

초두구로부터 분리한 비환식 트리테르페노이드계 화합물의 세포 접착인자 저해활성

김지수¹ · 노문철² · 김강성¹ · 김관희^{1*} · 임병용¹

¹부산대학교 약학과
²한국생명공학연구원

Inhibition of Cell Adhesion by Noncyclic Triterpenoids from *Alpinia katsumadai*. Ji-Soo Kim¹, Mun-Chual Rho², Koanhoi Kim^{1*}, Byung-Yong Rhim¹. ¹Department of Pharmacology, Pusan National University - School of Medicine, Busan, Korea, ²Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon, Korea

Abstract The present study purified two noncyclic triterpenoids, compound 1 and compound 2, that intervene interaction of ICAM-1 and LFA-1 from ethanol extracts of *Alpinia katsumadai*. The compound 1 and 2 inhibited adherence of sICAM-1 to THP-1 cells with an IC₅₀ of 7.59 µg/ml 및 6.98 µg/ml, respectively, without affecting viability of the cells. The compound 1 and 2 also inhibited interaction of CHO-ICAM-1 cells with THP-1 cells with an IC₅₀ 6.7 µg/ml 및 5.5 µg/ml, respectively. These findings suggest that the noncyclic triterpenoids from *Alpinia katsumadai* have inhibitory activities against cell adherent molecules. The present study proposes that noncyclic triterpenoids from *Alpinia katsumadai* can applied to therapeutic approaches to the diseases that are associated with adhesion of inflammatory cells.

Key words : *Alpinia katsumadai*, cell adhesion, triterpenoids, ICAM-1, THP-1

서 론

동맥경화는 혈중의 과다한 콜레스테롤 농도, 고혈압, 또는 독소에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 혈관벽 내피세포가 약해지고 손상이 나타나면, 그곳에 염증이 생겨서 혈중의 단핵구가 혈관벽으로 침투한다. 혈관벽에서는 단핵구가 대식세포로 분화하여 혈중에 유입된 콜레스테롤을 저장하는 foam cell 로 분화하여 혈관세포의 섬유화가 진행된다. 결과적으로 혈관이 좁아지는 비가역적 변성을 일으키게 된다 [15,18].

이러한 염증성 동맥 경화 과정에서 세포접착인자는 세포간의 연결을 통해 섬유화를 유지하는 데에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 기술 선진국에서는 동맥경화예방과 관련된 의약품 개발하기 위하여 임상적으로는 macrophage로의 분화

전단계인 monocyte와, 내피세포 사이에서 이들의 발현을 차단하는 저해제를 개발 중에 있다.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54)은 Ig-superfamily에 속하는 adhesion receptor로서, 혈관내피세포와 일부 lymphocyte, monocyte에서 저밀도로 발현된다 [3,22]. IL-1, TNF-α, IFN-γ와 같은 염증성 cytokine과 lipopolysaccharide (LPS)를 다양한 세포에 처리했을 때, multiple cell type에서 ICAM-1의 발현은 증가된다 [5]. Leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1; CD11a/CD18)은 ICAM-1의 ligand로서 resting leukocyte에서는 불활성이지만, T-cell receptor-mediated signaling이나 phorbol ester와 같은 다양한 자극인자에 의해 활성화 된다 [21].

백혈구가 염증부위에 침윤하기 위해서는 백혈구가 혈관내피세포 표면을 구르면서 혈관내피세포에 접착하는 과정을 통해야만 한다. ICAM-1은 특히 염

* Corresponding author

Phone: +82-51-240-7963, Fax: +82-51-244-1036

E-mail: koanhoi@pusan.ac.kr

증반응이 일어난 혈관내피세포에서 많이 발현되며 단핵구, 호중구 및 림프구와 같은 혈구세포가 혈관벽에 접착하고 침투력을 증가시키는 작용을 한다. 또한 혈소판과 혈관내피세포의 접착에도 ICAM-1이 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌다 [17].

