

비스테로이드성 항염증제에 의한 사람 백혈구 Cathepsin G의 효소 활성도 억제

고신대학 의학부 약리학 교실

배성준, 김우미, 강구일

Inhibition of Activities of Human Neutrophil Cathepsin G by NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)

Sung Jun Bae, Woo Mi Kim, Kooil Kang

*Department of Pharmacology
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

Human leukocyte cathepsin-Gs are active participant in the active phase of inflammations like rheumatoid arthritis, emphysema and glomerular injury. Inhibition effects of human leukocyte cathepsin-Gs by non-steroidal anti-inflammatory drugs were various. Among them, especially, sulindac, salicylate, phenylbutazone, oxyphenbutazone, and salicylic acid inhibited human leukocyte cathepsin-Gs effectively. IC₅₀s of each drug were 8.3mM, 14.3mM, 6.5mM, 11mM, and 15mM respectively. The drugs which have same chemical structure and same degree of inhibition effect on cyclooxygenase showed different degree or no effect on inhibition of cathepsin G. These different inhibition effects may be, beside of inhibition of cyclooxygenase in the prostaglandin synthesis pathway, another possible mechanism of antiinflammatory effect of NSAIDs and the effect could be a direct protection of tissue destruction in inflammatory diseases.

Key Words : PMN, Protease, Cathepsin G, NSAIDs

서 론

염증 반응시 인체 내에 침투된 병원체를 사멸시키는 일련의 과정에서 주 작용을 나타내는 사람 백혈구 cathepsin G¹⁰⁾는 비정상적으로 그 효소 활성도가 증가된 상태에서는 이 효소의 과다한 작용에 의해서 인체 정상 조직의 파괴가 야기되어 류마티스 관절염^{2, 17, 22, 24, 27)}를 비롯한 많은 염증성 질병이 야기될 수 있다고 알려져왔다^{9, 20, 29)}. 이러한 염증의 치료에는 비스테로이드성 항염증제(NSADs)^{6, 7)}가 흔히 이용되고 있으며, 그 작용 기전은 현재까지 cyclooxygenase를 억제함으로써 prostaglandin의 합성, 분비를 방해하여 항염증 작용을 나타낸다고 알려져 있다. 그러나, 이외에도 이러한 비스테로이드성 항염증제는 조직 파괴의 원인이 될 수 있는 cathepsin G의 효소 활성도를 직접 억제할 가능성 또한 있을 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 cathepsin G를 Ultrogel AcA54 gel filtration, CM-Sephadex ion-exchange chromatography의 두 단계 분리법을 이용하여 순수히 분리하고 상기한 비스테로이드성 항염증제(NSADs)를 이용하여 cathepsin G의 효소 활성도에 미치는 영향을 관찰한 바, prostaglandin 억제 기전과는 별도로 cathepsin G의 효소 활성도 증가에 의한 조직 파괴를 방어할 가능성을 관찰하여 이에 비스테로이드성 항염증제(NSADs)의 새로운 치료기전의 가능성을 산출해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Ultrogel AcA54는 LKB사, CM-Sephadex C-25는 Pharmacia사, L-Benzoyl-D-L-Phenylalanine P-Naphthylamine(BPNE), N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide(SAPNA), Fast Garnet GBC Base, Brij 35, N-Succinyl-L-Ala-Ala-L-Alanine p-Nitroanilide(SANA), 그리고 NSAIDs(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)는 Sigma사,

Spectrapore dialysis membrane은 Spectramedical사, YMS concentration membrane은 Amicon사 제품을 사용하였다. 그리고 기타 모든 시약은 특급을 이용하였다.

2. 방법

1) Cathepsin G의 분리

이전의 본 교실에서 이용한 방법¹¹⁾에 따라 Ultrogel AcA54 gel filtration과 CM-Sephadex ion exchange chromatography를 통하여 cathepsin G를 분리하였고 전기영동법과 cathepsin G에 대한 항체를 이용한 Ouchterlony 면역 확산법을 통해 그 분리 정도를 확인하였다.

