

생약의 류코트리엔 B₄ 수용체결합 저해작용 검색

이화진, 류재하*

숙명여자대학교 약학대학

Screening of Leukotriene B₄ Receptor Antagonist Activity from the Herbal Drugs

Hwa-Jin Lee and Jae-Ha Ryu*

College of Pharmacy, Chungpa-Dong, Yongsan-Gu, Seoul 140-742, Korea

Abstract – Leukotriene B₄ (LTB₄) is a pro-inflammatory mediator synthesized in myeloid cells from arachidonic acid. Elevated levels of LTB₄ have been found in a number of inflammatory diseases and levels are related to disease activity in some of these. Because LTB₄ interacts with cells through specific cell surface receptors, LTB₄ receptor blockade is the most specific approach to reduce the pathogenic role of LTB₄. In order to find LTB₄ receptor antagonist from plants, we screened the LTB₄ receptor antagonistic activity of the methanol extract and solvent fractions of herbal drugs. The ability of samples to inhibit specific binding of [³H]-LTB₄ to human peripheral neutrophils was used as assay to evaluate the antagonistic activity of plant materials. Among the tested methanol extracts of herbal drugs, Mori Radicis Cortex, Perillae Semen, Armeniacae Semen and Sophorae subprostratae Radix showed potent inhibitory activity above 70% at the concentration of 100 µg/ml. The inhibitory activities of LTB₄ binding to human neutrophils were evaluated for several solvent fractions at three different concentrations. Especially, hexane soluble fractions of Anemarrhenae Rhizoma and Embeliae Radix, and ethyl acetate soluble fractions of Aristolochiae Fructus, Magnoliae Cortex and Zingiberis Rhizoma crudus showed moderate activity at 25 µg/ml. These fractions were promising candidates for the study of the activity-guided chromatographic purification of active compounds. Silica gel column chromatography of hexane soluble fractions of Anemarrhenae Rhizoma and Embeliae Radix gave very active sub-fractions, AA-4 and ES-4, and their inhibition activities of LTB₄ binding to human neutrophil at 30 µg/ml were 78% and 62%, respectively. From these results we could anticipate new LTB₄ receptor antagonist from herbal drugs, and the block of LTB₄ effects may provide beneficial in neutrophil mediated diseases such as inflammation and bronchial asthma.

Key words – leukotriene B₄, receptor, antagonist, screening, inflammation, asthma

Leukotriene류는 백혈구(leukocyte)로부터 분리된 생리활성을 가진 지방산유도체들로서 3개의 공액이중 결합을 가진 화합물이다. Leukotriene B₄ (LTB₄; 5S, 12R-dihydroxy-6,14-cis-8,10-trans-eicosatetraenoic acid)는 호중구로부터 처음 분리 동정되었으며,¹⁾ 그 후 화학적으로 합성되어 호중구를 활성화하는 역할이 확인되었다.²⁾ LTB₄는 주로 활성화된 호중구나 대식세포에 의해 합성되며, 면역활성화와 관련된 다양한 세포

들의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. LTB₄는 arachidonic acid의 대표적인 두 가지 대사 경로 중의 하나인 5-lipoxygenase (5-LO)에 의해 5-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (5-HPETE)와 LTA₄를 경유하여 생성된다. LTB₄는 선택적인 세포표면의 수용체에 결합하여 활성을 나타내는데, 최근 LTB₄ 수용체의 유전자가 클론되었으며³⁾ 상호전환이 가능한 고친화 (kd 0.1-5 nM) 및 저친화상태 (k_d 15-500 nM)로 존재한다. LTB₄의 결합으로 세포가 활성화되면 세포내의 Ca 이온의 농도와 inositol-triph-

