

이자효소 분비에 관여하는 세포 내 조절 단백질에 대한 연구

연세대학교 의과대학 약리학교실 및 이화여자대학교 의과대학 외과학교실

정구용 · 최재원 · 최홍순 · 김경환

= Abstract =

Studies on Intracellular Regulatory Proteins of Pancreatic Exocrine Secretion

Ku Yong Chung*, Jae Won Choi, Hong Soon Choi and Kyung Hwan Kim

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

**Department of Surgery, College of Medicine Ewha Womans University, Seoul 110-126, Korea*

CCK and cholinergic agonist stimulate enzyme release from the pancreatic acini via G-protein-mediated activation of phospholipase C. In contrast secretin and related peptides increase the level of cAMP and activate cAMP-dependent protein kinase. Camostat, a synthetic protease inhibitor, causes pancreatic hypertrophy and hyperplasia by increasing the CCK release. In this study, the secretagogue-induced changes of intracellular proteins were examined in the dispersed pancreatic acini of rats with or without camostat treatment. Camostat (FOY-305, 200 mg/kg, p.o.) was given for 4 days twice daily and the dispersed acini were prepared at 12 hours after last treatment. The profiles of intracellular phosphoproteins were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis after incubating the acini with ^{32}P . The amylase release from the dispersed acini was measured. The pancreatic weight was increased to 126% of control, while amylase activity per mg acinar protein decreased to 41% of control. The maximum response of amylase release from dispersed acini to CCK-8 or carbachol was markedly decreased (65% or 46% of control, respectively). The group of intracellular proteins (24 kD, pI 4.5~8.5) was increased in quantity by camostat. CCK-8 or secretin increased phosphorylation of a protein (34 kD, pI 4.7) in camostat-treated as well as control rats. CCK-8 increased tyrosine phosphorylation in the acini of control rats. However, in camostat-treated rats, the basal level of tyrosine phosphorylation was increased and it was rather decreased by CCK-8. Secretin had no effect on the level of tyrosine phosphorylation in acini. These results indicate that both phospholipase C and adenylate cyclase induce phosphorylation of an intracellular acinar protein (34 kD, pI 4.7) and camostat treatment increases the basal level of tyrosine phosphorylation in acinar cells. And these results suggest that not only serine/threonine protein kinase but also protein tyrosine kinase/phosphatase are involved in the process of CCK receptor mediated stimulation-secretion coupling.

Key Words: Camostat, CCK-8, Phosphorylation, Tyrosine phosphorylation

서 론

이자 선포세포의 CCK 수용체는 G-단백을 경유하여 adenylate cyclase와 phospholipase C를 활성화시켜 각각 세포내 제 2전령 물질인 c-AMP와 inositol-1,4,5-triphosphate(IP₃), diacylglycerol(DAG)을 생성한다. c-AMP는 protein kinase A(PKA)를, IP₃, calcium 및 DAG는 Ca⁺⁺-activated calmodulin-dependent protein kinase(CaM protein kinase)와 protein kinase C(PKC)를 활성화 시킨다. 대부분의 세포내 제 2전령 물질은 protein kinase 또는 phosphatase를 활성화시킴으로써 단백질의 인산화 상태를 조절하는 것으로 알려져 있다(Cohen, 1985). 이자 선포세포 내의 다양한 protein kinase 역시 세포내 각종 단백질의 인산화 과정에 관여하고 있다(Hootman 및 Williams, 1987). 분비 자극 물질에 의하여 인산화가 증가되는 선포세포내 단백질로서는 ribosomal S6 단백질 및 S6 kinase가 있으며, 이들 단백질의 인산화는 CCK, carbachol, secretin, VIP 또는 insulin에 의하여 활성화되는 다양한 protein kinase에 의하여 조절됨이 알려져 있다(Burnham 및 Williams, 1982; Freedman 및 Jamieson, 1982; Sung 및 Williams, 1990; Vandermeer등, 1984). 이외에 95~100 kD의 elongation factor 2(Nairn 및 Palfrey, 1987), 56 kD의 Gc 단백질(vitamin D 결합 단백질)(Wooten등, 1985), myosin light chain(Burnham등, 1988), CCK 수용체(Klueppelberg등, 1991), CTP: phosphocholine cytidyl transferase(Groblewski등 1992)등이 분비자극물질에 의하여 인산화가 증가됨이 보고되어 있다.

CCK에 의하여 활성화 되는 신호 변환 체계에 대한 많은 연구는 주로 PKA, CaM protein kinase, PKC의 활성화 과정을 규명하는데 중점을 두고 있다. 이에 비하여 장기간의 CCK 자극으로 인한 이자 선포세포의 변화에 대한 연구는 많지 않다. 이는 장기간 CCK 투여시 나타날 수 있는 다양한 protein kinase들의 활성화 변화 및 이에 의

하여 초래되는 세포변화를 나누어 연구하기가 쉽지 않고, 이를 수행할 적절한 실험 모델을 확립하기 어렵기 때문으로 생각된다.

Fölsch등(1978)은 흰쥐에서 CCK를 하루에 2번 피하로 3주간 투여할 경우, 이자 무게 및 DNA양이 증가함을 관찰하여 CCK에 의한 이자세포 증식 효과를 보고한 바 있다. Otsuki등(1983)은 흰쥐 이자 선포세포를 이용한 실험에서 CCK를 장기간 전처치한 경우, CCK의 amylase 유리항진효과가 감소하는데 이는 zymogen 과립이 선포세포의 basolateral 부분에 주로 위치하므로써 자극에 의한 유리율이 감소되기 때문이라고 추측한 바 있다. 이때 CCK 수용체의 변화는 관찰되지 않아 이는 수용체 후 탈감작에 의한 현상으로 제시된 바 있으나 보다 정확한 기전은 규명되지 못하였다.

Camostat(FOY-305)은 합성 단백질 분해 효소 억제제로서 trypsin, kallikrein, thrombin, plasmin 및 C₁ esterase 등 여러 단백질 분해효소의 작용을 억제한다(Tamura등, 1977). Camostat 투여시 혈중 CCK치는 3~6시간 동안 상승되고 이자 비대가 초래되며(Elsasser등, 1985; Keim등, 1988), 이러한 camostat의 작용은 장내 단백질 분해효소에 의한 되먹이 억제기전(feedback inhibition)이 소실되므로써 나타난다고 보고되고 있다(Göke등, 1988). 단백질 분해효소 억제물질은 생콩 내에도 함유되어 있으므로(Liddle등, 1984; Louie등, 1986; Otsuki등, 1987), 생콩으로 장기간 사육하면 이자의 비대 및 증식이 나타난다(김등, 1986). 또한 camostat을 흰쥐에 장기간 투여할 때, 이자 선포세포의 CCK 반응이 감소된다고 보고된 바 있다(Göke등, 1986; Göke등, 1988; Wisner등, 1988). 이와 같은 단백질분해 효소 억제제에 의한 결과들은 CCK 장기 투여 결과(Fölsch등, 1978; Otsuki 및 Williams, 1983)와 일치하며, 따라서 camostat은 지속적인 CCK 유리 증가에 의한 이자 외분비기능 변화를 연구하기 위하여 이용될 수 있으리라 생각된다.

