

Tetracycline계 항균제에 의한 사람 호중구 Elastase의 효소 활성도 억제 및 그 작용 기전

고신대학교 의학부 약리학교실

김우미, 장구일

Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Tetracyclines and Possible Mechanism of Action of These Drugs

Woomi Kim, Kooil Kang

Department of Pharmacology

Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

=Abstract=

Human neutrophil elastase, which is known to be a possible mediator in the pathophysiology of connective tissue breakdown, was effectively inhibited by tetracycline, oxytetracycline and demeclocycline. Among them, oxytetracycline showed the most potent inhibitory effect on elastase activity. Tetracycline inhibited human neutrophil elastase non-competitively, however oxytetracycline inhibited human neutrophil elastase competitively. K_i values of tetracycline and oxytetracycline were 4.9mM and 0.39mM, respectively.

De-dimethylaminotetracycline, which showed no antibiotic activity since the active dimethylamino radical was removed from the position #4 of the tetracycline, inhibited the activity of human neutrophil elastase by tetracyclines not depend on the dimethylamino radical which is a critical active site for antibiotic effect, rather it depend on the hydroxyl radical of tetracyclines. The property of inhibiting elastase may be an additional molecular biochemical mechanism of action of these drugs as an inhibitor of tissue destruction at the inflammatory sites.

Key Words : Neutrophil Elastase, Tetracyclines.

서 론

사람의 백혈구 azurophil granule내에 존재하는 elastase(HNE, EC 3, 4, 21, 11)^{8,19)}는 인

체내에 침투된 병원체를 효소학적 작용으로 사멸시킴으로써 항균작용을 수행하며⁹⁾, 혈액내의 α_1 -proteinase inhibitor나 α_2 -macroglobulin과 같은 억제 인자들에 의하여 그 효소

활성도가 조절된다^{7, 10, 28)}. 그러나 이러한 억제 인자들과 효소와의 균형이 깨어진 상태에서 elastase의 효소 활성도가 비정상적으로 증가하게 되면, 이 효소의 과다한 작용이 인체내 정상조직에 대하여 단백 분해반응(proteolytic action)을 야기시킴으로써^{17, 18, 33)}, 폐기종^{6, 13, 21)}, 류마치양 관절염¹²⁾ 등의 비화농성 염증성 질환들을 초래한다고 알려져 왔다^{10, 16)}.

따라서 호중구 elastase에 대하여 그 분자생화학적 성상이나 효소적 특성에 대한 연구가 진행되어 왔으며^{3, 24)}, 이 가운데 특히 효소의 활성도 조절에 대한 연구는 상기 질환들을 치료하는 데에도 중요한 바탕이 되어 왔다. 또한 최근 수년간 연구를 통하여 본 교실에서는 항균제로서 이미 약리기전이 잘 알려진 cefamandole, oxytetracycline, methicillin 등의 약제가 호중구 elastase가 류마치양 관절염을 비롯한 비화농성 염증성 질환들의 주된 병으로 알려지고 있음으로, 이에 대한 연구는 elastase에 의하여 야기되는 질환들의 치료에도 도움이 될 뿐 아니라, tetracycline계 약제가 인체 내에서 항균작용 이외에 새로운 약리작용을 나타낼 수 있다는 가능성을 제시해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

이에 본 연구는 tetracycline과 그 유도체들이 elastase와 어떤 분자적 상호작용을 하는지, 분자 구조에 따른 효소 활성도 저해 형태 및 항균 효과와의 상관성에 대한 실험적 증명을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Ultrogel AcA 54는 LKB사, CM-Sephadex C-25는 Pharmacia사, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilide(SAPNA), N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilide(SAPNA), Oxytetracycline, Tetracycline, Demeclocycline은 Sigma사, Tris, glycine, sodium dodecyl sulfate는 Bio-Rad사 제

품을 사용하였고, de-dimethylaminotetracycline은 본 연구실에서 합성하였으며, 이외의 시약은 모두 특급을 사용하였다.