*교신저자 : Fax : 02-714-0745

osphate의 농도가 증가하고 adenylyl-cyclase의 활성이 감소된다. 또한 LTB₄는 호중구에 대한 주화성과 탈과립을 촉진시키며, 호중구의 라이소솜 효소의 유리를 자극하고 superoxide 라디칼의 생성을 증가시키며, interleukin-8과 LTB₄의 생성을 증가시켜 염증을 심화시키는 역할을 한다. 이와 같이 LTB₄는 급성염증 상태에서 혈관투과성을 항진시켜 백혈구를 혈관 밖으로 유주시켜 식균작용을 통해 외부로부터 침입한 병원균을 무력화하고 면역계를 활성화하는 역할을 하는 반면, 그 기능이 과도하게 항진된 경우는 낭포성섬유증,⁴⁾ 성인호흡곤란증후군,⁵⁾ 기관지천식,⁶⁾ 건선,⁷⁾ 통풍,⁸⁾ 류마치스성 관절염,⁹⁾ 염증성장질환¹⁰⁾ 등과 같은 다양한 염증성 질환의 원인이 되기도 한다. 치료 목적으로 LTB₄의 활성을 감소시키는 방법으로는 LTB₄의 합성효소인 5-LO 유전자의 조작, arachidonic acid의 공급감소, 5-LO의 효소활성의 저해 등이 가능하나 LTB₄ 수용체에 대한 저해제의 개발이 LTB₄의 기능을 억제하는 가장 선택적이고 효율적인 수단으로 이용되고 있다.

본 논문에서는 LTB₄ 수용체 저해활성을 가진 물질을 천식 또는 염증치료를 위한 의약품으로 개발하려는 노력의 일환으로, 각종 생약재료의 메탄올추출물 및 각종 용매분획의 LTB₄ 수용체결합 저해활성을 검색한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 식물재료는 경동시장의 한약건재상에서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기 - [³H]-LTB₄는 Dupont NEN사에서, Ficoll-Paque, Dextran T-500은 Pharmacia사에서, Hank's balanced salt solution (HBSS)은 Gibco사에서 구입하여 사용하였다. 식물재료의 추출용 용매는 공업용을 증류하여 사용하였고, 용매분획의 제조 및 컬럼크로마토그래피를 위해서는 시약용을 구매하여 사용하였으며, 컬럼용 실리카겔은 Merck사의 Kieselgel 60 (230-400 mesh)를 사용하였다. Cell harvester는 Brandel사의 M-12 Model을, 원심분기기는 Sorvall사의 RC2-B을, GF-B filter는 Brandel사의 제품을, liquid scintillation counter는 Beckman사의 Model LS 6500을 각각 사용하였다.

추출 및 분획 - 식물재료는 건조한 상태에서 메탄올로 3회 냉침하여 추출하고, 추출물을 감압 하에서 농축한 후 물에 분산하고 *n*-hexane으로 추출하여 *n*-

hexane 가용분획을 얻고, 물 층을 다시 EtOAc로 추출하여 EtOAc 가용분획 및 최종 물분획으로 나누어 각각에 대한 LTB₄ 수용체에 대한 저해작용을 검정하였다.

혈액으로 부터 호중구의 분리 - 사람의 혈액은 대한적십자사 혈액원에서 실험 당일 오전에 채혈한 신선한 혈액을 구매하여 알려진 방법에 준하여 호중구를 분리하였다.^{11,12)} 우선 100 ml의 혈액을 250 ml의 원심분리관에 취한 후 Ca²⁺, Mg²⁺를 함유하지 않은 HBSS 배지를 가해 200 ml로 하고 혼합하여 혈액을 희석하였다. 50 ml 원심분리관에서 희석혈액과 Ficoll/Paque가 27:10 (v/v)의 비율이 되도록 혼합을 Ficoll-Paque에 조심스럽게 상층으로 가하고 상온에서 500 g로 30분간 원심분리하였다. 혈장을 함유한 HBSS층, 중간층 및 단핵구층까지 버리고, 다시 HBSS 배지를 각 원심분리관의 15 ml 위치까지 가하였다. 계속하여 동일 부피의 3% dextran (0.9% NaCl용액)을 가한 후 조심하여 섞고, 1시간 동안 상온에서 방치한 후 침전한 적혈구로부터 조심스럽게 상등액을 취하였다. 상등액을 합하여 4°C에서 500 g로 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전에 일부 유입된 적혈구를 용혈 제거하기 위해 증류수를 가해 20초 동안 방치한 후 동일 부피의 1.8% NaCl로 등장액으로 하고 4°C에서 500 g로 5분간 원심분리한 후 침전으로 얻어진 호중구를 HBSS 배지에 분산하였다. Hemocytometer를 이용하여 호중구의 농도를 3×10⁷ cells/ml로 조정하고, 분리된 호중구는 1시간 이내에 LTB₄ 수용체 결합저해활성 검정을 위한 실험에 사용하였다.

