

Cyclooxygenase 억제제 검색을 통한 항염증제 개발 연구

이 수환, 정 성원, 이 우영
((주) 태평양 기술 연구원)

New screening method for anti-inflammatory agent

Lee, Soo Hwan, Jung, Sung Won, Lee, Woo Young
(Pacific R&D Center)

요 약

Gram 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 각종 세포에서의 prostaglandin 합성을 증진 시키며 이는 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 선택적 발현에 기인한다는 사실이 이미 보고된 바 있다. 본 연구에서는 mouse peritoneal macrophage를 대상으로 하여 LPS의 prostaglandin 합성 증진 작용에 대한 특성을 검토함으로써, COX-2에 대한 선택적 저해제 검색에 이용될 수 있는지 그 가능성을 확인코자 하였다. LPS는 peritoneal macrophage에 처리시 약 8 시간 정도의 lag time 을 보인 후 prostaglandin 합성을 현저히 증진 시켰으며, 이는 주로 COX 활성의 증가에 기인하는 것으로 추정 되었다. 또한 LPS의 작용은 항염증제인 dexamethasone 에 의해서 강하게 억제 되었으며 metabolic labeling 결과 이는 COX-2의 생합성을 억제하는데 기인하는 것으로 확인되었다. 따라서 mouse peritoneal macrophage에서의 LPS에 의한 prostaglandin 합성 증진 작용은 rat alveolar macrophage와 정성적으로 동일함을 확인할 수 있었으며, 본 실험 조건은 COX-2에 대한 선택적 저해제 검색에 응용될 수 있음을 확인 하였다. 본 실험 조건하에서 비스테로이드성 항염제인 ketoprofen의 작용을 검토한 결과 ketoprofen은 COX-1에 비교적 선택적인 저해 작용을 보이는 것으로 추정 되었다.

1. 서 론

Eicosanoid류란 탄소수 20여개인 지방산의 산화적 대사 산물을 칭하며, 이중 특히 arachidonic acid의 대사물들은 매우 다양한 생리 활성을 나타내고 있다. (1) 즉, 이들은 염증, 천식, 혈전 생성, 암, 동맥 경화등을 비롯한 각종 생리, 병리 작용에 대한 매개 및 조절 작용을 지닌다. 따라서 arachidonic acid 대사 경로를 조절함으로써 병리 현상을 치유하려는 시도는 오래전 부터 이루어져 왔으며, 그 대표적인 예가 바로 NSAID의 개발이다. Arachidonic acid로 부터 prostaglandin 또는 thromboxane의 생성에는 여러 효소가 관여하고 있으며, 이중 Prostaglandin (PG) H synthase/cyclooxygenase는 prostaglandin및 thromboxane 합성의 첫단계를 담당하는 효소로서 arachidonic acid로 부터 PGG₂를 생성하는 cyclooxygenase 활성과 PGG₂로 부터 PGH₂를 생성하는 peroxidase 활성의 두가지 효소 활성을 나타낸다. 이 효소는, PGG₂로 부터 PGH₂로의 변환시에 불활성화 됨으로써 강력한 생리활성을 갖는 prostaglandin 또는 thromboxane의 과도한 생성을 방지하는 특성을 지니고 있다. 따라서 각종 agonist들에 의한 cyclooxygenase계를 통한 prostaglandin 합성의 활성화는 효소 자체의 빠른 불활성화 덕택에 자동적으로 제한이 된다고 할 수 있다. 이러한 사실은, 세포막 인지질로 부터의 arachidonic acid의 유리가 과연 여러 agonist-response 계에서의 prostaglandin 또는 thromboxane의 폭발적인 생성을 유발하기에 충분한가에 대한 매우 중요한 의문을 제기하고 있다. 현재, arachidonic acid로 부터의 prostaglandin 생성을 지속 시키기 위해서는, 종종 이 PGH synthase의 새로운 합성이 필요하다는 의견들이 여러 연구자들에 의하여 제시되고 있으며, 이러한 사실들은, 몇몇 세포계에 있어서, 각종 mitogen처리에 의한 세포내 cyclooxygenase 발현 증가와 병행하여 prostaglandin 합성이 증가된다는 보고들로서 뒷받침 되고 있다. (2-5) 최근의 보고에 의하면, cyclooxygenase에는 두가지 종류의 isozyme이 존재하며 그 효소작용의 유사성에도 불구하고 효소 단백질의 아미노산 서열에는 60 -70% 정도의 유사성 만을 지니고 있으며, 각 isozyme의 세포내 발현 기전도 상이하다고 알려져 있다. (6) 이들 isozyme의 생체내 역할및 각종 agonist에 의해 자극된 세포 또는 병리, 생리학적 상태에서의 전반적인 prostaglandin 합성에 대한 각 isozyme의 공헌도 등에 대해서도 아직 이렇다할 연구가 진행되어 있지는 않으나, 기존에 알려져 있던 cyclooxygenase (COX-1)은 거의 모든 조직에 분포하며 hormone작용과 vascular homeostasis의 조절등과 같은 정상적인 세포 기능 유지를 위한 기본적인 역할을 할 것으로 추정되고 있다. (7) 한편, 최근에 밝혀진 COX-2는 serum, growth factors, phorbol ester, gonadotrophin, lipopolysaccharide (LPS) 및 각종 cytokines (IL-1, IL-2, TNF)등에 의해 활성화된 세포에서 선택적으로 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. COX-2의 발현이 각종 inflammatory mediators에 의해 증가하고, 스테로이드계 항염증제인 dexamethasone (DEX) 에 의해 선택적으로 감소되는 현상은 염증에 관련하여 시사하는 바가 크다 할 수 있다. (4)

