

## 생약자원으로부터 Monocyte Chemoattractant Protein-1에 의한 Chemotaxis 저해활성 검색

이승웅 · 권오익 · 정미연 · 김영호<sup>1</sup> · 노문철\* · 이현선 · 김영국  
한국생명공학연구원 지질대사 연구실, <sup>1</sup>충남대학교 약학대학

### Screening of Monocyte Chemoattractant Protein-1-Induced Chemotaxis Inhibitors from Medicinal Herbs

Seung woong Lee, Oh Eok Kwon, Mi Yeon Chung, Young Ho Kim<sup>1</sup>,  
Mun-Chual Rho\*, Hyun Sun Lee, and Young Kook Kim

Laboratory of Lipid Metabolism, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115,  
Yusong, Taejeon 305-600, <sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

**Abstract** – Blood monocytes are the precursors for the lipid-laden foam cells of early atherosclerotic lesions. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a CC chemokine, and chemokine receptor 2 (CCR2) play a crucial role in the recruitment of monocytes to the vascular lesion. Using the human monocyte THP-1 cell line, we investigate the inhibitory effects of methanol extracts of 127 medicinal herbs on MCP-1-induced chemotaxis. Seven kinds of methanol extracts of medicinal herbs showed above 40% inhibitory effect with the concentration of 25 µg/ml. They were divide three fractions of CHCl<sub>3</sub>, BuOH, H<sub>2</sub>O to use solvent partition. Among them, butanol extract of Junci Medulla and CHCl<sub>3</sub> extract of Clematidis Radix are showed significant inhibitory activities (above 50% inhibition) at the same concentration.

**Key words** – Medicinal herb, Chemotaxis, Monocyte chemoattractant protein-1

동맥경화는 혈중의 고 콜레스테롤, 고혈압, 독소, 병원체 등에 의한 혈관 벽의 내피세포에 발생한 미세한 손상부위에 monocyte와 macrophage가 침투하여 foam cell로 분화되어 혈관세포의 섬유화가 진행되는 다양하고 복합적인 발병 기작을 갖는 질환이다.<sup>1)</sup> 이러한 동맥경화 진전의 과정 중, chemokine은 혈관내피세포상에서 rolling하는 monocyte를 활성화시키고 내피세포에 발현된 ICAM-1, VCAM-1등의 세포접착인자의 관여로 monocyte가 혈관내막에 침투하게 된다.<sup>2)</sup>

Chemokine은 8-10 kDa의 펩타이드 단백질로 leukocyte의 주화성과 활성화에 중요한 역할을 한다. 이 단백질은 염기성으로 헤파린과 결합성이 강하며 현재까지 30여종의 chemokine이 밝혀졌고 N말단의 4개의 cysteine (C)중 최초의 2개의 cysteine의 배열에 따라 4개의 subgroup (CXC, CC, C, CX<sub>3</sub>C chemokine)로 분류되어진다. 일반적으로 CXC chemokine은 neutrophil을 유인하며 CC chemokine은 mono-

cyte, lymphocyte, basophilic leukocyte등을 유인한다.<sup>3-5)</sup> 특히, 동맥경화 병변이 일어나기 쉬운 혈관 분지부 등에는 세포접착인자와 함께 CC chemokine의 하나인 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)의 발현이 증가하는 것으로 밝혀졌으며,<sup>6-7)</sup> 혈관 형성이 진행되고 있는 동맥경화 환자의 동맥의 내피세포, macrophage, 평활근 세포에서 MCP-1의 mRNA의 발현이 확인되었다.<sup>8)</sup> 동맥경화 진전에 있어서의 MCP-1의 주 기능은 subendothelial 세포 층 속으로 monocyte의 침투를 유도하는 것이다.<sup>9)</sup> 동맥경화의 진전 중에는 LDL을 축적하고 있는 macrophage와 monocyte가 MCP-1에 의해 혈관내막층에 모이게 되며 이러한 세포내의 지방 침착은 동맥경화성 반이 형성되고 커지는 것을 유도한다.<sup>10)</sup> 또한, LDL내에 존재하는 콜레스테롤이 monocyte를 활성화시켜 MCP-1 수용체인 CCR2의 발현 양을 증가시키며, monocyte의 chemotaxis를 증가시키는 사실도 밝혀졌다.<sup>11)</sup> 실제로 동맥경화가 일어나기 쉬운 ApoE knock out mouse와 CCR2를 knock out 시킨 mouse의 교배에 의한 double knock out mouse에서는 동맥경화의 진전이 현저하게 감소

