

흰쥐 다형핵백혈구의 fMLP로 유도한 유주현상에 대한 신나믹산 유사체의 억제효과

민경락 · 김진준* · 박선규* · 이정래 · 강세훈* · 김영수*

충북대학교 약학대학, *(주)LG화학 화장품연구소

(Received December 20, 1997)

Inhibitory Effects of Cinnamic Acid Analogs on fMLP-Induced Chemotaxis of Rat Polymorphonuclear Leukocytes

Kyung Rak Min*, Jin-Jun Kim**, Sun-Gyoo Park**, Jeongrai Lee*,
Seh-Hoon Kang**, and Youngsoo Kim**

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea and

**Cosmetic R & D Center, LG Chemical Ltd., Taejon 305-343, Korea

Abstract—Inhibitory effects of 16 cinnamic acid analogs on formyl-Met-Leu-Phe(fMLP)-induced chemotaxis of rat polymorphonuclear leukocytes were determined by using a microchemotaxis apparatus. 3,4-Dihydroxycinnamic acid called as caffeic acid exhibited the highest inhibitory effect on the chemotaxis among cinnamic acid analogs tested in this study. Hydroxycinnamic acids exhibited stronger inhibitory effects on the chemotaxis than cinnamic acid. Hydroxycinnamic acids with one hydroxy group at *ortho*, *meta* or *para* position exhibited similar inhibitory effects on the chemotaxis with corresponding methoxycinnamic acids, but 3,4-dihydroxycinnamic acid did stronger inhibitory effects than 3,4-dimethoxycinnamic acid. 3,4-Dimethoxycinnamic acid exhibited weaker inhibitory effects on the chemotaxis than 1,2-dimethoxy-4-propenylbenzene and 3,4-dimethoxy cinnamitrile with $-\text{CH}=\text{CHCN}$ or $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$ group instead of $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$ group. 4-Hydroxycinnamic acid and 3,4-dihydroxycinnamic acid exhibited stronger inhibitory effects on the chemotaxis than 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid and 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid with $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ group instead of $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$ group.

Keywords □ Cinnamic acid analogs, polymorphonuclear leukocytes, chemotaxis, fMLP.

국소적 생체 방어작용인 염증반응에서 혈액내 백혈구가 염증국소로 이동하는 것을 유주현상(chemotaxis)이라 칭하며 이 현상은 주화성 인자(chemoattractant)에 의해 유도된다.^{1,2)} 백혈구의 유주현상은 selectin에 의해 백혈구가 혈관부위에 구르는 단계를 시작으로 백혈구에 주화성 인자가 결합하고 이어 세포 표면에 부착물질인 integrin 수가 증가한다.^{3,4)} 백혈구 표면의 integrin은 혈관 내피세포의 ICAM, ELAM, VCAM 등과 상호작용하여 백혈구가 혈관 내피세포에

부착하는 단계에 도달하고 이어서 혈관 내피세포의 간극을 통해 백혈구가 혈관을 탈출하여 이물질이 침입한 국소로 이동한다.⁵⁻¹⁰⁾

주화성 인자로는 지질대사체인 platelet activating factor와 leukotriene B₄, 보체결편 C5a, chemokine, 박테리아 펩타이드인 fMLP 등이 알려져 있다.¹¹⁻¹⁵⁾ 주화성 인자는 백혈구를 포함한 염증세포의 표면에 노출된 수용체에 특이적으로 결합하고 G 단백질을 경유한 phospholipase의 활성화에 의해 second messenger인 diacylglycerol과 inositol triphosphate를 생성한다.²⁾ 주화성 인자는 이물질이 침입한 국소의 세포에서 분비되며 저농도의 주화성 인자는 유주현상을 일으키지만 고농

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0431-61-2823 (팩스) 0431-68-2732

