

신장 세포에서 Levamisole의 세포내 Alkaline Phosphatase 활성 증가

황준일 · 김중환 · 김주일 · 이경태* · 권창호

경희대학교 약학대학

(1996년 10월 1일 접수)

Increase of Cellular Alkaline Phosphatase Activity by Levamisole in Kidney Cells

Joon Il Hwang, Jong Hwan Kim, Joo Il Kim, Kyung Tae Lee*, Chang Hoo Kwon

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

(Received October 1, 1996)

The purpose of this study is to explain the relationship between the pharmacological mechanism of levamisole and the cellular activity of cellular alkaline phosphatase (ALPase) in kidney cells. The results of our investigation were as follows. 1. Cellular ALPase activity in *Macacus rhesus* monkey kidney cells (MA 104 cells) and primary cultured rabbit kidney proximal tubular cells treated with levamisole was increased about two or three times than control. However, 50% of ALPase activity in cultured medium was inhibited by levamisole itself. 2. The proliferation of MA 104 and cultured rabbit kidney proximal tubular cells was linearly decreased in paralleled with increase of levamisole concentration (50 and 500 μ M) with MTT test. 3. In the heat stability tests, the inhibition of ALPase activity with and without levamisole at 56°C in MA 104 cells showed different IC_{50} values. 4. HPLC analysis of levamisole metabolites produced by cultured MA 104 cells suggested that the formation of a metabolite, that may be associated with its increase of cellular ALPase activity. Based on these results, we assumed that the increase of cellular ALPase activity by levamisole was evoked by modification of the ALPase catalytic sites.

Keywords—Alkaline phosphatase, Levamisole, MTT assay, Heat stability, Kidney cells

Levamisole은 tetramisole hydrochloride의 활성 levo-isomer로서 화학명은 (-)-(s)-2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazole [2,1-b] thiazole monohydro-chloride이다. 본래 구충제로 개발되어 동물이나 사람의 선충 및 유충 구제에 널리 사용되었으며 특히 회충에 효과적이고 십이지장충 및 요충을 억제하는 데에도 일부 효과가 인정되었다.¹⁾ Levamisole은 면역반응에도 영향을 미치며 1971년 mouse에 대한 Brucella 백신의 보호작용이 levamisole에 의해 증강된다는 보고²⁾가 있다 이 약의 면역학적인 효과에 대한 폭넓은 연구가 진행되었고, 결장암에 외과적 절제와 병행하여 화학면역요법제로서 장기간 연구되었다.^{3,4)} Levamisole의 *in vivo* 및 *in vitro* 면역 연구가

많은 결과를 보여 줌에도 불구하고 그의 목적 및 관계하는 세포와 면역작용, 치료효과에 대한 정확한 기전은 아직 연구중에 있다.

약물학적 연구에서 levamisole은 경구투여후 위에서 빠르게 흡수되며 간에서 대부분이 대사된다. 약물은 성인 남자의 경우 대부분이 *p*-hydroxylevamisole대사되어 요로 배설됨이 확인되었으며 일부는 glucuronic acid와 포접되어 배설된다. Renous⁵⁾는 levamisole 면역작용의 주요 위치는 간의 hepatocytes에서 발생하는 것으로 제안하였으며 약물 투여후 효과는 5-7일간 계속 유지된다고 알려져 왔다.

Levamisole에 의해 선택적인 저해작용을 받는 alkaline phosphatase(ALPase)는 생체내 기질이 확인되지 않아 그의 기능이 정확히 밝혀지지는 않았으나 *in vitro* 분석에서 기질로 사용되는 *p*-nitrophenyl-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

phosphate(*p*-NPP)는 phospho-tyrosine(*p*-Tyr)과 화학구조가 유사하여 protein tyrosine phosphatase (PTPase)로서 세포내 작용을 하는것으로 추측하고 있다.