2) 비스테로이드성 항염증제에 의한 cathepsin G의 활성도 억제시험

150mM NaCl, 12.5%의 DMSO로 조절된 100mM의 Tris-Cl(pH 7.3)에 210ng의 cathepsin G를 첨가한 후 10 μ l의 비스테로이드성 항염증제를 다양한 농도로 가하여 37℃에서 30분간 방치하였고, SAPNA를 최종 농도 1mM이 되도록 가하여 37℃에서 50분간 incubation한 후 유리된 nitroanilide의 양을 410nm에서 흡광도를 읽어 cathepsin G의 효소 활성도를 측정하였다.

결 과

12개의 비스테로이드성 항염증제와 1개의 salicylate metabolite를 선택하여 순수 분리된 cathepsin G의 효소 활성도에 미치는 영향을 관찰한 바, arylalkanoic acid 계열의 ibuprofen은 5.4mM 농도에서 human leukocyte cathepsin G의 효소 활성도를 48.1% 억제 한 반면 ketoprofen과 naproxen은 혈중 농도의 10배에 해당하는 양에서도 cathepsin G의 효소 활성도에 큰 영향을 미치지 못하였다. Talmetin과 indole 유도체 계열의 indomethacin, p-aminophenol 계열의 phenacetin 그리고 비스테로이드성 항염증제 중에서 가장 흔히 사용되고 있는 aspirin 역시 cathepsin G의 효소 활성도에 큰 영향을 주지 못했다

(Fig 1, Fig 4) 반면에 pyrazolone 계열의 비스테로이드성 항염증제는 Fig 3에서 보이는 바와 같이 phenylbutazone은 6.5mM농도에서 cathepsin G의 효소 활성도를 50% 억제했으며 oxyphenbutazone은 11mM과 22mM에서 각각 사람 백혈구 Cathepsin G를 50%, 99% 억제했다. Sulindac과 salicylate, 그리고 그 대사 산물인 salicylunc acid의 IC₅₀은 각각 8.3mM, 14.3mM, 15mM이었으며 (Fig.1, Fig 4) sulindac은 18mM에서, 그리고 salicylate는 23.2mM 농도에서 90℃ 이상의 cathepsin G 효소 활성도를 억제했다. p-Aminophenol 계열의 zomepirac sodium은 0.5mM 농도에서 cathepsin G의 효소활성도를 18.6% 억제하였으며, 그 이상의 농도에서

도 같은 정도의 억제 경향을 나타냈다. 각각의 약에 대한 IC₅₀은 Table 1과 같다.

고 찰

비스테로이드성 항염증제는 조직의 화농성 염증의 치료 뿐만 아니라 류마티스 관절염을 포함한 비화농성 염증의 치료를 위해서도 흔히 이용된다.^{6,13)} 이를 비스테로이드성 항염증제는 joint synovitis의 통증, 염증을 완화시킬 뿐만 아니라 관절연골의 항상성에도 도움을 준다.¹⁴⁾ 이들 약의 항염증 작용은 cyclooxygenase를 억제하여 prostaglandin의 합성, 분비를 방해함으로 이루어진다고 알려져 있지만^{6,7)}, 이 기전외에 human leukocyte cathepsin G를 억제하여 조직의 직접 파괴를 저해시

Table 1. IC₅₀ of Various NSAIDs on Human Leukocyte Cathepsin G Activity

DRUG(NSAIDs)	IC ₅₀ (mM)
<u>Arylalkanoic acid derivatives</u>	
Ibuprofen	NA
ketoprofen	NA
Naproxen	NA
<u>Pyrazolone derivatives</u>	
Phenylbutazone	6.5
Oxyphenbutazone	11
<u>Indol derivatives</u>	
Indomethacien	NA
Sulindac	8.3
<u>Salicylates</u>	
Acetylsalicyic acid	NA
Salicylic acid	14.3
<u>Salicylate like antipyretic analgesics</u>	
Phenacetin	NA
Zomepirac sodium	NA
<u>Others</u>	
Tolmetin	NA
Salicylunc acid	15