그리고 투석용 막(Spectrapor dialysis membrane)은 Spectrum medical사 제품을 초여과막(Ultrafiltration membrane)은 Amicon사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) Elastase의 분리

건강한 공여자로부터 채취한 신선전혈을 사용하였으며, Ultrogel AcA 54gel filtration chromatography와 CM-Sephadex ion exchange chromatography를 이용하여 2차 정제된 elastase를 얻었다. 기타 자세한 방법들은 이전의 교실에서 보고한 방법²¹⁾에 따랐으며, 분리된 elastase는 전기 영동법을 이용하여 그 분리정도를 확인한 후, 효소 활성도 억제 실험에 사용하였다.

2) 효소 활성도 억제실험

pH 7.3으로 조절된 반응 용액, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂가 함유된 50mM Tris-Cl 용액 150 μ l(0.37mg/ml)씩 넣고, 억제제로서 oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline, de-dimethylamino tetracycline를 다양한 농도로 첨가한 후, 37°C에서 15분~60분간 평형시킨 다음, 기질인 SANA를 최종적으로 가하여 반응 후 유리된 Nitroanilide의 양을 410nm에서 흡광도를 읽어서 효소 활성도를 측정하였다.

3) Kinetic analysis

억제율(% inhibition) 은 $100 \times [1 - (\text{Vinh} / \text{Vinh}^0)]$ 에 의하여 산출하였으며, 효소활성도 억제형태와 Kinetic parameter를 산출하기 위하여, Lineweaver-Burk plot을 이용하였다^{26, 27)}.

결 과

2단계의 분리법을 거쳐서 얻어진 elastase의 특이 활성도는 $32 \times 10^2 \mu \text{ moles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었으며, 전기 영동으로 그 순도를 확인하

였다.

측쇄 구조가 각기 다른 3종의 tetracycline 계 약제가 호중구 elastase의 효소 활성도에 미치는 영향을 관찰한 바에 의하면(Fig.1),

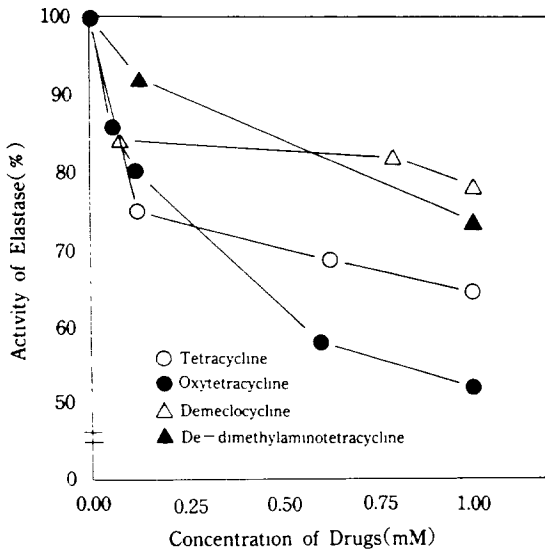


Fig.1. Effects of tetracyclines on activity of human neutrophil elastase

이 실험을 실시한 조건하에서 demeclocycline은 0.6mM의 약물 농도에서 효소 활성도를 18% 억제하였으나, 같은 농도에서 oxytetracycline은 42.1%, tetracycline은 31%의 억제 효과를 나타내었다. 그리고 이 약제들의 효소에 대한 억제작용은 0.1mM 이내에서 강한 억제 효과를 나타내었으며, 그 이후의 약물 농도에서는 대체로 억제 정도가 둔화되었음을 알 수 있다.

Tetracycline의 구조 가운데 항균작용을 나타내는 활성 부위인 dimethylamine기가 elastase의 효소 활성도에 미치는 영향을 알기 위하여, dimethylamino기를 제거시킨 de-dimethylaminotetracycline을 합성하여 효소 활성도 억제 실험에 사용하였으며, 합성 후 변화된 분자 구조와 항균작용이 손실되었음은 이전의 교실 논문에서 따로 보고한 바와

같다²¹. 그리고 de-dimethylaminotetracycline과 중간유도체인 tetracycline-methiodide, tetracycline이 elastase의 효소 활성도에 미치는 영향은 Fig.2에 나타난 바와 같다. De-dimethylaminotetracycline은 1mM미만의 약물 농도에서 elastase의 효소 활성도를 60%이상 억제함으로써 tetracycline과 유사한 억제효과를 나타내었다. 그리고 중간유도체인 tetracycline-methiodide는 elastase의 효소 활성도에 거의 영향을 주지 못하였음을 알 수 있다.