Swarp⁶⁾ 등은 ALPase가 phosphoserine보다 phosphotyrosine기에 6배 이상의 선택성이 있으며, Foulkes⁷⁾ 등도 ALPase가 단백질의 tyrosine기에 선택성이 있음을 보고하였으며 이^{8,9)} 등도 혈장 내에 있는 PTPase의 활성이 전부 ALPase에 기인한다는 것을 보고한 바 있다.

PTPase는 단백질의 tyrosine기 인산화에 의한 상보적인 기능을 함으로서 protein tyrosine kinase에 의한 세포성장을 억제하는 기능을 나타내는 것으로 추정하고 있다. 세포에서 protein tyrosine kinase(PTK)의 비정상적인 활성의 증가는 세포의 증식과 oncogenic transformation을 일으키는 것으로 보고¹⁰⁾되었으며, PTK antagonist로서 작용하는 PTPase는 암의 저해 유전자로 예측되어 많은 연구¹¹⁾가 진행되고 있다.

본 실험은 면역치료제인 levamisole의 약물작용 기전은 밝혀지지 않는것이나 최근 세포내 특정 효소의 활성 저해 및 증가 등에 의한 것으로 추정되어 배양 원숭이 신장 세포 및 토끼의 일차 근위 세뇨관 상피세포를 이용하여 levamisole을 처리 결과 배양 세포의 배지 및 세포내 ALPase의 활성, 세포 증식, 대사체 연구 및 효소의 열 안정성 성질을 비교 연구하여 levamisole에 의한 ALPase 활성과 세포의 증식과의 상관성을 관찰하고자 하였다.

실험방법

시 약

Para-nitrophenyl phosphate(*p*NPP), tri-chloroacetic acid(TCA), bovine serum albumin(BSA), collagenase(Type IV), glucuronidase, aryl-sulfatase, 1-heptane sulfonic acid, MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)등은 Sigma chemical Co(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Levamisole, pentobarbital, methanol(HPLC grade)은 Aldrich chemical Co(Milwaukee, U.S.A)에서 구입하였다. DMEM, Ham's F₁₂, RPMI 1640, MEM medium, soybean trypsin, fetal bovine serum(FBS), penicillin G(92 IU/ml) streptomycin(100 g/ml)들은 Gibco(Grand

island, NY)에서 구입하였다. 실험에 사용한 동물은 체중 1.8-2.0 kg의 수토끼(New Zealand white)를 사용하였다. 사료는 삼양유지사료(주)의 고행사료로 하고, 충분한 물을 공급하면서 온도와 습도가 조절된 사육실에서 사육하였다. 실험 동물은 2주간 실험실 환경에 순응시킨 후 사용하였다.

세포 배양

토끼 근위 세뇨관 상피세포의 분리 및 배양은 Chung등¹²⁾의 방법에 따랐으며 요약하면 다음과 같다. 체중 2.0 kg 정도의 토끼를 cervical dislocation에 의해 처사시킨 다음, 신장을 적출하고 신동맥을 통하여 인산 완충용액(PBS)을 주입하여 세척하였다. 다시 DME/F12 배지로 2회 세척한 후 0.5% 산화철용액을 주입하고, 신 피질만을 박리 하여 DME/F₁₂ 배지에 넣어 Dounce-homogenizer로 균질화 시켰다. Homogenator를 253 μm mesh filter를 통과시키고, 83 μm mesh filter에 모아진 세뇨관과 사구체를 DME/F₁₂ 배지에 옮기고, 사구체는 magnetic stirring bar를 이용하여 제거하였다. 그 직후 trypsin inhibitor와 collagenase를 넣어 2분간 실온에서 배양한 후 insulin(5 μg/ml), transferrin(5 μg/ml) 및 hydrocortisone(5 × 10⁻⁸ M)을 첨가한 DME/F₁₂ 배지에 부유시켜 일정량씩 배양접시에 접종하고, CO₂ incubator에서 37°C로 2주간 배양한 후 levamisole이 있는 10 ml 배지(1 × 10⁶ cells/ml)로 교환 후 배양시켰다.

