

5-Lipoxygenase 의 활성과 Leukotriene B₄ 생합성 억제물질

민경락·신종만·장윤숙·김영수

충북대학교 약학대학

(Received November 1, 1989)

The Activity of 5-Lipoxygenase and the Inhibitor of Leukotriene B₄ Biosynthesis

Kyung Rak Min, Jong Man Shin, Yun Sook Chang and Youngsoo Kim

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 360-763 Korea

Abstract—Polymorphonuclear leukocyte (PMNL) was obtained from peritoneal cavity in rat treated with casein. Effects of divalent cations and drugs on leukotriene B₄ (LTB₄) formation from arachidonic acid in the PMNL were determined by HPLC assay. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for LTB₄ formation from arachidonic acid, exhibited V_{max} at $1 \times 10^{-5}M$, and K_m at $9.89 \times 10^{-5}M$ of arachidonic acid. Optimal Ca^{++} concentration for the enzyme activity was $1 \times 10^{-5}M$ but Zn^{++} did not show any significant effects on the LTB₄ formation. Indomethacin and caffeic acid exhibited inhibitory effects on the LTB₄ formation at $1 \times 10^{-5}M$ and $4 \times 10^{-5}M$, respectively. However, 6-aminohexanoic acid did not show any significant effects on the LTB₄ formation.

세포막의 인지질에서 유리되는 arachidonic acid 가 염증반응에서 화학전달물질로 대사되는 과정¹⁾은 두 종류로 대별된다.

그 첫째 과정은 cyclooxygenase 를 key enzyme 으로 하는 prostaglandins (PGs) 생합성과정으로서, cyclooxygenase 에 대한 효소학적 연구^{2,3)} 및 대사산물들의 생체내 작용, 특히 염증 1기의 혈관투과성 항진작용 등²⁻⁵⁾에 대하여는 많은 연구가 수행되었고, cyclooxygenase 의 활성억제 약물들로 많이 개발되어 비스테로이드성 항염증약⁶⁻⁸⁾으로 임상에 이용하고 있다.

그리고 두번째 과정은 key enzyme 인 lipox-ygenase 는 5-, 12-, 15- lipox-ygenase 의 3종류⁹⁾가 있으며 이들 중 5-lipox-ygenase 는 arachidonic acid 을 5-HPETE 를 경유하여 leukotriene A₄, B₄, C₄, D₄, E₄ (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) 등을 합성¹⁰⁾한다. Samuelsson 등¹¹⁾에 의하면 이들 LTs 중에서 LTB₄는 염증반응 제2기에 활동하는 백혈구 중 주로 polymorphonuclear

leukocyte (PMNL)에서 생합성되어 백혈구응집, 침윤, 주화성, 라이소솜효소의 유리 등의 작용¹²⁻¹⁵⁾을 나타내는 물질로 보고하였다. 그 후 여러 학자들에 의하여 5-lipoxygenase 의 활성과 그 활성억제 약물개발에 관한 연구가 수행되어 왔으나 이 효소활성에 미치는 인자에 관한 연구 및 이 효소의 활성을 억제하는 약물에 관한 연구는 미진하여 현재까지 ETYA¹⁶⁾와 BW_{755c}¹⁷⁾ 등 수종의 약물이 개발되었을 뿐이다.

그래서 본인 등은 실험동물의 복강으로부터 채취한 PMNL 를 실험재료로 사용하여 5-lipoxygenase 활성과 활성에 미치는 인자들을 검색함과 동시에 lipox-ygenase 의 활성을 저해함으로써 LTB₄ 생합성을 억제시키는 약물을 검색하였다.

실험재료 및 방법

실험동물—본 대학 동물사에서 번식, 사육한 Sprague Dawley 계 흰쥐를 23±2°C, 습도 65±

2%의 조건하에서 사육하여 체중이 300~350g 이 되었을 때 실험에 사용하였으며 사육기간 중 사료와 물을 자유로이 섭취하게 하였다.

약물 및 시약-Arachidonic acid(Sigma), caffeic acid(Nikon kasei), PGB₁(Wako), LTB₄(Wako), trypan blue(Wako), EtOH(Wako), MeOH(J. T. Baker), acetonitrile(J. T. Baker), AcOH(Hayashi), 6-aminohexanoic acid(제일약품)을 구입하여 사용하였으며 증류수는 탈이온수를 재증류하여 사용하였으며 기타시약은 시판특급 또는 1급품을 사용하였다.

실험기기-Hemocytometer(EKDS, 일본), ultrasonic cleaner(Nissei, 일본), refrigerated centrifuge(MSE, 영국), shaking incubator(BKS-300, 영국), rotary evaporator(Büchi, 스위스), HPLC(Waters, 미국)와 homogenizer(Nihonseiki, 일본) 등을 사용하였다.