호중구를 이용한 LTB₄ 수용체 결합저해 활성의 측정¹³⁻¹⁵⁾

시료용액 50 μl를 polypropylene 시험관에 취하여 얼음물에서 0°C로 유지하고 50 μl의 [³H]-LTB₄ (200 Ci/mmol, 최종농도 0.5 nM)용액을 가하였다. 이때 시료의 용매는 1 mM Ca²⁺와 5 mM Mg²⁺를 함유한 HBSS 배지였으며 호중구는 시험관 당 3×10⁶ 세포를 100 μl에 분산하여 사용하였다. 0°C의 얼음물에서 정확히 45분간 유지한 후 0°C의 Tris 완충액 (pH 7.4) 50 μl를 가하여 반응을 종결하였다. Cell harvester를 이용하여 GF/B 필터로 여과하고 차가운 Tris 완충액으로 30초간 세척하였다. 필터를 12시간 공기 중에서 건조하고 Liquid scintillation counter에서 방사능을 측정함으로써 수용체에 결합된 LTB₄를 정량하였다.¹⁶⁾

지모와 호미초 용매분획의 실리카겔 컬럼크로마토그래피

지모의 hexane 가용분획 (640 mg)과 호미초의 hexane 가용분획 (500 mg)에 대하여 각각, 실리카겔 30 g을 이용하여 hexane/EtOAc (100:1 → 75:1 → 50:1 → 20:1 → 10:1 → 1:1) 를 이동상으로 극성을 증가시키면서 컬럼크로마토그래피하여 4개의 소분획으로 나누었다.

결과 및 고찰

천연식물 재료로부터 LTB_4 수용체 결합저해작용을 가진 물질을 검색하기 위해 한방에서 항염증, 천식 등의 목적으로 사용되어 온 21종의 식물재료를 실험대상으로 선정하였다. 식물 재료로부터 제조한 시료의 LTB_4 수용체 저해작용에 관한 실험에 사용한 수용체로는 사람 혈액으로부터 분리한 호중구를 사용하였으며 이를 분리하기 위하여 Ficoll-Paque를 이용한 기울기 원심분리법과 dextran 침전법을 활용하였다. 호중구의 표면에는 LTB_4 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있어 LTB_4 수용체에 대한 연구에 많이 활용되고 있다. 호중구의 표면에 존재하는 수용체에 대한 리간드로는 $[^3H]-LTB_4$ 를 사용하였으며 총결합 (total binding; TB)은 동위원소가 표지된 $[^3H]-LTB_4$ (0.5 nM)만을 리간드로 사용한 경우의 cpm 값으로 하고 (시료대신 완충액 처리의 경우 TB_{cont} , 시료처리의 경우 TB_{samp}), 비특이적 결합 (non-specific binding; NB)은 동위원소가 표지되지 않은 LTB_4 리간드를 동위원소 표지된 $[^3H]-LTB_4$ 의 1000배에 해당하는 농도 (0.5 μM)로 처리하였을 때의 cpm으로 하였다. 따라서 특이적 결합 (specific binding; SB)은 총결합과 비특이적 결합의 차이(시료대신 완충액 처리의 경우: $TB_{cont} - NB = SB_{cont}$, 또는 시료처리의 경우: $TB_{samp} - NB = SB_{samp}$)로 구하였다. 수용체에 대한 시료의 LTB_4 리간드 결합 저해정도는 저해율 (%)로 표현하였으며 이 값은 다음의 식으로부터 구하였다. 즉,

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times \left[\frac{SB_{cont} - SB_{samp}}{SB_{cont}} \right]$$

식물재료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 물로 희석하여 원하는 농도로 제조하였고, DMSO의 LTB_4 결합실험계 내에서의 최종농도는 0.2% 이하로 조절하였으며 이 농도 이하에서는 LTB_4 의 호중구의 수용체 결합에 영향이 없음을 예비실험에서 확인하였다.

