nucleotides 5'-GATC CACATCTGCTGGAA-3'이었다. PCR 과정은 Tris buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP, 100 units of *Taq* DNA polymerase (Promega Co., WI, USA), 0.1 µM β-actin primer 및 0.1 µM VCAM-1과 ICAM-1 primers로 94°C에서 1분간, 55°C에서 2분간 그리고 72°C에서 3분간씩 30번 반복 실시되었다. 증폭된 PCR 산물(5 µL)은 ethidium bromide(0.5 µg/mL)가 함유된 1% agarose-formaldehyde gel 상에서 전기영동을 실시하였으며, gel 상의 bands는 UV transilluminator(Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)로 가시화 되었고, photographs를 Polaroid Type 667 positive/negative 필름으로 현상하였다. Primer를 첨가하지 않은 negative control samples로 RT-PCR 분석을 실시하여 오염상태를 정기적으로 검사하였다.

#### 통계처리

실험 data는 means ± SEM으로 표시하였으며, SAS PC program(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 그룹간의 차이(p<0.05)를 비교하였다. Two-way ANOVA로 검증하였고 유의적인 차이를 보이는 그룹에 대해서는 Tukey correction으로 검증하였다.

#### 결과 및 고찰

TNF-α로 활성화된 혈관내피세포와 단핵구의 adhesion에서 플라보노이드의 억제효과

본 연구에서는 TNF-α로 활성화된 혈관내피세포와 단핵

구의 adhesion에 있어서 사용된 50 µM 플라보노이드가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. Choi 등(28)의 연구결과에 따라 50 µM 플라보노이드를 세포배양에 사용하였는데 이 농도에서는 혈관내피세포의 증식과정에서 세포독성을 나타내지 않았다. Fig. 1은 혈관내피세포에 calcein-AM으로 염색 표시된 단핵구의 adhesion을 촬영하고 정량화한 결과이다. TNF-α를 6시간 처리한 혈관내피세포는 이것을 처리하지 않은 혈관내피세포에 비하여 THP-1 단핵구 adhesion이 유의적으로 증가되었다. 한편, TNF-α를 처리한 혈관내피세포에 각각의 플라보노이드를 처리하였을 때, 단핵구 adhesion을 억제시키는 플라보노이드의 효과는 각기 다르게 나타났다. Flavonones인 apigenin과 luteolin은 TNF-α에 의한 단핵구 adhesion을 완전히 억제시켰으며, flavonol인 quercetin에서도 상당한 억제효과가 나타났다(Fig. 1). 반면에, flavanones인 naringin과 hesperidin 그리고 flavanol catechins인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechins에서는 이러한 억제효과가 전혀 보여지지 않은 것으로 조사되었다. 그러므로, flavonones과 flavanols 중의 quercetin은 죽상경화과정에서 활성화된 혈관내피조직 부위에 단핵구의 adhesion을 억제하여 죽상경화과정의 초기단계를 억제시킬 수 있는 탁월한 효과가 있음을 보여주었다.

다른 세트의 한 실험에서는 luteolin, apigenin 그리고 quercetin이 단핵구의 adhesion을 억제시키는 것이 혹시 이러한 플라보노이드가 TNF-α에 의하여 활성화된 혈관내피세포에 세포독성을 유발하여 혈관내피세포의 숫적 감소가 나타나면서 단핵구의 adhesion을 억제시킨 것이 아닌지 조사하였다. TNF-α 존재하에 플라보노이드의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 플라보노이드에 의한 세포생존율을 조사한 결과는 Fig. 2에 요약되었다. 혈관내피세포의 THP-1 adhesion에 탁월한 억제효과를 보인 luteolin과 apigenin 그리고 quercetin은 아무 것도 처리되지 않은 혈관내피세포 대조군의 세포생존율과 유의적으로 다르지 않았다. 그러므로, 본 연구에 사용된 이러한 플라보노이드 50 µM은 TNF-α로 처리된 혈관내피세포에 세포독성을 전혀 나타내지 않았다는 것을 알 수 있었다. 이로서, TNF-α로 활성화된 혈관내피세포의 단핵구 adhesion은 명백하게 이러한 플라보노이드의 세포독성이 아닌 플라보노이드의 생리활성으로 인하여 억제되었다고 볼 수 있다.

