약학회지 제52권 제1호 37~42 (2008)
Yakhak Hoeji Vol. 52, No. 1

藥學會誌

HL-60 세포에서 TNF-α에 의한 MCP-1 발현에 미치는 Betulinic Acid의 효과

김경찬* · 이추희#
*대구가톨릭대학교 의과대학, 영남대학교 의과대학
(Received November 12, 2007; Revised January 4, 2008)

The Effect of Betulinic Acid on TNF-α-induced MCP-1 Expression in HL-60 Cells

Kyung-Chan Kim* and ChuHee Lee#
**Department of Internal Medicine, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea*
Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu 705-717, Korea

Abstract — Betulinic acid, a naturally occurring pentacyclic triterpenoid, is found in abundance in the outer bark of white birch (*Betula alba*). In this study, we investigated if betulinic acid affects cytokine expression from activated macrophage cells. ELISA result showed that stimulation of HL-60 cells with proinflammatory cytokine such as TNF-α resulted in MCP-1 release into culture medium. In addition, transcriptional upregulation of MCP-1 in response to TNF-α was observed by RT-PCR analysis. However, incubation of HL-60 cells with betulinic acid prior to TNF-α treatment abrogated MCP-1 expression in transcription and translational level. Consistent with a number of studies which reported requirement of ERK activation for TNF-α expression, Western blot analysis showed that TNF-α-induced ERK activation was suppressed by pretreatment of HL-60 cells with betulinic acid. Taken together, our data indicate that betulinic acid exerts its anti-inflammatory effect through inhibition of TNF-α-induced ERK activation which is required for the subsequent MCP-1 release.

Keywords □ betulinic acid, TNF-α, MCP-1, ERK

Betulinic acid(3β-hydroxy-lup-20(19) lupaen-28-carbonic acid)는 pentacyclic triterpenoid 구조를 가진 식물에서 생합성 되는 천연물의 일종으로, East Africa의 상록수(Ziziphus mauritiana)에서 최초로 분리되었으며, 특히, 흰 자작나무의 껍질에 풍부한 것으로 보고되어 있다.[1] 이는 melanoma나 neuroectodermal origin의 암세포에 선택적으로 작용하여 암세포를 사멸시키는 효과를 가진 것으로 알려져 있다.[2,3] Betulinic acid의 이러한 항암작용은 미토콘드리아의 투과성을 감소시키거나 세포질 내로 mitochondrial cytochrome *c* 방출 등의 미토콘드리아의 기능저하를 비롯하여 활성산소 형성, 또는 caspase 활성화 등과 같은 다양한 기전을 통하여 이루어 지는 것으로 알려져 있다.[4-6] 또한 betulinic acid 유도체들은 HIV-1의 fusion과 maturation과정을 차단하는 활성을 보여, 항바이러스 제제로 활용될 가능성을 보여주었으며, 그 외 박테리아 및 말라리아와 같은 감염성 질환에도 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.[7-10] 더불어, 이들 betulinic acid 유도체들이 interferon-γ에 의한 NO 생성 저해 활성을 갖고 있는 것으로 보고됨에 따라, betulinic acid의 항 염증 작용에 관한 관심도 높아지고 있다.[11] 이에 본 연구에서는 TNF-α와 같은 대표적인 proinflammatory cytokine의 생물학적 활성에 미치는 betulinic acid의 영향을 알아보고자 하였다.

TNF-α는 가장 많이 연구된 염증 유발 cytokine이며, 상당히 광범위한 생물학적 활성을 가지고 있다. 염증반응에서 가장 중요한 과정 중 하나는 염증 부위 또는 조직으로 leukocyte recruitment가 유발되는 것이다. Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)과 같은 chemokine들이 이러한 과정을 조절하는 인자로 잘 알려져 있다. 염증성 cytokine 중에서도 TNF-α는 MCP-1의 발현을 유도하고, MCP-1을 통한 leukocytes recruitment를 매개하는 것으로 잘 알려져 있다.[12,13] 이들 염증매개 인자들은 대개 chemoattractive 활성을 가지며, 폐혈증이나 천식 등을 포함하는 수많은 염증성 질환에 깊이 관여하고 있는 것으로 보