본 실험에서는 다양한 분비 자극물질에 의한 이

자 외분비 기능 변동을 분산 선포세포를 이용하여 관찰하고, 분비 자극물질 또는 camostat 처치에 의하여 초래되는 단백 및 인단백의 변화와 이자 외분비 기능 변동 사이의 연관성을 관찰하므로써, 이자 외분비 기능에 관여하는 세포내 신호변환 체계와 세포내 조절단백을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 실험 재료

(1) **사용 약물:** 우혈청 알부민(fraction V), soybean trypsin inhibitor(type 1-S), minimal essential medium amino acid(50배 농축물), L-glutamine, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethane sulfonic acid(HEPES), carbachol, CCK-8, secretin, 3',3'-diaminobenzidin 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, 정제된 collagenase(CLSPA)는 Worthington Biochemicals Co. (Freehold, NJ, U.S.A.)에서 구입하였다. Carrier-free [³²P]orthophosphate는 Amersham(England)에서, 표준 분자량 단백질은 Bio-Rad Laboratories(Richmond, CA, U.S.A.)에서 구입하였다. Chemiluminescence용 Western blotting kit는 Boehringer Mannheim Co.(Germany)에서 구입하였다. Camostat(FOY-305, Ono Pharmaceutical)은 일성신약으로부터 제공 받았다.

(2) **실험 동물 및 실험군:** 실험 동물로는 본 동물실에서 사육된 몸무게 200 g 안팎의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 단백질 21.5%, 지방 3.5%, 칼슘 0.6% 이상이 함유된 시판 흰쥐용 표준 배합사료로 사육하였으며, 이자 적출전 24시간동안 물을 제외하고는 금식시켰다.

실험은 대조군과 camostat 처치군으로 나누어 시행하였으며, camostat 처치군은 camostat를 수돗물에 녹여 200 mg/5 ml/kg씩 12시간 간격으로 4일간 1일 2회 위내처치하였고, 마지막 투여후 12시간 후 단두하여 이자를 적출하였다. 대조군은 camostat 처치군과 같은 방법으로 동량의 수돗물

을 투여하였다.

(3) **이자 선포세포의 분리:** 이자를 적출하여 지방조직과 결합조직을 제거한 다음 무게를 잰 후, 선포세포를 분리하였으며 일부 이자조직은 총단백량 및 효소 함량 측정을 위해 -70°C에 보관하였다.

이자 선포세포는 Ansa 등(1986)의 방법을 변형하여 분리하였다. 선포세포 분리에 사용한 기본 완충용액의 조성은 25 mM HEPES, 104 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.0 mM CaCl₂, 15 mM glucose와 50X 필수 아미노산 용액 2% (v/v)에 0.1% 우혈청 알부민, 0.012% soybean trypsin inhibitor를 첨가한 후 pH를 7.4로 교정하고, 100% O₂로 포화시켜 사용하였다.

분리과정을 간략히 설명하면 적출한 이자 조직 1 g당 collagenase 효소용액(50~60 U/ml) 5 ml를 주입한 후 가위로 잘게 잘라서 37°C 항온수조에서 160회/분으로 흔들면서 10분간 소화시켰다. 신선한 효소용액으로 바꾸어 주면서 총 40분간 효소용액으로 소화시킨 다음 기본 완충액으로 세척한 후 pipette을 이용해 이자조직을 기계적으로 분리시켰다. 분리된 선포세포는 nylon mesh를 이용하여 여과한 후, 4%와 1% 우혈청 알부민 완충액을 이용하여 차례로 원심분리(200 g, 30초)하여 선포세포의 분리도를 높였다. 이렇게 분리된 선포세포는 trypan blue dye exclusion test로 90% 이상의 생존율을 확인한 후 기본 완충액에 희석하여 실험에 이용하였다.

2) 실험방법

(1) **조직내 총단백량 및 amylase 활성 측정:** 이자조직은 1 mg당 10 ml의 생리식염수를 넣어 균질화한 후, 원심분리(1,500 g, 15분)하여 얻은 상층액을 총단백량 및 amylase 활성 측정에 이용하였다. 총단백량은 Lowry법(Lowry 등, 1951)에 따라 측정하였고, amylase 활성은 전분기질에서 유리되는 maltose를 Bernfeld법(Bernfeld, 1955)을 이용하여 측정하여 international unit(IU)로

표시하였다.

(2) 선포세포의 amylase 유리 측정: 분리된 이자 선포세포를 silicon 처리된 vial에 담고 37°C에서 70회/분으로 흔들리는 항온 수조에서 amylase 유리를 관찰하였다. Amylase 유리는 30분간의 기초분비를 관찰한 후 여러 농도의 CCK-8, secretin 또는 carbachol을 첨가하여 다시 30분간 자극에 의한 유리를 측정하였다. 분비자극제 투여 직전 및 자극 30분 후 일정량의 세포분산액을 취하여 원심분리(2,700 g, 15분)하고 상층액과 세포층으로 분리하였다. 세포층은 기본 완충액으로 세척후 이에 부유시킨 다음 초음파분쇄기(W-385, Heat system-Ultrasonics, Inc., Farmingdale, NY, U.S.A.)로 분쇄하였다. Amylase 유리는 기초 또는 30분간 자극후 배양액 내로 유리된 amylase양을 다음 수식에 의해 상층액과 세포층에 있는 amylase 총량에 대한 백분율로 표시하였다. 즉, % of total amylase content=(자극후 상층액 내의 amylase양-상층액 내의 기초 amylase 유리양)/(자극후 상층액 내의 amylase양+자극후 세포 내의 amylase양)

(3) ³²P 표지 및 인단백 분리: Carrier free [³²P] orthophosphate 500 μCi/ml을 가지고 37°C에서 60분간 incubation하여 세포내 ATP pool을 표지시켰다. 표지후 분산 선포세포를 Eppendorf tube에 나누어 넣고 CCK-8 또는 secretin을 농도별로 첨가하여 37°C에서 일정 시간동안 incubation하였다. 이후 원심분리하여 상층액을 버린 다음 차가운 0.9% NaCl 용액으로 선포세포를 세척한 후 균질화 용액(9M urea, 2% Pharmalyte, pH 3~10, 5% 2-mercaptoethanol, 2% NP-40)을 첨가하여 선포세포를 균질화 하였다. 이를 원심분리(16,000 g, 10분)한 후 상층액을 취하여 -20°C에서 보관하였으며, 단백질량은 Bradford(Bradford, 1976) 방법을 다소 변형하여 측정하였다.