Table I에는 각종 식물의 메탄올 추출물 및 용매분획에 대한 LTB_4 수용체결합 저해작용에 관한 결과를 나타내었다. 일차로 각 식물재료의 메탄올 냉침 추출물에 대하여 100 $\mu g/ml$ 농도에서 활성을 검정한 후, 지속적인 활성검정의 필요가 있는 재료에 대해서는 hexane 가용분획, EtOAc 가용분획 및 최종 수층에 대한 활성을 검정하였다. 메탄올 추출물 상태에서는 상백피, 소자, 행인 및 산두근이 70% 이상의 강한 활성을 나타내었으며, 메탄올 추출물에 대한 활성정도가 10% 이하로 매우 미약한 도인, 갈근, 내복자, 복분자 및 백부근은 용매분획에 대한 활성검정 실험에서 제외하였다. 지모, 호미초, 산두근, 후박, 소자 등은 활성이 hexane 가용분획으로 이행되었으며, 마두령, 애엽, 두층, 행인, 목향, 상백피 등은 EtOAc 가용분획으로 활성이 이행되었다. 특히 100 $\mu g/ml$ 농도에서 지모의 hexane 가용분획과 EtOAc 가용분획, 마두령의 EtOAc 가용분획, 마황의 hexane 가용분획 및 호미초의 hexane 가용분획 등이 80% 이상의 강력한 호중구에 대한 LTB_4 결합저해 활성을 나타내었다. 대부분의 재료식물의 경우 최종 수층의 활성은 매우 약하게 관찰되었으나, 마황과 상백피는 특이하게 물 층의 LTB_4 결합 저해활성이 각각 65%와 89%로 매우 높게 확인되었다.

Table II에서는 활성이 비교적 우수하고 분획의 TLC 양상이 간단하여 활성 성분연구의 가능성이 있는 것으로 판단된 용매분획들에 대하여 세 가지의 농도 (100, 50, 25 $\mu g/ml$)로 처리한 결과이다. 이들 중 활성의 용량의존성이 우수하고 25 $\mu g/ml$ 농도에서도 여전히 양호한 활성을 나타내는 지모의 hexane 가용분획, 마두령의 EtOAc 가용분획, 호미초의 hexane 및 EtOAc 가용분획, 생강의 EtOAc 가용분획 등에 대해서는 지속적인 활성을 추적하는 연구를 통해 활성성분의 구조를 확인할 수 있을 것으로 기대되었다. 또한 LTB_4 수용체에 대한 결합 저해활성 뿐 아니라 5-LO에 대한 저해활성 가능성까지 고려하고 기존에 알려진 이들 저해제들의 구조를 참조할 때,^{17,18)} hexane 가용분획으로 활성이 집중되는 지모 및 호미초를 활성성분의 연구대상으로 선정하였다. 그래서 지모와 호미초의 hexane 가용분획을 실리카겔을 고정상으로 컬럼크로마토그래피하여 각각 4개의 소분획으로 나누고, 30 $\mu g/ml$ 농도에서 활성을 검정한 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 두 식물의 컬럼분획 모두 극성이 강한 4번째의 분획인 AA-4와 ES-4에서 각각 78%와 62%의 강한 LTB_4 결합 저해활성이 관찰

Table I. Inhibition of receptor binding of LTB₄ to human neutrophils by solvent fractions of herbal medicines

Drug Name	Latin Name	Inhibition(%)*			
		MeOH	Hexane	EtOAc	Water
Anemarrhenae Rhizoma(지모)	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	32	80	58	<10
Aristolochiae Fructus(마두령)	<i>Aristolochia contorta</i>	61	51	78	20
Armeniaca Semen(행인)	<i>Prunus armeniaca</i>	71	43	54	<10
Artemisiae asiaticae Herba(애엽)	<i>Artemisia asiatica</i>	66	65	76	<10
Asteris Radix(자원)	<i>Aster tataricus</i>	22	-	-	-
Embeliae Radix(호미초)	<i>Embelia parviflora</i>	44	62	33	26
Ephedrae Herba(마황)	<i>Ephedra sinica</i>	29	83	69	65
Eriobotryae Folium(비파엽)	<i>Eriobotrya japonica</i>	52	43	42	18
Eucommiae Cortex(두충)	<i>Eucommia ulmoides</i>	67	42	55	<10
Magnoliae Cortex(후박)	<i>Magnolia officinalis</i>	55	63	25	52
Mori Radicis Cortex(상백피)	<i>Morus alba</i>	102	11	62	89
Perillae Semen(소자)	<i>Perilla sikokiana</i>	73	74	56	<10
Persicae Semen(도인)	<i>Prunus persica</i>	<10	-	-	-
Puerariae Radix(갈근)	<i>Pueraria thunbergii</i>	<10	-	-	-
Raphani Semen(내복자)	<i>Raphanus sativus</i>	<10	-	-	-
Rubi Fructus(복분자)	<i>Rubus coreanus</i>	<10	-	-	-
Saussureae Radix(복향)	<i>Saussurea lappa</i>	32	39	56	<10
Sophorae subprostratae Radix(산두근)	<i>Sophora subprostrata</i>	71	49	27	<10
Stemona Radix(백부근)	<i>Stemona japonica</i>	<10	-	-	-
Torilidis Fructus(사상자)	<i>Torilis japonica</i>	66	51	55	<10
Zingiberis Rhizoma crudus(생강)	<i>Zingiber officinale</i>	35	27	71	<10

All samples were tested at 100 µg/ml in [³H]-LTB₄ binding assay mixture.