Macacus rhesus 원숭이 신장세포(MA 104 cell)는 10% FBS 및 100 unit/L의 penicillin G와 streptomycin을 첨가한 DMEM 배지 10 ml(1 × 10⁶ cells/ml)에 이식하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양된 세포를 levamisole이 있는 배지로 교환 후 배양시켰다.

ALPase 활성 및 단백질 정량

ALPase 활성은 배양한 세포의 배지를 취한 후 남은 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후 세포를 policeman으로 취하고 10초간 sonication한후 원심분리하여 세포에서 시료를 준비하였다. 대조군과 levamisole로 처리한 sample을 각각 200 μl와 기질인 20 mM *p*NPP 200 μl을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 40% TCA 400 μl을 가해 반응을 중지시키고, 1500 g에서 5분간 원심분리 시킨 후 상등액 450 μl을 취해 1 M Na₂CO₃ 600 μl와 반응시켜 410 nm에서 흡광도를 측정했다. 효소 활성은 Unit로서 표현하며 1 Unit은 위의 조건에서 분당 1 nmol의 *p*-nitrophenyl phosphate를 변화시키는 것

이며, *p*-nitrophenol의 molar coefficient는 $1.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이다.⁸⁾

단백질 정량은 BSA를 기준 물질로 사용하여 Bradford Reagent(BioRad)로 측정하였다.

MTT test

배양한 세포를 10^6 cells/ml 농도로 희석하고, levamisole을 여러 농도로 제조하여 96 well plate에 세포 희석액 0.1 ml 및 각종 농도의 검체 0.1 ml를 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다. MTT용액 (5 mg/ml) 50 µl씩을 가하여 4시간 배양한 후 상등액을 제거하고, DMSO 100 µl를 가하여 침전물을 용해시킨 다음, ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HPLC analysis¹³⁾

MA 104 세포를 levamisole로 24시간 배양한 후 policeman으로 세포를 취한 후 3배 부피의 cold methanol을 가하여 24시간동안 4°C에 냉장 보관 후 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 protein을 제거한 후 상등액을 취하였다. Sep-Pak C₁₈ cartridges에 물을 주입하여 활성화시킨 후 위에서 준비한 상등액을 1 ml/min의 속도로 주입한 후 다시 물로 1 ml씩 2회에 걸쳐 같은 속도로 elution시켜 수용성 물질을 제거하였다. Chloroform 500 µl로 2회 elution시켜 시료를 추출한 후, speed vacuum evaporator를 사용하여 시료를 농축한 후 잔류물에 이동상 용매를 50 µl을 가해 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액 10 µl를 주입하였다. 이동상 용매는 0.2% glacial acetic acid를 함유한 water, methanol 및 1-heptane sulfonic acid (55:45:2)로 준비하였다. 칼럼은 reverse phase Nova-Pak C18 column (Waters, T 086344)를 사용하여, 유속 0.5 ml/min하여 254 nm에서 측정하였다.

ALPase의 열 안정성 시험

배양한 MA 104 세포에서 50, 500 µM levamisole을 가하고 24시간 배양하여 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 세포를 policeman으로 scraping하여 모은 후 10초간 sonication하여 -20°C에서 저장하였다. 56°C에서 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32분간 preincubation한 후 위에서 설명한 ALPase 활성법에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