\*교신저자(E-mail) : rho-m@kribb.re.kr

되는 사실이 밝혀졌다.<sup>12)</sup> 한편, CCR2 결손 마우스에서는 동맥경화반의 크기가 감소되나 혈장 콜레스테롤의 양은 변화가 없는 사실로부터 MCP-1은 콜레스테롤의 축적에 의한 동맥경화와는 다른 기작으로 동맥경화의 진전에 관여하는 것으로 밝혀졌다.<sup>12)</sup> 따라서 MCP-1과 그 수용체 CCR2는 동맥경화질환의 예방 및 치료제 개발의 새로운 target으로 주목되어진다.

현재까지의 동맥경화 관련된 심혈관계질환은 예방 및 치료약 개발을 위하여 주로 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소 저해제, 항 고혈압제, 항 혈소판 응고제, 콜레스테롤 아산화 저해제 등이 연구되어왔다. 본 연구에서는 동맥경화와 관련된 새로운 작용 기작으로 동맥경화 진전에 관여하고 있는 MCP-1과 그 수용체 CCR2를 target으로 활성 물질을 탐색하였으며, 본보에서는 127종의 국내 식물자원의 MeOH 추출물에 대한 저해활성 검색 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 이용된 생약시료는 시중 한약건재상(대전소재)에서 기 감정되어진 것을 구입하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 저해활성 측정에 사용된 시료는 DMSO (Sigma Co.)에 녹여 PBS buffer (Gibco BRL)로 희석하여 사용하였다. Cell culture용 배지는 RPMI-1640, FBS (fetal bovine serum), kanamycin sulfate (Gibco BRL), 2-Mercaptoethanol, HEPES (Sigma Co), sodium hydrogen carbonate (Wako Co.)를 사용하였다. 반응배지는 RPMI-1640에 BSA (bovine serum albumin, Sigma Co.)를 녹여 사용하였으며, rhMCP-1 (Wako Co.)은 DMSO에 녹여 분주하였다. 저해활성은 MTT시약(Sigma Co)을 사용하여 microplate reader (VERSAmax, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. Boyden chamber (Neuro Probe), polycarbonate filter (5 µm, Neuro Probe Inc.), 96-well plate (Nunc)를 사용하였다.

**식물추출물의 조제 및 시약조제** - 시료 약 5 g에 100 ml MeOH을 가하여 실온에서 3일간 2회 추출한 후 농축하여 MeOH 추출물을 조제하였고, 용매분배를 이용하여 CHCl<sub>3</sub>, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획을 조제하였다. 검색시약은 DMSO로 5 mg/ml의 농도로 하여 stock solution을 만든 후 PBS buffer로 1 mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 반응배지는 kanamycin sulfate 60 mg/L, sodium hydrogen carbonate 120 mg/L를 함유한 RPMI-1640에 0.1% BSA를 첨가하여 사용하였다. Polycarbonate filter 세척용으로 20 mM EDTA를 함유한 PBS buffer를 사용하였다. rhMCP-1(Wako Co.)은 10 µM의 농도로 DMSO에 녹여 10 µl씩 분주하였으며 사용시

PBS buffer로 희석하여 사용하였다.

