

增殖性 炎症의 再増殖過程에 따른 Protocollagen Proline Hydroxylase 의 活性

申 國 鉉

서울大學校 生藥研究所

(Received October 25, 1975)

Kuk Hyun Shin (*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110*): Protocollagen Proline Hydroxylase Activity in the Course of Rebound of Proliferative Inflammation

Abstract—Protocollagen proline hydroxylase (PPH) activity in the course of rebound of rat carrageenin granuloma was assayed to investigate its relationship with collagen biosynthesis. The specific activity of PPH which was inhibited significantly by treatments with hydrocortisone acetate (3mg/kg/day, 3days) was recovered near to the normal level by 48hr after the cessation of the corticoid treatments. The total enzyme activity of the granuloma of treated group was not yet recovered even on the 3rd day, still showing a significant difference from control. PPH activity expressed in terms of granuloma cells between control and the drug treated group, however, was changed showing no apparent difference throughout the experimental period. These results suggested that the synthesis of protocollagen (collagen precursor) rather than PPH activity was directly affected by administration and withdrawal of corticoid.

Collagen 은 結合組織의 炎症性增殖에 따라 炎症反應의 後期에 旺盛히 合成되어 纖維를 形成하는 特異蛋白質이나 collagen 的 生成機能, 合成 및 分泌의 制御機轉等에는 아직도 不明한 點이 많이 남아 있다.

著者는 増殖性 carrageenin 肉芽腫囊을 誘發시킨 rat에 steroid 性 消炎劑를 連續投與後 그 投與를 中止하면 肉芽腫囊의 增殖組織 (granuloma)는 勿論 ^{131}I -human serum albumin (^{131}I -HSA)에 의한 渗出液의 血管透過性反應에 急激한 再增殖現象 (rebound phenomenon)이 있음을 立證한바 있다^{1,2)}. ^{131}I -HSA에 依한 肉芽腫囊 渗出液의 血管透過性反應은 steroid 投與中止後 第 1 日만에는 強하게 抑制되었으나 第 2 日과 3日만에 rebound 現象이 있음을 알았다. 肉芽組織의 濕重量도 steroid 投與中止 2日과 3日 사이에 急激한 上昇을 보이고 1日과 2日 사이에 lag-phase

가 存在함을 報告하였다. 이 rebound 現象의 生化學的 機轉을 追求할 目的으로 組織代謝 level 에서 經時的으로 肉芽組織成分인 non-collagen 蛋白, DNA, 및 collagen 的 生合成能을 追跡한 結果 non-collagen 蛋白의 細胞當 合成能은 rebound 現象의 가장 빠른 時期에 回復되어 steroid 投與中止 第 1 日부터 對照群과 同一한 變化를 나타내었으며, DNA 合成能도 第 1 日과 第 2 日 사이에 回復을 나타내었으나 collagen 的 生合成能은 steroid 投與中止 3日과 4日만에 復舊되며 回復을 나타내었다. Klein 等³⁾에 依한 說, 즉 細胞의 DNA 合成이 開始되고 合成이 繼續되기 위해서는 어떤 蛋白質의 繼續적인 合成을 必要로 한다는 개념에 根據를 둔다면 肉芽組織細胞에서도 DNA 合成에 必要한 어떤 蛋白質의 合成能이 가장 먼저 回復되고 繼續하여 DNA 合成能의 回復이 일어난 것으로 料된다. 이와는 달리 collagen 合成能의 回復이 늦는 것은 collagen 的 生合成能에 特異的인 機轉이 存在함을 示唆하고 있다. 따라서 著者は 이 肉芽組織의 回復期에 일어나는 collagen 的 飛躍이 어찌한 意味를 갖고 있는가를 究明하기 위하여 rebound 現象에 있어서 collagen 生合成前驅物質인 protocollagen 的 水酸化酵素活性의 變化를 追跡하여 細胞增殖과 어찌한 相關性이 있는가를 檢討하였다.