활성화된 혈관내피세포의 단핵구 adhesion에 대한 플라보노이드의 억제효과는 플라보노이드의 활성산소를 제거하는 항산화능과는 무관한 것이 아닌가 추정된다. 본 연구에 사용된 플라보노이드는 세포나 조직에서 활성산소종을 제거하는 자연적인 항산화제의 역할을 지니고 있다고 보고되고 있다(16-18). Choi 등(28)의 최근 연구에서, 본 실험에 사용된 flavanols인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin 그리고 apigenin의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) free radical의 소거활성이 조사되었다. (-)Epigallocatechin gallate와 (+) catechin은 DPPH를 50% 소거할 수 있는 농도인 SC<sub>50</sub>이

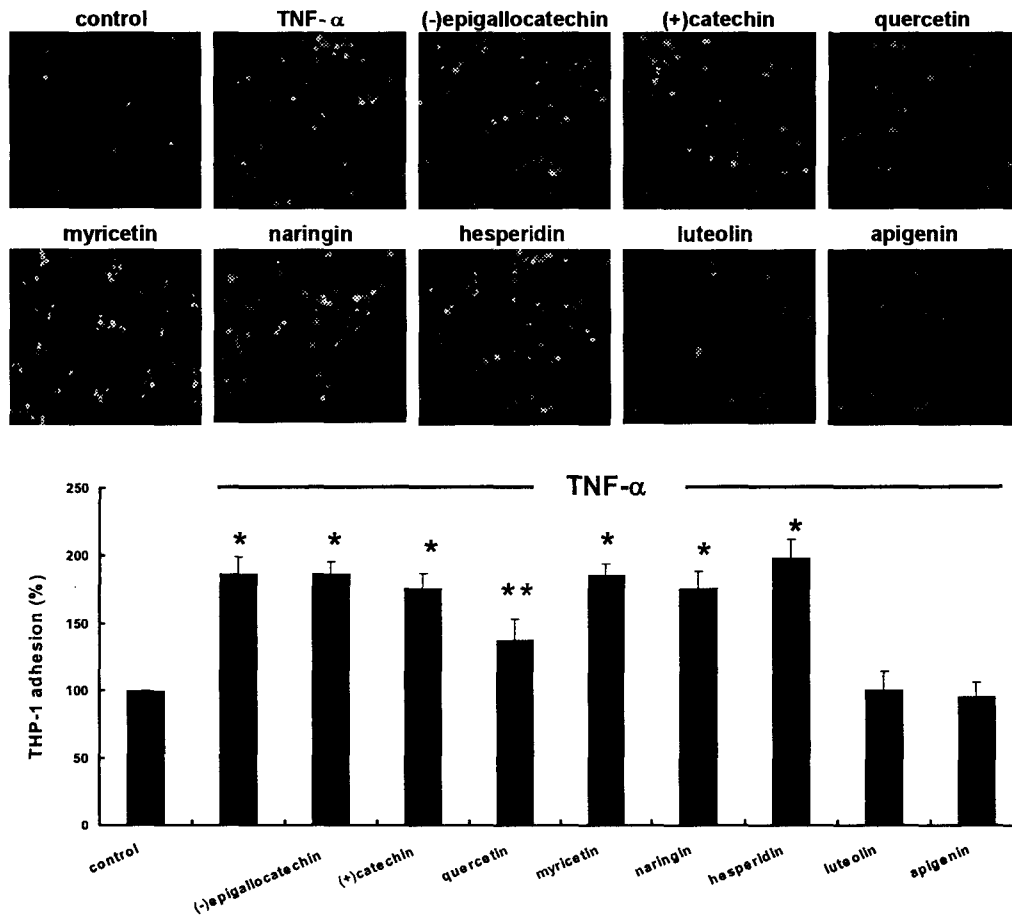


Fig. 1. Inhibition by flavonoids of THP-1 monocyte adhesion to the TNF- $\alpha$ -activated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

HUVECs were pre-treated with and without 50  $\mu$ M flavonoids for 20 min and then activated with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  for 6 hrs. Endothelial cells were washed twice with phosphate buffer saline and co-cultured with calcein-AM-labeled THP-1 monocytes for 24 hrs. Upper panel: Images were obtained using a fluorescence microscopy. Microphotographs are representative of 3~4 microscopic fields per chamber slide (in duplicate) of 3 independent experiments. Magnification  $\times$ 200. Bottom panel: The bar graphs (means  $\pm$  SEM) represent quantitative results obtained by using a Fluoroscan ELISA plate reader at  $\lambda$ =485 nm excitation and  $\lambda$ =538 nm emission. \* $p$ <0.05, compared to untreated control adhesion. \*\* $p$ <0.05, compared to both untreated control and TNF- $\alpha$  induced VCAM-1 expression.