**세포배양** - Human monocyte THP-1 cell은 2-Mercaptoethanol 20 µM, kanamycin sulfate 60 mg/L, sodium hydrogen carbonate 120 mg/L, HEPES 25 mM과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 배양배지로 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 36시간을 주기로 T-75와 T-25 culture flask에 배양하였다. 활성 측정 실험 전 THP-1 cell은 0.1% BSA가 포함된 RPMI 1640 반응배지로 2.0×10<sup>6</sup> cells/ml로 cell 수를 조정하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 안정화 시켰다.

**Chemotaxis assay**<sup>13)</sup> - Boyden chamber의 아래에 96-well plate를 놓고 RPMI 1640 (0.1% BSA) 반응배지를 330 µl 채운 다음 10 µl의 rhMCP-1 (3~10 nM)을 넣었다. Polycarbonate filter membrane (pore size, 5 µm)을 위에 올려놓고 chamber를 고정시킨 뒤 위쪽 well에 2.0×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정된 THP-1 cell 200 µl와 sample 10 µl를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 120~180분 동안 incubation하였다. Incubation 후 위쪽 well의 배지를 제거하고 PBS buffer로 2회 washing한 후 180 µl의 PBS buffer와 20 µl EDTA (20 mM)를 넣고 4°C에서 20분간 incubation 하였다. Incubation 후 위쪽 well의 buffer를 제거하고 membrane을 PBS buffer로 1회 washing한 다음 chamber와 membrane이 부착된 96-well plate를 분리하였다. Plate는 15분간 1600 RPM에서 원심분리하여 cell을 down 시킨 다음 반응배지를 제거하고 200 µl씩의 새로운 배지를 각 well에 넣었다. 각각의 well에 MTT (5 mg/ml) 20 µl를 넣은 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3~4시간 동안 incubation 한 다음 1600 rpm에서 10분간 원심 분리하고 배지를 모두 제거한 후 100 µl의 DMSO를 넣고 20~30분간 shaking하여 microplate reader (490 nm/650 nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 저해도 (%)는 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\% \text{ of inhibition} = \{(Pa - Sa) / (Pa - Na)\} \times 100$$

Pa; sample을 첨가 하지 않은 well의 absorbance (MCP-1 처리)

Sa; sample을 첨가한 well의 absorbance (MCP-1 처리)

Na; sample을 첨가 하지 않은 well의 absorbance (MCP-1 무처리)

## 결과 및 고찰

초기 동맥경화성 병반에서 관찰되어지는 lipid-laden foam cell은 혈액 중의 monocyte로부터 유래된 것으로, monocyte의 migration은 CC chemokine의 일종인 MCP-1과 그 수용체인 CCR2에 의해서 유도되어진다. 본 실험에서는 *in vitro*