1mM미만의 농도에서 비교적 높은 저해율을 나타낸 oxytetracycline의 억제에 관한 kinetic parameter를 산출하기 위하여 Lineweaver-Burk plot를 시행한 결과, Fig.3에 나타난 바와 같이 경쟁적 저해 양상을 나타내었다. 그리고 이때 K_i 값은 39mM로 산출되었다.

반면에 tetracycline의 경우에는 Fig.4에 나타난 바와 같이 비경쟁적 저해 양상을 보였으며, K_i 값은 4.9mM로 나타났다.

고 찰

본 연구에서 억제제로 사용한 tetracycline 계 항균제의 구조를 살펴보면 Fig.5에 나타난 바와 같이 모두 polycyclic naphacencarboxamide유도체로써 측쇄(side chain)에 hydroxyl기, methyl기, chloride기를 치환, 혹은 제거시킨 상태임을 볼 수 있다. 분자 구조적 차이와 효소 활성도 억제 작용과의 상관성을 보기 위하여 oxytetracycline, demeclocycline이 elastase의 효소 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과, 주된 구조(main structure)는 동일하지만, 측쇄구조가 각기 변화된 이 약제들이 효소 활성도에 대해서도 서로 상이한 억제율을 나타냄을 볼 수 있었다(Fig.1). 그 예로서 6번 위치의 methyl기를 제거하고 7번의 위치의 chloride기를 첨가시킨 구조를 갖고 있는 demeclocycline은 tetracycline보다 낮은 효소 활성도 저해율을 나타내었으며, 5번째 위치의 측쇄에 hydroxyl기