물리적인 혈관 내경의 감소를 불러일으키는 혈관 협착은 앞서 언급한 바와 같이 과다한 혈중 콜레스테롤 농도, 고혈압, 또는 독소나 병원체로 인해 혈관벽의 내피세포(endothelial cell)에 미세한 손상이 나타나고, 만성염증화 된 이후에 나타난다. 혈관 협착의 실체는 내피세포에서 발현된 세포접착인자에 의해 혈중 단핵구가 혈관벽으로 침투하고, 혈관벽에서 대식세포로 분화되면서 혈관세포의 섬유화를 점진적으로 진행시켜 혈관이 좁아지는 비가역적 변성을 일으키는 것이다 [1]. 따라서 이러한 염증반응과 혈관협착과정에서 세포접착인자가 중요한 역할을 하고 있으며, 단핵구와 내피세포 사이에서 이들의 발현을 차단하는 저해제의 개발이 다양하게 시도되고 있다. 이러한 결과로 미루어 협착단계에 관여하는 ICAM-1이나 LFA-1을 저해한다면 염증반응으로 이어질 수 있는 혈관협착 관련 질환에 대한 잠재적인 치료가 가능할 것이다 [1,2].

실질적으로 ICAM-1이 염증반응의 진전에 중요하게 관여하고 있다는 사실은 ICAM-1의 monoclonal 항체와 여러 종류의 질환모델 동물실험을 통해서 밝혀지고 있다. ICAM-1이나, LFA-1에 직접적으로 대응하는 monoclonal antibody를 항체를 이용한 ICAM-1/LFA-1 결합 저해는 단순 세포간의 접착이외에도 세포 접착으로 인해 발생하는 자가면역 질환과 연관이 있는 것으로 알려졌다. 또, 면역응답반응에 있어서 T세포의 활성화에는 T세포 수용체를 통한 항원 특이적인 signal 이외에도 ICAM-1/LFA-1 등의 항원 비특이적인 signal이 반드시 필요한 것으로 밝혀졌다 [2,6,10,11,13].

본 연구는 동맥경화 발병의 초기 단계인 fatty streak의 형성에 중요한 역할을 하는 ICAM-1과 LFA-1 매개성 세포접착 저해활성을 확인하는 것을 주목표로 한다. 세포접착 저해활성물질을 탐색하기 위하여 천연 자원에서 탐색한 초두구 (*Alpinia katsumadai*)로부터 세포접착 저해활성을 보이는 물질이 분리정제 되었다. 정제된 화합물들을 대상으로 soluble type의 sICAM-1과 LFA-1간의 세포접착의 저해

와 세포의 epitope로 존재하는 형태의 CHO-ICAM-1과 LFA-1 간의 세포접착 저해를 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

RPMI 1640, FBS (fetal bovine serum), PBS 그리고 kanamycin은 GIBCO BRL로부터 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)와 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM)는 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하였다. 실험에 사용된 초두구는 대전소재 건재상으로부터 구입하였으며, 물로 깨끗이 세척한 후 그늘에서 건조한 후, 분쇄기로 분말화 시켜 사용하였다.

활성물질의 분리정제

초두구 열매 (100 g)는 상온에서 7일간 에틸알콜로 추출되었다. 에틸알콜 추출물은 감압농축한 후, 증류수에 현탁시켜 클로로포름으로 용매 분획하였다. 클로로포름층 (7.35 g)은 클로로포름:에탄올 (100:0, 90:1, 70:1, 50:1, 30:1, 15:1, 5:1, 1:1, 각 2 L)로 구성된 단계농도 구배(step gradient) 용매 시스템을 이용하여 실리카겔(SiO₂) 컬럼 크로마토그래피 (230-400 mesh, 1 kg, Merck)를 행하였으며, 총 8개 분획으로 나누었다. 활성을 평가하여 이중 활성이 있는 분획 (CHCl₃/EtOH= 70:1 fractions, 440 mg)을 감압 농축시켰다. 그리고 활성물질들을 분리정제하기 위하여 에탄올과 물 (70:1, 80:1, 90:1, 100:0, each 2L)을 이용하여 역상컬럼 크로마토그래피를 (100 g, YMC-Gel RP-18, 70-230 mesh) 실시하였다. 이 중 ICAM-1과 LFA-1 매개성 세포접착 저해활성이 높은 분획들을 모아 최종적으로 용출 용매로서 90% 에탄올을 6ml/min로 흘려주면서, 고속액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography; HPLC, YMC Jsphere ODS H-80 (250×20 mm))를 실시하여 화합물 1, 2의 순수화합물들을 얻었다. 활성물질의 검출은 UV 210 nm에서 행하였으며, ICAM-1과 LFA-1 매개성 세포접착 저해활성 물질은 25분 및 40분에 용출되었다.

