

Cyclic Peptide, Ro09-0198의 혈소판활성화에 대한 작용기전

정 세 영

경희대학교 약학대학

(Received January 12, 1991)

Mechanism of Platelet Activation Induced by Cyclic Peptide, Ro09-0198

Se Young Choung

College of Pharmacy, Kyung Hee University Seoul, 130-701, Korea

Abstract—Ro09-0198, a cyclic peptide isolated from culture filtrates of *Streptovercillium griseoverticillatum*, induced platelet aggregation and serotonin release simultaneously. LDH release was not observed. Addition of peptide to rat platelet, loaded with Ca^{2+} chelator quin-2, caused immediate rise in cytosolic free Ca^{2+} . Liposomal membrane containing phosphatidylethanolamine was damaged by peptide and released ^{45}Ca dose dependently.

Keywords □ Ro09-0198, platelet aggregation, serotonin release, quin-2, Ca^{2+} , phosphatidylethanolamine, liposome.

Ro01-0198은 분자량 2041, 아미노산 15개로 이루어진 cyclic peptide이며, 분자내에 lanthionine, β -methyllanthionine, lysinoalanine, β -hydroxyaspartic acid, D-phenylalanine과 같은 특이한 아미노산을 가지고 있다. Ro09-0198은 *Streptovercillium griseoverticillatum*의 culture filtrates에서 분리되었으며 항암 작용과 항균작용이 있는 것이 밝혀졌다.

항암작용은 cytotoxic T cell의 분화유도촉진과 suppressor T cell 분화유도억제로 인한 면역증강작용에 기인하는 것으로 되어 있으며 계속 연구중에 있다. 본 cyclic peptide의 receptor site는 인지질인 phosphatidylethanolamine(PE)이며 PE-cyclic peptide complex가 세포막의 일부분에 clustering하여 분자량 300 정도의 물질이 투과할 수 있는 pore를 형성함으로써 적혈구막, 리포솜막에 damage 주는 것이 알려져 있다.¹⁻³⁾

PE는 세포막에 보편적으로 존재하고 cyclic peptide가 혈액내에 유입되었을 때 최초로 접할 수 있는 혈구세포중 혈소판의 활성화에 의한 histamine, sero-

tonin release가 항암작용에 직접적인 원인의 하나로 예상되므로 혈소판활성화 여부 및 그 작용기전을 연구하게 되었고 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시약—bovine serum albumin, Tris-Tyrode, Triton X-100, NADH, sodium pyruvate, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cholesterol, quin-2, quin-2(AM), thrombin은 sigma 것을 사용하였으며 ^{14}C -serotonin, $^{45}CaCl_2$ 는 Amersham 것을 사용하였고 기타 모든시약은 특급품을 사용하였다.

실험동물—토끼는 체중 210g 전후의 웅성가토, rat은 250g 전후의 웅성 Wistar rat, mouse는 20g 전후의 웅성 ICR mouse를 사용하였으며 heparin 처리한 주사기로 심장채혈하였다. 사람은 건강한 25세 전후의 남자의 팔정맥으로부터 채혈하였다.

혈소판분리—채혈한 혈액을 폴리에틸렌 튜브에 옮겨 300g로 10분간 원심분리 후 상등액을 platelet rich

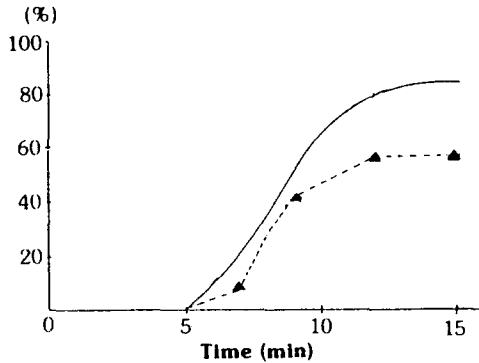


Fig. 1—Rat platelets activation by Ro09-1098. 5×10^8 rat platelets were incubated with 10^{-5} M Ro09-0198 at 37°C .
—aggregation, ----serotonin release

plasma (PRP)로 했다. PRP에 ACD(구연산 65 mM, 구연산나트륨 85 mM, glucose 2%)를 1/5 volume 가해 3200g로 10분간 22°C 에서 원심분리하여 백색침전을 얻었고 여기에 2.5 mg/ml의 bovine serum albumin을 함유한 Tris-Tyrode를 가하여 세포수 5×10^8 cells/ml 현탁액을 만들었다.

혈소판응집과 serotonin 방출실험—PRP 5 ml에 ^{14}C -serotonin(5-hydroxy [side chain $2\text{-}^{14}\text{C}$] tryptamine) 2 μCi 를 가해 22°C , 20분간 incubation하고 ACD 1 ml를 가해 혈소판 분리시와 동일조작을 거쳐 혈소판 현탁액을 얻었다. 응집반응은 aggregometer를 사용하여 37°C , 1000 rpm 회전속에서 660 nm 투과도 변화를 보았다. Serotonin release는 분리한 혈소판에 cyclic peptide 가하고 37°C , 1000 rpm에서 일정시간 incubation 후 eppendorf centrifuge로 12000g, 1분 원심분리하여 상등액 중의 방사능량을 β -scintillator로 측정하였다.