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-620-4522 (팩스) 053-654-6651
(E-mail) chlee2@ynu.ac.kr

고되어 있다.[14,15] 특히, 동맥경화와 같은 질환의 경우, 발병의 초기단계에 해당하는 leukocyte recruitment는 질환부위에서 과량으로 발현되는 MCP-1에 의한 것으로 보고되고 있다.[16,17] 따라서, 대표적인 염증성 cytokine인 TNF-α에 의해 생성되는 MCP-1의 발현을 효과적으로 차단함으로써, 다양한 질병의 치료 및 예방 효과를 기대할 수 있을 것이다. 이점에 착안하여 본 연구에서는 TNF-α에 의한 MCP-1의 발현에 미치는 betulinic acid의 영향을 조사하고, 그 작용기전을 살펴보고자 하였다. 이를 통하여 betulinic acid가 proinflammatory cytokine의 활성을 조절하는 항 염증 약물로써의 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

실험 방법

재료

HL-60 세포는 American Type Cultural Collection(ATCC)사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 배양액인 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), penicilline-streptomycin은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA), bicinchoninic acid(BCA) 단백질 정량시약(Pierce, USA), enhanced chemiluminescence(ECL)는 Amersham사(Buckinghamshire, United Kingdom)에서 구입하여 사용하였다 Agarose, TRI-reagent, Murine Leukemia Virus(MMLV) reverse transcriptase Kits, RNase inhibitor, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등은 Life Technologies사(Gaithershurg, MD, USA)로부터 구입하였다. Duoset human MCP-1 ELISA kit은 R & D systems사(Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Phospho-ERK와 ERK 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

세포배양

HL-60세포는 10% FBS와, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin을 함유하는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 계대배양 하였으며, 배양된 세포는 6-well (2×10^5) plate 또는 12-well(6×10^4) plate에 일정한 수의 세포를 분주하여 실험에 사용하였다.

세포 생존율 측정

96-well plate에 세포를 일정량(0.5×10^4) 분주한 후 betulinic acid를 농도별로 처리하였다. 배지를 제거하고 MTT 시약(2 mg/ml)을 배지와 섞은 후 분주하여 3~4시간 반응시켰다. 그리고 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 250 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 모두 녹을 수 있도록 약간 흔든 후 ELISA reader(Bio-TEK Instruments, Inc., USA)로 550 nm에서 측정하였다.

MCP-1 정량

세포를 배양하여 6-well(2×10^5) 또는 12-well(6×10^4) plate에 분주한 후 TNF-α를 농도별, 시간별로 처리하여 세포 배양액을 수확하였다. 수확한 세포 배양액의 MCP-1 함량을 enzymeimmuno assay(EIA) kit을 사용하여 측정하였다. Capture 항체가 부착된 96-well plate에 세포 배양액을 첨가하고 일정시간 반응 후 희석된 MCP-1 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 각각 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 세척액으로 여러 번 씻은 다음 효소 기질을 가하여 일정시간 반응시킨 후 1 N-sulfuric acid를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응 중지 후 발색된 흡광도는 형광광도계를 사용하여 450 nm 파장에서 측정하였다. MCP-1의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

Protein 추출 및 정량

세포(5×10^6)를 PBS로 3회 세척하고 각종 단백질 분해효소 저해제가 함유된 lysis buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10%glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 10 mM NaF)로 용해한 다음, 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액을 취하여 세포질 분획을 얻었다. BCA 단백질 정량시약을 사용하여, 수확한 세포질 분획에 함유된 단백질 농도를 측정하였다.