세포 배양

인간 급성 단핵구성 백혈병 세포인 THP-1 세포는 10%(v/v)의 fetal bovine serum(FBS) 와 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin sulfate가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 세포들은 5%의 이산화탄소가 첨가된 섭씨 37°C의 표준 배양기에서 배양되었다.

sICAM-1과 THP-1세포와의 결합저해 활성

Recombinant sICAM-1 (R&D Systems, Abingdon, UK)을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in PBS)로 희석한 후, 96-well plate에 100 μl 씩 넣고 4°C에서 12시간 반응 시켰다. PBS로 1회 washing하고, 10 mg/ml BSA를 100 μl 씩 넣고 상온에서 1~2시간 blocking 한다. THP-1 cells (1×10^7 cells/ml)는 형광을 띠게 하기 위하여 BCECF-AM (5 μM) 첨가 후 30~60분간 37°C에서 반응 시킨다. THP-1 cells을 PBS로 washing하고 LFA-1/2 antibody (500 ng/ml)처리하여 37°C에서 10~20분간 반응시킨 후 THP-1 cells와 시료를 sICAM-1이 코팅되어있는 plate의 각 well에 100 μl 씩 넣고 37°C에서 30~60분간 반응시킨다. 반응 후 binding 하지 않은 THP-1 cells을 제거하고, PBS로 3회 washing 한다. 세포접착 상태를 현미경하에서 사진을 촬영하고, PBS (1% Triton X-100)로 cell을 가용화 시킨 뒤 형광 (ex. 485, em. 592)을 측정하였다.

세포간 접촉 저해활성측정

CHO-ICAM-1 과 CHO-K1 cells 는 각각 1×10^4 cells/200 ml 및 1×10^5 cells/ 200 ml 을 seeding 후 96-well plate에서 3일간 배양한다. THP-1 cell은 BCECF-AM(5 mM) 첨가 후 30-60분간 섭씨 37도에서 반응시켜 형광 labeling 한 뒤 RPMI 1640 배지로 1회 washing 한다. 1×10^6 cells/ml 로 조절된 THP-1 cells을 CHO-ICAM-1 또는 CHO-K1 cell 이 완전히 자란 상태의 96well plate 에 100 μl 씩 처리한다. 이 96-well plate에 LFA-1의 활성을 증가시키는 LFA-1/2 antibody(500ng/ml) 및 시료를 5 ml씩 처리한 후 30분간 37도에서 반응시킨다. 반응후 binding 하지 않은 THP-1 cell 을 제거하기 위하여 배지를 150 μl 넣고 sealing 한 후 96 well plate를 뒤집어 30분간 상온에서 방치한다. 배지는 제거하고 PBS로 3회 washing 한 뒤 PBS(1% Triton X-100)로 Cell 을 가용화 시킨 뒤

형광 (ex. 485, em. 592)을 측정한다.

세포독성 측정

활성물질의 세포독성은 MTT 시약을 사용하여 측정하였다. THP-1 세포와 순차적으로 희석시킨 시험 sample을 96-well round bottom plate 에 넣었고 48시간 배양한 후, MTT (5 mg/ml)를 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. Plate는 1,700 rpm에서 centrifugation한 후 상층액을 제거하고, 100 μl dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣고 세포를 녹였다. 흡광도는 microplate reader (VERSAmax)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다 (reference 650 nm).