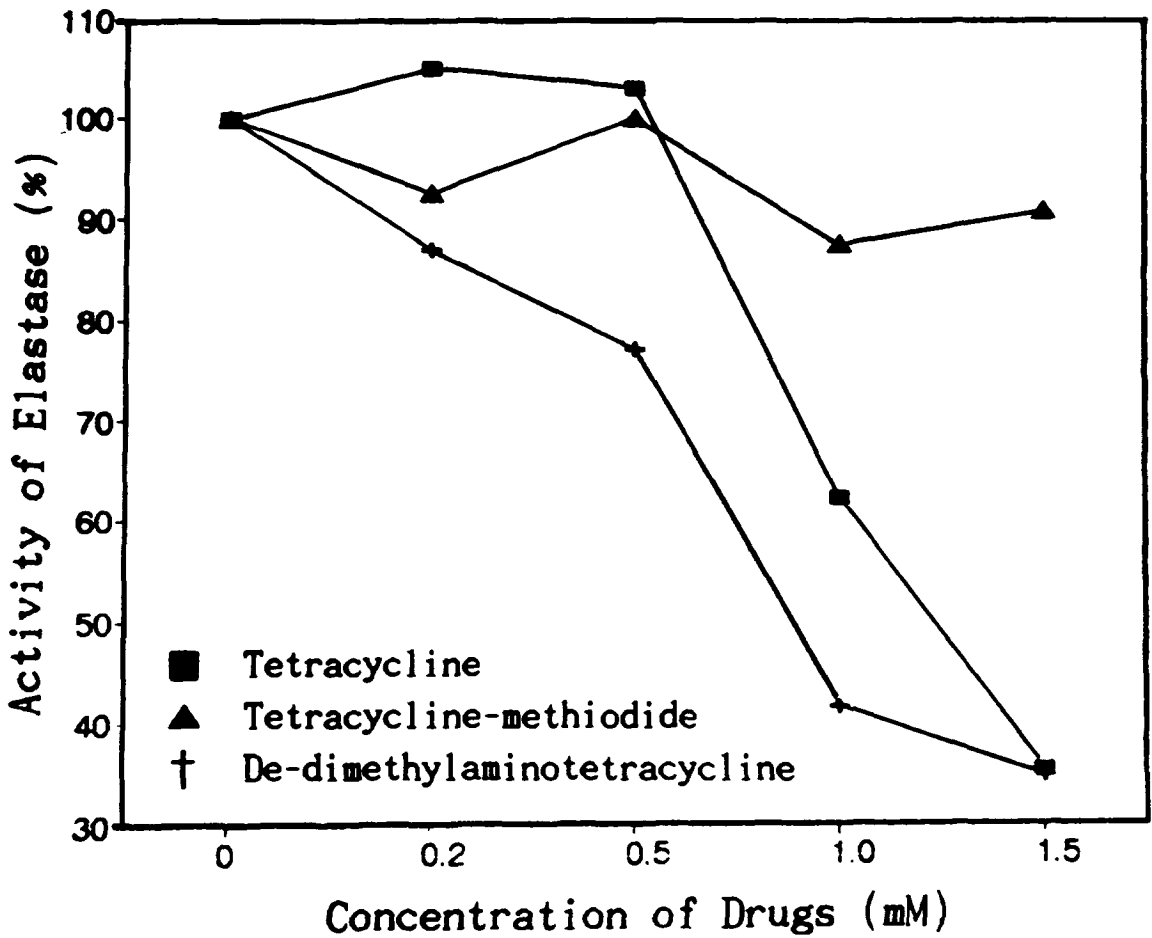


Fig.2. Effects of tetracycline, tetracycline-methiodide, de-dimethylaminotetracycline on activity of human neutrophil elastase

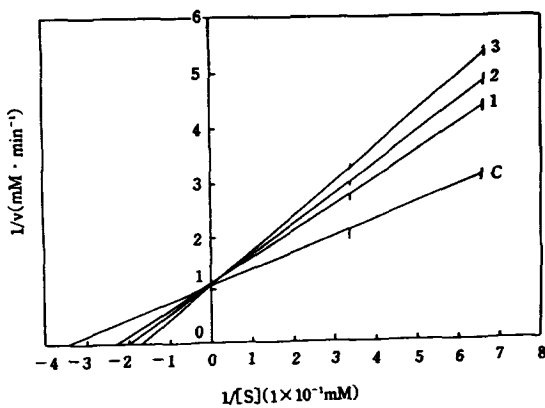


Fig.3. Lineweaver-Burk plot of inhibition of human neutrophil elastase by oxytetracycline. Oxytetracycline concentrations (mM): c=control, 1=0.6, 2=1.2, 3=2.4

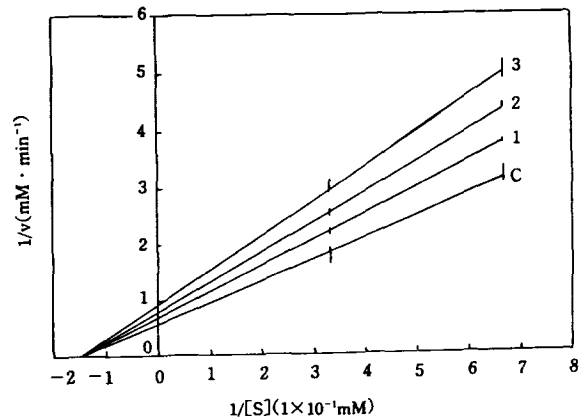


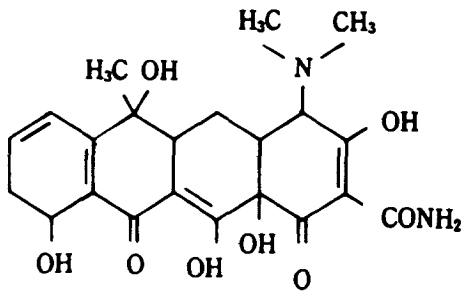
Fig.4. Lineweaver-Burk Plot of inhibition of human neutrophil elastase by tetracycline. Tetracycline concentrations (mM): c=control, 1=1.25, 2=2.5, 3=6.25