實驗方法

肉芽腫囊의 形成—實驗動物로서 Donryu 系, 體重 130~150 g, 6週令의 rat 를 사용하였다. 申等의 方法¹⁾으로 rat 의 背部皮下에 空氣 6 ml 를 注射하여 pouch 를 形成시키고 約 24 hr 後 carrageeinin 의 2% 生理食鹽 溶液 4 ml 를 pouch 內에 注入하면 數日後 卵形의 肉芽腫囊이 形成된다. Carrageeinin 은 Seakem #202 (Marine Colloid Inc. U.S.A.) 를 使用하였다. Carrageeinin 溶液을 生理食鹽液에 2%가 되도록 混合하고 高壓滅菌器로 120°, 15分間 加壓滅菌後, 溫時 注入한다. Carrageeinin 溶液 1 ml 에 對하여 0.1 mg 的 penicillin G 및 dihydrostreptomycin sulfate 를 添加했다. Carrageeinin 注入日을 第0日로 하였다.

肉芽組織의 Rebound 現象의 誘發—代表의 steroid 인 醋酸 hydrocortisone (Merck 萬有 Co. Ltd., Tokyo)의 0.5% carboxymethyl cellulose 현탄액을 carrageeinin 溶液 注入後 5日~7日에 걸쳐서 3 mg/kg/day 쯤 3日間 肉芽腫囊內에 連續投與했다. Steroid 連續投與中止 第 1 日, 2日 및 3日만에 肉芽組織을 쳐출하여 그 濕重量을 求하였다.

肉芽組織成分의 定量—DNA 的 分割은 Schmidt-Thannhauser-Schneider 法^{4,5)}에 依하여 EtOH :Et₂O=1:1의 抽出殘渣를 0.3N-KOH 로서 RNA 를 除去後 남은 fraction 으로부터 5% perchloric acid 로서 DNA 를 抽出分割하고 Burton 法⁶⁾에 依하여 DNA 를 定量하였다. 이때 標準物質로서 calf-thymus DNA 를 使用하였다.

肉芽組織의 各 enzyme fraction 的 蛋白質은 Lowry 法⁷⁾에 依하여 定量하였다. 標準物質로서 bovine serum albumin 를 使用하였다.

各 enzyme fraction 的 hydroxyproline 를 定量하기 위하여 試料를 105°에서 6N-HCl 로 16時間 加水分解시켰다. 이 加水分解物을 KOH 로 弱 alkali 性으로 하고 chloramine T 를 加하여 室溫에서 20分間 酸化시켜 生成하는 pyrroline 를 toluene 으로 抽出除去한 後 沸騰水浴中에서 30分間 加熱하여 pyrrole 를 生成시켰다. 生成된 pyrrole 를 toluene 으로 抽出하여 *p*-dimethylaminobenzaldehyde 로 發色시켜 560 nm 的 吸光度를 測定하여 定量하였다⁸⁾.

Protocollagen Proline Hydroxylase Activity의 測定—Substrate로서의 protocollagen 的 製造는 8-day-old granuloma 35 g 을 氷冷下에서 mince 하고 처음 10分間은 37°에서 1 mM α, α' -

dipyridyl을 含有하는 Krebs saline serum substitute (KSSS)⁹⁾ 140 ml [1]에서 incubation 한 後 ^3H -proline 700 μCi 를 添加하고 110分間 95% O_2 -5% CO_2 를 通해주어 incubation 하였다. Incubation 終了後 medium 을 decantation 하여 除去하고 minced granuloma 를 KSSS (1mM α, α' -dipyridyl 含有)로 3回 洗滌하였다. 50 ml 의 10% TCA 로 혼탁시킨 後 70°에서 1時間 incubation 하고 濾過하여 濾液을 赤色이 거의 消失될 때까지 Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.6) 並 數回透析하였다. 이 透析物을 100,000 g 로 1時間 遠心分離하고 上澄液을 ^3H -proline 標識 protocollagen substrate と 하였다. 基質液은 $1.47 \times 10^5 \text{ dpm}/\text{ml}$ 를 含有하였으며 1.2%의 hydroxyproline 을 含有한다.