NA Not Available

킴으로써 항염증 작용이 이루어질 가능성이 보여졌다¹³⁾. 이들 약물에 의한 cathepsin G의 효소 활성도 억제에 대하여는 Table 1에 표시한 바와 같으며, 이중 phenylbutazone 이 6.5mM의 IC₅₀로 가장 강력한 억제작용을 보였다. 그외, phenylbutazone 이 6.5mM의 IC₅₀로 가장 강력한 억제작용을 보였다. 그외, salicylate, sulindac, oxyphenbutazone, salicyluric acid도 그 차례순으로 강한 억제 경향을 보였다. 이들 약은 모두 혈중 농도의 10 배를 넘는 많은 양에서 cathepsin G의 효소 활성도를 억제했으나, 질병이 진행되고 있는 부위에서의 약물의 농도는 혈중 농도보다 높게 유지되어 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾. Pyrazolone 계열의 비스테로이드성 항염증제인 phenylbutazone과 oxyphenbutazone은 cathepsin G의 substrate인 SAPNA와 경쟁적으로 이 효소에 결합하는 것으로 보고되고 있으며¹³⁾, salicylate 계열의 NSAIDs의 경우에 있어서는 Fig.1에서 보이는 바와 같이 salicylate가 강한 억제작용을 보임에 비해서 aspirin 즉, acetylsalicylic acid는 거의 효과가

없음을 볼 수 있다. 이는 Fig.2의 1과 같이 cathepsin G의 active catalytic site에 salicylate의 벤젠 고리의 2번째 자리에 있는 hydroxyl group이 효과적으로 작용하는데 반해서 aspirin은 이 자리가 acetylation이 되어 있으므로 serine protease 분자 내의 active site에 대해 동일한 역할을 수행할 가능성이 있는 hydroxyl group이 봉쇄되었으므로 효과적인 효소 활성도 억제가 되지 않을 것으로 사료된다 (Fig.2의 2). 그리고, salicylate나 acetylsalicylic acid의 활성 대사 산물인 salicyluric acid 역시 Fig.2의 3과 같이 벤젠 고리의 2번째 자리에 hydroxyl group이 존재하기 때문에 cathepsin G의 활성도에 대해 억제 효과를 보일 것으로 생각된다. 비록 aspirin이 in vitro 실험상 cathepsin G에 대해 억제 효과가 없기는 하나 최근의 보고에서^{32,4)}처럼 aspirin이 체 내에서 급속히 salicylate로 변화할 수 있고 salicyluric acid가 aspirin의 활성 대사체라는 점을 감안하면 실제로의 임상적 적용에는 aspirin을 사용하더라도 동일한 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 한편, sulindac의