가 첨가된 oxytetracycline은 본래의 구조를 갖는 tetracycline보다는 10%가량 더 높은 저해율을 보여 주었음을 들 수 있다. 이는 강한 양성적 전하를 띠는 elastase가 그 효소적 작용을 하는데 있어서, 측쇄구조에 OH^- 기가 첨가됨으로써, 효소와 기질 사이의 작용을 더욱 효과적으로 봉쇄할 수 있다는 가정을 가능하게 하며, 이 가정은 Bae¹¹⁾에서 보여준 바와 같이 cathepsin G의 효소 활성화도가 벤젠 고리에 hydroxyl기가 노출된 salicylate나 salicyluric acid에 의해서는 강력하게 억제되었으나, 이 자리의 hydroxyl기가 아세틸화된 aspirin에 의해서는 억제되지 못하였다는 점에서 cathepsin G의 경우와 유사성을 나타낸다. 특히 tetracycline의 항균작용을 나타내는 활성 부위가 효소에 대한 억제작용을 나타내는데 어떤 영향을 미치는지를 보기 위하여 합성한 de-dimethylaminotetracycline¹⁵⁾은 tetracycline의 A ring에서 C4에 위치한 dimethylamine기를 제거하여 항균작용을 없앤 약물인데, tetracycline의 감수성 균주로 알려진 *U.urealyticum*, *S.aureus*, *E.coli*에 대하여 최소 억제 농도 (MIC)를 측정함으로써 항균작용이 소실되었음을 확인할 수 있었으며, 그 결과는 본 연구실에서 따로 보고한 바와 같다²¹⁾. 이 약물이 elastase의 효소 활성화도에 미치는 영향을 관찰한 결과에 의하면, Fig.2에서 보여주는 바와 같이 tetracycline과 유사한 높은 억제율을 보였음을 알 수 있다. 항균작용을 나타내는 활성부위가 제거됨으로 인해 항균효과는 소실되었으나, elastase의 효소 활성화도에 대한 억제작용은 변화되지 않은 것으로 보아, tetracycline에서 보여준 효소 억제작용은 이미 그 기전이 잘 알려져 있던 항균작용과는 서로 상관성이 없이 독립적인 기전으로 일어나는 약리작용이며, 분자단계에서 볼 때 항균효과를 나타내는 활성부위와 효소활성도 억제효과를 나타내는 부위가 서로 동일하지 않음을 알 수 있다.

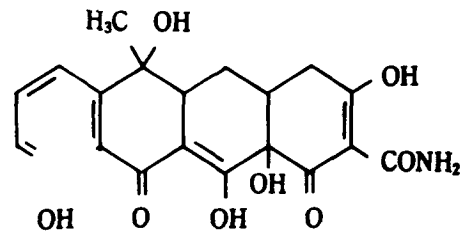
또한 약물의 기질에 대한 억제 형태를 규

명하기 위하여, $1/v$ 대 $1/[s]$ 로 나타낸 Lineweaver-Burk plot를 이용하였는데, Fig.3, Fig.4에서 보여준 바와 같이 tetracycline의 측쇄에 OH^- 기가 첨가됨으로써 구조가 변화되었을 때 tetracycline과는 다른 작용 기전에 의하여 효소의 작용을 더욱 강력하게 억제하였음을 알 수 있으며, oxytetracycline의 구조 가운데 5번째 측쇄에 위치한 OH^- 기가 그 주된 역할을 하였을 것으로 추정된다. Elastase의 active catalytic site에 위치한 serine은 OH^- 기가 그 주된 역할을 하며, 이 OH^- 기와 가까이 위치한 histidine의 N과 수소결합을 하여 charge relay system에 의하여 효소 활성화도가 일어난다고 알려져 왔다. 이때 효소가 활성화되면 serine의 OH결합이 불안정해지면서 음전하의 성질을 나타내는 O^- 기가 기질의 peptide bond 중 C^+ 에 대하여 강한 친화력을 갖게 됨으로써 기질에 대한 작용을 나타내게 된다. 그리고 이러한 성질을 나타내는데에는 N의 전기적 성향이 그 주된 영향을 미친다. 따라서 본 실험에서 elastase에 대해 강력한 억제 작용을 나타낸 oxytetracycline의 경우에는, 측쇄의 OH^- 기가 catalytic site에서 charge relay system³⁾에 관여하는 histidine의 N원자와 친화력을 갖게 되어, 결과적으로 효소의 active site인 serine의 OH^- 기가 기질에 작용할 수 있는 극성을 형성하는 것이 불가능해짐으로 인해 효소의 작용이 억제되는 것으로 추정되며, 이와 관련된 가능해짐으로 인해 효소의 작용이 억제되는 것으로 추정되며, 이와 관련된 다음 단계의 연구를 통하여 이 가설을 입증하고자 한다.