Protocollagen proline hydroxylase activity의 測定은 肉芽組織 collagen의 前驅物質인 protocollagen의 水酸化酵素活性을 放射性標識 protocollagen (^3H -protocollagen)을 基質로 하여 測定하였다. 各 實驗動物의 肉芽組織을 摘出한 後 minced granuloma 1 g 을 10 ml 的 0.1M-KCl, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH=7.6)에서 冰冷下에 Vir-Tis 45 homogenizer 를 使用하여 homogenize と고, homogenate 를 1°에서 90分間 12,000^g로서 遠心分離하여 上澄液 1 ml 를 protocollagen proline hydroxylase activity 測定에 使用하였다. Incubation medium 은 12,000 g 上澄液의 4.72~5.98 mg 의 protein, ^3H -proline 標識 protocollagen substrate ($1.47 \times 10^5 \text{ dpm}$), 0.2 mM FeSO_4 , 0.2 mM α -ketoglutarate, 1 mM ascorbic acid, 100 mM KCl 를 含有하여 50 mM 的 Tris-HCl buffer (pH=7.6)로서 最終 容量을 7 ml 로 調節하였다. 이 混合液을 空氣中에서 60分間 37°로 incubation 한 後, 5 ml 的 C-HCl 을 加하여 反應을 中止시키고 105°에서 16時間 加水分解시켰다. 加水分解物中의 hydroxyproline 을 pyrrole と 變換시킨 후 toluene 溶出液을 silicic acid column¹⁰⁾을 通過시켜 精製하고 ^3H -hydroxyproline 的 全放射能(dpm)을 Packard liquid scintillation spectrometer (model 3950)에 依하여 測定하였다 (Scintillator; 2,5-diphenyloxazol 15 g, 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzene 0.05 g 의 1 l toluene 溶液). 同時에 이 加水分解物中의 hydroxyproline 量도 上記方法에 依하여 求하였다. Incubation 에 依하여 生成된 collagen 的 hydroxyproline 的 放射能은 ^3H -proline 標識 protocollagen 基質의 加水分解物中에 存在하는 ^3H -hydroxyproline 的 放射能과 incubation 產物의 加水分解物中에 存在하는 ^3H -hydroxyproline 的 放射能과의 差로부터 求하였다. 마로 1 g 的 minced granuloma 를 homogenize 하여 이中에 含有된 DNA 를 上記方法에 依하여 定量하였다.

結果 및 考察

Glucocorticoid 投與中止에 따른 肉芽組織의 Rebound—Table I에 表示한 바와 같이 中等의 實驗結果¹⁾와 同一하게 hydrocortisone acetate 3 mg/kg/day 을 連續投與함으로서 granuloma의 濕重量이 45.4%抑制를 나타냈으나 3日後에는 對照群의 水準까지 回復하는 現象을 再確認하였다. 또한 肉芽組織細胞의 DNA 含量에 있어서도 2日과 3日 사이에 rebound 現象을 나타내었다.

Enzyme Activity 測定의 條件— ^3H -proline 標識 protocollagen 的 水酸化反應時間은 決定하기 위해서 8-day-old granuloma 的 12,000 g 上澄液을 Nakagawa 等¹¹⁾이 實施한 同一條件下에서 水酸化能의 變化를 檢討한 結果 Fig. 1에서 보는 바와 같이 30分의 lag phase 後 90分까지 거의 直線的으로 增加하였으므로 incubation 時間 30分以上 90分까지 旺盛한 水酸化反應이 나타남을 알 수 있다. 또한 Fig. 2에 表示한 바와 같이 ^3H -proline 標識 protocollagen 的 水酸化는 granuloma 12,000 g 上澄液의 酶素量의 增加에 따라 直線的으로 增加하였다. 따라서 protocollagen proline