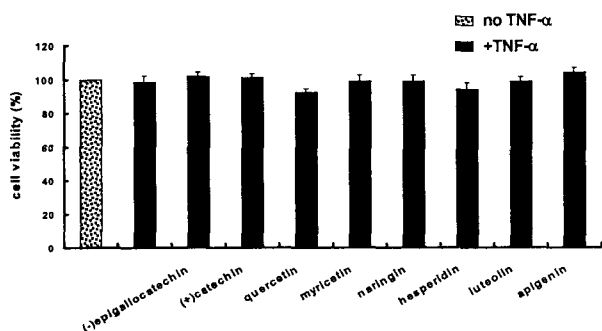


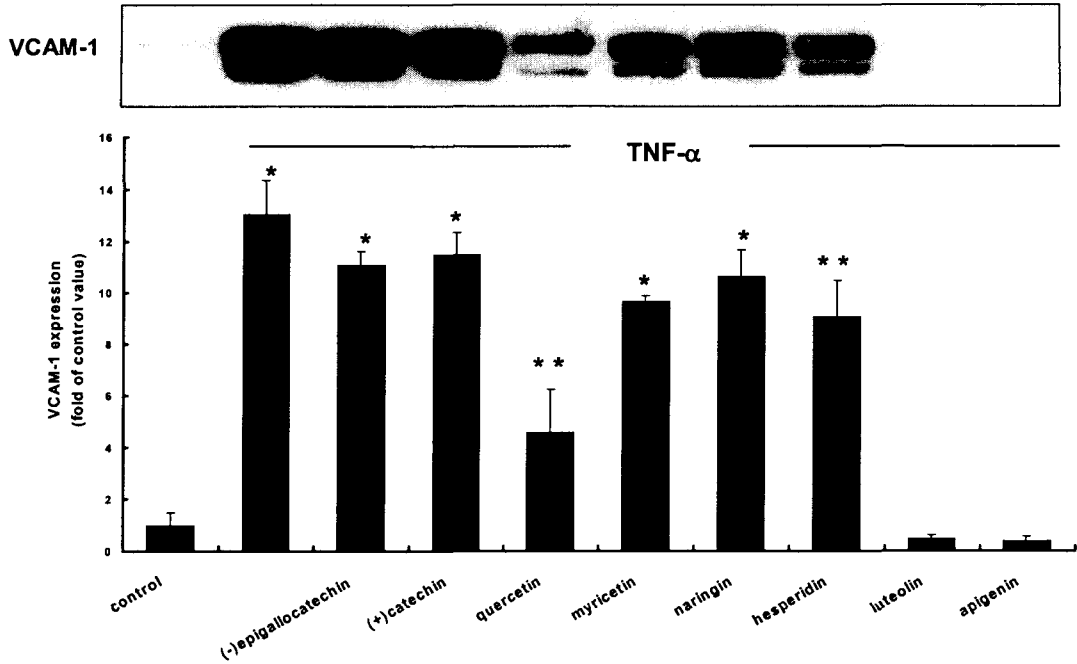
Fig. 2. Cytotoxicity of flavonoids added to M199 culture media in the presence of TNF- $\alpha$ .

Human umbilical vein endothelial cell viability was assessed by MTT after 6 hr incubation of flavonoids with TNF- $\alpha$ . Data (means  $\pm$  SEM, 6 separate experiments) are expressed as percent cell viability relative to flavonoid- and TNF- $\alpha$  free controls (viability=100%).