균질화된 단백 시료는 non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis(NEPHGE)와 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용한 2차원 전기영동법을 시

행하였다. 간략하게 설명하면, 1차 전기영동은 모세관에 4% acrylamide, 2% Pharmalyte, pH 3~10, 9 M urea 혼합액을 ammonium persulfate와 N,N,N',N'-tetramethylene ethylene diamine으로 중합시켜 5.5 cm 길이의 tube gel을 만들었다. Gel 상부에 단백 시료를 적용하고 8M urea로 덮어 단백용액이 완충용액과 직접 접촉되지 않게 하였다. 양극에는 0.01 M phosphoric acid 용액을, 음극에는 0.02M NaOH 용액을 채운 후 50V 15분, 100V 15분, 200V 3.5시간 등전집초(electrofocusing) 하였다. 등전집초가 끝난 후 모세관에서 gel을 빼내어 5% 2-mercaptoethanol을 함유한 sample buffer로 equilibration시킨 후 slab gel을 이용하여 2차 전기영동을 시행하였다(Laemmli, 1970). Stacking gel은 5% acrylamide, 0.4% SDS를 함유한 0.5M Tris-HCl 완충액(pH 6.8)을, running gel은 10% acrylamide, 0.4% SDS, 1.5M Tris-HCl 완충액(pH 8.8)을 이용하여 만들었다. 전기영동시 전류는 stacking gel에서는 25 mA, running gel에서는 35 mA로 유지시켰다. 단백질은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 30% methanol과 10% acetic acid 용액으로 탈색하고, vacuum dryer로 건조하여 -70°C에서 자가방사 기록법으로 인산화 단백을 관찰하였으며, 각 분획의 분자량은 표준 분자량 단백질분획(Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, U.S.A.)과 비교하여 결정하였다.

(4) Tyrosine 인산화 단백질의 분획 관찰: Tyrosine의 인산화 변동은 SDS-PAGE로 단백시료를 분리한 뒤 Western blot을 시행하여 관찰하였다. Western blot을 위한 electroblotting buffer의 조성은 20 mM Tris/150 mM glycine(pH 8.0), 20% methanol이었으며, phosphotyrosine을 가진 단백질의 분획은 phosphotyrosine에 대한 특이항체(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), streptavidin-POD, luminol 혹은 diaminobenzidine을 이용하여 관찰하였다.

3) 자료분석 및 통계처리

측정한 자료는 평균±표준오차로 표시하였다. 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고, P 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) 이자 무게 및 조직내 총단백량, amylase 활성의 변동

대조군의 이자 무게는 0.46 ± 0.03 g/100g body weight(b.w.), camostat 처치군은 0.58 ± 0.02 g/100 g b.w.으로 camostat 처치군이 유의있게 높았다($P < 0.01$). 이자 조직의 단위무게당 총단백 함량은 대조군이 212 ± 9.97 mg/g, camostat 처치군이 188 ± 8.38 mg/g으로 camostat 처치군이 오히려 감소하였으나, 통계학적 의의는 없었다. 이자 조직내 amylase 함량은 대조군이 169.5 ± 10.96 IU/mg protein이었으나, camostat 처치군은 69.5 ± 3.46 IU/mg protein으로 현저히 감소되었다(P

< 0.05)(Table 1).

2) 분산 설포세포의 amylase 유리 반응

분리된 이자 설포세포의 기초 유리는 대조군이 $3.10 \pm 0.24\%/30$ min이었으며, camostat 처치군에서는 $2.49 \pm 0.35\%/30$ min으로 유의있는 차이는

Table 1. The changes of weight, protein and amylase content in rat pancreas after camostat treatment

	Control	Camostat treated
Pancreatic wt. (g/100 g body wt.)	0.46 ± 0.03	$0.58 \pm 0.02^{**}$
Protein content (mg/g pancreas wt.)	212.88 ± 9.97	188.00 ± 8.38
Amylase activity (IU/mg protein)	169.50 ± 10.96	$69.5 \pm 3.46^*$

Values are means±S.E. of 6 rats. Camostat(200 mg/kg, p.o.) was administered twice daily for 4 days. Control rats were treated with tap water. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; difference from control.

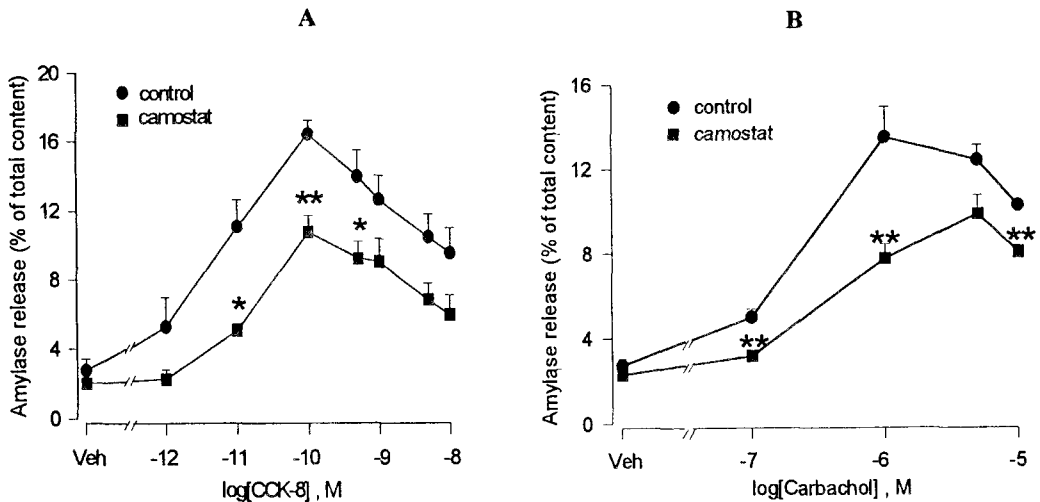


Fig. 1. The effects of CCK-8 (A) or carbachol (B) on amylase release in dispersed pancreatic acini. Values are means±S.E. of 3 rats. Camostat(200 mg/kg, p.o.) was administered twice daily for 4 days. Control rats were treated with tap water.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; difference from control

없었다.