결 과

활성물질의 분리정제 및 구조결정

ICAM-1과 LFA-1의 결합을 저해하는 물질을 찾고자 천연자원에 대한 screening결과, 초두구 에탄올 추출물이 강한 저해활성을 보였다. 이에 초두구 에탄올 추출물로부터 활성물질을 얻었다. 활성물질의 분리정제 및 구조결정에 대한 과정은 선행된 실험결과 화합물들이 있었다.

초두구 에탄올 추출물은 활성물질을 분리 정제하기 위하여, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물을 이용하여 각각의 분획물로 분리하였으며, SiO₂와 ODS gel을 이용한 컬럼 크로마토그래피 및 고속액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography; HPLC)를 실시하여 화합물 1과 2의 순수화합물들을 얻었다(Fig. 1).

분리된 화합물의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성

초두구의 에탄올 추출물은 50 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 sICAM-1과 THP-1세포와의 접촉을 각각 68%, 54% 저해하였다. 그 분획물에 클로로포름 추출물은 50 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 sICAM-1과 THP-1세포와의 접촉을 약 85%, 75% 이상 저해하였다(Fig. 2).

우수한 저해활성을 보이는 초두구 클로로포름 추출물은 다양한 분리정제 방법을 이용하여 비환식 트리테르페노이드계 화합물인 1과 2를 분리하였다. 화합물들의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성을 측정한 결과, IC₅₀ 값이 각각 7.59 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (화합물

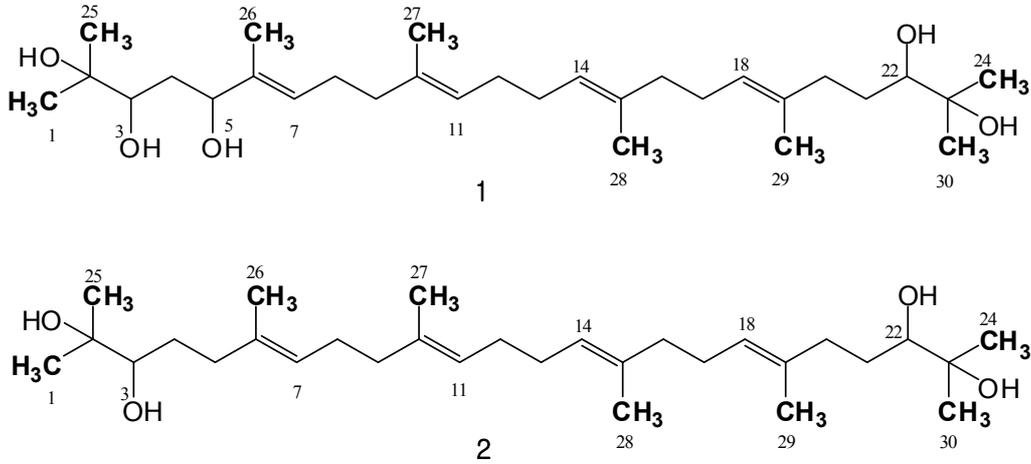


Fig. 1. 화합물 1과 2의 구조.

화합물 1: 2,3,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetraene, 화합물 2: 2,3,5,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetraene

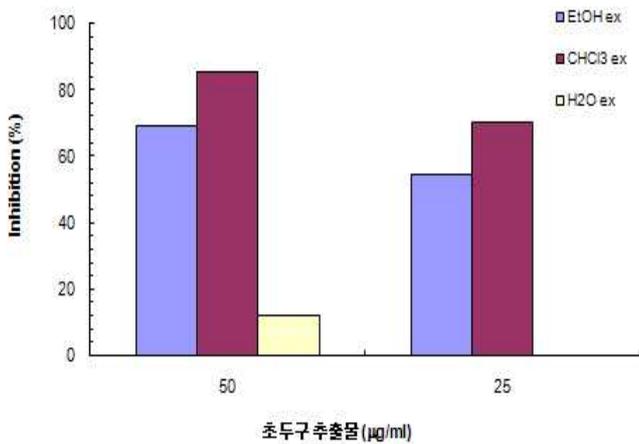


Fig. 2. 초두구 추출물들의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성.