Table I—Changes in wet weight and DNA contents of granuloma following withdrawal of hydrocortisone acetate treatments

Treatments	No. of rats	Granuloma wet wt. (g)	Total DNA (mg)
Day-8 Control	6	5.15±0.17	16.53±0.65
HC-Ac treated	6	2.81±0.14(45.4) ^a	8.45±0.45(48.9) ^a
Day-9 Control	6	5.79±0.52	18.84±1.24
HC-Ac treated	6	3.26±0.28(43.7) ^b	9.07±0.67(51.9) ^b
Day-10 Control	6	5.26±0.38	17.56±1.49
HC-Ac treated	6	4.64±0.33	14.52±1.55

Data are shown as means ± S.E.

The per cent inhibition is shown in parentheses.

Hydrocortisone acetate (HC-Ac) (3 mg/kg/day) was injected into pouch on days 5, 6, and 7, and then granuloma was harvested on days 8, 9, and 10.

a) Significantly different from control ($P < 0.001$)

b) Significantly different from control ($P < 0.01$)

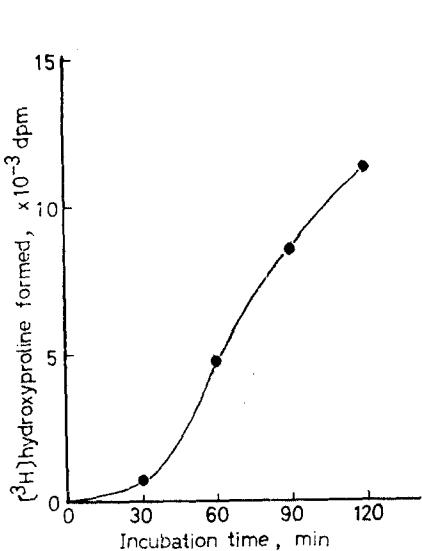


Fig. 1—Time course for the hydroxylation of [³H] proline labeled protocollagen.

Incubation was carried out under the conditions described in the text. Each point represents the average of duplicate experiments.

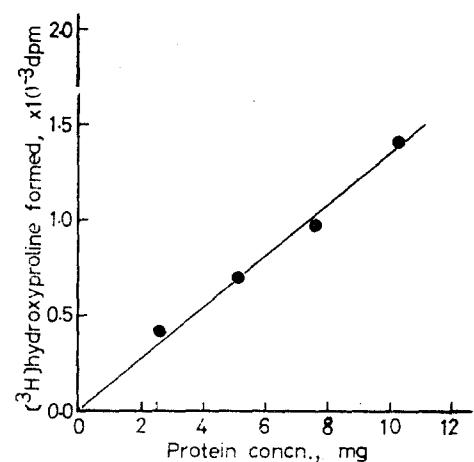


Fig. 2—The relationship between [³H] hydroxyproline formed and the protein content of [³H] proline-labeled protocollagen fraction added to the incubation mixture.

[³H] proline-labeled protocollagen (1.47×10^6 dpm) was incubated with varying amounts of the enzyme fraction from granuloma (8 days old) under the condition described in the text.

hydroxylase活性의 测定은 그 incubation時間 60分, enzyme濃度는 granuloma 12,000 g上澄液의 蛋白質 4.72—5.98 mg을 實驗條件으로 하였다.

Protocollagen Proline Hydroxylase活性—Steroid 3 mg/kg/day, 3日間連續投與後, 投與中止第1日, 2日 및 3日만에 各動物群을 頸動脈切斷에 依하여 痘生시키고 上記條件下에서 minced granuloma의 protocollagen proline hydroxylase activity를 测定한結果, 그 比放射能의 變化