10  $\mu$ M 이하로 상당한 항산화능을 보였다. 그러나, 혈관내피세포의 단핵구 adhesion에 탁월한 억제효과를 보인 apigenin의 DPPH 소거활성인  $SC_{50}$ 은 10 mM 이상으로 항산화능을 전혀 나타내지 못하였으며, 또한  $H_2O_2$ 의 hydroxyl radical에 의하여 유발된 세포사멸에 대하여 억제효과를 전혀 갖지 못하였다(28). 따라서, 플라보노이드의 단핵구 adhesion 억제작용은 radical 소거활성작용으로 인하여 발휘되는 것으로 보이지 않는다.

TNF- $\alpha$ 로 증가된 CAMs 단백질 발현에 대한 플라보노이드의 억제효과

CAMs은 주로 혈관내피조직에 단핵구가 결집하는 것을 담당하고, 죽상경화성 혈관손상을 초래하며 죽상경화성 플라그 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다(3,4,6,7,29). TNF- $\alpha$ 에 의한 혈관내피세포의 단핵구 adhesion에 대한 플라보노이드의



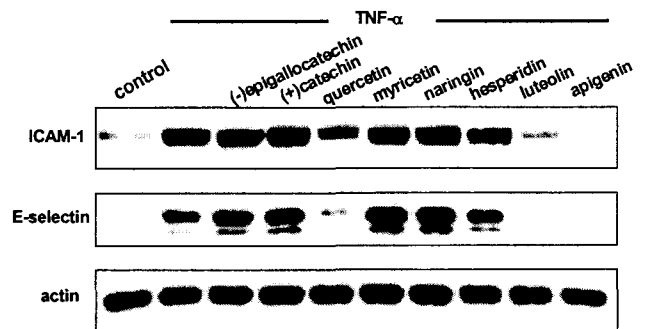
**Fig. 3.** Western blot data showing effects of flavonoids on VCAM-1 protein expression levels in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

HUVECs were pre-incubated with and without each flavonoid (50 μM) for 20 min and then activated by 10 ng/mL TNF-α for 6 hrs. Cell extracts were prepared and total cell extract protein (50 μg) was subjected to 8% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with a primary antibody against VCAM-1. Blot data (upper panel) are representative of 5 independent experiments. The bar graphs (bottom panel, means ± SEM) represent quantitative results obtained densitometrically. Values are expressed as folds of expression for untreated controls (expression level=1). \*p<0.05, compared to untreated control expression. \*\*p<0.05, compared to both untreated control and TNF-α-induced VCAM-1 expression.

억제효과가 혈관내피세포의 CAMs 발현이 억제되어 발휘되는 지가 조사되었다. 이를 위하여 CAMs 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 Western blot 분석을 시도하였다. Fig. 3은 TNF-α에 의한 VCAM-1 단백질 발현에 있어서 각각의 플라보노이드의 효과를 보여주고 있다. 전혀 처리되지 않은 혈관내피세포 대조군은 VCAM-1 단백질 발현이 아주 미약하지만, TNF-α를 처리하였을 때 VCAM-1 단백질의 발현은 10배 이상 증가되었다. TNF-α로 처리된 내피세포를 각각의 50 μM 플라보노이드로 처리하였을 때, 각각의 플라보노이드는 VCAM-1 발현에 있어서 서로 다른 억제효과를 보여주었다 (Fig. 3). Fig. 1에서 보여준 혈관내피세포에 THP-1의 adhesion을 완전히 차단시킨 luteolin과 apigenin은 TNF-α에 의하여 증가된 혈관내피세포의 VCAM-1 발현을 완전히 억제시켰다. 뿐만 아니라, THP-1 adhesion에 부분적인 억제효과를 나타낸 quercetin도 TNF-α에 의하여 증가된 VCAM-1 발현을 3배 정도 억제시킨다는 것을 보여주었다. 비록 단백질의 adhesion에는 별 효과를 보이지 않은 myricetin과 hesperidin의 경우에서도 VCAM-1 발현은 유의적인 수준으로 감소되었다. 그러나, 녹차의 polyphenolics인 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin은 염증성 cytokine에 의한 VCAM-1 발현에 전혀 유의적인 억제효과를 나타내지 못하였다. 이로서, 플라보노이드의 VCAM-1 단백질 발현에 대한 억제작용이 THP-1 단

백구가 활성화된 혈관내피세포에 결집하는 것을 차단시키는 플라보노이드의 핵심적인 구실을 담당한다고 볼 수 있다.