1) 및 6.98 µg/ml (화합물 2)로 측정되었다 (Fig. 3). 실험에 사용된 농도에서는 세포독성을 보이지 않았다.

분리된 화합물의 세포간 접착 저해활성 측정

초두구 클로로포름 추출물로부터 분리정제된 비환식 트리테르페노이드계 화합물들의 CHO-ICAM-1 과 THP-1 세포간 결합저해 활성을 측정결과, IC₅₀ 값이 각각 6.7 µg/ml (화합물 1) 및 5.5 µg/ml (화합물 2)로 측정되었다 (Fig. 5, 6).

고찰

LFA-1/2 antibody로 자극시킨 THP-1 세포를 이용

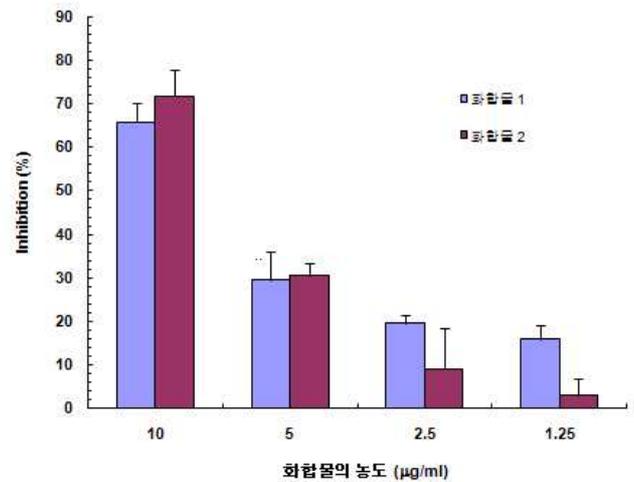


Fig. 3. 화합물 1 과 2의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성.

하여 초두구 EtOH 추출물에 대하여 우선 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성을 조사하였고, 초두구의 에탄올 추출물은 sICAM-1과 THP-1세포와의 접착을 저해하는 것으로 나타났고, 세포접착 저해활성이 우수한 분획물인 클로로포름 추출물 역시 sICAM-1과 THP-1세포와의 접착을 저해하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2). 본 실험을 통하여 초두구에서 추출된 물질이 세포접착을 방해한다는 것을 알 수 있었으며 클로로포름으로 추출된 추출물이 가장 활성이 좋은 것으로 나타났다. 추가적인 정제과정을 통하여 순수 분리된 화합물 1, 2를 순차적으로 희석한 농도에서 실험을 수행한 결과 형광 활성도가 낮아져 농도

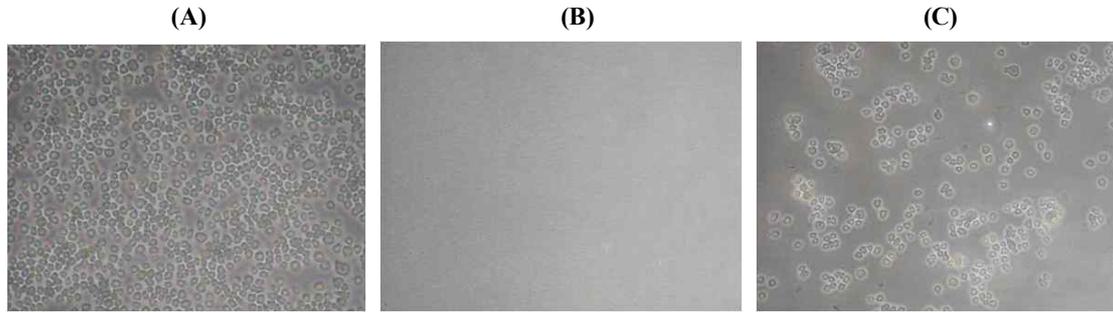


Fig. 4. 화합물 1의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성. Positive control 및 negative control 에는 DMSO (0.25%)를 처리하였고, 화합물 1은 10 mg/ml을 처리하였다. 형광측정 전에 광학 현미경으로 관찰하였다 (Nikon T-100, x400). (A): positive control, (B): negative control, (C): 화합물 1 첨가.