종래에 사용되어 오던 대부분의 항염증제에 관한 연구는 주로 COX-1만을 인식한 연구였으며, aspirin 역시 COX-1의 serine잔기를 acetylation 시킴으로써 비가역적으로 억제 하는 것으로 알려져 있으며 여타의 NSAID들도 이와 유사하거나 세포내 redox state의 변화 또는 competitive inhibitor로 작용하는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근, 위에서 언급한 cyclooxygenase isozyme의 역할을 고려하여 각종 항염증제를 COX-1 또는 COX-2의 inhibitor로 구분한 연구가 보고된 바 있으며 이를 기초로 하여 COX-2에 대한 선택적인 길항제를 개발함으로써, 부작용을 최소화 시키려는 시도가 이루어 지고 있다. (8)

따라서 연구자들은 이러한 점에 착안하여 COX-2의 세포내 발현을 억제하거나 COX-2의 효소 작용을 선택적으로 차단함으로써, 궁극적으로 부작용이 적은, 새로운 개념의 항염증제를 개발코자 우선, 적절한 검색 방법을 확립하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1. 시약

Bacterial lipopolysaccharide (E. coli 0111:B4), arachidonic acid, thromboxane B₂, dextran, PPO (2,5-Diphenyloxazole)등은 Sigma 사로 부터, RPMI 1640 media, fetal calf serum, methionine free DMEM등은 GIBCO사에서, [³⁵S]-methionine은 ICN radiochemical사에서, ³H-thromboxane은 new England Nuclear에서 구입하였으며, 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

2. Peritoneal macrophage의 분리

본 연구소에서 사육중인 웅성 C57BL/6 mice (25-30 g)를 실험에 사용하였다. Mouse를 경추 탈골에 의해 치사시킨 후, 5 ml의 cold PBS를 복강에 주사하고, 조심스럽게 마사지한 다음, Lavage한 fluid를 취했다. 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리시켜 얻은 pellet에 100 U/ml penicillin (Sigma) 및 100 µg/ml streptomycin (Sigma)이 함유된 RPMI-1640 media (GIBCO) 5 ml을 가하여 부유 시켰다. 세포수와 viability는 hemacytometer를 사용하여 trypan blue exclusion법으로 결정하였다. 24-well microtiter plate (Falcon)에 5 X 10⁵ cells/well을 가하고 37°C, 5% CO₂/95% O₂ 조건하에서 2 시간 동안 배양하여 cell이 바닥에 부착되도록 하였다.