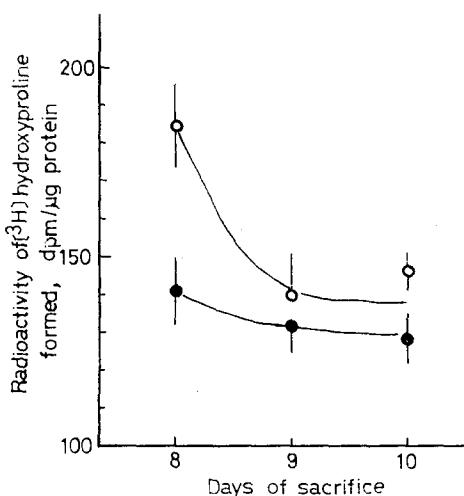


Fig. 3—Changes in protocollagen proline hydroxylase activity (specific activity) in granulomas after cessation of hydrocortisone acetate treatments. Minced granuloma harvested on indicated days was homogenized and its 12,000 g supernatant was incubated under the conditions described in the text.

Each point is the mean of 6 animals. A vertical line at each point represents the S.E. of the mean. (○-○, control; ●-●, treated)

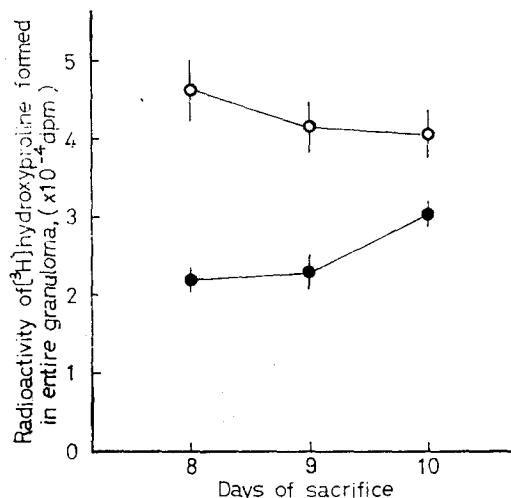


Fig. 4—Changes in total enzyme activity in granuloma after cessation of hydrocortisone acetate treatments.

Each point is the mean of 6 animals. A vertical line at each point represents the S.E. of the mean. (○-○, control; ●-●, treated)

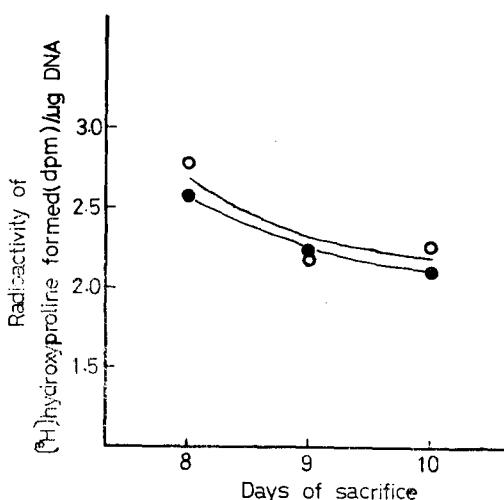


Fig. 5—Changes in protocollagen proline hydroxylase activity per μg DNA in granuloma after cessation of hydrocortisone acetate treatments. Each point is the mean of 6 animals. (○-○, control; ●-●, treated)

는 Fig. 3과 같고 그 全放射能의 變化는 Fig. 4에 表示한 바와 같다. Protocollagen proline hydroxylase의 比活性은 steroid 投與中止 2日 만에 對照群水準으로 回復되었고 總 protocollagen proline hydroxylase 活性은 投與中止 2日과 3日 사이에 飛躍을 나타내고 있으나 3日 째의 酶素活性에는 對照群과의 有意性있는 差를 認定할 수 있다. 이 現象은 steroid 投與中止 後 2日과 3日 사이에 collagen 量에 飛躍을 보인것과 類似하다¹⁾. 이 protocollagen proline hydroxylase活性을 肉芽組織細胞의 DNA當 protocollagen proline hydroxylase活性으로 나타낸 結果 Fig. 5에서 보는바와 같이 第 1日과 3日 사이의 細胞當 酶素活性은 對照群의 그것과 有意性있는 差를 認定할 수 없었다.