분산 이자 설포세포에 CCK-8 10^{-12} ~ 10^{-8} M을 투여하여 amylase 유리를 관찰한 바, 대조군에서는 각 농도에 따라 CCK-8 10^{-12} M에서 $5.28 \pm 1.70\%$, 10^{-11} M에서 $11.50 \pm 1.64\%$ 이었으며 10^{-10} M에서 $16.42 \pm 0.81\%$ 으로 최대반응을 나타내었으나, 이후 amylase 유리는 오히려 낮아져서 10^{-8} M에서는 $9.52 \pm 1.48\%$ 이었다. Camostat 처치군 역시 대조군과 비슷한 용량반응을 보여 CCK-8 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} 및 10^{-8} M에서 각각 2.26 ± 0.56 , 5.06 ± 0.41 , 10.77 ± 0.99 , $5.96 \pm 1.13\%$ 을 나타내었다. Camostat 처치군의 amylase 유리는 대조군에 비해 낮은 반응을 보였다(Fig. 1A).

Carbachol에 의한 amylase 유리 역시 CCK-8와 비슷한 용량반응을 나타내었으며 대조군에 비해 camostat 처치군이 현저히 감소하였다. Carbachol 10^{-7} M에서 amylase 유리율은 대조군이 $5.39 \pm 0.53\%$, camostat 처치군이 $3.13 \pm 0.44\%$ 이었으며, 10^{-6} M 또는 5×10^{-6} M에서는 각각 대조군이 15.23 ± 1.77 , $13.40 \pm 0.56\%$ 이었고, camostat 처

치군이 7.06 ± 0.33 , $8.71 \pm 0.64\%$ 로 camostat 처치군에서 유의있게 감소하였다($P < 0.01$)(Fig. 1B).

그러나 secretin은 10^{-13} ~ 10^{-6} M의 농도범위에

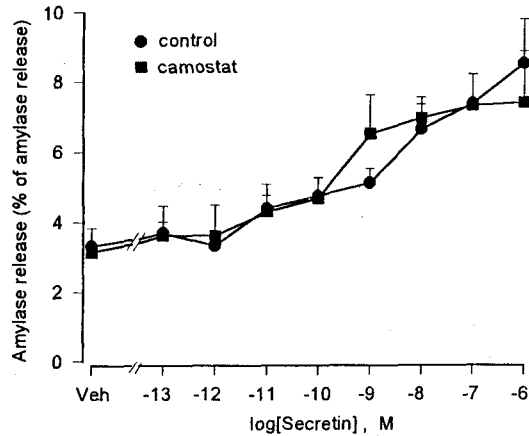


Fig. 2. The effects of secretin on amylase release in dispersed pancreatic acini. Values are means \pm S.E. of 3 rats. Camostat(200 mg/kg, p.o.) was administered twice daily for 4 days. Control rats were treated with tap water.

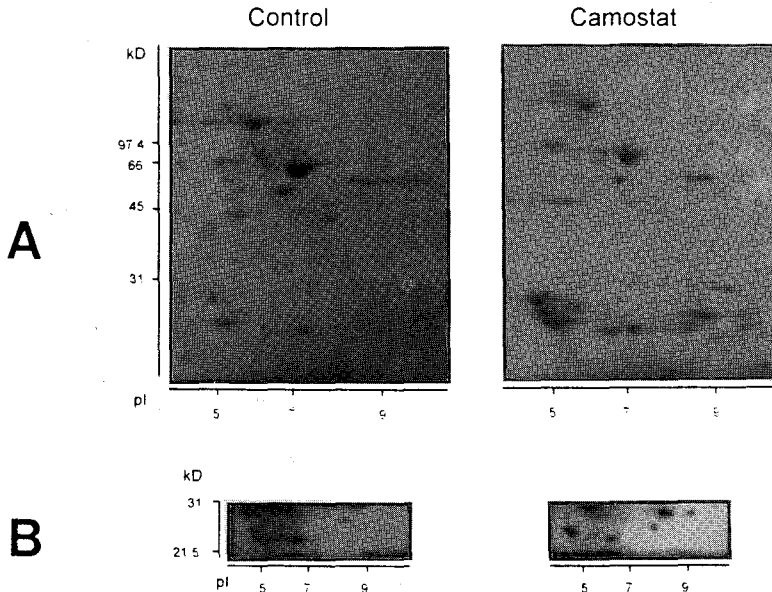


Fig. 3. Two dimensional gel electrophoretic separation of pancreatic acinar proteins. A: Coomassie-brilliant blue staining. B: Autoradiogram of $[^{32}\text{P}]$ -radiolabeled acinar proteins.

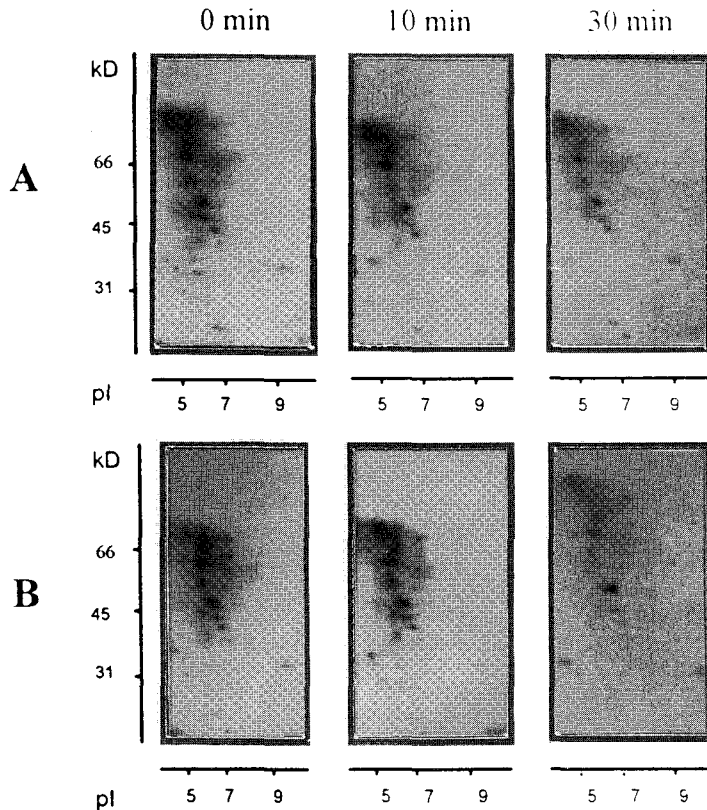


Fig. 4. Time-dependent phosphorylation of acinar proteins after CCK-8 10^{-10} M treatment. [32 P]-Radiolabeled acinar proteins from dispersed pancreatic acini was separated by two dimensional electrophoresis. A: Autoradiogram of phosphoproteins from control acini. B: Autoradiogram of phosphoproteins from camostat-treated acini.