Westernblot 분석

단백질(30 μg)을 10% SDS-polyacylamide gel상에서 전기영동하여 분리한 후, 분리한 단백질은 20% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 Ponceau 액으로 이동유무를 확인한 후, 5% 차단용 완충액(non-fat dry milk)으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고, 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체와 막을 4시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-tween buffered saline(TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액으로 2분간 반응하고 X-선 필름에 노출시켜 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

RNA 추출 및 확인

직경 60 mm 배양접시에 세포를 2×10^5개로 분주하였다. 멸균된 PBS로 2회 세척하고 700 μl TRI-reagent로 용해시켰다. TRI-reagent로 용해시킨 세포용액을 새 tube로 옮긴 후, chloroform을 140 μl를 넣고 30초간 진탕한 후 얼음에 15분간 두었다. 4°C, 13,200 rpm에서 15분간 원심분리하였다. RNA 용액을 새 tube로

옮긴 후 isopropanol을 같은 부피로 넣고 30초간 진탕하였다. 얼음에서 30분간 반응시킨 뒤 4°C, 13,200 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. RNA 침전물은 70% ethanol 1 ml을 넣고 4°C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상청액을 완전히 제거한 후 실온에서 RNA를 건조시켰다. RNA는 DEPC 처리한 증류수 10~20 μl에 녹였다. RNA는 1% formaldehyde agarose gel 상에서 전기영동하여 RNA가 제대로 분리되었음을 확인하였다.

역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

Oligo(dT) primer와 MML reverse transcriptase를 이용하여 전체 RNA에서부터 cDNA를 합성하였다. 2 μgRNA, 50 μM oligo (dT), 25 mM dNTPs을 넣고 증류수로 전체 부피가 5 μl되게 하여 65°C에서 5분간 반응시키고 2분간 얼음에 보관하였다. 2 U RNase inhibitor, 200 U MMLV rever se transcriptase, 2 μl 5×buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 30 mM $MgCl_2$)를 넣고 전체 부피가 10 μl되게 한 후, 42°C, 2시간 반응하였다. 40 μl의 멸균증류수를 넣고 72°C에서 10분간 반응하였다. PCR은 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 200 μM dNTPs, 2 μM forward primer, 2 μM reverse primer, 1.5 mM $MgSO_4$, 2 U AmpliTag 중합효소를 넣고 전체부피를 10 μl가 되게 하여 시행하였다. 제조한 PCR 혼합물은 PCR 기계에서 변성과정(94°C, 5분, 1회), 변성과정; 연결과정; 신장과정(94°C, 15초; 60°C, 30초; 72°C, 30초)을 총 28회 반복하여 생성물을 제조한 뒤, agarose gel상에서 전기영동으로 확인하였다.

통계처리

MCP-1 및 세포생존율 측정값은 평균±표준편차로 표현하였다. 모든 실험은 triplicate로 세 차례 이상 수행하였다.

실험결과 및 고찰

TNF-α에 의한 MCP-1 생성 확인

TNF-α에 의한 MCP-1의 발현 여부를 확인하기 위하여 HL-60 세포에 TNF-α를 농도별(0.005~5 ng/ml)로 처리하고, 5시간 및 10시간 후에 세포 배양액을 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중에 포함된 MCP-1의 양을 ELISA 방법으로 정량하였다. TNF-α를 5 ng/ml의 농도로 10시간 처리한 경우, MCP-1의 생성이 가장 높았으며, 처리한 TNF-α의 농도가 높을수록 또한 처리시간이 길수록 MCP-1의 생성이 증가함을 확인하였다(Fig. 1A).

전사단계에서의 TNF-α에 의한 MCP-1 발현 조절

이전 실험에서 확인된 TNF-α에 의한 MCP-1의 생성이 전사단계에서부터 조절되는지 확인하였다. HL-60 세포를 6-well plate에 일정량 분주 후 5 ng/ml의 TNF-α를 시간 별(0, 2, 4, 6, 8 h)로 처리하여 MCP-1 mRNA의 변화를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. MCP-1 mRNA는 TNF-α 처리시간에 비례하여 발현이 증가되었으며 4시간째에 이르러 최대로 되었다가 이후부터는 서서히 감소하였다(Fig. 1B). 이 결과로부터 TNF-α는 전사단계에서부터 MCP-1의 발현을 조절하고 있음을 알 수 있다. 즉, HL-60 세포에 TNF-α를 처리하면 비교적 빠른 시간 내에 MCP-1 mRNA의 양이 증가하고, 증가된 mRNA로부터 MCP-1 단백질이 새로이 생성되어 세포 배양액 중으로 분비됨을 알 수 있었다.