도의 주화성 인자는 염증세포의 활성화 및 탈과립을 일으킬 수 있다. 따라서 유주현상에 의해 혈관을 탈출하여 이물질이 침입한 국소에 도달하면 고농도의 주화성 인자에 의해 백혈구가 활성화되어 활성산소 등을 방출하고 탈과립에 의해 각종 가수분해성 효소를 유리시켜 이물질을 분해시키는 염증반응이 일어난다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 그러나 과대 염증반응은 이물질의 분해와 제거외에도 주변에 있는 정상세포를 손상시킨다. 따라서 항염증 약물을 복용함에 의해 과대 염증반응에 의한 정상세포의 손상을 최소화할 수 있다.²⁰⁾

본 논문은 fMLP로 유도한 흰쥐 다형핵백혈구의 유주현상에 대한 16종 cinnamic acid 유사체들의 억제효과를 1 μM 농도에서 평가한 연구로 시료중 3,4-dihydroxycinnamic acid(caffeic acid)가 가장 우수한 억제효과를 나타냈으며 cinnamic acid 유사체의 구조와 다형핵백혈구의 유주현상에 대한 억제효과간의 상관성을 고찰하였다.

실험방법

시약 및 기기 - RPMI 1640와 Hanks' balanced salts는 GIBCO 사(Grand Island, NY)에서 구입하였고 f-MLP, arachidonic acid, heparin, histopaque 1077, histopaque 1119, dextran은 Sigma 사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 cinnamic acid와 그 유사체는 Aldrich 사에서 구입하여 사용하였다. Neuro Probe 사의 microchemotaxis chamber와 Cambridge 사의 영상분석기를 사용하였다.

흰쥐 다형핵백혈구 분리 - Sprague-Dawley계 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 심장으로부터 1 ml의 heparin(75 units/ml)을 넣은 주사기로 약 10 ml의 혈액을 채취한 다음 동량의 Hanks' 용액으로 희석하였다. 희석한 혈액에 5 ml의 histopaque 1077과 5 ml의 histopaque 1119를 가한 다음 상온에서 10분간 방치하고 1600 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 다형핵백혈구 분획을 채취한 다음 Hanks' 용액으로 1회 세척하고 dextran 침전 및 중류수로 적혈구를 제거한 다음 5 ml RPMI 1640 배지에 현탁시켰다. Trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 살아있는 다형핵백혈구 수(생존율은 95% 이상)를 산정한 다음 1×10^6 cells/ml이 되도록 RPMI 1640 배지로 희석하였다.

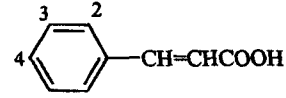
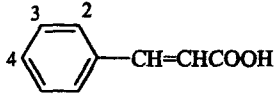
유주현상 측정 - Microchemotaxis chamber의 lower chamber에 RPMI 1640 배지로 희석한 0.1 μM 의 fMLP를 well당 25 μl 씩 주입하고 그 위에 lower filter와 upper filter를 순차적으로 올려 놓은 다음 upper chamber를 고정하였다. Upper filter(poly-carbonate, 3 μm)와 lower filter(nitrocellulose, 0.02 μm)는 0.03% BSA를 함유한 RPMI 1640 배지에 2시간 이상 방치한 다음 사용하였다. 시료인 cinnamic acid 유사체는 에탄올로 용해한 다음 RPMI 1640 배지로 희석하여 사용하였다. 180 μl 의 다형핵백혈구 현탁액(1×10^6 cells/ μl)에 20 μl 의 시료를 가하고 37°C, 5% CO_2 에서 30분간 방치한 다음 upper chamber의 well당 45 μl 씩 주입하였다. 37°C, 5% CO_2 에서 1시간 방치한 다음 upper chamber의 세포 현탁액을 제거하고 filter에 부착된 다형핵백혈구를 고정하기 위해 well당 50 μl 의 formaldehyde를 가하고 30초간 상온에서 방치하였다. Lower filter에 고정된 다형핵백혈구 수를 영상분석기를 사용하여 산정하였다.

유주현상 억제율 산출 - RPMI 1640 배지만 처리된 대조군에 대한 시료군의 유주현상 정도를 비교하여 억제율(%)로 산출하였으며 동일시료를 15개(n=15)처리하여 얻은 결과를 통계처리하였고 유의성은 Student's t-test로 검정하였다.