MA 104 세포 및 일차 배양 토끼근위세뇨관 상피 세포에서 levamisole에 의한 ALPase 활성

신장세포에서 levamisole의 ALPase 활성에 대한 영향을 관찰하기 위하여 세포내 ALPase 활성을 측정 한 결과 MA 104 원숭이 신장세포에서의 세포내 ALPase의 활성은 토끼근위세뇨관 상피세포에서의 활성에 비해 7-8배, 단백질 mg에 대한 효소 활성인 specific activity는 약 10배의 높은 활성을 관찰하였다. 두 세포의 ALPase 총 활성 및 specific activity의 차이는 같은 신장 세포이나 MA 104는 세포주로서 일차 배양 근위세뇨관 세포와는 매우 다른 효소의 양 및 성질을 나타내고 있음을 보여주고 있다. Levamisole을 5, 50 및 500 M을 24시간 배양하였을 때 MA 104 세포내 ALPase 활성은 농도 의존적으로 증가하며 50 및 500 µM에서 각각 67.6% 및 76.5% 효소 활성 증가를 보였다(Table 1). 배양 토끼 근위 세뇨관 세포의 배지에서 levamisole을 5, 50, 500 µM에서 각각 53.47%, 53.82%, 64.74%의 활성 저해를 보인 반면 세포내 효소 활성은 5 µM에서는 거의 변화를 관찰할 수 없었으나 50 µM, 500 µM에서 각각 2배 이상의 활성 증가를

Table 1— Summary of Cellular Alkaline Phosphatase Activity Changed in Kidney Cells by Levamisole.

Group	Levamisole (50 µM)			Levamisole (500 µM)		
	Protein C. ^a	ALPase ^b activity	Specific ^c activity	Protein C. ^a	ALPase ^b activity	Specific ^c activity
MA104(Control)	1.4(1.2)	56.7(34)	40.5(28.3)	1.1(1.2)	66(34)	60(28.3)
Rabbit kidney proximal tubule cells(Control)	2.2(1.9)	10.5(4.9)	4.7(2.6)	2.3(1.9)	13.6(4.9)	5.9(2.6)

^a Protein C. : protein concentration in sonicated portion (mg/ml)

^b ALPase activity : Activity is expressed as units in sonicated cell portion described in the Material and Methods

^c Specific activity : units/mg of protein

* Each values represented the mean (n=3)

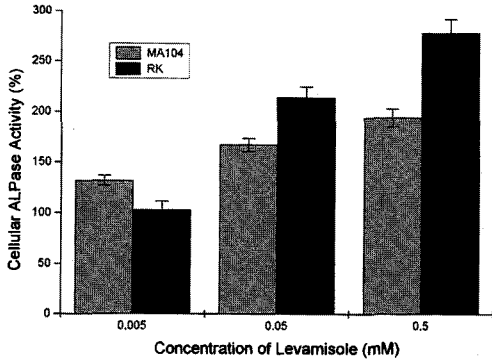


Figure 1—Increase of cellular ALPase activity on cultured rabbit kidney proximal tubule cells and monkey kidney cells by levamisole for 24 hours incubation.

MA 104 : *Macacus rhesus* monkey kidney cell line
 PK : Primary rabbit kidney proximal tubule cell

보임으로서 MA 104 세포에서의 농도 비례와 유사한 효소 활성 증가를 보여주고 있으나 증가율은 높게 나타났다(Figure 1).

ALPase는 tissue-unspecific, intestinal, placental 및 placental-like type으로 나누어지며, 전기영동, 열 안정성 및 특정 저해제에 의한 방법에 의해 이들 isoform을 나누고 있다. ALPase는 특이적으로 분자량이 적은 물질인 phenylalanine 및 homoarginine등에 의해 저해 작용을 받고 있으며 levamisole은 특히 tissue-unspecific ALPase만 강력한 저해 작용을 보여 주며 다른 isoform ALPase에 대해서는 거의 저해 작용을 보여주지 않고 있다.¹⁴⁾ ALPase는 근본적으로 세포막 효소로서 levamisole의 저해작용으로 인간의 간 세포막 인산 단백질들의 탈인산화를 저해한다고 알려졌으며¹⁵⁾ 이는 세포막 단백질의 인산화를 증가시키는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 levamisole의 세포내 활성의 증가는 상대적으로 세포 성장의 신호전달 경로 중 외부에서 전달되는 단백질 인산화를 levamisole에 의한 세포내 효소 활성 증가로 이를 탈 인산화 하여 저해함으로써 ALPase 활성을 매개로 하는 세포 성장조절기능과의 연관성을 추정해 볼 수 있다.