서 amylase 유리율은 대조군 및 camostat 처치군 모두에서 유의있는 차이가 없었다(Fig. 2).

3) 2차원 전기영동상에서의 단백질 분획상

대조군과 camostat 처치군에서 이자 선포세포의 2차원 단백질 분획을 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 상대적 단백질량을 비교하였을 때, 25~28 kD의 pI 4.5~4.7, 5.9, 6.6, 8.5의 단백질 분획이 대조군에 비해 camostat 처치군에서 증가된 양상을 보였다(Fig. 3A).

4) 2차원 전기영동상에서 인단백 변동

SDS-PAGE에 의한 1차원 전기영동에서 대조군

과 camostat 처치군에서 자가방사기록에 의한 인단백 분획은 별다른 차이를 보이지 않았다. 그러나 NEPHGE와 SDS-PAGE에 의한 2차원 전기영동 후 자가방사기록된 인단백 분획상에서 25 kD, pI 5.0 단백질의 인산화가 대조군에 비해 camostat 처치군에서 증가되어 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 3B).

분산 선포세포에 CCK-8 10^{-10} M을 투여하여 0, 10, 30분간 incubation한 후, 2차원 전기영동을 실시하여 선포세포내 인단백 분획을 관찰한 바 대조군과 camostat 처치군 모두에서 34 kD, pI 4.7 단백질의 인산화가 CCK-8 투여전에 비해 투여후 10분에 증가되고, 이 변화는 30분까지 지속됨을

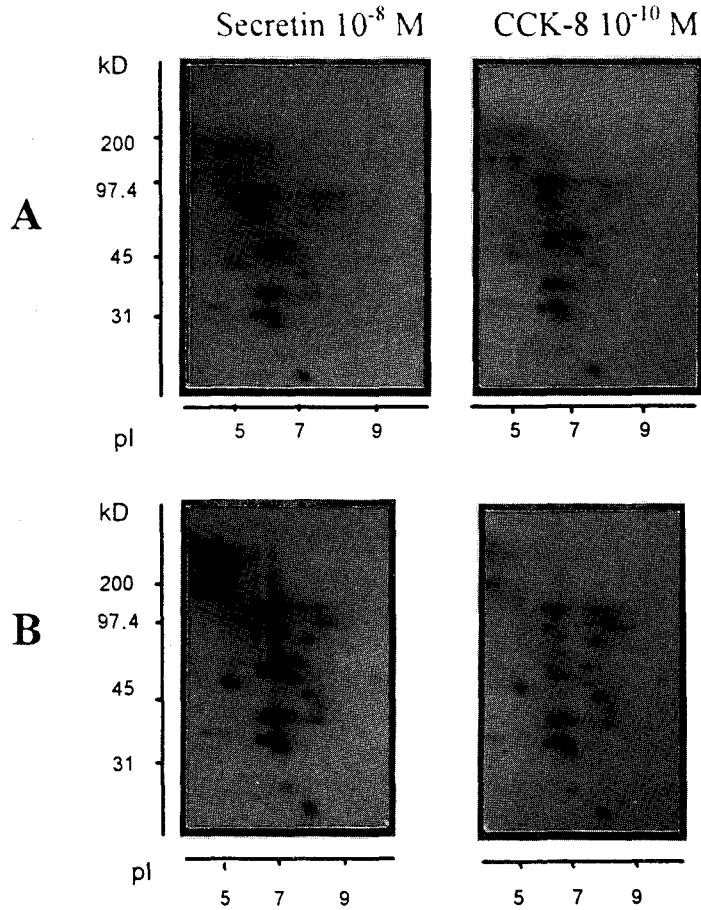


Fig. 5. Two dimensional gel electrophoretic separation of [³²P]-radiolabeled acinar proteins from dispersed pancreatic acini after secretin 10⁻⁸M treatment. A: Autoradiogram of phosphoproteins from control acini. B: Autoradiogram of phosphoproteins from camostat-treated acini.

관찰할수 있었다(Fig. 4).

한편 secretin 10⁻⁸M 투여하고 10분간 incubation한 후 2차원 전기영동을 실시하였을 때, CCK-8 투여시와 마찬가지로 34 kD, pI 4.7 단백질의 인산화가 증가되는 양상을 보였다(Fig. 5).

5) Tyrosine 인산화 단백질의 변동

Phosphotyrosine에 대한 항체를 이용함으로 [³²P] 표지후 자가방사기록에 의해 관찰되는 일반 인단백 분획과 차이가 있는 tyrosine 특이 인산화 단백을 관찰할 수 있었다. Camostat 처치군에서 ty-

rosine 인산화 단백질은 1차원 전기영동과 2차원 전기영동시 대조군에 비해 전반적으로 tyrosine 인산화가 증가되어 있음을 볼 수 있었다(Fig. 6).

대조군의 분산 선포세포에 CCK-8 투여시 전반적으로 tyrosine의 인산화가 증가되었고, 이는 CCK-8 10⁻¹⁰M 투여시 그 증가가 가장 뚜렷하였다. Camostat 처치군은 CCK-8 10⁻¹⁰M 투여시 tyrosine 인산화의 정도가 다소 감소됨이 관찰되었다(Fig. 7). 그러나 secretin 투여시 tyrosine 인산화 단백질은 대조군과 camostat 투여군에서 뚜렷한 변동이 없었다(Fig. 8).