의존적인 저해활성이 나타남을 입증하였다(Fig. 3).

LFA-1 은 실험에 사용된 THP-1 세포 이외에도 HL-60 등의 세포에 있는 epitope 이다. 그리고 LFA-1 은 ICAM-1과 결합을 하게 된다. 실험에서 사용된 sICAM-1은 세포에 붙어있지 않은 독립된 epitope로써 세포-세포간의 실험과는 다르게 우선적으로 ICAM-1을 세포로부터 나타나는 여러 가지 인자를 배제한 상태에서 실험적으로 적용하여 보았고, 실제적으로 세포간의 접촉현상을 확인하기 쉽고 그에 따른 정제이전 추출물의 세포접착인자 저해에 관한 활성도를 확인하는데 좋은 방법이다.

이어서 정제된 화합물 1, 2에 대하여 실제의 세포 (CHO cell)에 존재하는 ICAM-1(CHO-ICAM-1)과 THP-1 cell에서 발현되는 LFA-1간의 세포 접착 저해 활성을 조사하였다. THP-1 cell에 형광물질을 발현할 수 있도록 조작하여 CHO cell과 접촉시켰다. 이에 대한 결과역시 화합물 1, 2 의 농도에 따라 저해활성을 나타내어 형광 활성도가 낮아져, 농도 의존적인 저해활성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 5).

실제로 세포접착인자 저해가 나타나는지는 현미

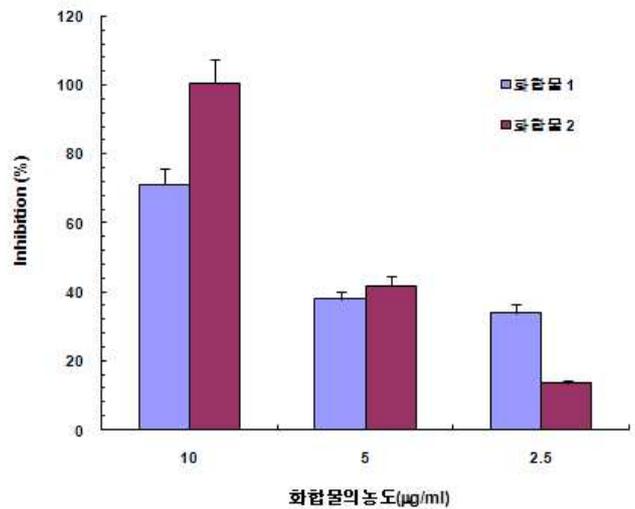


Fig. 5. 화합물 1, 2의 CHO-ICAM-1 과 THP-1 세포간 결합저해활성.

경 사진을 참고할 수 있다(Fig. 4, 6). 각 그림의 (A), (B)은 (+) control과 (-) control 이고, (C)는 화합물을 처리한 상황을 나타낸 것이다. 그림 4에서는 sICAM-1과 THP-1 cell 간의 활성을 알아본 것이기