MA 104 및 토끼근위세뇨관 상피세포의 levamisole에 의한 세포증식

MA 104 및 토끼근위세뇨관 상피세포에서 levamisole이 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 법에 의해 조사하였다. 세포내 ALPase의 활성에 영향을 미치지 않는 5 μM levamisole 농도에서 MA 104 세포 및 토

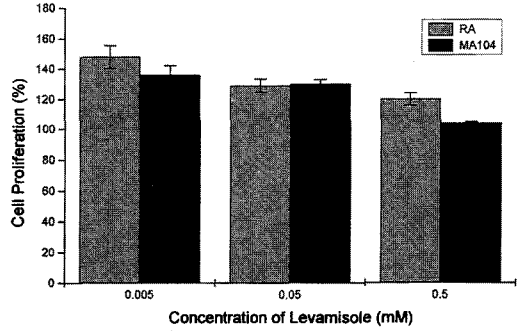


Figure 2—Effect of levamisole on cell proliferation.

MA 104 : *Macacus rhesus* monkey kidney cell line
 PK : Primary rabbit kidney proximal tubule cell

끼근위세뇨관 상피세포에서 각각 34% 및 49%의 증가를 보였으나 시료의 농도가 증가할수록 세포 증식의 감소를 확인하였다(Figure 2). 단백질 tyrosine기의 인산화는 세포의 증식 및 분화와 관련되어 있음이 보고 되었으며, PTK의 비 정상적인 활성의 증가는 세포의 증식과 oncogenic transformation을 일으키는 것으로 보고되어, PTK의 antagonist로서 작용하는 PTPase는 암의 저해 유전자로 예측하여 많은 연구가 진행중이다. 여러 종류의 암에도 특이적으로 서로 다른 PTK가 관여하기 때문에 가능한 많은 PTPase를 분리하여 연구, 비교하는 것이 필요하며 ALPase도 여러 tyrosine기가 인산화된 단백질을 탈 인산화를 보고 하였다. 본 실험에서도 50 μM 및 500 μM levamisole에 의한 세포내 ALPase의 활성증가로 인해 세포내 여러 tyrosine기의 탈인산화를 일으킴으로서 세포 증식을 억제하는 것으로 추정할 수 있다.

Levamisole의 세포내 대사체 분석

Levamisole의 세포내 ALPase의 활성 증가 원인을 규명하기 위하여 MA 104 세포 및 일차 배양 토끼근위 세뇨관 상피세포에서 levamisole을 24시간 배양하여 세포 및 배지에서의 대사체를 분석하였다(Figure 3). 대조군에서는 19분대에서 levamisole만 확인할 수 있었으나 MA 104 세포에서는 19분대의 levamisole외에 16분대에서 levamisole의 주요 대사체를 확인할 수 있었으며 토끼근위세뇨관 상피세포에서도 유사한 결과를 보였다. 이 대사체는 *in vivo* 연구에서 주 대사물질로 밝혀진 *p*-hydroxy levamisole로 추정하고 있으며 levamisole의 세포내 신장세포의 microsomal 효소계에 의한 Phase I 반응에 의해 *p*-hydroxy levamisole 대사체가 형성