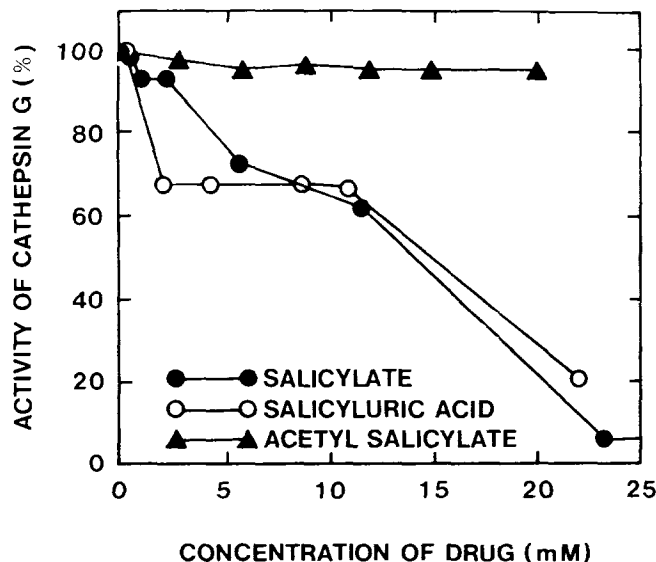


Fig. 1. Effects of salicylates on activity of human leukocyte cathepsin G

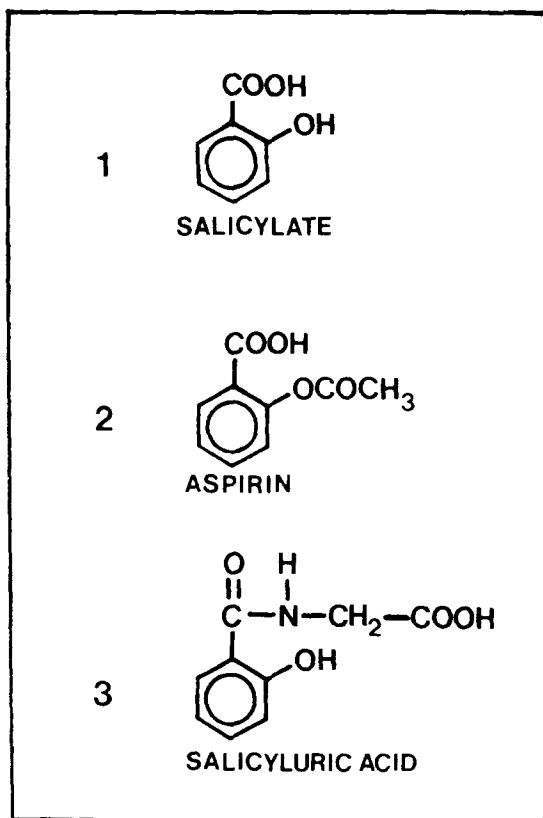


Fig. 2. Structure of salicylates

분자 반응 기전에 있어서는 그 기능 그룹의 다양성 때문에 cathepsin G와의 실제 분자적 응집 또는 결합이 어떻게 이루어지는 가는 알기가 어렵다.

임상적 적용에 있어서, cathepsin G에 대해 억제 효과가 크게 나타나는 이들 비스테로이드성 항염증제는 류마티스 관절염을 비롯한 cathepsin G와 관련되어 발생하는 여러 질환의 치료에 있어서 직접적인 효소 억제 작용이 그 작용 기전의 하나로 생각된다. 류마티스 관절염은 생리 pH에서 다핵 백혈구로부터 분비되는 cationic protease에 의해서 발생하며¹⁷⁾ elastase와 cathepsin G는 이들 cationic protease의 거의 대부분을 차지하고 있다¹⁾. Cathepsin G와 elastase는 proteoglycan과 collagen을 직접적으로 파괴시킴으로써 관절연골의 파괴와 pannus 형성이 발생하여 류마티스 관절염이 이루어진다고 보고되었다.^{2, 7)} 따라서 비스테로이드성 항염증제는 이러한 관절연골의 파괴에 중요한 역할을 하는 cathepsin G의 활성도를 억제함으로써 류마티스 관절염 치료에 있어서의 항염증 작용에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

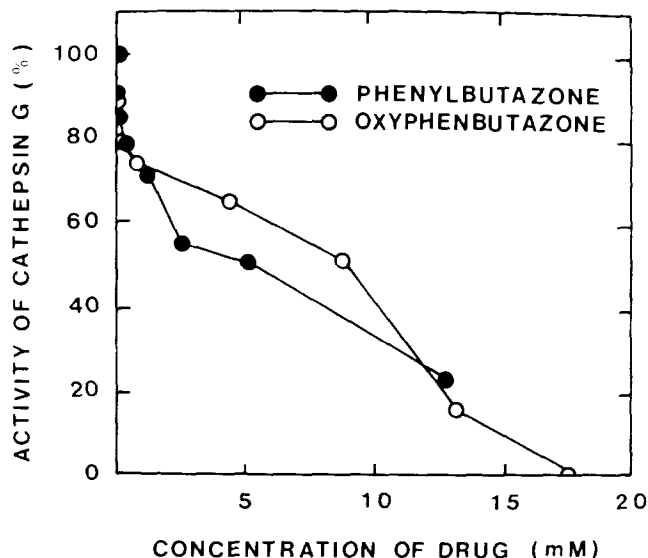


Fig. 3. Effects of pyrazoline derivatives on activity of human leukocyte cathepsin G

이상의 연구 보고에서, human leukocyte cathepsin G의 효소 활성도 억제에 따른 비스테로이드성 항염증제의 항염증 작용은 cyclooxygenase의 억제에 의한 prostaglandin 합성 및 분비의 억제 기전 이외에 조직 파괴에 직접 작용하는 neutral protease인 cathepsin G의 효소 활성도를 억제함으로써 이 효소에 의한 조직 파괴를 감소시켜주어 염증성 질환의 치료에 직접적인 효과를 주는 새로운 기전으로 제안한다. 부가적으로, cathepsin G의 효소 활성도에 대해 억제효과가 있는 비스테로이드성 항염증제는 다음과 같은 질병과 함께 동반된 염증의 치료에 도움이 될 가능성을 가질 수 있을 것으로 사료된다. 즉, pH 7.3에서 7.5사이에서 cathepsin G에 의해 angiotensinogen과 angiotensin I이 직접적으로 angiotensin II로 전환되거나^{12, 20, 28}), 혹은 prorein이 활성화되어⁵) 야기된 angiotensionogen converting enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase) inhibitor인 captopril로 치료되지 않는 고혈압의 치료에도 도움이 될 수 있는 가능성을 가진다. 또한 myelocytic leukemia를 비롯하여 백혈구가 증가된 질환에서의 출혈성 증세를 조절하는데