**Table 1.** Inhibitory effects of methanol extracts of medicinal herbs on MCP-1- induced chemotaxis

Herbal drugs	Scientific name	Inhibition rate(%)*	Family
Puerariae Radix (갈근)	<i>Pueraria thunbergii</i>	-	Leguminosae
Glycyrrhizae Radix (감초)	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	28.53	Leguminosae
Zingiberis Rhizoma (건강)	<i>Zingiber officinale</i>	-	Zingiberaceae
Rehmanniae Radix (건지황)	<i>Rehmania glutinosa</i>	-	Scrophulariaceae
Cassiae Semen (결명자)	<i>Cassia obtusifolia</i>	35.53	Leguminosae
Cinnamomi Ramulus (계지)	<i>Cinnamomum cassia</i>	-	Lauraceae
Cinnamomi Cortex (계피)	<i>Cinnamomum cassia</i>	-	Lauraceae
Angelicae tenuissimae Radix (고본)	<i>Angelica tenuissima</i>	-	Umbelliferae
Sophorae Radix (고삼)	<i>Sophora flavescens</i>	53.65	Leguminosae
Agastachis Herba (괘향)	<i>Agastache rugosa</i>	29.72	Labiatae
Trichosanthis Radix (팔루인)	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	41.36	Cucurbitaceae
Sophorae Flos (괴화)	<i>Sophora japonica</i>	-	Leguminosae
Lycii Fructus (구기자)	<i>Lycium chinense</i>	10.39	Solanaceae
Lonicerae Flos (금은화)	<i>Lonicera japonica</i>	-	Capripoliaceae
Platycodi Radix (길경)	<i>Platycodon grandiflorum</i>	-	Campanulaceae
Phragmitis Rhizoma (노근)	<i>Phragmite communis</i>	-	Gramineae
Angelicae gigantis Radix (당귀)	<i>Angelica gigas</i>	-	Umbelliferae
Cirsii Herba (대계)	<i>Cirsium japonicum</i>	-	Compositae
Arecae Pericarpium (대복피)	<i>Areca catechu</i>	17.65	Palmae
Persicae Semen (도인)	<i>Prunus persica</i>	18.08	Rosaceae
Araliae cordatae Radix (독활)	<i>Aralia cordata</i>	-	Araliaceae
Benincasae Semen (동과자)	<i>Benincasa hispida</i>	25.07	Cucurbitaceae
Eucommiae Cortex (두충)	<i>Eucommia ulmoides</i>	21.86	Leguminosae
Junci Medulla (등심)	<i>Juncus effusus</i>	64.19	Juncaceae
Ephedrae Herba (마황)	<i>Ephedra sinica</i>	-	Ephedraceae
Vitidis Fructus (만형자)	<i>Vitex rotundifolia</i>	41.65	Verbenaceae
Liriopsis Tuber (백문동)	<i>Liriope platyphylla</i>	-	Liliaceae
Hordei Cortex Germinatus (맥아)	<i>Hordeum vulgare</i>	-	Gramineae
Moutan Cortex Radicis (목단피)	<i>Paeonia moutan</i>	-	Paeoniaceae
Akebiae Caulis (목통)	<i>Akebia quinata</i>	26.99	Lardizabalaceae
Saussureae Radix (목향)	<i>Saussurea lappa</i>	-	Compositae
Menthae Herba (박하)	<i>Mentha arvensis var. piperascens</i>	-	Labiatae
Pinelliae Tuber (반하)	<i>Pinellia ternata</i>	-	Araceae
Sinomenii Caulis et Rhizoma (방기)	<i>Sinomenium acutum</i>	22.68	Menispermaceae
Ledebouriellae Radix (방풍)	<i>Ledebouriella seseloides</i>	-	Umbelliferae
Bombycis Corpus (백강잠)	<i>Bombyx mori</i>	-	Bombycidae
Thujae Semen (백자인)	<i>Thuja orientalis</i>	-	Cupressaceae
Paeonia japonica (백작약)	<i>Paeonia japonica Miyabe et Takeda</i>	-	Paeoniaceae
Angelicae dahuricae Radix (백지)	<i>Angelica dahurica</i>	-	Umbelliferae
Tribuli Fructus (백질여)	<i>Tribulus terrestris</i>	36.13	Zygophyllaceae
Atractylodis Rhizoma alba (백출)	<i>Atractylodes japonica</i>	-	Compositae
Dolichoris Semen (백편두)	<i>Dolichos labla</i>	-	Leguminosae
Hoelen (복령)	<i>Poria cocos</i>	15.61	Polyporaceae
Rubi Fructus (복분자)	<i>Rubus coreanus</i>	17.11	Rosaceae
Hoelen cum Radix (복신)	<i>Pachyma hoelen</i>	-	Polyporaceae
Zedoariae Rhizoma (봉출)	<i>Curcuma Zedoaria</i>	-	Zingiberaceae
Aconiti Tuber (부자)	<i>Aconitum carmichaeli</i>	18.02	Ranunculaceae
Arecae Semen (빈랑)	<i>Areca catechu Linne</i>	-	Palmae
Adenophorae Radix (사삼)	<i>Adenophora tetraphylla</i>	-	Campanulaceae