*The inhibition (%) was calculated as described in Results and Discussion section.

Table II. Dose dependent inhibition of receptor binding of LTB₄ to human neutrophils by solvent fractions of herbal medicines

Drug Name	Fractions	Inhibition (%)		
		100*	50*	25*
Anemarrhenae Rhizoma	hexane	80	58	27
	EtOAc	58	24	<10
Aristolochiae Fructus	EtOAc	78	46	32
	hexane	65	<10	<10
Artemisiae asiaticae Herba	EtOAc	76	<10	<10
	hexane	65	<10	<10
Embeliae Radix	hexane	80	58	33
	EtOAc	69	51	12
Ephedrae Herba	hexane	83	33	<10
	EtOAc	69	51	12
Magnoliae Cortex	hexane	63	41	26
	EtOAc	62	48	18
Mori Radicis Cortex	hexane	74	23	21
	EtOAc	71	70	46
Perillae Semen	hexane	74	23	21
	EtOAc	71	70	46
Zingiberis Rhizoma crudus	hexane	35	27	71
	EtOAc	35	27	71

*Final concentrations in binding assay mixture in µg/ml.

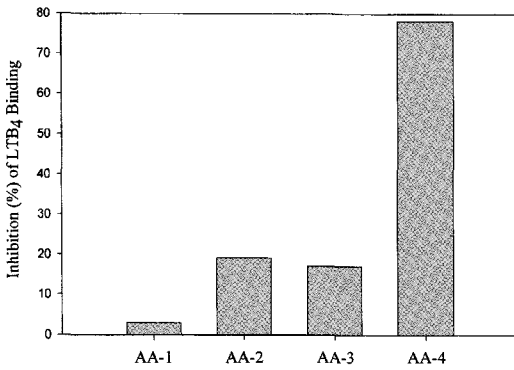


Fig. 1. Inhibition of receptor binding of LTB₄ to human neutrophil by the column fractions of the hexane soluble fraction of Anemarrhenae Rhizoma.

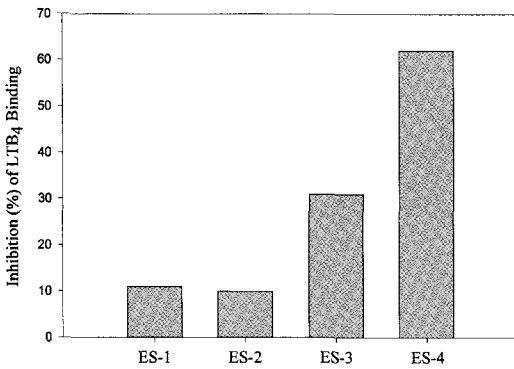


Fig. 2. Inhibition of receptor binding of LTB₄ to human neutrophil by the column fractions of the hexane soluble fraction of Embeliae Radix.

되었다. 이 소분획을 구성하는 성분들이 각 식물의 EtOAc 가용분획에도 상당 부분 포함된 것을 TLC에서 확인할 수 있었으며, 이는 이들 식물들의 EtOAc 가용분획에서 비교적 강한 활성을 나타내는 주요 성분들이므로 예상할 수 있었다.