PMNL의 채취-멸균한 KRB로 2% casein 현탁액을 조제하여 흰쥐의 복강내에 주사(120 ml/kg)하고 15시간 후에 개복하여 casein 현탁액에 부유되어 있는 PMNL을 siliconized tube에 채취한 다음 원심분리(250×g, 3 min, 4°C)하여 PMNL pellet를 취하고 2~3회 Ca⁺⁺ free PBS로 세척하였다. 세척한 PMNL pellet에 PBS 1.0 ml를 정확히 가하여 현탁시키고 cell volume을 측정 한 후 10 ml가 되도록 PBS를 추가하여 다시 현탁시킨다. 이 현탁액 100 μl를 취하여 0.1% trypan blue 10 ml에 가하고 그 일정량을 hemocytometer에 주입하여 PMNL의 수를 세고 다음 식에 의하여 전체 PMNL 수를 계산하였다.

$$\text{PMNL 수} = \frac{X}{2} \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

\bar{x} : hemocytometer의 한 구획의 평균 cell 수

효소분획의 조제-Koshihara 법¹⁸⁾을 이용하였으며 그 간단한 조작법은 PMNL pellet를 incubation buffer(50 mM phosphate buffer+1 mM EDTA+0.1% gelatin)에 현탁(1.0×10⁷ cell/ml)시킨 후 homogenizer를 이용하여 homogenate를 만들고 원심분리(10,000×g, 10 min, 4°C)하여 얻은 상정액을 5-lipoxygenase 분획으로 하여 실험하였다.

효소활성에 미치는 기질의 영향-효소분획을 배양 시험관 당 1.8 ml씩 취한 다음 CaCl₂ 용액을 추가하고 37°C에서 5분간 예비배양한 후 기질인 arachidonic acid의 alcohol 용액을 일정농도로 추가하여 총용량을 2.0 ml가 되도록 하였다. 이 때 Ca⁺⁺의 농도는 최종농도가 1×10⁻³ M이 되도록 하였으며 arachidonic acid의 농도는 최종농도가 5×10⁻⁶ M, 1×10⁻⁵ M, 2×10⁻⁵ M, 그리고 4×10⁻⁵ M이 되게 하였으며 알콜의 농도는 0.5% 이하가 되도록 사용하였다.

각 2.0 ml의 배양시험관을 37°C에서 5분간 배양하고 빙냉하여 반응을 정지시키고 internal standard로 PGB₁ 60 ng을 가한 후 Sep-pak C₁₈ cartridge에 흡착시키고 MeOH로 용리하였다. MeOH 분획을 감압하에 증발 건조하고 무수 MeOH 80 μl를 가하여 용해시킨 후 그 중 20 μl를 HPLC에 주입하고 280 nm에서 흡광도를 측정하여 LTB₄의 양을 정량하였다. 이 때 column은 Nucleosil C₁₈(4.6×150 mm)을 사용하였고 유출 용매는 CH₃CN : MeOH : H₂O : AcOH(33.6 : 5.4 : 61.1 : 1.0 v/v, pH 5.6)을 사용하였다.

배양시간에 따른 LTB₄ 생성량-효소분획 1.8 ml씩을 취하고 CaCl₂를 1×10⁻³ M이 되도록 가하고 37°C에서 5분간 예비배양한 후 arachidonic acid를 2×10⁻⁵ M이 되도록 가하여 혼합한 후 37°C에서 10, 30, 60분간 배양하고 빙냉하에 반응을 정지시킨 후 같은 방법으로 LTB₄의 생성량을 측정하였다.

효소활성에 미치는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺의 영향-효소분획에 CaCl₂, MgCl₂, 그리고 ZnSO₄ 등의 2가 양이온을 5×10⁻⁴ M, 1×10⁻³ M 및 2×10⁻³ M이 되도록 추가하고 5분간 preincubation한 다음 기질로서 arachidonic acid 2×10⁻⁵ M가 되도록 가하였다. 다시 37°C에서 5분간 배양한 후 상기와 같은 방법으로 LTB₄의 양을 측정하였다.