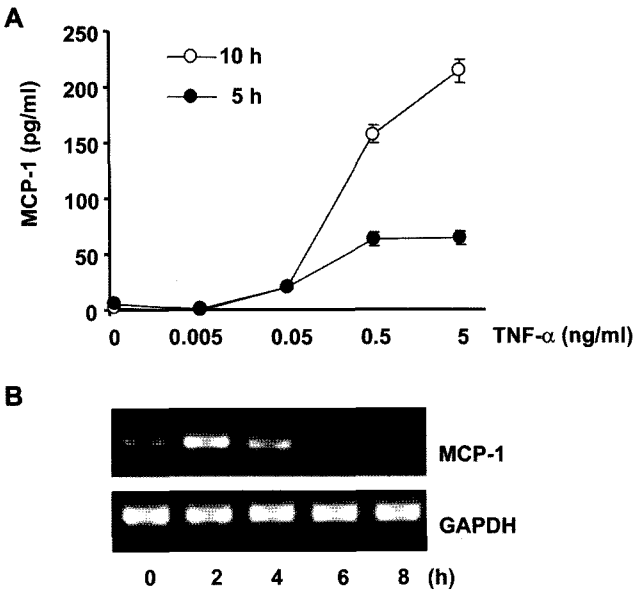

Fig. 1 – TNF-α induced MCP-1 production from HL-60 cell is dose and time dependent. A. Cells were treated with different concentrations of TNF-α for 5 and 10 hours and culture supernatants were assayed for MCP-1 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Data are expressed as mean values±S.D. B. After 2, 4, 6, 8 hours of 5 ng/ml TNF-α stimulation, total RNA was extracted and subjected to cDNA synthesis followed by PCR amplification using primers specific for MCP-1 or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

TNF-α에 의한 MCP-1 생성에 미치는 betulinic acid의 영향

많은 연구자들이 betulinic acid의 항 염증 작용 및 면역조절 작용을 보고하였다.[11] 2003년 Kim 등은 betulinic acid가 단핵세포나 조직 내 대식세포로부터 interleukin-1β 및 TNF-α 생성을 증가시키는 반면, LPS에 의한 iNOS 및 NO 생성, 그리고 COX-2의 발현은 감소시키는 결과를 보고하였다.[18] 즉, 어떤 염증물질은 betulinic acid에 의해 생성이 유도되지만, 일부 염증물질은 betulinic acid에 의해 오히려 생성이 억제되고 있음을 알 수 있다.[18] 이러한 선행 연구결과들을 고려하여 TNF-α에 의한 MCP-1 생성에 미치는 betulinic acid의 영향을 확인하였다. HL-60 세포에 betulinic acid를 농도 별(0.65~65 μM)로 1시간 전처리 한

다음 5 ng/ml의 TNF-α를 10시간 처리한 후 세포 배양액을 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중에 포함된 MCP-1의 양을 ELISA 방법으로 정량하였다. 전처리 한 betulinic acid의 농도에 비례하여 TNF-α에 의한 MCP-1의 생성이 감소함을 확인하였다(Fig. 2A). 즉, betulinic acid는 TNF-α에 의한 MCP-1의 생성을 저해하고 있음을 알 수 있다.

TNF-α에 의한 MCP-1 생성을 저해하는 betulinic acid의 효과가 세포독성에 의한 이차적인 효과일 가능성을 배제하기 위하여, betulinic acid를 처리한 후 세포 생존율을 살펴보았다. MTT를 이용한 세포 생존율 분석 결과, 사용한 betulinic acid의 농도 및 시간 조건은 세포 생존율에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

TNF-α에 의한 MCP-1 전사조절에 미치는 betulinic acid의 영향

이전 실험의 결과, TNF-α에 의한 MCP-1의 발현은 전사단계에서부터 증가하고 있음을 확인하였으므로, TNF-α에 의한 MCP-1 생성에 미치는 betulinic acid의 영향이 전사단계에서부터 작용하고 있는 것인지 살펴보았다. HL-60 세포에 65 μM의 betulinic acid를 1시간 전처리 한 다음 5 ng/ml의 TNF-α를 4시간 처리한 후 MCP-1 mRNA의 변화를 RT-PCR을 통하여 확인하였다(Fig.