Fig. 4는 배양된 혈관내피세포에서 ICAM-1과 E-selectin의 CAMs 단백질 발현에 대한 Western blot 분석을 통하여 나온 연구결과를 보여주고 있다. TNF-α로 활성화되지 않은



**Fig. 4.** Western blot data showing effects of flavonoids on expression levels of ICAM-1 and E-selectin proteins.

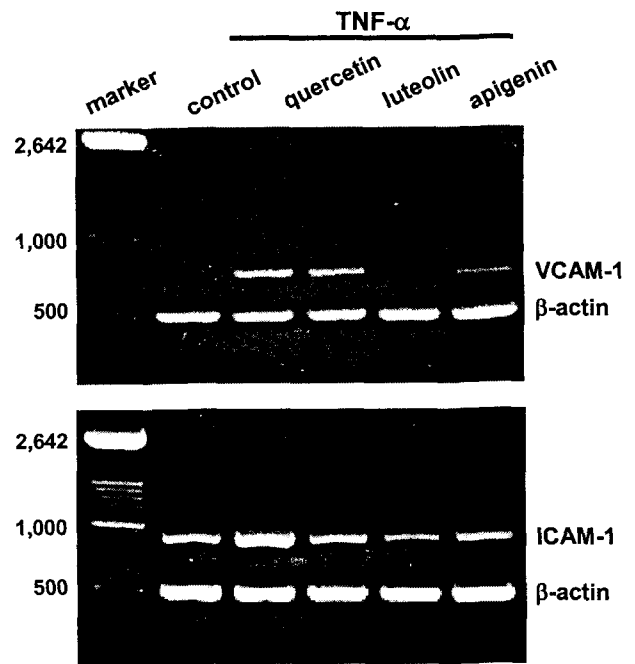
Human umbilical vein endothelial cell extracts were prepared from cells pre-treated with each of flavonoid (50 μM) for 20 min and then exposed to 10 ng/mL TNF-α for 6 hrs. Total cell extract protein (50 μg) per lane was electrophoresed on a 8% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with primary antibodies against ICAM-1 and E selectin. Actin protein was used as an internal control.

정상세포는 이런 ICAM-1과 E-selectin의 발현도 아주 미약하다는 것을 보여주고 있다. 그러나, VCAM-1 단백질과 마찬가지로 ICAM-1과 E-selectin의 발현도 TNF- $\alpha$ 의 처리에 의하여 획기적으로 상승하였다. TNF- $\alpha$ 에 노출된 혈관내피세포를 플라보노이드로 처리하였을 때 이 두 CAMs 단백질의 발현에 대한 억제유형이 비슷하게 나타났다. Quercetin, luteolin 및 apigenin은 TNF- $\alpha$ 에 의하여 증가된 이 단백질들의 발현을 뚜렷이 감소 또는 차단시켰다. 그러나, 이러한 플라보노이드를 제외한 나머지 플라보노이드는 직접적인 ICAM-1과 E-selectin의 발현에 대한 억제효과를 보이지는 않았으며 오히려 E-selectin의 경우에는 심화되는 경향이 나타났다.

따라서, 선별된 quercetin, luteolin과 apigenin의 플라보노이드는 혈관내피세포의 CAMs 단백질의 발현을 억제하므로서 적어도 혈관내피조직에 단백질의 adhesion을 억제시킬 수 있다는 것을 확인해 주고 있다. 뿐만 아니라, 각각의 CAMs 단백질 발현 억제작용에 있어서 플라보노이드는 억제능이 다르게 나타나며, VCAM-1 단백질 발현에 대한 억제작용이 여러 플라보노이드에서 현저하게 나타난다는 것도 알 수 있다. 여기서 모든 플라보노이드가 이러한 활성을 지니지 않으며, radical 소거활성이 낮은 flavones 계통의 플라보노이드가 죽상경화의 초기과정을 차단시키면서 죽상경화증과 관상동맥질환을 예방하고 치료하는 데에 효과적이라고 할 수 있다.