현재까지 LTB₄ 수용체 저해제를 개발하기 위한 노력은 대부분 유기합성에 의한 분자들을 이용하고 있으며, 이들은 LTB₄의 구조유사체,¹⁹⁾ hydroxyacetophenone 유도체,²⁰⁾ dicarboxylic acid의²¹⁾ 세 가지 기본 골격을 가진 화합물들로 크게 나눌 수 있다. 천연에서 발견된 저해제로는 leucettamine A가 유일한 분자로서 해면에서 분리되었으며²²⁾ IC₅₀ 값이 4.6 μM로서 활성이 유기합성분자들에 비해 미약한 편이다. 최근 천식치료로 사용하는 흡입제의 이용이 어려운 환자를 위해 경구용 천식치료제로 cysteinyl leukotriene 수용체 저해제인 Zafirlukast와 5-LO 저해제인 Zileuton 등이 개발되면서, 경구용 LTB₄ 수용체 저해제를 천식

치료제로 개발하려는 노력이 가속화되고 있다.²³⁾ LTB₄ 수용체 저해제는 천식과 각종 염증성질환 및 골다공증에 대한 치료효과도 있는 것으로 알려지면서 활성을 가진 새로운 화합물 골격의 제시가 절실한 상태이다. 천연물로부터 새로운 골격의 활성분자를 제시하는 것은 아직 활성체의 기본 골격이 매우 제한된 이 분야의 연구에 매우 중요한 의미를 가진다.

결론

Leukotriene B₄ (LTB₄)는 활성화된 호중구나 대식세포에서 arachidonic acid로부터 5-lipoxygenase에 의해 합성되는 물질이다. LTB₄는 급성염증 상태에서 혈관투과성을 항진시켜 백혈구를 혈관 밖으로 유주시켜 식균작용을 통해 외부로부터 침입한 병원균을 무력화하고 면역계를 활성화하는 역할을 하는 반면, 그 기능이 과도하게 항진된 경우 다양한 염증성 질환의 원인이 되기도 한다. LTB₄는 선택적인 세포표면의 수용체에 결합하여 활성을 나타내므로, 천식 또는 염증치료 목적으로 LTB₄의 활성을 감소시키는 방법으로 LTB₄ 수용체에 대한 저해제의 개발이 가장 선택적이고 효율적인 수단으로 이용되고 있다. 생약으로부터 새로운 골격의 LTB₄ 수용체 저해제를 찾기 위한 노력으로 한방에서 사용되는 생약의 추출물에 대하여 LTB₄ 수용체 결합 저해활성을 검색하였다. 활성의 평가는 사람의 혈액에서 분리한 호중구에 대한 동위원소가 표지된 [³H]-LTB₄ 리간드의 결합을 억제하는 능력으로 평가하였다.