Table 1. continued

Herbal drugs	Scientific name	Inhibition rate(%)*	Family
Torilidis Fructus (사상자)	<i>Torilis japonica</i>	28.1	Umbelliferae
Amomi Semen (사인)	<i>Amonum xanthioides</i>	-	Zingiberaceae
Crataegi Fructus (산사자)	<i>Crataegus pinnatifida</i>	-	Rosaceae
Dioscorese Rhizoma (산약)	<i>Dioscorea japonica</i>	15.58	Dioscoreaceae
Scirpi Rhizoma (삼능)	<i>Scirpus flaviatilis</i>	-	Cyperaceae
Loranthi Ramulus (상기생)	<i>Loranthus parasiticus</i>	-	Loranthaceae
Mori Cortex Radicis (상백피)	<i>Morus alba L.</i>	-	Moraceae
Haliotidis Concha (석결명)	<i>Haliotis gigantea</i>	-	Haliotidae
Dendrobii Herba (석곡)	<i>Dendrobium nobile</i>	-	Orchidaceae
Cicadidae Periostracum (선태)	<i>Cryptotympana pustulata</i>	18.1	Cicadidae
Agrimoniae Lignum (선태초)	<i>Agrimonia pilosa var. japonica</i>	-	Rosaceae
Asiasari Radix (세신)	<i>Asiasarum sieboldi</i>	-	Aristolochiaceae
Caesalpiniae Lignum (소목)	<i>Caesalpiia sappan</i>	-	Leguminosae
Perillae Herba (소엽)	<i>Perilla frutescen var. acuta</i>	23.54	Labiatae
Perillae Semen (소자)	<i>Perilla sikokiana</i>	-	Labiatae
Rehmanniae Radix Preparata (숙지황)	<i>Rehmannia glutinosa</i>	-	Scrophulariaceae
Cimicifugae Rhizoma (승마)	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	-	Ranunculaceae
Bupleuri Radix (시호)	<i>Bupleurum falcatum</i>	-	Umbelliferae
Magnoliae Flos (신이화)	<i>Magnolia denudata</i>	43.04	Magnoliaceae
Artemisiae asiaticae Herba (애엽)	<i>Artemisia asiatica</i>	-	Compositae
Forsythiae Fructus (연교)	<i>Forsythia viridissima</i>	-	Oleaceae
Nelumbinis Semen (연자육)	<i>Nelumbo nucifera</i>	-	Nymphaeaceae
Schizandrae Fructus (오미자)	<i>Schizandra chinensis</i>	-	Schizandraceae
Evidiae Fructus (오수유)	<i>Evodia rutaecarpa</i>	-	Rutaceae
Linderae Radix (오약)	<i>Lindera strychnifolia</i>	-	Lauraceae
Gentianae scabrae Radix (용담)	<i>Gentiana scabra</i>	-	Gentianaceae
Longanae Arillus (용안육)	<i>Euphoria longana</i>	-	Sapindaceae
Arctii Semen (우방자)	<i>Arctium lappa</i>	-	Compositae
Polygalae Radix (월지)	<i>Polygala tenuifolia</i>	-	Polygalaceae
Clematidis Radix (위령선)	<i>Clematis mandshurica</i>	72.68	Ranunculaceae
Cistanchis Herba (육종용)	<i>Cistanchu dederticola</i>	-	Orobanchaceae
Coicis Semen (이의인)	<i>Coix lacyma-jobi var. ma-yuen</i>	16.91	Gramineae
Artemisiae capillaris Herba (인진)	<i>Artemisia capillaris</i>	-	Compositae
Asteris Radix (자원)	<i>Aster tataricus</i>	-	Compositae
Polyporus (저령)	<i>Polyporus umbellatus</i>	-	Polyporaceae
Paeoniae Radix Rubra (적작약)	<i>Paeonia albiflora</i>	-	Paoniaceae
Anthrisci Radix (진호)	<i>Anthriscus sylvestris</i>	-	Umbelliferae
Caryophylli Flos (정향)	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-	Myrtaceae
Bamusaе Caulis in Taeniam (죽여)	<i>Phyllostachys nigra var. henosis</i>	16.97	Bambusaceae
Phyllostachysis Folium (죽엽)	<i>Phyllostachys nigra var. henosis</i>	-	Bambusaceae
Aurantii Fructus (지각)	<i>Citrus aurantium</i>	-	Rutaceae
Lycii Radicis Cortex (지골피)	<i>Lycium chinense</i>	-	Solanaceae
Anemarrhenae Rhizoma (지모)	<i>Anemarrhena asphodeloides Bunge</i>	-	Liliaceae
Ponciri Fructus (지실)	<i>Poncirus trifoliata</i>	-	Rutaceae
Auranti nobilis Pericaroiium (진피)	<i>Citrus unshiu</i>	-	Rutaceae
Plantaginis Semen (차전자)	<i>Plantago asiatica</i>	-	Plantaginaceae
Xanthii Fructus (창이자)	<i>Xanthium strumarium</i>	-	Compositae
Atractylodis Rhizoma (창출)	<i>Atractylodes japonica</i>	-	Compositae
Cinidii Rhizoma (천궁)	<i>Cinidium officinale</i>	-	Umbelliferae