**활성화된 혈관내피세포의 CAMs 단백질 전사작용에 대한 플라보노이드의 억제효과**

활성화된 CAMs 단백질 발현에 대한 플라보노이드의 억제효과가 CAMs 단백질의 mRNA 수준에서 조절되는지를 규명하기 위하여, 혈관내피세포에서의 CAMs 단백질의 mRNA 수준을 반정량적인 RT-PCR 방법으로 조사하였다(Fig. 5). 이러한 분석을 통하여 TNF  $\alpha$ 에 의한 CAMs 발현을 플라보노이드에 의하여 down regulation을 일으키는 분자적인 기작을 분명하게 밝힐 수 있었다. 반복적인 가열 증폭과정을 통하여 얻게 된 Fig. 5의 RT-PCR 연구결과에서 활성화된 상태의 정상세포에서는 VCAM 1과 ICAM-1 각각의 mRNA 발현에 대한 신호가 아주 미약하다는 것을 확인할 수 있었다. 동량의 loading을 위한  $\beta$ -actin을 동시 사용하여 나온 RT-PCR data는 TNF  $\alpha$ 에 의하여 활성화된 혈관내피세포에서 VCAM-1과 ICAM 1의 mRNA 발현이 급격하게 증가된다는 것을 보여주고 있다. 플라보노이드의 CAMs 발현 억제효과를 mRNA 수준에서 조절기작을 규명하기 위하여, TNF  $\alpha$ 에 의하여 활성화된 혈관내피세포에 단백질의 adhesion과 CAMs 발현을 억제시키는 것으로 그 활성이 증명된 quercetin, luteolin과 apigenin 플라보노이드가 선별되었다. Quercetin, luteolin과 apigenin 그 자체는 CAMs mRNA 발현에 대한 뚜렷한 효과를 보여주지 못하였지만(자료 없음), 이들 플라보노이드는 TNF  $\alpha$ 에 의하여 up-regulation된 VCAM-1과 ICAM-1 mRNA 발현수준을 억제한다는 것을 확인할 수 있



**Fig. 5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction data showing the steady state mRNA transcriptional levels of VCAM-1 (upper panel) and of ICAM-1 (bottom panel).**

Confluent human umbilical vein endothelial cells were incubated in a M199 medium containing flavonoids (50  $\mu$ M) for 20 min and exposed to 10 ng/mL TNF  $\alpha$  for 6 hrs. For RT-PCR data for the transcriptional levels of VCAM-1 mRNA and ICAM-1 mRNA, total cellular RNA was isolated, reverse transcribed into human VCAM-1 and ICAM-1 specific cDNAs, subjected to PCR, and amplified with VCAM-1 and ICAM-1 specific DIG-labeled oligonucleotide primers. PCR samples were resolved in a 1% agarose gel.  $\beta$ -Actin was used as an internal control for the co-amplification with VCAM-1 and ICAM-1, and RT-PCR data were normalized by calculating the ratio of the bands for VCAM-1 or ICAM-1 vs.  $\beta$ -actin.

었다. Luteolin과 apigenin는 VCAM-1 mRNA의 발현을 상당히 억제하였다. ICAM-1 mRNA의 경우에는 ICAM-1 단백질의 발현에 대한 급격한 감소(Fig. 4)와는 달리 획기적인 감소 효과는 나타나지 않았지만, TNF  $\alpha$ 에 의한 ICAM-1 mRNA는 부분적으로 억제시켰다. 한편, flavonols인 quercetin에서는 VCAM-1과 ICAM-1 mRNAs가 약하게 억제된다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 비추어 보면, 단백질의 adhesion을 억제시키는 플라보노이드들은 CAMs 단백질 발현과정에서 유전자 전사단계에 직접 작용하여 이러한 CAMs의 발현을 억제시킴으로서 이들 생리활성을 발휘한다는 것을 제시하고 있다.

**요 약**

염증성 cytokines의 분비 또는 혈관손상으로 인한 백혈구의 adhesion과 transmigration을 통하여 죽상경화과정이 시발되는데, 본 연구에서는 이러한 죽상경화의 초기과정에서 플라보