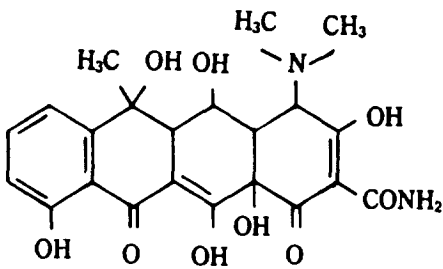
이상의 연구를 통하여, tetracycline계 약제가 지금까지 알려져 있던 항균제로서의 약리작용, 즉 세균의 30S ribosome에 결합하여 단백질 합성 과정 중 초기단계에 있는 ribosome의 기능을 차단시킴으로써 세균을 사멸시키는 작용 이외에, neutral proteinase에 의하여 야기되는 비화농성 염증성질환에서 과도하게 증가된 국소 부위의 효소작용



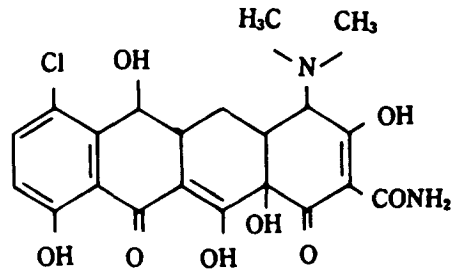
Tetracycline



De - dimethylaminotetracycline



Oxytetracycline



Demeclocycline

Fig.5. Structures of tetracycline, oxytetracycline, demeclocycline and De-dimethylaminotetracycline

을 억제함으로써 숙주의 조직을 보호할 수 있다는 새로운 약리 기전을 제시할 수 있을 것이다. 또한 상기의 약리기전을 분자적 단계에서 살펴본 바에 의하면, tetracycline의 측쇄 구조의 변화에 따라 elastase의 효소 활성도 억제작용이 다양하게 나타났음을 알 수 있으며, 억제 양상에 있어서도 특히 측쇄의 6번 위치에 OH⁻기가 첨가된 oxytetracycline의 경우는 tetracycline과는 상반된 경쟁적 억제 형태를 나타내었음을 알 수 있었

다. 그리고 항균작용을 나타내는 활성부위를 제거시킨 de-dimethylaminotetracycline이 tetracycline에서와 같은 동일한 효소 억제작용을 나타낸 것으로 보아 tetracycline에서는 항균작용을 갖는 부위와 효소에 대한 억제작용을 나타내는 부위가 동일하지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 항균작용이 없으면서, elastase의 효소 활성도를 억제할 수 있는 de-dimethylaminotetracycline은 항균제의 장기 사용시에 발생할 수 있는 저항균의

출현과는 무관하므로, 다른 부작용에 대한 연구가 선행될 경우, elastase에 의해 야기되는 만성질환들의 치료제로서도 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 바이다.