3. Prostaglandin 생성능과 Cyclooxygenase 활성의 측정

Cell에 3% fetal calf serum (FCS, GIBCO) 가 함유된 RPMI-1640 배지를 가하고, 37°C에서 일정 시간 배양 하였다. 일정 시간 배양한 후 배지를 전량 취하여 -20°C에 보관 하였다가 생성된 thromboxane의 양을 radioimmunoassay (RIA)로 측정 하였다. Cyclooxygenase (COX) 활성은 Fu등에 의한 실험 방법에 준하여 측정 하였다. (3) 즉, thromboxane B₂의 생성능을 측정하기 위해 배지를 제거한 cell에 과량의 arachidonate (30 μM, Sigma)가 함유된 PBS를 가하여 10분간 배양하였다. 배지를 취하여 생성된 TXB₂의 양을 RIA로 정량하여 COX의 활성으로 하였다.

4. Metabolic labeling 과 cyclooxygenase의 Immunoprecipitation

6-well tissue culture plate (Falcon)에 2×10⁶/2ml/well의 cell을 seed하고 약물이 처리된 RPMI 배지에서 일정 시간 동안 배양하였다. PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 후, 약물이 함유된 Methionine free DMEM (GIBCO)으로 갈아주었다. 여기에 [³⁵S]-methionine(ICN) 100μCi가 함유된 배지 100μl를 가한 후 37°C에서 4시간 더 배양하였다. Cold PBS로 3회 washing하고 solubilization buffer를 200μl씩 가한 후 sonication에 의해 cell을 solubilize시켰다. Solubilization buffer의 조성은 다음과 같다. : 50mM Tris(pH 7.4), 1% Tween 20, 10mM EDTA, 1mM EGTA, 10μM Leupeptin, 1mM Phenylmethyl Sulfonylfluoride Solubilized cell suspension을 10,000rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리한 후 얻은 상층액의 10μl를 취해 radioactivity를 측정하고 동일한 radioactivity를 갖도록 aliquot을 취하여 4°C에서 preimmune rabbit serum과 1시간, protein A-bead과 1시간 동안 반응시키고 원심 분리하여 상층만 취함으로써 nonspecific binding이 가능한 물질을 미리 제거시켰다. Cyclooxygenase antibody를 2μl씩 가해 immunoprecipitation시키고 SDS-polyacrylamide gel상에서 전기 영동한 후 Gel을 30% methanol과 10% acetic acid용액에서 1시간 동안 처리하여protein을 fixation시킨 후 Enhance(NEN)로 1시간 동안 처리한다. Gel dryer에서 gel을 건조한 후 -70°C에서 X-ray film에 일정 시간 동안 노출시킨 후 현상하여 새로이 합성된 cyclooxygenase의 지표로 하였다.

5. 통계 처리

모든 data는 mean ± SE로 나타내었으며, student's t-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