노이드가 억제작용을 발휘하는 지를 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 화학적인 구조가 서로 다른 플라보노이드를 사용하여 화학적인 구조와 항동맥경화작용과의 상관성을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 는 혈관내피세포를 활성화시켜 THP-1 단핵구의 adhesion을 유의적으로 증가시켰다. 여러 형태의 플라보노이드를 전처리하고 TNF- $\alpha$ 를 가하여 혈관내피세포를 활성화시켰을 때, flavonols인 quercetin과 flavones의 luteolin과 apigenin은 THP-1 단핵구의 adhesion 억제효과를 보여주었다. 그러나, catechins과 flavanones의 플라보노이드는 이러한 억제효과를 전혀 보여주지 못하였다. 이러한 adhesion 억제작용을 가지는 플라보노이드는 CAMs 단백질의 발현도 차단시킨다는 것을 확인할 수 있었다. Quercetin, luteolin과 apigenin은 TNF- $\alpha$ 에 의하여 증가된 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin의 단백질 발현을 일률적으로 감소 또는 차단시켰다. 그 대신, 단핵구의 adhesion을 차단시키지 못한 (-)epigallocatechin gallate와 (+)catechin은 TNF- $\alpha$ 에 의한 이러한 CAMs의 발현을 전혀 억제시키지 못하였다. 또한 quercetin, luteolin과 apigenin의 CAMs 단백질 발현 억제작용은 유전자 전사단계에서 mRNA의 down-regulation으로 인하여 나타난다는 사실을 알 수 있었다. 결론적으로 quercetin, luteolin, apigenin과 같은 플라보노이드는 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 cytokines에 의한 단핵구의 adhesion을 혈관내피세포의 CAMs 단백질 발현을 억제하므로써 차단시킨다는 것이 확인되었다. 여기서 모든 플라보노이드가 이러한 활성을 다 지니고 있지 않아서 화학적인 구조와 초기 항동맥경화작용에는 서로 연관성이 있다는 것이 제시되었다. 또한, 선별된 플라보노이드의 초기 항동맥경화작용은 활성산소를 소거하는 플라보노이드의 항산화능과는 무관한 것 같다고 할 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 단독기초연구지원(과제고유번호: 02-PJ1-PG3-22004-0002)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 문헌

- Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
- Krauss RM. 1987. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 113: 578-582.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 320: 915-924.
- Scalia R, Appel JZ III, Lefer AM. 1998. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit. Role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Biol* 18: 1093-1100.
- Schonbeck U, Mach F, Libby P. 2001. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 89: 1092-1103.
- Osborn L, Hessian C, Tizard R, Vassallo C, Lohowskyj S, Chi-Rosso S, Lobb R. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59: 1203-1211.
- Cybulsky ML, Gimbrone MA Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. 1986. Induction by IL-1 and interferon  $\gamma$ : tissue distribution, biochemistry, and function of anatural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245-254.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. 1999. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85: 199-207.
- Lessner SM, Prado HL, Waller EK, Galis ZS. 2002. Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am J Pathol* 160: 2145-2155.
- Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. 1992. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 141: 161-168.
- O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Furgerson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92: 945-951.
- Levy A, Fuhrman B, Markel A, Dankner G, Ben-Amotz A, Presser D, Aviram M. 1994. Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry. *Ann Nutr Metab* 38: 287-294.
- Kris-Etherton PM, Keen CL. 2002. Evidence that the anti-oxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 13: 41-49.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
- Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. 2002. Anti-oxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol* 79: 379-381.
- Bito T, Roy S, Sen CK, Shirakawa T, Gotoh A, Ueda M, Ichihashi M, Packer L. 2002. Flavonoids differentially regulate IFN gamma-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Lett* 520: 145-152.
- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. 2002. Inhibition of matrix-proteases by flavonoids: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 64: 229-237.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease and cancer pharmacol. *Rev* 52: 673-751.
- Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1: 569-590.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 357-362.
- Fuhrman B, Aviram M. 2001. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12: 41-48.

23. Chen JW, Zhu ZQ, Hu TX, Zhu DY. 2002. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol Sin* 23: 667-672.
24. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *Clin Invest* 52: 2745-2756.
25. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetyl-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99: 2034-2040.
26. Anderson JJ, Garner SC. 1998. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557.
27. Park SH, Park JHY, Kang JS, Kang YH. 2003. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF- $\alpha$ -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 168-182.
28. Choi YJ, Choi JS, Lee SH, Lee YJ, Kang JS, Kang YH. 2002. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on apoptosis in human vascular endothelial cells. *J Food Sci Nutr* 31: 672-678.
29. Dustin ML, Springer TA. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 321-331.

(2002년 10월 5일 접수; 2002년 12월 9일 채택)