실험결과 및 고찰

주화성 인자인 fMLP의 농도에 따른 다형핵백혈구의 유주현상을 평가한 결과 0.1 μM 의 fMLP를 처치했을 때 가장 높은 효과를 나타냈다. 0.001 μM 이하의 fMLP 농도에서는 유의성있는 유주효과를 나타내지 않았으며, 1 μM 이상의 fMLP를 처치했을 때는 0.1 μM 의 fMLP를 처치했을 때 나타나는 유주효과보다 감소하는 경향이 있었다. 따라서 시료의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과를 평가할 때 0.1 μM 의 fMLP를 사용하였다. 방치시간에 따른 다형핵백혈구의 유주현상을 평가한 결과 방치시간에 비례하여 유주효과가 증가하였으나, 90분 이상 방치하였을 때는 lower filter로 이동한 다형핵백혈구의 수가 너무 많아 산정하기가 어려웠다. 따라서 시료에 의한 유주현상 억제효과를 평가할 때 방치시간을 60분으로 정하였다.

시료로 cinnamic acid와 benzene 환에 수산기 또는 메톡시기가 치환된 유도체와 $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$ 기가 다



Chemicals	Substituents			Inhibition (%)
	2	3	4	
Chinamic acid	H	H	H	26±13
2-Hydroxycinnamic acid	OH	H	H	44±12*
3-Hydroxycinnamic acid	H	OH	H	53±9*
4-Hydroxycinnamic acid	H	H	OH	52±7*
3,4-Dihydroxycinnamic acid	H	OH	OH	63±6**

Fig. 1— Inhibitory effects on chemotaxis by hydroxycinnamic acids. Inhibitory effects of hydroxycinnamic acids at the concentration of 1 uM are represented as % of inhibition compared with the control, mean± standard error (n=15), and significant differences of them from the control are *p<0.05 and **p<0.01.

Chemicals	Substituents			Inhibition (%)
	2	3	4	
2-Hydroxycinnamic acid	OH	H	H	44±12
2-Methoxycinnamic acid	OCH ₃	H	H	49±9
3-Hydroxycinnamic acid	H	OH	H	53±9
3-Methoxycinnamic acid	H	OCH ₃	H	43±6
4-Hydroxycinnamic acid	H	H	OH	52±7
4-Methoxycinnamic acid	H	H	OCH ₃	61±7
3,4-Dihydroxycinnamic acid	H	OH	OH	63±6
3,4-Dimethoxycinnamic acid	H	OCH ₃	OCH ₃	25±14**

Fig. 2— Inhibitory effects on chemotaxis by methoxycinnamic acids. Inhibitory effects of methoxycinnamic acids at the concentration of 1 uM are represented as % of inhibition compared with the control, mean± standard error (n=15), and significant difference of them from those of the corresponding hydroxycinnamic acids is **p<0.01.

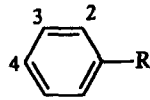
른 기능기로 치환된 유사체, 총 16종을 선별하여 fMLP로 유도한 다형핵백혈구의 유주현상에 대한 억제효과를 평가하였다. 농도 1 uM에서 본 연구의 시료 16종은 14%에서 63%의 억제효과를 나타냈고 3,4-dihydroxycinnamic acid(caffeic acid)가 가장 높은 억제효과를 나타냈다.