효소활성의 억제물질의 작용-효소분획 1.8 ml씩을 배양시험관에 취하고 CaCl₂를 1×10⁻³ M이 되도록 추가한 다음 세포수준에서 LTB₄ 합성 억제효과가 보고된 약물인 6-aminohexanoic acid와 caffeic acid를 일정량씩 추가하여 예비배양하고 arachidonic acid를 2×10⁻⁵ M이 되도록 가하고

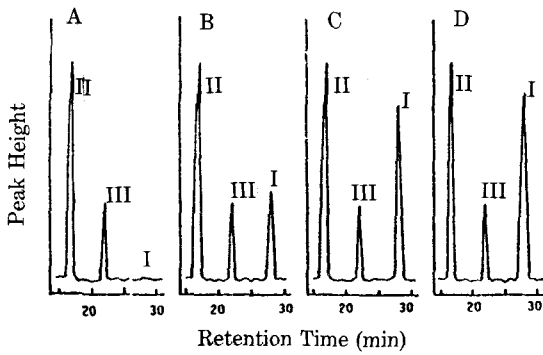


Fig. 1. Chromatograms of LTB₄ formed from arachidonic acid in rat polymorphonuclear leukocyte. HPLC assay was performed in: column, Nucleosil C₁₈ (5 μm, 4.6×150 mm); mobile solvent, CH₃CN:MeOH:AcOH:H₂O (33.6:5.4:1:61.1); flow rate, 1.0 ml/min; and detector, UV at 280 nm. Chromatograms are: A, blank; B, 10 μM; C, 20 μM; and D, 40 μM of arachidonic acid. Peaks are LTB₄ (peak I), PGB₁ (peak II) as an internal standard, and unknown (peak III).

다시 37°C에서 5분간 배양한 후 같은 방법으로 LTB₄ 생성량을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 효소활성에 미치는 기질의 영향

PMNL 균질물(1×10⁷ cell/1.0 ml)을 효소분획으로 사용하고 기질로 arachidonic acid를 각 농도별로 추가한 다음 배양하였다. LTB₄의 chromatogram은 Fig. 1과 같았으며 기질의 농도에 따른 LTB₄의 생성량은 Table I과 같다.

효소분획의 5-lipoxygenase의 활성은 arachidonic acid의 농도가 2×10⁻⁵ M이었을 때 최대 반응속도를 나타내었으며 그 때의 K_m value는 9.89×10⁻⁶ M 이었고, LTB₄의 생성량은 arachidonic acid의 log dose와 비례하였다.

한편, arachidonic acid를 첨가하지 않았을 때의 LTB₄의 양은 처치 전부터 PMNL에 포함되어 있는 LTB₄와 PMNL 유래 arachidonic acid로부터 생성된 것으로 생각된다.

2. 배양시간에 따른 LTB₄ 생성량

상기와 같은 효소분획과 기질의 농도를 2×10⁻⁵ M로 일정하게 하여 반응시간별로 LTB₄의 생성량

Table I—LTB₄ formation dependent on arachidonic acid concentration

Arachidonic acid (M)	Peak area (cm ²)	Treated/untreated
0	0.13±0.05	1
5×10 ⁻⁶	1.92±0.33*	14.8
1×10 ⁻⁵	3.06±0.39*	23.5
2×10 ⁻⁵	3.76±0.28*	28.9
4×10 ⁻⁵	4.24±0.40*	32.6

LTB₄ formation from arachidonic acid was estimated using HPLC assay. Each value (mean±S.E.) was obtained by 5 assays. Significance compared to control is P<0.01 (*).

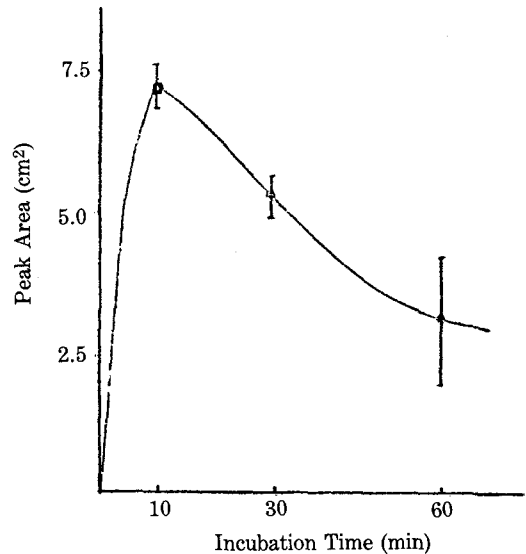


Fig. 2. LTB₄ formation from arachidonic acid dependent on time.

Each value was obtained by 5 assays and each standard error is indicated by a vertical bar.

을 Fig. 2에 표시하였다. 배양시간 10분에서 최대 반응속도를 나타냈으며 그 후 시간이 경과함에 따라 LTB₄의 양이 감소되었다. 이는 LTB₄가 PGs 등과 같이 반감기가 짧기 때문에 신속히 분해되는 것으로 생각된다. 이하의 실험에서는 배양시간을 5분으로 하였다.