Lactic dehydrogenase 활성측정—cyclic peptide 가한 뒤 상등액을 취해 6 mM NADH, 12 mM sod. pyruvate, 0.1 M Tris-HCl(pH 9.0)을 가하여 37°C , 1 hr incubation 후 aliquot 20 μl 취해 0.3 N HCl 40 μl 가했다. Vortex mixer로 혼화하고 37°C , 30분 incubation 후 증류수 1 ml 가해 excitation 365 nm, emission 455 nm에서 형광도를 측정했다.

Platelet로의 Ca^{2+} 유입⁴⁾—PRP에 15 μM quin-2/AM을 가해 37°C , 30분간 incubation 후 3200g, 15분간 원심분리하고 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM

MgSO_4 , 10 mM sod. Hepses, 10 mM dextrose(pH 7.4)에 현탁했다. 1 mM CaCl_2 , cyclic peptide 가해 일정시간 incubation하고 excitation 339 nm, emission 500 nm에서 형광도를 측정했다.

Liposome으로부터의 Ca^{2+} 방출실험²⁾—Phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine/cholesterol(5/5/10)을 조성으로 하고 $^{45}\text{CaCl}_2$ 2 μCi , 0.3 M glucose를 함유하는 liposome을 reverse phase evaporation method로 만들고 cyclic peptide를 가하여 일정시간 incubation 후 12000g, 15분 원심분리하여 상등액 중의 ^{45}Ca 량을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

혈소판응집과 serotonin 방출—Rat의 혈소판을 분리한 뒤 peptide를 가해 ^{14}C -serotonin release와 aggregation 여부를 보았다. peptide 가한뒤 5분의 lag time을 가지고 응집이 일어났으며, 거의 동시에 serotonin release가 일어났다(Fig. 1). 이와 같은 혈소판 활성화 작용은 peptide에 의한 적혈구 용혈에서처럼 rat, rabbit, mouse, human 모두에서 일어났으며, 이는 세포막에 보편적으로 존재하는 PE를 receptor site로 한다는 점에서 당연하다 할 것이다. 응집과 serotonin release는 human < rabbit < rat 순으로 일어났으며 다른 혈소판활성화 물질과도 일치하는 결과라 하겠다 (Table I).

Lactic dehydrogenase 방출—혈소판응집 측정시의 상등액 일부를 취해 LDH의 활성을 보았다. 혈소판 응집, serotonin release가 일어나는 과정에서 LDH의 release는 보이지 않았으며 이는 적혈구 용혈처럼 혈소판이 damage를 입어 LDH와 함께 histamin, serotonin을 내놓는 것은 아니라는 것을 증명해 주는 것이라 하겠다.

Platelet로의 Ca^{2+} 유입—혈소판활성화 기전에 대해서는 peptide가 분자량 300 정도를 통과시킬 수 있는 pore를 liposome 막에 형성시키는 점에 착안하여 혈소판막에 Ca^{2+} 을 통과시킬 수 있는 pore 형성의 가능성을 보기위해 peptide에 의한 혈소판세포내 Ca^{2+} 농도변화를 quin-2를 이용하여 검토하였다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 혈소판 응집이 일어나기 시작하는 5분경에 Ca^{2+} influx가 일어나 460 nM 정도까지의 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 일어남을 알 수

Table I—Ro09-0198 induced platelets activation from various animal species.

Ro09-0198		10 ⁻⁵ M	5×10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M	Control
Species					
Rat	serotonin release	57%	15%	3%	2%
	relative light transmittance	85%	40%	20%	—
	lag time	5 min	7 min	7 min	—
Mouse	serotonin release	61%	30%	12%	2%
	relative light transmittance	74%	45%	30%	—
	lag time	5 min	7 min	8 min	—
Rabbit	serotonin release	39%	17%	2%	2%
	relative light transmittance	60%	40%	15%	—
	lag time	7 min	8 min	10 min	—
Human	serotonin release	17%	9%	3%	4%
	relative light transmittance	40%	20%	3%	—
	lag time	1 min	1 min	3 min	—

5×10⁸ platelets from various animal species were incubated with Ro09-0198 at 37°C.