Table 1. continued

Herbal drugs	Scientific name	Inhibition rate(%)*	Family
Arisaematis Tuber (천남성)	<i>Arisaema amurense</i>	-	Araceae
Gastrodiae Rhizoma (천마)	<i>Gastrodia elata</i>	-	Orchidaceae
Asparagi Tuber (천문동)	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	-	Liliaceae
Rubiae Radix (천초)	<i>Rubia akane</i>	28.02	Rubiaceae
Trichosanthis Radix (천화분)	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	-	Cucurbitaceae
Aurantii immatri Pericarpium (청피)	<i>Cirsium unshiu</i>	23.61	Rutaceae
Amomi tsao-ko Fructus (초과)	<i>Amomum tsao-ko</i>	-	Zingiberaceae
Aconiti ciliare Tuber (초오)	<i>Aconitum ciliare</i>	-	Ranunculaceae
Alismatis Rhizoma (택사)	<i>Alisma orientale</i>	15.7	Alismataceae
Cuscutae Semen (토사자)	<i>Cuscuta chinensis</i>	-	Comvolvulaceae
Tetrapanax Medulla (통초)	<i>Tetrapanax papyriferus</i>	-	Araliaceae
Tigllii Semen (파두)	<i>Croton tiglium</i>	-	Euphobiaceae
Fritillariae Bulbus (패모)	<i>Fritillaria thunbergii</i>	-	Liliaceae
Typhae Pollen (포황)	<i>Typha orientalis</i>	38.47	Typhaceae
Piperis longi Fructus (필발)	<i>Piper longum</i>	-	Piperaceae
Notarchi leachii Ovum (해분)	<i>Notarchus leachii freeri</i>	-	Aplysiidae
Cyperi Rhizoma (향부자)	<i>Cyperus rotundus</i>	-	Cyperaceae
Elsholtziae Herba (향유)	<i>Elsholtzia ciliata</i>	-	Libiatae
Scrophulariae Tadix (현삼)	<i>Scrophularia buergeriana</i>	-	Scrophulariaceae
Corydalis Tuber (현호색)	<i>Corydalis ternata</i>	-	Papaveraceae
Nepetae Spica (헹개)	<i>Nepeta japonica</i>	-	Labiatae
Trigonellae Semen (호로파)	<i>Trigonella foenum-grecum</i>	26.97	Leguminosae
Picrorrhizae Rhizoma (호황련)	<i>Picrorrhiza kurroa</i>	-	Scrophulariaceae
Carthami Flos (홍화)	<i>Carthamus tinctoris</i>	-	Compositae
Scutellariae Radix (황금)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	15.58	Labiatae
Coptidis Rhizoma (황련)	<i>Coptis japonica</i>	-	Ranunculaceae
Phellodendri Cortex (황백)	<i>Phellodendron amurense</i>	-	Rutaceae
Foeniculi Fructus (회향)	<i>Foeniculum vulgare</i>	-	Umbelliferae
Magnoliae Cortex (후박)	<i>Magnolia officinalis</i>	-	Magnoliaceae

\*Samples treated to the THP-1 cells at the final concentration of 25 µg/ml.  
Values are expressed as mean of three replications. - : <10% inhibition.