3. 효소활성에 미치는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 및 Zn⁺⁺의 영향

5-lipoxygenase는 Ca²⁺ 농도에 의존한다고 보고

Table II—Effect of divalent cations on LTB₄ formation

Cation	Concentration (M)	Peak area (cm ²)
	0	1.44 ± 0.22
Ca ⁺⁺	5 × 10 ⁻⁴	1.95 ± 0.05*
	1 × 10 ⁻³	3.44 ± 0.25**
	2 × 10 ⁻³	2.41 ± 0.31**
Mg ⁺⁺	5 × 10 ⁻⁴	0.90 ± 0.07*
	1 × 10 ⁻³	1.08 ± 0.07*
	2 × 10 ⁻³	1.75 ± 0.10
Zn ⁺⁺	5 × 10 ⁻⁴	1.50 ± 0.04
	1 × 10 ⁻³	1.54 ± 0.20
	2 × 10 ⁻³	1.47 ± 0.32

Divalent cations (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and Zn⁺⁺) were CaCl₂, MgCl₂ and ZnSO₄. Each value (mean ± S.E.) was obtained by 5 assays. Significances compared to control are p < 0.05 (*) and p < 0.01 (**).

Table III—Effect of indomethacin on LTB₄ formation

Indomethacin (M)	Peak area (cm ²)	% of control
0	3.40 ± 0.21	100
1 × 10 ⁻⁶	3.03 ± 0.22	89
5 × 10 ⁻⁵	2.82 ± 0.16**	83
1 × 10 ⁻⁵	2.61 ± 0.14**	77

Each value (mean ± S.E.) was obtained by 5 assays. Significance compared to control is p < 0.01 (**).

되어 있으므로 인체에 비교적 다량 함유되어 있는 2가 양이온인 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺와 Zn⁺⁺의 영향을 농도별로 검토하여 그 결과를 Table II에 표시하였다.

5-lipoxygenase 활성은 Ca⁺⁺의 농도가 1 × 10⁻³ M에서 최대의 활성은 나타냈고, Mg⁺⁺는 저농도에서는 오히려 억제적으로 작용하였고, Zn⁺⁺은 활성에 영향을 미치지 않았다. 그래서 모든 실험에서는 Ca⁺⁺의 최농농도를 1 × 10⁻³ M이 되도록 조제하여 사용하였다.

4. 효소활성을 억제시키는 약물

Indomethacin—Baumann 등¹⁹⁾은 cyclooxygenase의 억제제인 indomethacin이 lipoxygenase 억제효과가 없는 것으로 보고하고 있으므로 본 실험에서 indomethacin을 사용한 것은 arachidonic acid가 PGs로의 대사를 억제하기 위하여 사용하였으나, 의외로 LTB₄ 생성량도 억제하는 것

Table IV—Effect of 6-aminohexanoic acid and caffeic acid on LTB₄ formation

Drug	Concentration (M)	Peak area (cm ²)	% of control
Control	0	3.34 ± 0.19	100
6-Aminohexanoic acid	4 × 10 ⁻³	3.43 ± 0.22	103
	4 × 10 ⁻²	3.28 ± 0.25	98
Caffeic acid	4 × 10 ⁻⁶	3.25 ± 0.24	97
	4 × 10 ⁻⁵	1.87 ± 0.17*	56
	4 × 10 ⁻⁴	0.80 ± 0.05*	24

Each value (mean ± S.E.) was obtained by 5 assays. Significance compared to control is p < 0.01 (*).

으로 나타났다 (Table III).

본 실험에서 사용한 5 × 10⁻⁵ M의 indomethacin은 Bauman 등이 보고한 cyclooxygenase의 활성을 50% 억제하는 농도로서 이와 같은 상이한 결과는 cell의 기원과 종의 차에서 오는 결과가 아닌가 추측된다.

6-Aminohexanoic acid와 caffeic acid—민 등²⁰⁾의 보고에 따라 PMNL의 세포수준에서의 LTB₄ 합성 억제효과를 발현하는 약물의 IC₅₀을 기준으로 하여 10배씩 차를 두어 몇 단계의 농도로 전치하였을 때의 결과는 다음과 같았다 (Table IV).

위와 같은 결과는 6-aminohexanoic acid의 경우 세포수준의 실험결과와 상치하는 결과를 나타냈으나 caffeic acid는 세포수준의 실험과 유사한 억제효과를 나타냈다. 이 결과로 보아 6-aminohexanoic acid는 효소에 직접 억제작용을 나타내는 것이 아니고 효소의 유리 또는 유도를 억제하는 것으로 생각되며 caffeic acid는 효소의 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

결 론

흰쥐의 복강으로부터 채취한 PMNL을 마쇄한 후 원심분리하여 얻은 상정액을 효소분획으로 사용하였고 arachidonic acid를 기질로 사용하여 생성되는 leukotriene B₄의 생성량을 HPLC를 정량하였다.