도 한 몫을 할 수 있을 것으로 사료된다. 이를 출혈성 증세는 증가된 백혈구로부터 분비된 cathepsin G가 혈소판 응고 작용과 5-hydroxytryptamine 분비를 방해하며²⁵) prothrombin의 Phe⁴¹-Trp⁴² 사이의 결합을 끊음으로써 이루어질 수 있다고 알려져 있다²⁹). 그러나 이러한 출혈성 질환의 치료에 있어서, salicylate 계열의 약들은 약 자체의 출혈성 부작용이 존재함으로 선택에 있어서 고려해야 할 점 또한 많을 것으로 사료된다. 비스테로이드성 항염증제는 또한 cathepsin G에 의해서 phospholipase C가 활성화되어 Ca의 투과율이 증가됨으로써 endothelium의 방어막 작용의 특성이 약해지거나^{33, 34}). 혹은 cathepsin G에 의해 gap의 크기가 증가됨으로써²³). albumin의 flux가 증가되어 발생할 수 있는 pulmonary edema, cathepsin G의 proteolytic activity에 의해서 사구체 투과율이 증가되어 야기된 glomerular injury⁹), elastase와의 상보 작용에 의해 유발될 수 있는 lung emphysema^{14, 26}) 등을 비롯한 cathepsin G와 관련되어 발생하는 여러가지 질병의 치료, 예방에도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