각종 생약재료의 메탄올 추출물 중 상백피, 소자, 행인 및 산두근이 100 μg/ml 농도에서 70% 이상의 결합 저해활성을 나타내었다. 메탄올 추출물 수준에서 활성이 관찰된 재료로부터 제조한 용매분획 중 특히 활성이 강하게 관찰된 분획들에 대하여 100, 50, 25 μg/ml의 농도에서 활성을 검색한 결과, 지모, 호미초의 hexane 가용분획과 마두령, 호미초, 생강의 EtOAc 가용분획이 매우 양호한 활성을 보였다. 지모와 호미초의 hexane 가용분획으로 부터 실리카겔 컬럼을 통하여 얻은 소분획 AA-4와 ES-4는 30 μg/ml 농도에서 LTB₄ 수용체 결합 저해활성이 각각 78% 및 62%로서 매우 우수하였다. 이와 같은 결과들로부터 생약 추출물의 활성 추적과정을 통하여 새로운 골격의 LTB₄ 수용체 저해제를 찾고 LTB₄의 활성을 차단함으로써 소염 및 천식의 치료에 활용할 수 있는 물질의 도출이 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 재단법인 보건장학회의 1999년 연구비 수혜로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Borgeat, P. and Samuelsson, B. (1979) Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes, *J. Biol. Chem.* 254: 2643-2646.
- Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A., Doig, M. V., Shipley, M. E. and Smith, M. J. H. (1980) Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes, *Nature* 286: 264-265.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y. and Shimizu, T. (1997) G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis, *Nature* 387: 620-624.
- Cromwell, O., Walport, M. J., Morris, H. R., Taylor, G. W., Hodson, M. E., Batten, J. and Kay, A. B. (1981) Identification of leukotrienes D and B in sputum from cystic fibrosis patients, *Lancet* 2: 164-165.
- Antonelli, M., Bufi, M., De Blasi, R. A., Crimi, G., Conti, G., Mattia, C., Vivino, G., Lenti, L., Lombardi, D. and Dotta, A. (1989) Detection of leukotrienes B₄, C₄ and of their isomers in arterial, mixed venous blood and bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients, *Intensive Care Med.* 15: 296-301.
- Wardlaw, A. J., Hay, H., Cromwell, O., Collins, J. V. and Kay, A. B. (1989) Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 84: 19-26.
- Kragballe, K. and Voorhees, J. J. (1985) Arachidonic acid in psoriasis. Pathogenic role and pharmacological regulation, *Acta Derm Venereol Suppl. (Stockh)* 120: 12-17.
- Rae, S. A., Davidson, E. M. and Smith, M. J. (1982) Leukotriene B₄, an inflammatory mediator in gout, *Lancet* 2: 1122-1124.
- Davidson, E. M. and Rae, S. A. and Smith, M. J. (1983) Leukotriene B₄, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 42: 677-679.
- Stenson, W. F. (1990) Role of eicosanoids as mediators of inflammation in inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 172: 13-18.
- Powell, W. S. (1984) Properties of leukotriene B₄ 20-hydroxylase from polymorphonuclear leukocytes, *J. Biol. Chem.* 259: 3082-3089.
- Tsai, B. S., Keith, R. H., Villani-Price, D., Haack, R. A. and Djuric, S. W. (1994) The leukotriene B₄ receptor agonist/antagonist activities of SC-45694 in human neutrophils, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1493-1498.
- Lin, A. H., Ruppel, P. L. and Gorman, R. (1984) Leukotriene B₄ binding to human neutrophils, *Prostaglandins* 28: 837-849.
- Gorman, R. R. and Lin, A. H. (1987) Assay for the leukotriene B₄ receptor, *Methods Enzymol.* 141: 372-378.
- Ford-Hutchinson, A. W., Charleson, S. and Evans, J. F. (1988) Leukotriene B₄ receptors on rat and human neutrophil membranes, *Methods Enzymol.* 163: 340-343.
- Suh, H., Jeong, S.-J., Han, Y. N., Lee, H.-J. and Ryu, J.-H. (1997) 3-Amino-1,2-benzisoxazoles: A new family of potent inhibitors of LTB₄ binding to the human neutrophils, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 389-392.
- Fukuyama, Y., Kiriyama, Y., Okino, J., Kodama, M., Iwaki, H., Hosozawa, S. and Matsui, K. (1993) Naturally occurring 5-lipoxygenase inhibitor. II. Structures and syntheses of ardisianones A and B, and maesanin, alkenyl-1,4-benzoquinones from the rhizome of *Ardisia japonica*, *Chem. Pharm. Bull.* 41: 561-565.
- Jackson, W. T., Boyd, R. J., Froelich, L. L., Gapinski, D. M., Mallett, B. E. and Sawyer, J. S. (1993) Design, synthesis, and pharmacological evaluation of potent xanthone dicarboxylic acid leukotriene B₄ receptor antagonists, *J. Med. Chem.* 36: 1726-1734.
- Morris, J. and Wishka, D. G. (1988) Synthesis of novel antagonists of leukotriene B₄, *Tetrahedron Lett.* 29: 143-146.
- Djuric, S. W., Collins, P. W., Jones, P. H., Shone, R. L., Tsai, B. S., Fretland, D. J., Butchko, G. M., Villani-Price, D., Keith, R. H., Zemaitis, J. M., Metcalf, L. and Bauer, R. F. (1989) 7-[3-(4-Acetyl-3-methoxy-2-propylphenoxy)propoxy]-3,4-dihydro-8-propyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylic acid: an orally active selective leukotriene B₄ receptor antagonist, *J. Med. Chem.* 32: 1145-1147.
- Konno, M., Sakuyama, S., Nakae, T., Hamanaka, N., Miyamoto, T. and Kawasaki, A. (1991) Synthesis and structure-activity relationships of a series of substituted phenylpropionic acids as a novel class of

- leukotriene B₄ antagonists, *Adv. Prostaglandin, Thromboxane Leukotriene Res.* 21: 411-414.
22. Chan, G. W., Mong, S., Hemling, M. E., Freyer, A. J., Offen, P. H., DeBrosse, C. W., Sarau, H. M. and Westley, J. W. (1993) New leukotriene B₄ receptor antagonist: leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta micro-*
- raphis*, *J. Nat. Prod.* 56, 116-121.
23. Fabbri, L. M., Piattella, M., Caramori, G. and Ciaccia, A. (1996) Oral vs inhaled asthma therapy. Pros, cons and combinations, *Drugs* 52 Suppl. 6: 20-28.

(2000년 7월 18일 접수)