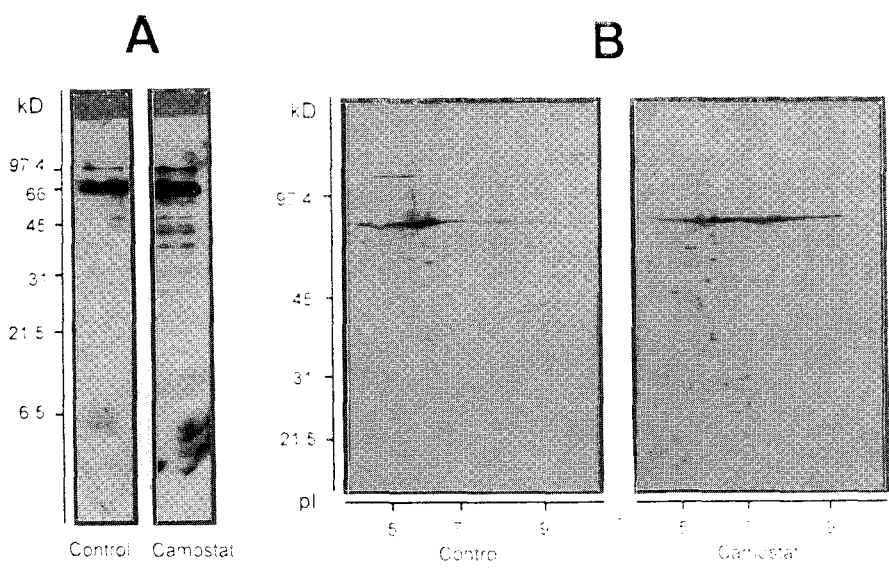


Fig. 6. Protein tyrosine phosphorylation in camostat-treated pancreatic acini. Proteins retaining phosphotyrosine residues were detected by using anti-phosphotyrosine antibodies. A: One dimensional electrophoretic separation of acinar proteins by SDS-PAGE. B: Two dimensional electrophoretic separation of acinar proteins by NEPHGE/SDS-PAGE.

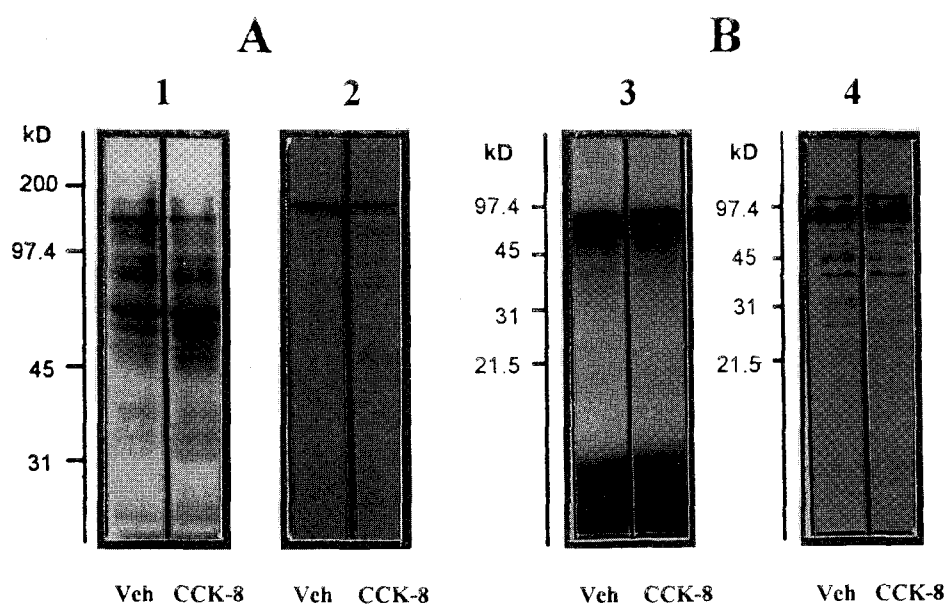


Fig. 7. The effects of CCK-8 on protein tyrosine phosphorylation in dispersed pancreatic acini. A: Control. B: Camostat-treated acini. 1, 3: Autoradiogram of phosphoproteins labeled with $[^{32}\text{P}]$. 2, 4: Protein tyrosine phosphorylation. VEH: Vehicle. CCK-8: CCK-8 10^{-10}M .

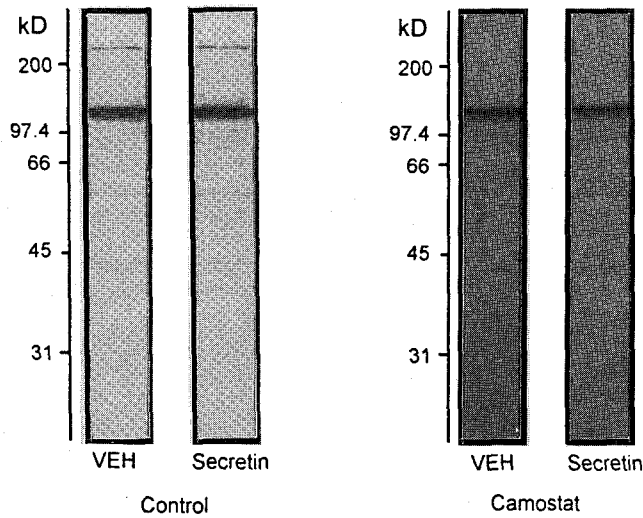


Fig. 8. The effects of secretin on protein tyrosine phosphorylation in dispersed pancreatic acini. Proteins retaining phosphotyrosine residues were detected by using anti-phosphotyrosine antibodies. VEH: Vehicle. Secretin: Secretin 10^{-6} M. Control: Control acini. Camostat: Camostat-treated acini.

고 찰

Camostat 또는 CCK를 장기간 투여할 때 이자의 증식 및 비대와 외분비 기능변동이 초래됨이 보고되고 있다(Fölsch등, 1978; Otsuki등, 1987; 김등, 1986). 이러한 변화는 CCK 수용체의 자극에 의해 발생하는 일련의 세포내 반응에 대한 연구의 실마리를 주고 있다. 본 연구에서는 camostat을 투여하여 비대가 초래된 이자의 분산 선포세포에서, 효소 분비, 세포내 단백질 분해 및 인산화 단백질의 변화를 관찰하므로써 이자 선포세포내 주요 조절과정을 구명하고자 하였다.

Camostat을 4일간 위내 투여하였을 때 이자의 비대가 초래되었으나 단위 단백질당 amylase 활성은 camostat 처치군에서 현저히 감소되었다. 이 결과는 장기간 camostat 투여로 혈중 CCK 농도가 증가하며 이자 비대가 유발된다는 Göke등(1988)의 결과와 상응하며, camostat 처치시 단위 단백질당 amylase 활성이 감소한다는 결과(Liddle등, 1984; 김등, 1994)와도 일치함을 알

수 있다. Camostat 투여시 혈중 CCK 농도가 증가하며(Göke등, 1988), camostat에 의한 이자 비대는 CCK 수용체 길항제인 L-364,718에 의하여 봉쇄되는 것으로 보아(Wisner등, 1988), camostat에 의한 이자 비대는 CCK를 매개하여 발생된다고 보고 있다.