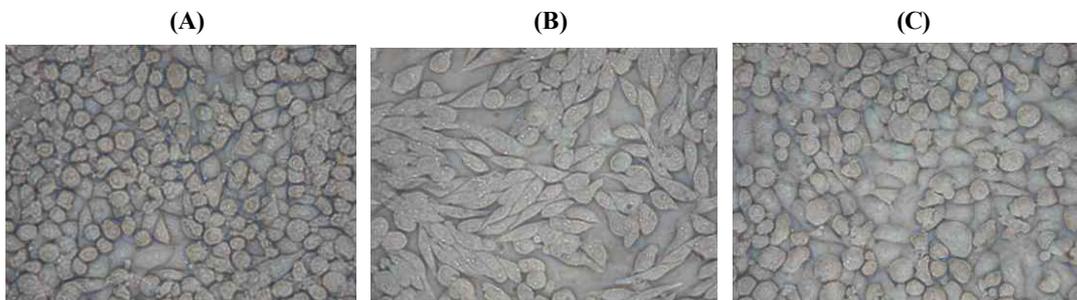


Fig. 6. 화합물 1의 CHO-ICAM-1 과 THP-1 세포간 결합저해활성. Positive control 및 negative control 에는 DMSO (0.25%)를 처리하였고, 화합물 1은 10 mg/ml을 처리하였다. 형광측정 전에 광학 현미경으로 관찰하였다 (Nikon T-100, x400). (A): positive control, (B): negative control, (C): 화합물 1 첨가.

때문에 - control에 다른 세포는 없다. 하지만 Fig. 6에는 CHO cell에서 발현된 ICAM-1 과 THP-1 cell에서 발현된 LFA-1 간의 세포접착을 알아본 것이었기 때문에 (-) control에도 긴 방추형의 CHO cell 이 자리잡고 있다. 각 그림의 좌상부에는 다수의 원형 세포들이 접착되어 있는데, 이는 THP-1 cell 이다. 그리고 각 그림의 (C)에는 화합물의 세포접착인자 저해활성에 따라 접착되지 않았다.

현재 다국적 제약회사에서의 ICAM-1이나 LFA-1의 활성 저해제 개발은 그들의 중화항체가 주로 대상이었으며 천연물로부터는 수종의 저해제만이 보고되어 있는 실정이다. Abbott사에서 합성품으로서 ICAM-1발현 저해물질을 보고하였으며 [19] ICAM-1의 epitope를 모체로 한 합성물질인 LFA-1의 antagonist가 Novartis사와 Roche사 로부터 개발 되었으나 [16] 아직 질환동물모델을 이용한 *in vivo*활성에 대한 보고는 없다. 한편, 천연물로부터는 seco-limonoids계 물질 (*Trichilia rubra*, IC₅₀; 10~25 nM) cucurbitacins (*Conococca scoparioides*, IC₅₀; 0.18~1.36 mM), ad-xanthromycins (*Streptomyces* sp. Na-148, IC₅₀; 1.5~6.5 mM)등이 ICAM-1/LFA-1 매개성 세포접착을 저해하는 물질로 보고되었다 [12].

이 연구는 동맥경화 발생의 초기 단계인 fatty streak 의 형성에 중요한 역할을 하고 있는 ICAM-1과 LFA-1이라는 세포접착인자간의 결합을 target으로 하므로, 지금까지의 동맥경화와 관련된 치료제들의 작용기작과는 다른 새로운 기작의 의약품의 개발이 기대된다. 임상적으로는 이러한 기전이 발병기전에 포함되어있는 것으로 알려진 류마티스 관절염, 천식, 건선, 아토피, 골다공증, 전신 홍반성 루푸스, 크론병, 혈관협착, 암전이, 이식거부등과 같은 염증관련 질환에 유효할 것으로 사료되며 [7,8,14], 아울러 ICAM-1을 이용하여 감염되는 것으로 알려진 Rhinovirus 와 HIV-1 등의 감염성 질환에 대한 예방 및 치료차원의 신약 개발에도 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다 [4,7,20]

요 약

1. 천연자원으로부터 ICAM-1과 LFA-1 매개성 세포접착 저해제를 탐색한 결과, 초두구 에탄올 추출물은 이에 대한 저해 활성을 나타내었다.

2. 초두구로부터 세포 접착 인자 활성화에 관한 물질을 분리 정제하기 위하여, 각종 용매추출과 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 얻은 화합물 1과 2로 세포접착인자 저해활성을 확인하였다.

3. 분리된 화합물 1 과 2의 sICAM-1 과 THP-1 세포와의 결합저해활성 측정 결과, IC₅₀ 값은 각각 7.59 µg/ml 및 6.98 µg/ml로 측정되었다. 실험에 사용된 농도에서는 세포독성을 보이지 않았다.