LPS는 gram 음성균 세포벽의 주성분으로 세균 감염시 병리학적 제증상을 발현하는 주원인 물질로 알려져 있다. LPS는 lipid A와 polysaccharide 부분으로 크게 나뉘며, 이중 lipid A는 LPS의 생리활성의 많은 부분을 대변해주고 있는 것으로 알려져 있다. (9,10) LPS는 표적 세포에 작용하여 다양한 생리, 생화학적 반응을 일으키며 특히, macrophage로부터 다양한 생리 활성 mediators의 생성을 유도함으로써 면역 기능의 변화, 세포 괴사, 염증 반응 또는 endotoxic shock등 다양한 반응을 일으키게 된다. (11) LPS에 의하여 유도되는 반응중 prostaglandin의 합성 증가에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있으며, 최근에는 rat alveolar macrophage에서 cyclooxygenase의 발현을 선택적으로 증가 시킴으로써 prostaglandin 합성이 증진됨이 보고된 바 있다. (4) 본 연구에서는 이러한 LPS의 prostaglandin 합성 증진 작용 특성을 mouse peritoneal macrophage에서 검토함으로써, 항염증제 개발을 위한 검색법으로서의 이용 가능성을 확인코자 하였다. LPS는 본 연구자 및 기타 보고에 따라 10 µg/ml의 농도에서 최대 효과를 보이고 있음이 이미 확인되어 있었으므로 본 연구에서는 시간별 반응 곡선만을 검토하였다. LPS는 여러 보고에 의하면, 표적 세포에 작용 후 급격하게 arachidonic acid 대사를 촉진하며 이 작용은 약 30분 경과 후에는 plateau에 달한다고 알려져 있다. 이 작용은 주로 Phospholipase A₂의 활성화에 기인하는 것으로 추정되고 있으나 (12) rat alveolar macrophage를 대상으로한 저자등의 결과에 의하면, 본 실험 조건하에서, 이러한 arachidonic acid대사 증가는 그다지 뚜렷하지 않음을 확인된 바 있다 (13) 이와는 달리 LPS를 장시간 처리한 경우, 통상 4-6 시간 정도의 lag time을 가진 후 폭발적인 prostaglandin합성 증가가 관찰되고 있는데, 본 연구에서도, 약 8 시간 정도의 lag time 후, 급격한 증가 현상을 확인할 수 있었다. (Fig. 1) 이러한 증가 양상은, cyclooxygenase 활성화의 증가와 거의 일치하는 경향을 보였다. (Fig. 2) 또한, 강력한 항염증제인 dexamethasone 처리에 의해 prostaglandin 합성이 현저히 억제되어 rat alveolar macrophage에서와 동일한 결과를 얻었다. (4,13) (Fig. 3) 이러한 결과는 LPS에 의한 prostaglandin 합성의 증가는 cyclooxygenase-2의 de novo synthesis 증가에 기인하며, dexamethasone은 LPS에 의한 cyclooxygenase-2의 발현을 선택적으로 억제한다는 이전의 보고와 일치하고 있으며 (4) 이는 본 연구에서 행한 metabolic labeling을 통해서도 재확인 할 수 있었다. (Fig. 4) Meade등은 기존의 비 스테로이드성 항염증제의 COX-1, COX-2에 대한 선택성을 검토하여 Indomethacin, aspirin 등은 COX-1에, 6-methoxy-2-naphthyl acetic acid는 COX-2에 비교적 선택적으로 작용하며, propionic acid 유도체인 flurbiprofen 및 ibuprofen은 선택성이 없는 것으로 보고한 바 있다. (14) 본 실험 조건하에서 propionic acid 유도체인 ketoprofen을 이용하여 단시간 (3 시간) 및 장시간 (16 시간) 처리한 경우의 prostaglandin 합성 억제 작용을 검토한 결과 (Fig. 5), 단시간 처리의 경우 비교적 강한 억제 활성을 보이는 반면 (40 -50% 억제), 장시간 처리에 의해서는 상대적으로

억제 정도가 그리 강하지 못하였다. 이러한 결과는 장시간 처리시 주로 COX-2가 발현되며, 단시간 처리시에는 주로 COX-1이 작용한다는 사실을 고려할때, ketoprofen은 COX-1에 더 선택적으로 작용할 가능성을 제시하고 있다.

본 실험 결과, mouse peritoneal macrophage는 PKC activator에 대한 반응성이 상이함에도 불구하고 (15) LPS에 의한 prostaglandin 합성 증가 특성에 있어, rat alveolar macrophage와 정성적으로 동일함을 확인 할수 있었으며, arachidonic acid 대사 증진 작용은 cyclooxygenase-2의 발현을 증가시키는데에 기인하는 것으로 관찰되어, cyclooxygenase-2에 대한 선택적 저해제 개발을 위한 model screening system으로 이용 가능할 것으로 확인 되었다.

Abstract

It is well known that bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulates prostaglandin synthesis in various experimental system via enhancing the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2). This study was designed to characterize LPS-induced prostaglandin synthesis in mouse peritoneal macrophages. LPS-stimulated prostaglandin synthesis in macrophages with short term exposure was not so much prominent, but there was a burst in prostaglandin synthesis 8 hours after the LPS treatment and this was accompanied with the increase of cyclooxygenase activity. Dexamethasone markedly inhibited prostaglandin synthesis in this system. Metabolic labeling data supported above observations and thus, it could be concluded that LPS induces the de novo synthesis of COX-2 by which it stimulates the prostaglandin synthesis in mouse peritoneal macrophages. These data suggested that this experimental model system could be used for the screening procedure of COX-2 selective inhibitors. Ketoprofen, a non steroidal antiinflammatory agent, appeared to inhibit COX-1 relatively more selectively than COX-2.