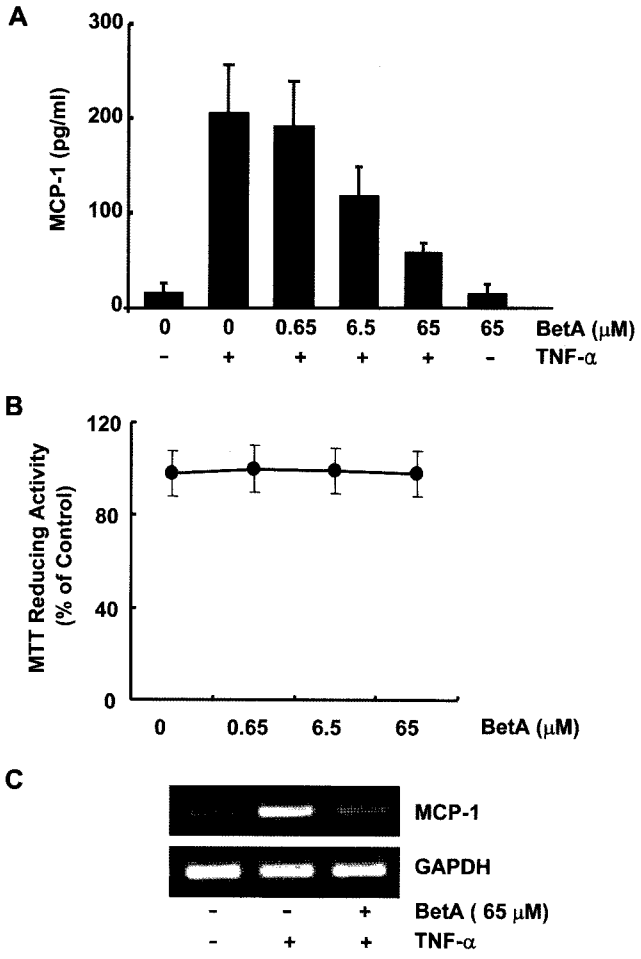

Fig. 2 – Betulinic acid inhibits MCP-1 production by TNF-α stimulation. A. Cells were treated with 5 ng/ml of TNF-α for 10 hours with or without pre-incubation of betulinic acid at the indicated concentrations. Culture supernatants were assayed for MCP-1 by ELISA. B. Cells were treated with the indicated concentrations of betulinic acid for 10 hours and MTT reducing activity was determined. Data are expressed as mean value±S.D. C. After 4 hours of TNF-α stimulation with or without pre-incubation of betulinic acid (Bet A), total RNA was extracted and subjected to cDNA synthesis followed by PCR amplification using primers specific for MCP-1 or GAPDH.