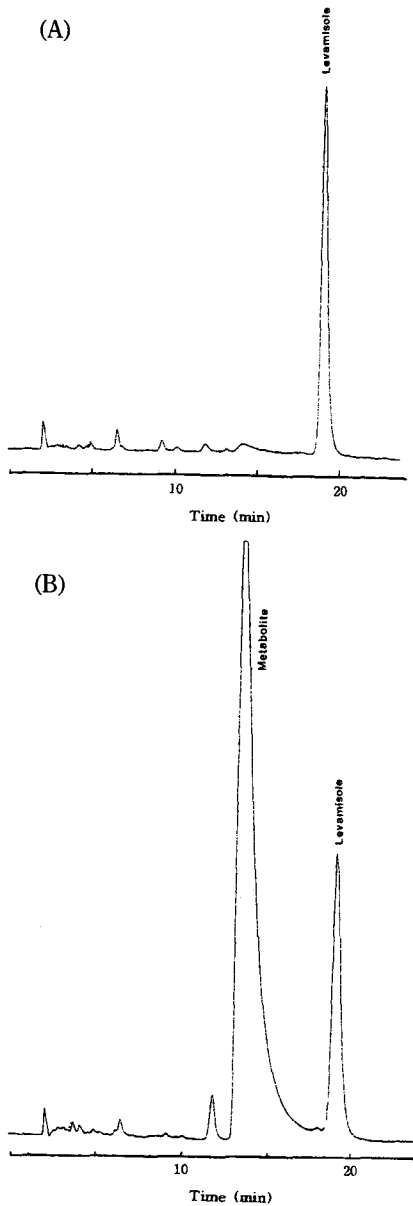


Figure 3—High performance liquid chromatographic analysis of levamisole metabolism by cultured MA 104 cells. (A) The elution profile of the parent compound levamisole without any prior metabolism is shown. (B) Cultured MA 104 cells with 0.5 mM levamisole, and conditioned medium and cells were collected after 24 hrs incubation.

되어 ALPase의 활성을 증가시키게 하는 원인으로 생각되어 진다.

열 안정성 시험

배양한 MA 104 세포에 50, 500 μ M levamisole을

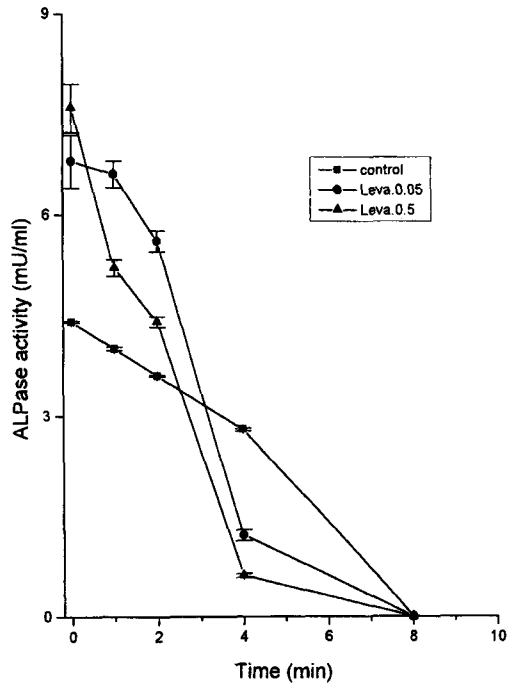


Figure 4—Heat stability of cellular ALPase activity at 56°C in MA 104 cells

가하고 각각 24시간 배양하였을 때 세포내에 증가하는 ALPase 활성의 열 안정성을 56°C에서 대조군과 비교 실험하였다(Figure 4). 대조군은 8분간 배양하였을 때 대부분의 ALPase 활성이 저해되어 IC₅₀은 5분을 보여 주고 있으나, levamisole 처리시 세포내 ALPase 활성의 50% 저해는 약 3분에서 보여 주고 있다. ALPase의 56°C 열 안정성 시험에서 placental/placental-like ALPase의 활성은 전혀 변화가 없으며, intestinal ALPase는 60분에서 tissue-unspecific ALPase는 5-6분에서 IC₅₀을 보여 isoform ALPase를 분류하는 방법으로 사용됨에 따라¹⁴⁾ MA 104 세포에서의 ALPase는 tissue-unspecific ALPase로 분류된다. 세포내 ALPase 활성의 56°C에 대한 IC₅₀의 차는 효소의 구조적 변형에 대한 활성 부위 및 regulatory site의 변형으로 추정되고 있다.

이상의 실험 결과에서 levamisole 대사체가 열의 안정성 시험에서 단백질 합성 유도에 의한 효소량의 증가에 비해 세포내 ALPase의 활성 구조를 변형함으로써 세포내 효소의 활성 증가를 이루며 결국 세포 성장에 영향을 주는 것으로 추정된다. 앞으로 대사체 구조의 확인을 통한 직접적인 효소 활성 억제 연구등이 필요하다고 사료된다.