Cinnamic acid의 benzene 환에 수산기가 치환된 유도체들의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 Fig. 1과 같다. Cinnamic acid의 억제효과는 1 uM에서 26%이었으나 *ortho*, *meta* 또는 *para* 위치에 수산기 한 개가 치환된 hydroxycinnamic acid들은 동일농도에서 44%에서 53%의 억제효과를 나타냈고 *meta*와 *para* 위치에 두 개의 수산기가 치환된 3,4-dihydroxycinnamic acid는 63%의 억제효과를 나타냈다. 따라서 cinnamic acid 보다 benzene 환에 수산기 한 개가 치환된 유도체들이 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 유의성있게 강한 것을 알 수 있었고, 또한 두 개의 수산기가 치환된 유도체는 한 개의 수산기가 치환된 유도체보다 더 강한 억제효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

Hydroxycinnamic acid들의 수산기가 메틸화된 화합물들의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 Fig. 2와 같다. 2-Methoxycinnamic acid, 3-methoxycinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 1 uM 농도에서 각각 49%, 43%, 61%이었다. 그리고 3,4-dimethoxycin-

amic acid는 1 uM 농도에서 다형핵백혈구 유주현상을 25% 억제하였다. 한 개의 수산기가 치환된 hydroxycinnamic acid들과 수산기가 메틸화된 대응하는 methoxycinnamic acid들간은 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 서로 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 3,4-dihydroxycinnamic acid와 비교하여 두 개의 수산기가 모두 메틸화된 3,4-dimethoxycinnamic acid는 다형핵백혈구 유주현상에 대해 현저히 약한 억제효과를 나타냈고 수산기가 없는 cinnamic acid와 유사한 수준의 억제효과를 나타냈다.

Cinnamic acid 유도체의 -CH=CHCOOH기가 다른 기능기로 치환된 화합물들의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 Fig. 3과 같다. 2-Methoxycinnamaldehyde와 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 1 uM 농도에서 38%와 14%이었고, 1,2-dimethoxy-4-propenylbenzene과 3,4-dimethoxycinnamonitrile의 억제효과는 40%와 51%이었다. 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid와 3,4-dihydroxy hydrocinnamic acid의 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과는 1 uM 농도에서 29%이었고 3-(4-methoxyphenyl)propionic acid의 억제효과는 46%이었다. Cinnamic



Chemicals	Substituents				Inhibition(%)
	2	3	4	R	
2-Methoxycinnamic acid	OCH ₃	H	H	CH=CHCOOH	49±9
2-Methoxycinnamaldehyde	OCH ₃	H	H	CH=CHCHO	38±10
4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	H	OCH ₃	OH	CH=CHCOOH	23±9
4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	H	OCH ₃	OH	CH=CHCHO	14±13
3,4-Dihydroxycinnamic acid	H	OCH ₃	OCH ₃	CH=CHCOOH	25±14
1,2-Dimethoxy-4-propenylbenzene	H	OCH ₃	OCH ₃	CH=CHCH ₃	40±12*
3,4-Dimethoxycinnamionitrile	H	OCH ₃	OCH ₃	CH=CHCN	51±7**
4-Hydroxycinnamic acid	H	H	OH	CH=CHCOOH	52±7
3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	H	H	OH	CH ₂ CH ₂ COOH	29±11*
3,4-Dihydroxycinnamic acid	H	OH	OH	CH=CHCOOH	63±6
3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	H	OH	OH	CH ₂ CH ₂ COOH	29±13**
4-Methoxycinnamic acid	H	H	OCH ₃	CH=CHCOOH	61±7
3-(4-Methoxyphenyl)-propionic acid	H	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ COOH	46±12

Fig. 3 - Inhibitory effects on chemotaxis by cinnamic acid analogs.

Inhibitory effects of samples at the concentration of 1 μ M are represented as % of inhibition compared with the control, mean±standard error (n=15), and significant differences of them from those of the corresponding cinnamic acids are *p<0.05 and **p<0.01.

acid 유도체와 -CH=CHCHO기를 가지고 있는 cinnamaldehyde 유도체간에는 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 서로 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 3,4-Dimethoxycinnamic acid와 비교하여 -CH=CHCH₃기를 가지고 있는 1,2-dimethoxy-4-propenylbenzene과 -CH=CHCN기를 가지고 있는 3,4-dimethoxycinnamionitrile은 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 현저히 강한 것을 알 수 있었다. Hydroxycinnamic acid 유도체와 비교하여 -CH=CHCOOH기가 -CH₂CH₂COOH기로 치환된 화합물들은 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 현저히 약하였고, 4-methoxycinnamic acid와 비교하여 -CH₂CH₂COOH기를 가지고 있는 3-(4-methoxyphenyl)propionic acid는 유주현상 억제효과에 있어 서로 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