Table 2. Inhibitory effects of solvent fractions of medicinal herbs on MCP-1- induced chemotaxis

Herbal drugs	Scientific name	Inhibition rate (%)*			
		MeOH	CHCl <sub>3</sub>	BuOH	H <sub>2</sub> O
Sophorae Radix	<i>Sophora flavescens</i>	53.65	41	10	30
Trichosantis Radix	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	41.36	13.07	-	-
Junci Medukka	<i>Juncus effusus</i>	64.19	15.70	57.94	11.75
Vitidis Fructus	<i>Vitex rotundifolia</i>	41.65	35.41	26.79	20
Magnoliae Flos	<i>Magnolia denudata</i>	43.04	-	-	-
Clematidis Radix	<i>Clematis mandshurica</i>	72.68	57.85	24.19	-

\*Samples treated to the THP-1 cells at the final concentration of 25 µg/ml.  
Values are expressed as mean of three replications. - : <10% inhibition.

상에서 boyden chamber법을 이용하여 human monocyte THP-1 cell이 polycarbonate membrane을 통과하여 이동된 세포를 microplate reader 사용하여 흡광도를 측정하였으며,

chemotaxis의 저해활성은 127종의 생약자원의 MeOH 추출 물을 대상으로 조사하였다.

생약자원의 MeOH 추출물의 최종농도를 25 µg/ml로 하

여 chemotaxis 저해활성을 조사한 결과, Cassiae Semen, Trichosanthis Radix, Tribuli Fructus, Typhae pollen, Vitis Fructus, Magnoliae Flos 등에서 30~40% 정도의 저해활성이 나타났으며 Sophore Radix (53.65%), Junci Medulla (64.19%), Clematidis Radix (72.68%) 등에서는 50% 이상의 유의성을 보이는 저해활성이 나타났다 (Table 1). THP-1 cell의 MCP-1에 의한 chemotaxis에 대한 1차 저해활성 검사 결과 40% 이상의 저해활성을 보인 생약자원을 선별하여 활성물질의 용매 이행성을 조사하였다. 각각의 선별된 생약자원의 MeOH 추출물을 CHCl<sub>3</sub>, BuOH, H<sub>2</sub>O로 순차적으로 분획하여 최종농도 25 µg/ml에서의 chemotaxis 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Sophore Radix (41%), Vitis Fructus (35.41%), Clematidis Radix (57.85%)는 CHCl<sub>3</sub> 분획으로 활성물질이 이행되었으며, Junci Medulla (57.94%)는 BuOH 분획으로 활성물질이 이행되었다 (Table 2). 한편, Trichosanthis Radix와 Magnoliae Flos는 MeOH 추출물에서만 저해활성을 나타내었다 (Table 2). MeOH 추출물에서 40% 이상의 저해활성을 나타낸 생약자원들에 대한 용매 이행성 실험 결과, 그 저해 활성이 현저하게 증가된 분획은 관찰되지 않은 것으로부터 활성성분이 단일 용매층으로 이행되지 않고 각각의 용매에 분산되었거나 각각 용해도가 다른 활성성분이 존재하고 있을 가능성이 시사되었다. 이후, THP-1 cell의 상태변화 및 용매에 대한 활성물질의 안정성 그리고 기타 실험에 영향을 줄 수 있는 요인들에 대한 보다 많은 실험들이 필요한 것으로 사료된다.