1. 최대 반응속도를 보인 기질의 농도는 2 × 10⁻⁵ M 이었고, K_m 치는 9.89 × 10⁻⁶ M 이었다.

2. 37°C에서 효소를 반응시켰을 때 10분에서 최대 반응속도를 나타냈다.
3. Ca⁺⁺의 농도가 1×10⁻³ M이었을 때 LTB₄의 생합성이 최대가 되었다.
4. Indomthacin (5×10⁻⁵ M)과 caffeic acid (4×10⁻⁵ M)는 유의성 있게 LTB₄ 생합성을 억제 하였으나 6-aminohexanoic acid는 억제효과가 없었다.

감사의 말씀

본 논문은 1987년도 문교부 학술연구조성비로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Corey, E.J. and Munroe, J.E.: Irreversible inhibition of PG and LT biosynthesis from arachidonic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1752-1754 (1982).
- 2) Loris, A.C.: Interaction of bradykinin, PE, 5-HPT histamine, and ATP on the dye leakage response in rate skin. *J. Biochem. Pharmacol.*, **28**, 753-757 (1976).
- 3) Ford-Hutchinson, A.W., Walker, J.R., Davidson, E.M., and Smith, M.J.H.: A potential mediator of inflammation. *Prostaglandins*, **16**, 253-258 (1978).
- 4) Ronald, I.C., Francoise, M., Roman, C., and Abraham, M.R.: PGE₂ is a potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus. *Prostaglandins*, **16**, 259-260 (1978).
- 5) Higgs, E.A., Moncada, S., and Vane, J.R.: Inflammatory effects of prostacyclin and 6-oxo-PGE_{1α} in the rat paw. *Prostaglandins*, **16**, 153-162 (1978).
- 6) Di Rosa, M., Paradimitriou, J.M., and Willoughby, D.A.: A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of non-steroidal antiinflammatory drugs., *J. Pathol.*, **105**, 239-256 (1971).
- 7) Flower, R., Gryglewski, R., and Vane, J.R.: Effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. *Nature*, **238**, 104-106 (1972).
- 8) Kitagawa, H., Mohri, T., and Kitagawa, M.: Comparative studies on anti-inflammatory effects and biological fates of dexamethasone and prednisolone. *Arznei-Forsch.*, **22**, 402-410 (1972).
- 9) Borgeat, P., Hamberg, M., and Samuelsson, B.: Transformation of arachidonic acid by rabbit PMNL. *J. Biol. Chem.*, **24**, 7816-7820 (1976).
- 10) Dahlen, S.-E., Bjork, J., Hedqvist, P., and Samuelsson, B.: Leukotrienes promote plasma leakage and leukocytes adhesion in postcapillary venules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3887-3891 (1981).
- 11) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Arachidonic acid metabolism in PMNL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3213-3217 (1979).
- 12) Wedmore, C.V. and Williams, T.J.: Control of vascular permeability by PMNL in inflammation., *Nature*, **289**, 646-650 (1981).
- 13) Harvath, L. and Leonard, E.J.: Two neutrophil population in human blood with different chemotactic activities. *Infection and immunity*, **36**, 443-449 (1981).
- 14) Bokoch, G.M. and Reed, P.W.: Effect of various lipoxygenase metabolite of arachidonic acid on degranulation of PMNL. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5317-5320 (1981).
- 15) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., and Smith, M.J.H.: Leukotriene B₄ a potent chemokinetic and aggregating substance released from PMNL. *Nature*, **286**, 264-265 (1980).
- 16) Hammerstrom, S.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by 5,8,11-icosatriynoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 517-522 (1977).
- 17) Radmark, O., Malmstein, C., and Samuelsson, B.: The inhibitory effects of BW755C on arachidonic acid metabolism in human polymorphonuclear leukocyte. *FEBS*, **110**, 213-218 (1980).
- 18) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Fujimoto, Y., and Tatsuno, T.: Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **792**, 92-96 (1984).
- 19) Baumann, J., Bruchhausen, F.V., and Wurm, G.: Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*, **20**, 627-632 (1980).
- 20) Min, K.R. and Min, B.Y.: Antiinflammatory effect of 6-amino-hexanoic acid. *Chungbuk J. Pharm. Sci.*, **2**, 1-10 (1987).