분산 선포세포에서 CCK-8에 의한 자극 분비 곡선은 전형적인 이상 농도-반응 곡선을 보였으며, 최대 유리반응을 나타내는 농도는 대조군과 camostat 처치군 모두에서 10^{-10} M로 차이가 없었다. Camostat 처치후 채취한 분산 이자 선포세포에서, 기초 분비는 대조군과 차이가 없으나, CCK-8 또는 carbachol 자극에 의한 amylase 유리는 대조군에 비하여 유의있게 감소되었다. 이러한 자극 분비의 감소 원인으로서는, camostat 처치시 선포세포내 zymogen 과립의 분포가 달라짐이 제시된 바 있다(Otsuki 및 Williams, 1983). Camostat 처치시 CCK 수용체는 변화되지 않음이 보고된 바 있고(Otsuki 및 Williams, 1983), carbachol은 CCK와 같이 G-단백과 phospholipase C를 통해 선포세포에서 효소 분비를 일으킨다(Gardner 및

Jensen, 1981). Herzig등(1990)은 4일간 camostat 처치후 분산 이자 선포세포에서 CCK-8 또는 carbachol 투여시 phosphoinositide의 전환율(turnover) 및 calcium의 세포질내 유출 정도에는 변화가 없으나, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 투여에 의한 amylase 유리가 감소하므로, camostat 처치후 amylase 자극분비가 감소하는 이유는 PKC 이후 단계의 변화 때문인 것으로 추측하였다. 또한 guinea pig의 선포세포에 TPA를 처치할 경우 세포내 PKC 활성이 시간이 지남에 따라 저하되며 이에 따라 CCK-8 및 carbachol에 의한 amylase 유리가 감소됨이 보고된 바 있다 (Sung등, 1988). 이러한 연구결과는 camostat에 의한 효소유리변동이 수용체 이후 과정의 변화에 기인됨을 제시하고 있다.

Camostat 처치시 나타나는 이자 선포세포의 변화를 관찰하기 위해 세포내 단백질 및 인단백 분해를 관찰하였을 때, camostat 처치군에서 24~28 kD, pI 4.5~8.5 단백질 및 25 kD, pI 5.0 인단백이 대조군에 비하여 증가되어 있음을 알 수 있었다. 선포세포내 단백질의 이러한 변화는 분비자극제 투여시의 amylase 유리증가와 동반되어 나타나지 않았으며, 따라서 이 단백질들은 camostat 처치시 관찰되는 이자의 증식 및 비대와 관련이 있을 것으로 생각된다.

선포세포의 자극 분비시 동반된 인산화 단백질의 변화를 관찰한 바 대조군과 camostat 처치군 모두에서 CCK-8 투여시 34 kD, pI 4.7 단백질의 인산화가 증가되었고, secretin 투여시에도 이 단백질의 인산화가 증가되었다. 따라서 이 단백질의 인산화 과정에는 Ca^{++} 또는 c-AMP에 의하여 인산화가 조절되는 ribosomal S6 단백질(Burnham 및 Williams, 1982; Freedman 및 Jamieson, 1982; Vandermeers등, 1984)과 비슷하게 세포내 다양한 제 2전령물질들이 관여하는 것으로 생각된다.

세포를 ^{32}P 를 지닌 배양액에서 incubation할 경우, ^{32}P 로 표지되는 인산화 단백질은 대부분 serine/threonine 인산화 단백질로 생각되고 있다(Hunter, 1991). 전체 인산화 단백질 중 tyrosine 인산화

단백은 0.1% 미만으로 생각되나, tyrosine을 인산화시키는 tyrosine kinase는 세포 증식과 분화에 중심적 역할을 함이 인정되고 있다(Hunter, 1985). 다수의 oncogene들이 tyrosine kinase를 표현함이 보고되어 있으며, 그 예로서는 상피 성장인자(epidermal growth factor) 수용체(Cohen등, 1982), insulin 및 insulin 유사 성장인자 수용체(Sahal등, 1988)들을 들 수 있다. 본 실험에서 전체 단백질의 인산화 정도에 있어서는 camostat 처치군과 대조군에서 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았지만, camostat 처치군에서 기초상태의 선포세포내 tyrosine 인산화 정도가 대조군에 비하여 증가되어 있었다. Rivard등(1994)은 CCK-A 수용체 효현체인 JMV-180을 투여할 때 tyrosine-specific protein kinase 활성 증가가 나타나며, 이러한 변화가 caerulein을 장기간 투여할 때 나타나는 이자 비대와 연관될 것으로 추측한 바 있다. 본 실험 결과는 camostat을 장기간 투여할 때, tyrosine의 인산화 정도가 증가되어 있으며, 이는 tyrosine kinase 활성 증가 혹은 phosphotyrosine phosphatase 활성감소가 이자 비대의 직접적인 유인일 수 있음을 제시하는 것으로 생각된다.

CCK-8 투여시 대조군에서는 tyrosine의 인산화가 전반적으로 증가되는 반면에, camostat 처치군에서는 tyrosine의 인산화가 다소 감소되었다. tyrosine 인산화 정도는 tyrosine kinase와 phosphotyrosine phosphatase에 의하여 조절됨을 고려할 때(Fisher등, 1991; Trowbridge, 1991), 이 결과는 CCK-8 투여시 선포세포내 tyrosine kinase 및 phosphotyrosine phosphatase가 모두 활성화될 수 있음을 제시하는 것으로 생각된다.

이자내 tyrosine kinase의 활성이 CCK 혹은 caerulein 투여에 의하여 증가됨(Rivard등, 1994)이 보고된 바 있다. Tyrosine kinase 억제제인 genistein이 CCK 혹은 carbachol을 매개한 amylase 분비를 부분적으로 억제하며(Lutz등, 1993; Piiper등, 1994), CCK, bombesin, carbachol 및 $GTP\gamma S$ 에 의한 IP₃ 생성을 억제하므로, 이자외분비기능과 연관된 tyrosine kinase의 작용에는 선포세포

결 론

막의 G 단백질 및 phospholipase C가 관여됨이 제시된 바 있다(Piiper 등, 1994). 이는 tyrosine kinase에 의하여 phospholipase C에 의한 제 2 전령 물질의 생성이 조절될 수 있음을 제시하고 있다. 그러나 이 tyrosine kinase의 활성화 기전은 분명하지 않다. 세포내 calcium 농도의 증가(Huckle 등 1990; Leeb-Lundberg 및 Song, 1991), 혹은 protein kinase C 활성화(Yamada 등, 1990) 등에 의하여 tyrosine 인산화 및 tyrosine kinase 활성이 증가됨이 보고된 바 있으므로, 본 실험 대조군의 선포세포에서 관찰된 CCK 투여에 의한 tyrosine 인산화의 증가는 이러한 경로를 통한 tyrosine kinase의 활성화에 의한 것으로 생각된다.