Glucocorticoid에 依한 肉芽組織의 protocollagen proline hydroxylase活性에 對한 抑制機轉으로서는 2가지의 可能性을 생각할 수 있다. 첫째 collagen의 前驅物質인 protocollagen의 合成의 阻害이며 둘째는 protocollagen proline

hydroxylase 活性 自體의 抑 制 를 들 수 있다. Nakagawa 等¹¹⁾은 glucocorticoid 를單一回 投與時 (i.v.), 投與 4.5時間 만에 collagen hydroxyproline 의 合成能이 強力히 抑制된다는 結果를 얻었고 著者等이 hydrocortisone 을 肉芽腫囊內에單一回 投與時에도 類似한 結果를 얻었다¹²⁾.

Steroid 連續投與後 그 投與를 中止한 경우에도 collagen hydroxyproline 的 合成能은 投與中止 24時間의 時點에서도 強力히 抑制되었다¹³⁾. Fig. 5에 依하면 細胞當 protocollagen proline hydroxylase 活性이 steroid 投與中止 以後 24시간의 時點에서도 전혀 抑制를 보이지 않고 對照群과 同一한 變化를 보이고 있다. 이와같이 collagen 的 合成能이 抑制를 보임에도 불구하고 細胞當 enzyme活性에 抑制가 나타나지 않았다는 事實은 이 反應系에서는 적어도 前記 2種의 可能性中 後者인 enzyme activity의 變化가 純粹 관여하고 있지 않다는 것을 認定할 수 있다. 따라서 hydrocortisone 的 連續投與에 依한 collagen 合成能의 抑制와 그 回復은 collagen 前驅物質인 protocollagen 自體의 變化에 起因한다고 料된다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 protocollagen proline hydroxylase의 比活性이 hydrocortisone 投與中止 21日만에 完全히 回復되었다고 하드라도 collagen 的 前驅物質인 protocollagen 的 合成이 回復되어 있지 않기 때문에 hydroxylase 活性이 回復되어 있어도 collagen 量에 回復이 일어나지 않은 것이라고 推測된다. 이는 steroid 單一回 投與時에 Nakagawa 等¹¹⁾이 觀察한 結果와도 부합되고 있다. 細胞가 新生되어도 enzyme活性의 上昇이 일어나지 않고 細胞의 增加와 同一한 形의 變化를 보이고, rebound 現象에서의 新生細胞의 DNA 合成能의 回復과 collagen 合成能의 回復과의 사이에 11以上의 차나 特異的 DNA 抑制時의 1日以上的 差¹³⁾를 관찰할 수 없다는 事實은 collagen 的 前驅物質인 protocollagen 이 細胞內에 축적되었다가 steroid 投與中止에 따라 水酸化가 일어나지는 않는다는 것을 示唆해 주고 있다. 그러나 protocollagen 이 細胞膜과 bound 한다면 protocollagen 이 축적될 可能性도 있으며 이는 더 檢討해볼 課題이다.

文 獻

1. K.H. Shin, H. Nakagawa and S. Tsurufuji, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 381 (1974).
2. K.H. Shin, H. Nakagawa and S. Tsurufuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1137 (1975).
3. A. Klein and F. Bonhoeffer, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 322 (1972).
4. G. Schmidt and S.J. Thannhauser, *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945).
5. W.C. Schneider, *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
6. K. Burton, *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
7. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
8. K.I. Kivirikko, O. Laitiner and D.J. Prockop, *Analyt. Biochem.*, **19**, 249 (1967).
9. H.A. Krebs, *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 249 (1950).
10. K. Juva and D.J. Prockop, *Analyt. Biochem.*, **15**, 77 (1966).
11. H. Nakagawa, M. Fukuhara and S. Tsurufuji, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2253 (1971).
12. K.H. Shin, H. Nakagawa and S. Tsurufuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2070 (1975).
13. K.H. Shin and S. Tsurufuji, Unpublished data.