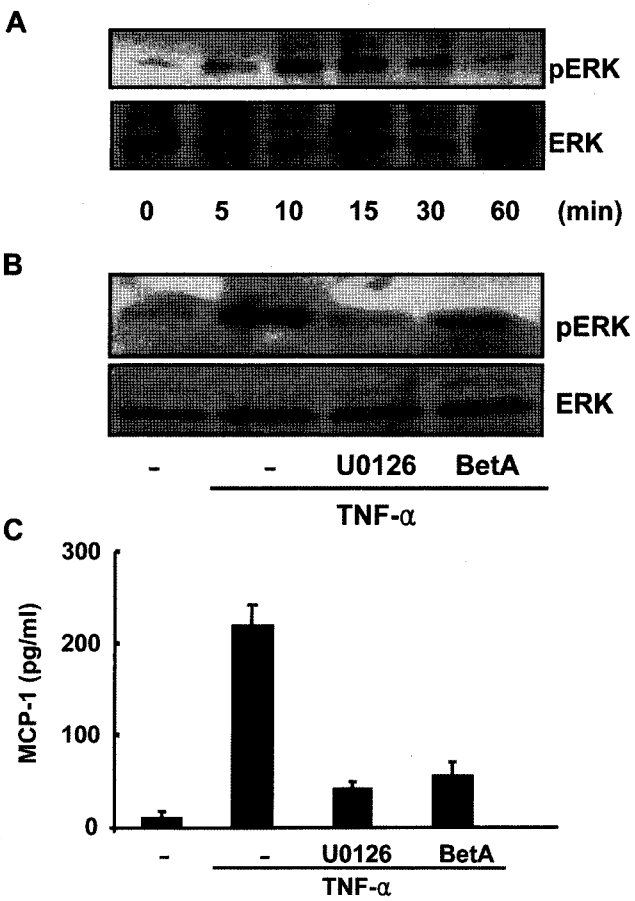

Fig. 3 – Betulinic acid blocks phosphorylation of ERK by TNF-α stimulation. A. Cells were treated with 5 ng/ml of TNF-α for 5 to 60 min. After stimulation, total cell lysates were separated by SDS-PAGE and activation of ERK was analyzed by Western blot with antibodies specific for the proteins. B. Cells were stimulated with 5 ng/ml TNF-α for 10 min with or without pre-incubation of 65 mM betulinic acid (Bet A) or 10 mM U0126 for 1 hour. C. Cells were treated with 5 ng/ml of TNF-α for 10 hours with or without the indicated inhibitors. Culture supernatants were assayed for MCP-1 by ELISA. Data are expressed as mean value± S.D.

2C). Betulinic acid를 전처리한 실험군에서는 TNF-α에 의한 MCP-1 mRNA 증가를 관찰할 수 없었다. 즉, betulinic acid는 TNF-α에 의해 MCP-1 mRNA가 증가하는 것을 차단함으로써, mRNA로부터 MCP-1 단백질이 새로이 생성되어 세포 배양액 중으로 분비되는 다음 단계에 까지 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 즉, betulinic acid는 TNF-α에 의한 MCP-1 생성을 전사단계에서부터 저해하고 있음을 시사하고 있다.

TNF-α에 의한 ERK 활성화에 미치는 betulinic acid의 영향

선행 연구결과에서 확인된 TNF-α에 의한 MCP-1 생성에 미치는 betulinic acid의 영향을 보다 구체적으로 이해하기 위하여, TNF-α에 의한 MCP-1 생성에 관련된 신호전달체계를 분석하고, 이에 미치는 betulinic acid 영향을 확인하였다. TNF-α를 시간별(0, 5, 10, 15, 30, 60 min)로 처리한 후, ERK 인산화 정도를 살펴보았다. 5 ng/ml TNF-α에 의한 ERK 인산화는 10, 15분에 최대에 이르렀다가 이후 감소함을 관찰하였다(Fig. 3A). 동일한 조건에서 65 μM betulinic acid를 전처리 하면 TNF-α에 의한 ERK 인산화는 일어나지 않았다(Fig. 3B). 이는 ERK inhibitor와 같은 수준의 저해효과를 갖는 것으로, 이 결과는 betulinic acid는 TNF-α에 의한 ERK 인산화 과정을 저해함으로써 결과적으로 TNF-α에 의한 MCP-1 생성이 감소될 가능성을 시사하고 있다. 이에 착안하여, ERK inhibitor와 betulinic acid를 각각 전처리 한 후 TNF-α에 의한 MCP-1의 생성 정도를 ELISA로 살펴보았다. ERK inhibitor와 betulinic acid 모두 TNF-α에 의한 MCP-1의 생성을 현저히 감소시킴을 확인할 수 있었다. 종합하면, betulinic acid의 작용은 ERK 인산화 저해와 그에 따른 MCP-1 전사조절 기전을 통하여 TNF-α에 의한 MCP-1 생성을 감소시키는 것임을 알 수 있다.