REFERENCES

1. Bae SJ, Ghim SY and Kang K : Inhibition of human leukocyte cathepsin G by NSAIDs. *Korean J Pharmacol* 26(1) : 51-54, 1990
2. Bae SJ, Kim WM, Kim KC, Chang MW and Kang KI : Human Neutrophil Cathepsin G : In vivo synthesis of anti-HNCG antibody, Inhibition of the activity of HNCGs and mechanism of inhibitions. *Korean J Pharmacol* 27(2) : 145-153, 1991
3. Baugh RJ, Travis : Human leukocyte granule elastase. *Biochemistry* 15 : 638-841, 1976
4. Blow DM, Birktoff JJ and Hartley BS : Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature(London)* 221 : 237, 1969
5. Ciancio SG, Mather ML and McMullen JA : En evaluation of Minocycline in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 51 : 530-534, 1980
6. Cohen AB : Neutrophils in normal lungs. *Am Rev Dis* 127 : 53-59, 1983
7. Cohen AB : The interaction of alpha-1antitrypsin with chymotrypsin, trypsin and elastase. *Acta Biochim Biophys* 391 : 193-200, 1975
8. Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U and Baggiolini M : Subcellular localization and heterogeneity of neutral protease in neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *J Exp Med* 1441 : 702, 1975
9. Elsbach P, Weiss J : Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol Letters* 11 : 159, 1985
10. Fritz H, Jochum M, Duswald KH, Dittmer H, Kortmann H, Neumann S, Lang H : Granulocyte lproteases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation; a review. In;Cysteine proteases and their inhibitor. Turk V ed., Berlin, Walter de Gruyter & Co, 1986, pp 785-807
11. Ghim SY, Jeong HY, Bae SJ and Kang KI : Antibiotics;Methicillin, Cefamandole and Oxytetracycline can modulate the activity of human neutrophil elastases. *Koren J Pharmacol* 25(1) : 109-113, 1989
12. Glynn LE : Pathology, pathogenesis and eiology of the rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 31 : 412, 1972
13. Goldston M, Janoff A and Davis AL : Familial variation of leukocyte lysosomal protease and serum alpha-1-antitrypsin as determinants in chroinic obstructive pulmonary disease. *Amer Rev Dis* 107 : 718-728, 1973
14. Golub LM, Goodson JM, Lee Hm, Vidal AM, McNamara TF and Ramamurthy NS : Locally and low dose systemically administered tetracycline inhibit tissue collagenase activity;Potential new approaches in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol* 56 : 93-97, 1985a
15. Golub LM, Manamura TF, Angelo GD, Greenwald RA and Ramamurthy NS : A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activith. *J Dental Res* 66(8) : 1310-1314, 1987
16. Janoff A : Neutrophil proteases in inflammation. *Annu Rev Med* 23 : 177-

- 190, 1972a
17. Janoff A : Elastase in tissue injury. *Ann Rev Med* 36 : 207, 1985
18. Janoff A : Mediators of tissue damage in leukocyte lysosomes. X, Further studies on human granulocyte elastase. *Lab Invest* 22 : 228, 1970
19. Janoff A, Scherer J : Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX, Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 128 : 1137, 1968
20. Janoff A : Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Annu Rev Resp Dis* 105 : 121-122, 1972c
21. Jeong Hy, Ghim SY and Kang K : Simultaneous separation of pure neutrophils and lymphocytes from normal blood by step gradient centrifugation. *Korean J Immunol* 9 : 27, 1987
22. Lindhe J, Liljenberg B and Adielsson E : Effect of long term tetracycline therapy on human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 10 : 190-601, 1983
23. Mittan C : Summary of symposium on pulmonary emphysema and proteolysis. *Amer Rev Resp Dis* 105 : 430-448, 1974
24. Ohlsson K and Olsson I : The neutral proteinases of human granulocytes; Isolation and partial characterization of granulocyte elastase. *Eur J Biochem* 42 : 519, 1974
25. Segel IH : Enzyme kinetics; Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme system, New York, Wiley Inc., 1974, pp 100-135
26. Segel IH : Biochemical calculations; How to solve mathematical problems in general biochemistry. 2nd ed. New York John Wiley & Sons Inc., 1975, pp 208-319
27. Slots J and Rosling BG : Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 50 : 495-509, 1983
28. Starky PM : Elastase and Cathepsin G; The serine proteinase of human neutrophil leukocytes and spleen. In proteinases in mammalian cells and tissues. (Ed Barret), Elsevier/North Holland 1977, p57-89
29. Starky PM, Barret AJ, Burleigh MC : The degradation of articular collagen by neutrophil proteases. *Acta Biochim Biophys* 483 : 386, 1977
30. Starky PM, Barrett AJ : Human lysosomal elastase; Catalytic and immunological properties. *Biochemistry* 155 : 265-271, 1976