4. 분리된 화합물 1 과 2의 CHO-ICAM-1 과 THP-1 세포간의 결합저해활성을 측정한 결과, IC₅₀ 값이 각각 6.7 µg/ml 및 5.5 µg/ml로 측정되었다.

5. 이상의 실험 결과로 미루어 보아, 초두구로부터 분리한 비환식 트리테르페노이드계 화합물들은 세포 접착인자에 대한 저해활성을 가지고 있다고 볼 수 있으며 이 기전을 통하여 생길 수 있는 질환에 대한 치료제 개발에 유효할 것이다. 특히 동맥경화에 대해서는 새로운 기전으로 접근하고 있으므로 기존의 치료제들의 작용기작과는 다른 약품의 개발이 기대된다. 또한 ICAM-1은 염증반응 및 암의 전이에도 관련되어 있으므로, 동맥경화 관련 질환이외에도 다양한 질환에 대한 의약품으로의 응용도 기대된다.

참 고 문 헌

1. Christopher K. G. and Joseph L. W. 2001. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**, 503-516.
2. Cornejo C. J., Winn R. K. and Harlan J. M. 1997. Anti-adhesion therapy, *Adv. pharmacol.* **39**, 99-141.
3. Dustin M. L. and Springer T. A. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1, *Nature* **341**, 619-624.
4. Giguere J. F. and Tremblay M. J. 2004. Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1, *J. Virology* **78**, 12062-12065.
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. 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.
7. Macchioni P., Boiardi L., Meliconi R., Salvarani C., Grazia Ugucioni M., Rossi F., Pulsatelli L., and Facchini A. 1994. Elevated soluble intercellular adhesion molecule 1 in the serum of patients with polymyalgia

- rheumatica: influence of steroid treatment, *J. Rheumatol.* **21**(10), 1860-1864.
8. Mason J. C., Kapahi P., and Haskard D. O. 1993. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1, *Arthritis Rheum.* **36**, 519-527.
 9. Musza L. L., Speight P., McElhiney S., Barrow C. J., Gillum A. M., Cooper R., and Killar L. M. 1994. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*, *J. Nat. Prod.* **57**, 1498-1502.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Oppenheimer-Marks N. and Lipsky P. E. 1996. Adhesion molecules as targets for the treatment of autoimmune diseases, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **79**, 203- 210.
 13. 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**, 75-78.
 14. Poston R. N., Haskard D. O., Coucher J. R., Gall N. P., and Johnson-Tidey R. R. 1992. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques, *Am. J. Pathol.* **140**, 665-673.
 15. Rothlein R., Dustin M. L., Marlin S. D., and Springer T. A. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1, *J. Immunol.* **137**, 1270-1274.
 16. 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.
 17. Ross R. 1995. Cell biology of atherosclerosis, *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 791-804.
 18. Springer T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system, *Nature* **346**, 425 -434.
 19. Stewart A. O., Bhatia P. A., McCarty C. M., Patel M. V., Staeger M. A., Arendsen D. L., Gunawardana I. W., Melcher L. M., Zhu G. D., Boyd S. A., Fry D. G., Cool B. L., Kifle L., Lartey K., Marsh K. C., Kempf-Grote A. J., Kilgannon P., Wisdom W., Meyer J., Gallatin W. M., and Okasinski G. F. 2001. Discovery of inhibitors of cell adhesion molecule expression in human endothelial cells. 1. Selective inhibition of ICAM-1 and E-selectin expression *J. Med. Chem.* **44**, 988-1002.
 20. Tomassini J. E., Graham D., DeWitt C. M., Lineberger D. W., Rodkey J. A., and Colonna R. J. 1989. cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **86**, 4907-4911.
 21. Thomas J. and DeGraba M. D. 1997. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque, *Neurology* **49**, 15-19.
 22. Welzenbach K., Hommel U., and Weitz-Schmidt G. 2002. Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the I-like domain of lymphocyte function-associated antigen-1. Molecular insights into integrin inhibition, *J. Biol. Chem.* **277**, 10590-10598.