참고 문헌

1. Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison, a.R. and Lefkowitz J.B. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 69, 1986.
2. O'Sullivan M.G., Huggins, E.M. and McCall C.E. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **191**, 1294, 1993
3. Fu J.Y., Masferrer J.F., Seibert K., Raz A. and Needleman P. *J. Biol. Chem.* **265**, 16737, 1990.
4. Lee S.H., Soyoola E., Chanmugam P., Hart S., Sun W., Zhong H., Liou S., Simmons D. and Hwang D. *J. Biol. Chem.* **267**, 25934, 1992.
5. Wu K.K., Hatzakis H., Lo S.S., Seong D., Sandjua K. and Tai H.H. *J. Biol. Chem.* **263**, 19043, 1988.
6. Kujubu D.A. and Herschman H.R. *J. Biol. Chem.* **267**, 7991, 1992.
7. Vane J. *Nature* **367**, 215, 1994.
8. Simmons D.L., Xie W., Evett G., Merrill J., Robertson D.L. and Bradshaw W.S. *J. Lipid Mediators* **6**, 113, 1993.
9. Morrison D.C. and Ryan J.L. *Ann. Rev. Med.* **38**, 417, 1987.
10. Raetz C.R.H., Ulevitch R.J., Wright S.D., Sibley C.H., Ding A. and Nathan C.F. *FASEB J.* **5**, 2652, 1991.
11. Nathan C.F. *J. Clin. Invest.* **79**, 319, 1987.
12. Wang J., Kester, M. and Dunn M.J. *Biochim. Biophys. Acta* **963**, 429, 1988
13. Lee S.H., Lim J.S., D.H. Hwang and Moon C.K., *Kor. J. Food Hygiene* **8**, 181, 1993.
14. Meade E. and DeWitt D.L. *J. Biol. Chem.* **268**, 6610, 1993.
15. Marc P.G., McNish R.W., Brieland J.K. and Fantonr J.C. *J. Immunol.* **144**, 4320, 1990.

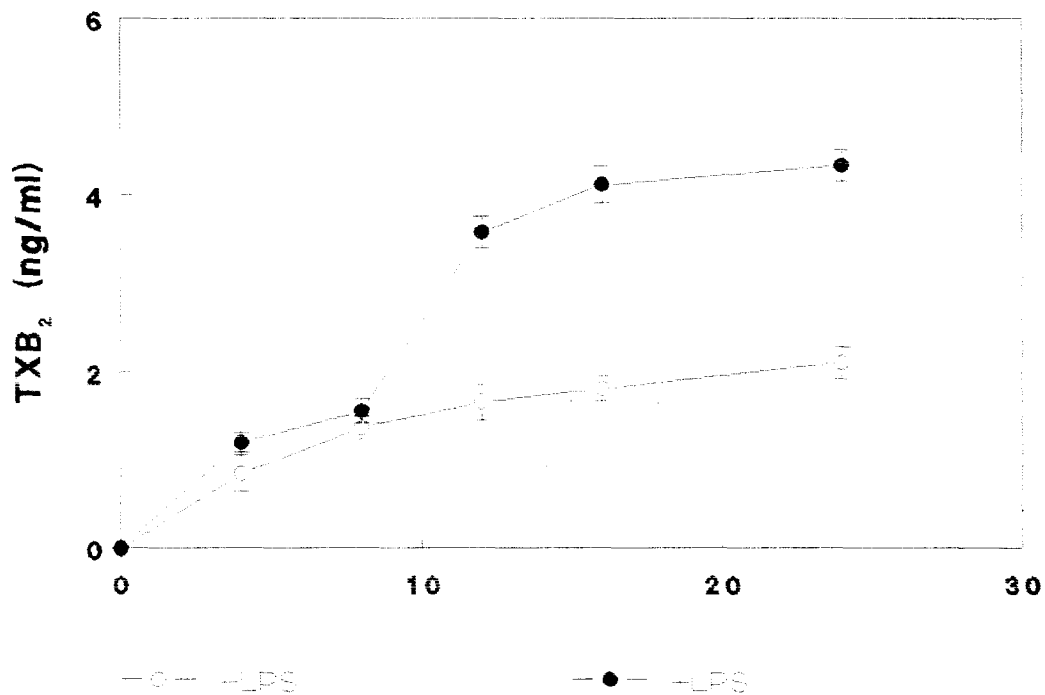


Fig. 1. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on TXB₂ synthesis in mice peritoneal macrophages
 Macrophages were incubated with or without LPS (10 µg/ml) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and TXB₂ were quantified by radioimmunoassay.