결 론

1. 신장세포에서의 ALPase 활성은 levamisole 처리군에서 대조군에 비해 약 2배의 세포내 ALPase의 활성 증가를 관찰하였으며 배지에서의 ALPase 활성은 levamisole의 직접적 저해 작용으로 활성이 50% 감소를 확인하였다.

2. MTT법에 의해 세포 증가를 확인한 결과 levamisole의 처리에 의해 50 및 500 μ M의 낮은 농도에서 MA-104 및 토끼근위 신장세포에서 세포 증가 억제력을 확인하였다.

3. MA 104 세포에서 levamisole을 분리하여 HPLC로 분리한 결과 주 대사체를 분리하였다.

4. MA 104 신장 세포의 세포내 ALPase의 활성은 56°C에서 열 안정성 시험을 한 결과 대조군에서는 5분에서 활성도의 50%가 저해작용을 보여 주고 있으며, levamisole 50 및 500 μ M 처리에서는 3분에서 50%의 저해를 보여 줌으로서 ALPase 활성 부위의 변화로 열에 대한 저항성의 변화를 보여주고 있다.

감사의 말씀

본 연구의 경비의 일부는 1995년도 경희대학교 교수 연구비 지원에 의해 수행하였습니다.

문 헌

- 1) E.F. James Reynolds, *Martindale* (The extra Pharmacopeia), London, The pharmaceutical press, 55-57 (1989).
- 2) M.A. Chirigos, W.K. Amery, Combined levamisole therapy : *An overview of its protective effects in immunotherapy of human cancer.*, New York, NY, Raven, 181-195 (1978).
- 3) H. Verhaegen, J. De Cree and W. DeCock, *Immunotherapy of human cancer; Levamisole therapy in patients with colorectal cancer.*, Terry WD, Rosenberg SA, New York, NY, Elsevier, 225-229 (1982).
- 4) C.G. Moertel and T. Fleming, Levamisole and

- fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma., *N. Engl. J. Med.*, **322**, 352-358 (1990).
- 5) G. Renoux, The general immunopharmacology of levamisole., *Drugs*, **19**, 89-99 (1980).
- 6) G. Swarp, S. Cohen and D.L. Garbers, Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases., *J. Biol. Chem.*, **256**, 8197-8201 (1981).
- 7) J.G. Foulkes, Separation of multiple phosphotyrosyl- and phosphoseryl- protein phosphatases from chicken brain. *J. Biol. Chem.*, **258**, 431-456 (1983).
- 8) K.T. Lee, C.H. Kwon, E. Waelkens and W. Merlevede, Substrate specificity of alkaline phosphatase. *Yakhak Hoeji*, **37**, 571-576 (1993).
- 9) K.T. Lee, E. Waelkens and W. Merlevede, Plasma tyrosine phosphatase from healthy rabbits can be totally ascribed to the tissue-unspecific alkaline phosphatase. *Arch. Int. Pharmacodyn. Pharmacother.*, **311**, 189-190 (1991).
- 10) T. Hunter and B.M. Sefton, Transforming gene products of rous sarcoma virus phosphorylate tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1311-1315 (1980).
- 11) R.A. Stinson and J.R.A. Chan, Alkaline phosphatase and its function as a protein phosphatase., *Adv. Prot. Phosphatases*, **4**, 127-151 (1985).
- 12) S.D. Chung, N. Alavi, D. Livingston, S. Hiller and M. Taub, Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J. Cell Biol.*, **95**, 118-126 (1982).
- 13) M. Alvinertie, P. Galtier and G. Escoula, Ion-pair high-performance liquid chromatography assay of levamisole in biological fluids., *J. Chromatography* **223**, 445-448 (1981).
- 14) H. Harris, The human alkaline phosphatase : what we know and what we don't know., *Clinica. Chimica Acta.*, **186**, 133-150 (1989).
- 15) J.R. Chan and R.A. Stinson, Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases., *J. Biol. Chem.*, **261**, 7635-7639 (1986).