Cinnamic acid 유사체들의 구조와 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과간의 상관성을 종합하면 다음과 같다. Cinnamic acid 보다 benzene 환에 수산기 한 개가 치환된 hydroxycinnamic acid들과 benzene 환의 *meta*와 *para* 위치에 수산기가 치환된 3,4-dihydroxycinnamic acid가 다형핵백혈구 유주현상에

대한 억제효과에 있어 유의성 있게 강하였다. Benzene 환에 수산기 한 개가 치환된 hydroxycinnamic acid들과 수산기가 메틸화된 대응하는 methoxycinnamic acid들은 유주현상 억제효과에 있어 차이가 없었으나, 3,4-dihydroxycinnamic acid와 비교하여 수산기가 모두 메틸화된 3,4-dimethoxycinnamic acid는 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과가 현저히 약하였다. 3,4-Dimethoxycinnamic acid와 비교하여 -CH=CHCOOH기가 -CH=CHCN기 또는 -CH=CHCH₃기로 치환된 1,2-dimethoxy-4-propenylbenzene과 3,4-dimethoxycinnamionitrile은 다형핵백혈구 유주현상에 대한 억제효과에 있어 유의성 있게 강하였다. 따라서 cinnamic acid의 *meta*와 *para* 위치에 수산기가 치환되고 -CH=CHCN기 또는 -CH=CHCH₃기로 치환된 화합물들이 다형핵백혈구 유주현상에 대해 강한 억제효과를 나타낼 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구의 일부분은 과학기술처 연구비(95-G-04-03-A-31)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Weissmann, G. : Inflammation historical perspective. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*(Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 5-10, Raven Press, New York (1992).
- 2) Snyderman, R. and Uhing, R. J. : Chemoattractant stimulus-response coupling in *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 421-440, Raven Press, New York (1992).
- 3) Carlos, T. M. and Harlan, J. M. : Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol. Rev.* **114**, 5 (1990).
- 4) Osborn, L. : Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* **62**, 3 (1990).
- 5) Springer, L. M. : Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425 (1990).
- 6) Arnaut, M. A. : Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* **75**, 1037 (1990).
- 7) Perretti, M. : Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. *TIPS* **18**, 418 (1997).
- 8) Kishimoto, T. K. and Anderson, D. C. : The role of integrin in inflammation. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*(Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 353-406, Raven Press, New York (1992).
- 9) Butcher, E. C. : Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Cell* **63**, 861 (1990).
- 10) Helmer, M. E. : VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their roles on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 365 (1990).
- 11) Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. and McIntyre, T. M. : Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 17381 (1990).
- 12) Samuelsson, B. : Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568 (1983).
- 13) Goldstein, I. M. : Complement: biologically active products. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*(Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 63-80, Raven Press, New York (1992).
- 14) Schall, T. J. : The chemokines. In *The Cytokine Handbook*(Thomson, A. ed.)pp. 419-460, Academic Press, New York (1994).
- 15) Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P. : The N-formyl-peptide receptor. *Biochem.* **29**, 11123 (1990).
- 16) Tamura, M., Tamura, T., Tyagi, S. R. and Lambeth, J. D. : The superoxide-generating respiratory burst oxidase of human neutrophil plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **263**, 17621 (1988).
- 17) Rotrosen, D. : The respiratory burst oxidase. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 589-601, Raven Press, New York (1992).
- 18) Bentwood, B. J. and Henson, P. M. : The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J. Immunol.* **124**, 855 (1980).
- 19) Henson, P. M., Henson, J. E., Fittschen, C., Bratton, D. L. and Riches, D. W. H. : Degranulation and secretion by phagocytic cells. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. eds.), pp. 511-539, Raven Press, New York (1992).
- 20) Prous, J. R. : *The Year's Drug News*, Prous Science, Barcelona (1995).