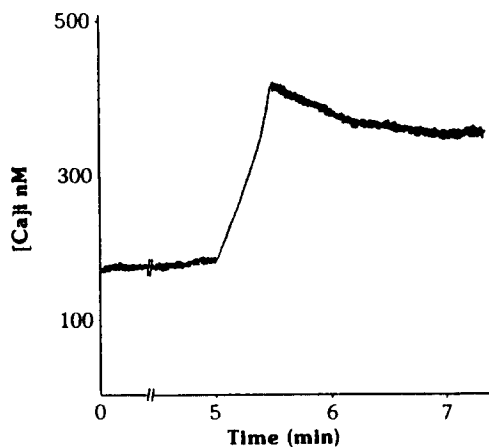


Fig. 2—Ca²⁺ uptake of rat platelets induced by Ro09-0198. Response of quin-2 loaded rat platelets to addition of Ro09-0198 (10 μM) was calculated from the ratio F/F_{max}.

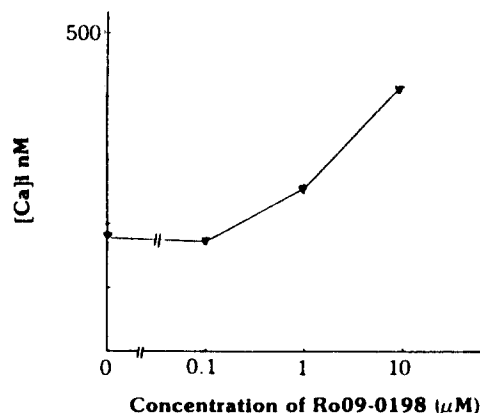


Fig. 3—Ca²⁺ uptake of rat platelets induced by Ro09-0198 (dose response).

결론

있었다. 또한 peptide 농도에 비례해서 Ca²⁺ influx도 증가하였다.

liposome으로부터의 ⁴⁵Ca 방출—혈소판세포내 Ca²⁺ influx가 peptide-PE complex의 clustering에 의한 것인지를 보기위해 liposome내에 봉입한 ⁴⁵Ca의 peptide에 의한 release를 보았다. ⁴⁵Ca release는 5 μM peptide에서 거의 100% 일어났으며 이는 peptide의 Ca ionophore로서의 기능을 보여주는 좋은 결과라 하겠다(Fig. 4).

Ro09-0198은 cytotoxic T cell의 분화유도를 일으키며 suppressor T cell의 분화억제를 시킴으로써 면역증강 작용에 의해 항암효과가 있다고 밝혀졌다. 본 연구에서는 Ro09-0198이 platelet막의 Ca²⁺ 투과도를 높일 수 있는 pore를 형성하고 Ca²⁺의 세포내 유입에 의해 혈소판이 활성화되어 histamin, serotonin, PAF 등의 생리활성인자를 내놓게 되는 것을 알 수 있었으며, 이들에 의해 혈관투과성이 높아지고 macrophage, neutrophile이 동원되면 암세포에 대해

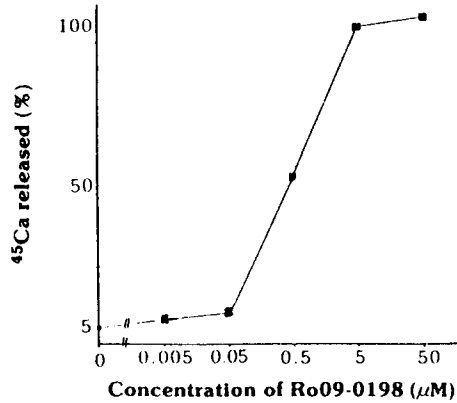


Fig. 4—Release of ^{45}Ca from liposomes induced by Ro 09-1098. Liposomes composed of egg-yolk phosphatidylcholine, egg-yolk phosphatidylethanolamine, dicetylphosphate and cholesterol (molar ratio, 0.75 : 0.25 : 0.1 : 1.0) were swollen in 0.3 M glucose containing ^{45}Ca .

직접적인 공격인자가 되어 항암작용의 한 기전이 될 수 있다는 것이 시사되었다. 또한 PE가 세포막에 보편적으로 존재함으로 peptide에 의한 혈소판활성화는 rat, rabbit, mouse, human 모두에 있어 일어났고 rat, mouse가 가장 민감하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1989년도 교육부 지원 학술진흥재단의

신진 연구활성조성비에 의하여 연구되었음.

문 헌

- 1) Choung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, J., Takemoto, K., Ishitsuka, H. and Inoue, K. : Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*. *Biochim. Biophys. Acta* **940**, 171(1988).
- 2) Choung, S.Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H. and Inoue, K. : Interaction of a cyclic peptide, Ro09-1098, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **940**, 180(1988).
- 3) Wakamatsu, K., Choung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, K., Higashijima, T. and Miyazawa, T. : Complex formation of peptide antibiotic Ro09-0198 with lysophosphatidylethanolamine : H-NMR analyses in dimethylsulfoxide solution. *Biochemistry* **29**, 113(1990).
- 4) Rin K, T.H., Sanchez, A and Hallam, T.J. : Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets. *Nature* **305**, 317(1983).