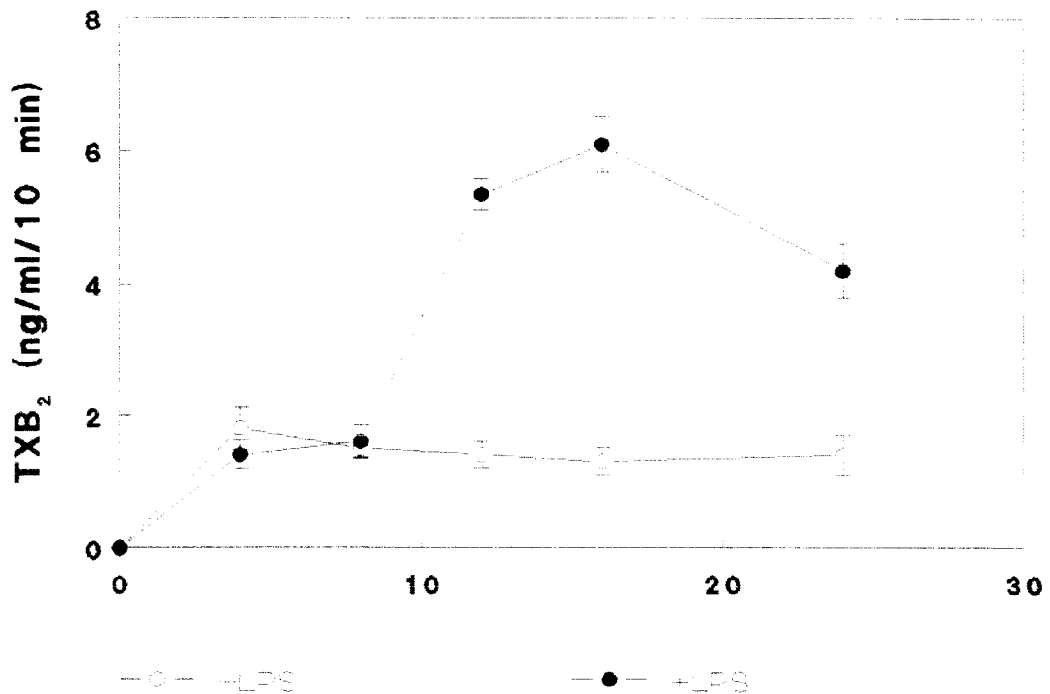


Fig. 2. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the activity of cyclooxygenase in mice peritoneal macrophages
 Macrophages were incubated with or without LPS (10 µg/ml) for indicated time. Cells were then incubated with 30 µM of arachidonic acid for 10 minutes and TXB₂ were quantified by radioimmunoassay.

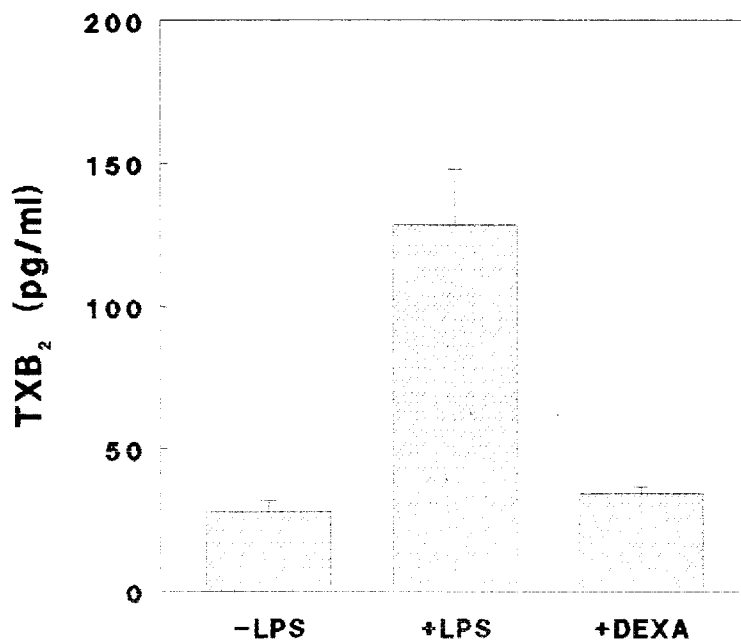


Fig. 3. The effect of dexamethasone (DEX) on LPS-induced TXB₂ synthesis in mice peritoneal macrophages

Macrophages were incubated with dexamethasone (DEX) in the presence of LPS (10 μ g/ml) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and TXB₂ were quantified by radioimmunoassay.