결 론

East Africa의 상록수에서 최초로 분리된 betulinic acid는 pentacyclic triterpenoid로써 흰 자작나무의 나무껍질에 풍부하다. 이는 melanoma와 같은 암세포에 특이적으로 작용하는 항암효과로 주로 주목을 받아왔으나, 본 연구에서는 TNF-α와 같은 proinflammatory cytokine에 의한 MCP-1 생성에 대한 영향을 살펴보았다. HL-60 세포에 TNF-α를 처리하면 MCP-1의 mRNA 생성 및 분비가 시간 및 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 세포에 betulinic acid를 전 처리할 경우, TNF-α에 의한 MCP-1 mRNA 발현이 감소되었으며, TNF-α에 의한 ERK phosphorylation 역시 대부분 저해되었다. 실험 결과들은 betulinic acid에 의한 MCP-1 발현 저해는 전사단계 혹은 그 이전 단계에서부터 조절되고 있으며, 그 작용기전으로는 ERK phosphorylation 저해임을 지적하고 있다. 본 연구를 통하여, betulinic acid가 TNF-α와 같은 대표적인 proinflammatory cytokine의 활성을 조절하는 항 염증 약물로써의 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단(R03-2004-000-10009-0) 및 2006년도 신임교원 정착연구비 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1) Pisha, E., Chai, H., Lee, I. S., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Beecher, C. W., Fong, H. H., Kinghorn, A. D. and Brown, D. M. : Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **10**, 1046 (1995).
2) Liu, W. K., Ho, J. C., Cheung, F. W., Liu, B. P., Ye, W. C. and Che, C. T. : Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **498**, 71 (2004).
3) Fulda, S., Jeremias, I., Steiner, H. H., Pietsch, T. and Debatin, K. M. : Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer.* **82**, 435 (1999).
4) Fulda, S., Scaffidi, C., Susin, S. A., Krammer, P. H., Kroemer, G., Peter, M. E. and Debatin, K. M. : Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **273**, 33942 (1998).
5) Fulda, S. and Debatin, K. M. : Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 616 (2000).
6) Wick, W., Grimmel, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J. and Weller, M. : Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1306 (1999).
7) Schühly, W., Heilmann, J., Calis, I. and Sticher, O. : New triterpenoids with antibacterial activity from Zizyphus joazeiro. *Planta Med.* **65**, 740 (1999).
8) Steele, J. C., Warhurst, D. C., Kirby, C. C. and Simmonds, M. S. : *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother. Res.* **13**, 115 (1999).
9) Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L. A., François, G., Sankara Narayanan, A. S., Peters, K. and Peters, E. M. : Betulinic acid: isolation from Triphyophyllum peltatum and Ancistrocladus heyneanus, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med.* **63**, 255 (1997).
10) Honda, T., Liby, K. T., Su, X., Sundararajan, C., Honda, Y., Suh,

N., Risingsong, R., Williams, C. R., Royce, D. B., Sporn, M. B. and Gribble, G. W. : Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both *in vitro* and *in vivo* of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **16**, 6306 (2006).

11) Zhou, J., Huang, L., Hachey, D. L., Chen, C. H. and Aiken, C. : Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral Gag protein in immature HIV-1 particles. *J. Biol. Chem.* **280**, 42149 (2005).
12) Aiken, C. and Chen, C. H. : Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol. Med.* **11**, 31 (2005).
13) Robinson, E. A., Yoshimura, T., Leonard, E. J., Tanaka, S., Griffin, P. R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Appella, E. : Complete amino acid sequence of a human monocyte chemoattractant, a putative mediator of cellular immune reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1850 (1989).
14) Folkard, S. G., Westwick, J. and Millar, A. B. : Production of interleukin-8, RANTES and MCP-1 in intrinsic and extrinsic asthmatics. *Eur. Respir. J.* **10**, 2097 (1997).
15) Sousa, A. R., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A., Yoshimura, T., Lee, T. H. and Poston, R. N. : Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 42 (1994).
16) Gu, L., Okada, Y., Linton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P. and Rollins, B. J. : Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275 (1998).
17) Reape, T. J. and Groot, P. H. : Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**, 213 (1999).
18) Yun, Y., Han, S., Park, E., Yim, D., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K. and Kim, K. : Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 1087 (2003).