MCP-1과 그 수용체 CCR2는 순환기계 질환의 예방 및 치료제 개발에 새로운 target으로 주목받고 있으며, 일본의 Tjian과 미국의 LeukoSite and Parke-Davis, Roche Biosciences, Merck사 등에서 MCP-1 수용체인 CCR2 antagonist들이 보고되고<sup>14)</sup> 있으나 아직까지 이들의 *in vivo* 활성에 대해서는 보고되고 있지 않다. 특히 이들은 합성에 의한 화합물로서 아직까지 천연물로부터 MCP-1의 활성을 조절하는 물질은 보고되어지지 않고 있다. 따라서 천연자원으로부터 MCP-1과 그 수용체인 CCR2의 저해활성물질의 탐색연구는 MCP-1의 활성을 조절하는 새로운 형태의 lead 화합물을 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 현재 활성을 나타낸 식물자원 추출물에 대한 활성성분의 분리와 그 구조를 규명하는 연구를 진행하고 있다.

## 결 론

Monocyte는 초기동맥경화반에서 형성되는 foam cell의 전구세포이며 이 monocyte는 MCP-1과 그 수용체인 CCR2에 의해 혈관내벽으로 침투하게 된다.

Human monocyte인 THP-1 cell line을 이용하여 생약자원 127종의 MeOH 추출물의 MCP-1에 의한 chemotaxis 저해활성을 조사한 결과, 최종농도 25 µg/ml에서 40% 이상의 저해활성을 나타내는 생약자원 7종을 선별하였다. 이들을 CHCl<sub>3</sub>, BuOH, H<sub>2</sub>O로 순차적으로 분획하여 최종농도 25 µg/ml에서의 chemotaxis 저해활성을 측정 한 결과, Junci Medulla의 BuOH 분획 및 Clematidis Radix의 CHCl<sub>3</sub> 분획에서 50% 이상의 저해활성이 나타났다. 현재 활성성분의 분리와 그 구조를 규명하는 연구를 진행하고 있다.

## 인용문헌

- Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 791-804.
- Gerszten, R. E., Lim, Y. C., Ding, H. T., Snapp, K., Kansas, G., Dichek, D. A., Cabanas, C., Francisco, S. M., Gimbrone Jr, M. A., Rosenzweig, A. and Lusinskas, F. W. (1998) Adhesion of Monocytes to Vascular Cell Adhesion Molecule-1-Transduced Human Endothelial Cells : Implications for Atherogenesis. *Circ. Res.* **82**: 871-878.
- Power, C. A. and Proudfoot, A. E. (2001) The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 417-424.
- Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J. and Charo, I. F. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* **103**: 773-778.
- Baggiolini, M. and Loetscher, P. (2000) Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol. Today* **21**: 418-420.
- Takeya, M., Yoshimura, T., Leonard, E. J. and Takahashi, K. (1993) Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum. Pathol.* **5**: 534-539.
- Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D. and Wilcox, J. N. (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **4**: 1121-1127.
- Seino, Y., Ikeda, U., Sekiguchi, H., Morita, M., Konishi, K., Kasahara, T. and Shimada, K. (1995) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue. *Cytokine* **6**: 575-579.
- Taub, D. D. (1996) Chemokine-leukocyte interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**: 355-376.
- Harrington, J. R. (2000) The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells* **18**: 65-66.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P. and Rollins, B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low

- density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**: 275-281.
12. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. and Charo, I. F. (1998) Decreased lesion formation in *CCR2*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**: 894-897.
  13. Turner, S. J., Domin, J., Waterfield, M. D., Ward, S. G. and Westwick, J. (1998) The CC Chemokine Monocyte Chemoattractant Peptide-1 Activates both the Class I p85/p110 Phosphatidylinositol 3-kinase and the Class II PI3K-C2. *J. Bio. Chem.* **273**: 25987-25995.
  14. Horuk, R. and Ng, H. P. (2000) Chemokine receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* **20**: 155-168.

(2002년 8월 2일 접수)