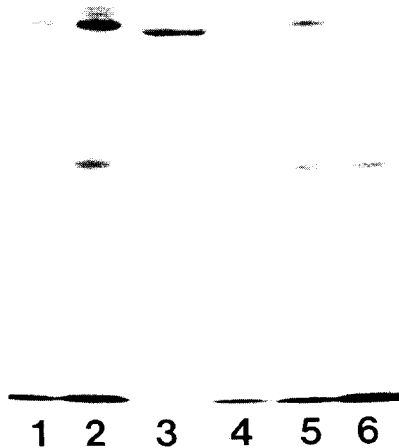


Fig. 4. The Effect of LPS on the de novo synthesis of cyclooxygenase in mice peritoneal macrophages

Macrophages were treated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 hrs and washed twice with cold PBS (PH 7.4) and incubated for another 4 hrs in the methionine free DMEM containing 100 μCi of [^{35}S]-methionine. Then cells were washed three times with PBS and solubilized with 1% tween 20. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-COX-2 antibody and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Resulting gel was fluorographed, exposed to XAR-5 film and developed. Lane 1: -LPS; lane 2: +LPS; lane 3: ^3H -acetylated COX; lane 4: actinomycin D; lane 5: dexamethasone; lane 6: cold inhibition.

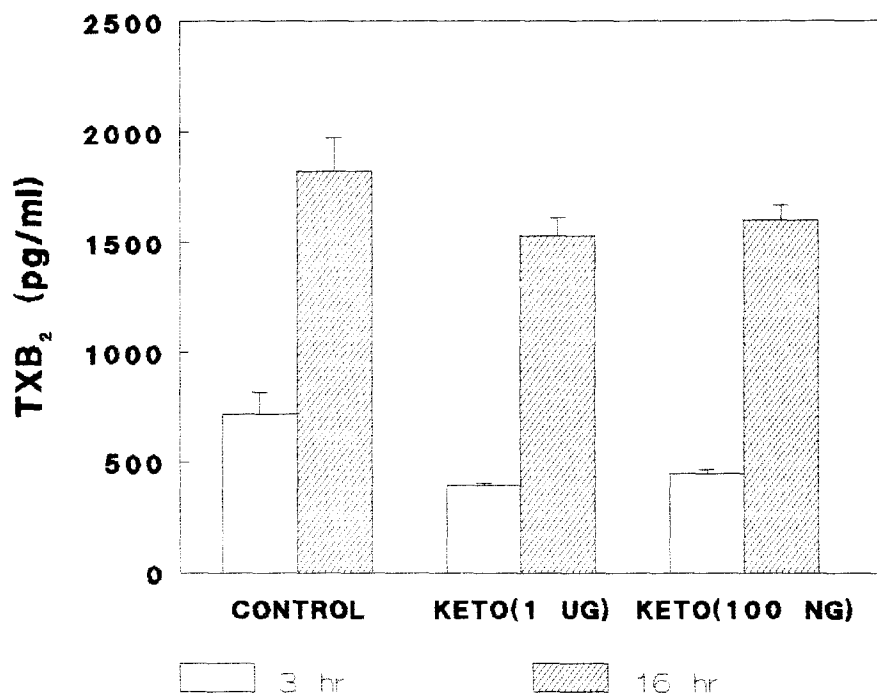


Fig. 5. The effect of ketoprofen (KETO) on LPS-induced TXB₂ synthesis in mice peritoneal macrophages

Macrophages were incubated with keto[rofen (KETO, 1 μ g/ml, 100 ng/ml) in the presence of LPS (10 μ g/ml) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and TXB₂ were quantified by radioimmunoassay.