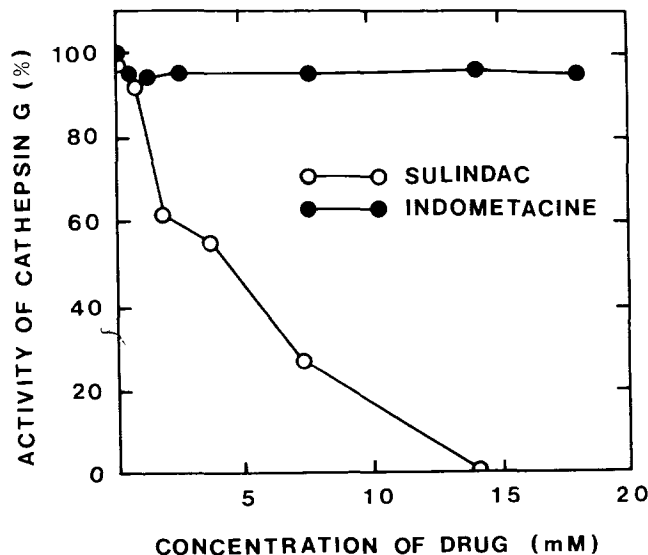


Fig. 4. Effects of indol derivatives on activity of human leukocyte cathepsin G

REFERENCES

1. Baggiolini M, Schnyder J, Bretz U, Dewald B, Ruch W: Cellular mechanisms of proteinase release from inflammatory cells and the degradation of extracellular proteins. *Ciba found Symp* 75:105, 1979.
2. Barrett AJ: Capacity of leukocyte elastase and cathepsin G to degrade mature collagen fibers. In: *Neutral Proteinase of human PMN Leukocyte* Havemann K, Jonoff A eds., Baltimore-Munich, Urban & Schwarzenberg, 1978, pp 385-389
3. Cleland LG, Lowthian PJ, Imhoff D, Bochner F, O'callghan J: Plasma and synovial fluid gentisate in patients receiving salicylate therapy. *J Rheumatol* 12:136, 1985
4. Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U, Baggiolini M: Subcellular localization and heterogeneity of neutral protease in neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *J Exp med* 141:709, 1975
5. Dzau VJ, Gonzalez D, Kaempfer C, Dubin D, Wintroub BU: Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin. *Circ Res* 60:595, 1987
6. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F: *The pharmacological basis of therapeutics*. 7th ed New York, Macmillan Publishing Co., 1985, pp 674-715
7. Goth A: *Medical pharmacology*, 11th ed. St Louis, Mosby Co., 1984, pp 367-368, 560
8. Golub LM, McNamara TF, Dangelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS: Non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 66:1310, 1987
9. Johnson RJ, Couser WG, Alpers CE, Vissers M, Schulze M, Klebanoff SJ: The human neutrophil serine proteinases, elastase and cathepsin G, can mediate glomerular injury in vivo. *J Exp med* 168:1169, 1988
10. Kang K: The role of neutral proteinases in cellular invasion. *Molecular Biology News* 2:29, 1990.
11. Kang, Jeong HY, Ghim S-Y: Simultaneous separation of pure neutrophils and lymphocytes from normal blood by step gradient centrifugation. *Korean J Immunol* 9:27, 1987
12. Klickstein LB, Kaempfer CE, Wintroub BU: The granulocyte angiotensin system. Angiotensin I converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem* 257:15042, 1982
13. Lentini A, Ternai B, Ghosh P: Synthetic inhibitors of human granulocyte elastase, part 4. Inhibition of human granulocyte elastase and cathepsin G by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Biochem International* 15:1069, 1987
14. Lucey EC, Stone PJ, Breuer R, Christensen TG, Calore JD, Cataanese A, Franzblau C, Snider GL: Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamster, with in vitro observations on elastolysis by these enzymes. *Am Rev Respir Dis* 132:362, 1985
15. Ludwig RR, Bretz U, Baggiolini M: Cathepsin G: The chymotrypsin like enzyme of human polymorphonuclear

- leukocytes. In:Neutral proteinase of human PNM Leukocyte. havemann K, Janoff A eds. Baltimore-Munich, Urban & Schwarzenberg, 1978, pp 138-149
16. Odeberg H, Olsson I:Antibacterial activity of cationic proteinases from human granulocyte. J Clin Invest 56:1118, 1975
17. Oronsky AL, Buermann CW: Granulocyte neutral proteinases in a rheumatoid arthritis, In:Neutral Proteinase of human PMN Leukocyte. Havemann K, Janoff A eds, Baltimore-Munich, Urban & Schwarzenberg,m 1978, pp 361-371
18. Petrerson MW, Gruenhaupt D, Shasby DM.Neutrophil cathepsin G increase calciium flux and inositol polyphosphate produotion in cultured endothelial cells. J Immunol 143:609, 1989
19. Peterson MW:Neutrophil cathepsin G increase transendothelial albumin flux. J Lab Clin Med 113:297, 1989
20. Reilly CF, Tewskbury DA, Schechter NM, Travis J:Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. J Biol Chem 257:8619, 1982.
21. Rest RF, Fisher SH, Ingham ZZ, Jones JF:Interaction of Neisseria gonorrhoeae with human neutrophils; effect of serum and gonococcal opacity on phagocyte killing and chemiluminescence. Infec Immun 36:737, 1982
22. Robbins SL, Cotran RS, Kumar VK:Pathologic basis of disease. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunder Co., 1984, pp 49-51
23. Rochar T, Casale J, Hunninghake GW, Perterson MW:Nutrophil cathepsin G increases permeability of cultural type II pneumocytes. Am J Physiol 255 : - 603, 1988
24. Saklatvala J, Barrett AJ:Identification of protease in the rheumatoid synovium; determination of leukocyte elastase and cathepsin G and another serine proteinase. Biochem Biophysica Acta 615:167, 1980
25. Selak MA, Chignard M, Smith JB:Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils, Biochem j 251:293, 1988
26. Smylaki M, Davril M, Hayem A:Colum weparation using Bio-Gel P100 for the characterization of the products of human lung elastin degradation by lukocyte elastase and cathepsin G. Biomed Chromatogr 1:27, 1986.
27. Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC:The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. Biochem et Biophys Acta 483:386, 1977
28. Tonnesom MG, Kimpner MS, Austem KF, Wintroub BU:Identification of a human neutrophil angiotensin II generation protease as cathepsin G J Clin Invest 69:25, 1982
29. Turkington PT, Blumsom NI, Elmore DT:The degradation of bovine and human prothrombin by human polymorphonuclear leukocyte cathepsin G. Thromb res 44:339, 1986.