본 실험에서 camostat 처치군의 분산선포세포내 tyrosine 인산화가 증가되어 있고, CCK 투여에 의하여 tyrosine 인산화가 다소 감소됨이 관찰되었다. 이자조직내 phosphotyrosine phosphatase의 활성이 caerulein 혹은 carbachol 투여에 의하여 증가하고, 재생되는 이자조직에서는 감소되어 있다는 보고(Rivard 등, 1994)는, 이 효소가 이자외분비기능 및 세포증식과 같은 다양한 생리적 반응에 관여되어 있음을 제시하고 있다. 또한 Jena 등(1991)은 streptolysin O로 처리된 분산선포세포에 recombinant phosphotyrosine phosphatase를 투여할 경우, calcium에 의한 amylase 유리가 증가됨을 관찰한 바 있다. 이들은 calcium외 amylase 분비자극물질의 작용에 대해서는 관찰하지 않았으므로, 이 recombinant phosphotyrosine phosphatase의 작용기전은 분명하지 않으나, 이 결과는 이자외분비기능에 phosphotyrosine phosphatase가 관여함을 제시하고 있다. CCK-8 투여시 tyrosine kinase와 phosphotyrosine phosphatase가 같이 활성화 될 수 있다는 본 실험 결과를 고려할 때, 각 효소 고유의 기질이 활성화되므로써, tyrosine kinase와 phosphotyrosine phosphatase 모두에 의하여 이자 외분비 기능이 조절될 수 있을 것으로 생각된다.

이자외분비기능 특히 세포내 기전을 구명하기 위하여 다양한 분비 자극물질에 의한 이자 외분비 기능변동을 분산 선포세포를 이용하여 관찰하고, 분비 자극물질 또는 camostat 투여에 의하여 초래되는 분산 선포세포내 단백질의 변화를 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 체중비 이자 무게는 대조군에 비해 camostat 처치군에서 유의하게 증가하였고, 단위 단백질 당 amylase 활성은 camostat 처치군에서 현저히 감소하였다.

2) 분산 선포세포의 amylase 기초유리는 대조군과 camostat 처치군간에 차이가 없었으나, CCK-8과 carbachol 처치에 의한 최대 amylase 유리는 대조군에 비하여 camostat 처치군에서 현저히 감소하였다. Secretin 처치에 의한 amylase 유리반응은 대조군과 camostat 처치군 사이에 차이가 없었다.

3) Camostat 처치군에서 24~28 kD, pI 4.5~8.5 세포내 단백질의 양이 대조군에 비해 증가되었으며, 25 kD, pI 5.0 단백질의 인산화가 증가되었다.

4) CCK-8 또는 secretin 투여로 34 kD, pI 4.7 단백질의 인산화가 증가되었고, 이는 대조군 및 camostat 처치군 모두에서 관찰되었다.

5) 세포내 tyrosine 인산화 단백질은 기초상태에서는 camostat 처치군에서 전반적으로 증가되었으나 CCK-8 처치시 대조군에서는 tyrosine 인산화가 증가되는 반면에 camostat 처치군에서는 다소 감소되었다. Secretin은 tyrosine 인산화에 별 영향을 주지 않았다.

이상의 실험결과로 보아 CCK-8 또는 secretin은 이자 선포세포내 34kD, pI 4.7 단백질의 인산화를 특이하게 증가시키며 이 과정에는 phospholipase C 및 adenylate cyclase가 모두 관여할 것으로 생각된다. 또한 CCK-8 처치 혹은 camostat을 장기간 투여한 경우 tyrosine 인산화가 증가하는 것으로 보아 CCK 수용체를 매개하는 자극분비과

정에 serine/threonine kinase 뿐만 아니라 tyrosine kinase/phosphotyrosine phosphatase가 기능적으로 연관되어 있다고 생각한다.

감사의 글

이 논문의 일부는 연세대학교 의과대학 특별 지정연구비(1990년도)로 이루어졌음.

참 고 문 헌

- 김경환, 김동구, 이선미, 안영수: 생공 투여가 흰쥐 췌장의 외분비 기능 및 미세구조에 미치는 영향. 원주의대 논문집 1: 65-76, 1986
- 김 철, 김동구, 김경환: Camostat 투여 흰쥐 이자 외 분비선의 분비자극물질에 대한 반응성. *Kor J Pharmacol* 30: 205-215, 1994
- Ansah TA, Dho S and Case RM: *Calcium concentration and amylase secretion in guinea pig pancreatic acini: interactions between carbachol, cholecystokinin octapeptide and the phorbol ester, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate.* *Biochem Biophys Acta* 889: 326-333, 1986
- Bernfeld P: *Amylase α and β .* in *Methods in enzymology. vol 1, Academic, 149-150, 1955*
- Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- Burnham DB, Sung CK, Munowitz P and Williams JA: *Regulation of protein phosphorylation in pancreatic acini by cyclic AMP-mediated secretagogues: Interaction with carbamylcholine.* *Biochem Biophys Acta* 969: 33-39, 1988
- Burnham DB and Williams JA: *Effects of carbachol, cholecystokinin, and insulin on protein phosphorylation in isolated pancreatic acini.* *J Biol Chem* 257: 10523-10528, 1982
- Cohen P, Fava R and Sawyer ST: *Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver.* *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6237-6241, 1982
- Cohen P: *The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity.* *Eur J Biochem* 151: 439-448, 1985
- Elsasser HP, Lutke H and Kern HF: *Acinar and duct cell replication and regeneration.* In: *Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Sebenthal E, DiMugno EP, Scheele GA, eds. The Exocrine Pancreas. New York: Raven, 45-54, 1985*
- Fischer EH, Charbonneau H and Tonks NK: *Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes.* *Science* 253: 401-406, 1991
- Fölsch UR, Winckler K and Wormsley KG: *Influence of repeated administration of cholecystokinin and secretin on the pancreas of the rat.* *Scand J Gastroent* 13: 663-671, 1978
- Freedman SD and Jamieson JD: *Hormone-induced protein phosphorylation. II. localization to the ribosomal fraction from rat exocrine pancreas and parotid of a 29,000-dalton protein phosphorylated in situ in response to secretagogues.* *J Cell Biol* 95: 909-917, 1982
- Gardner JD and Jensen RT: *Regulation of pancreatic enzyme secretion in vitro.* In: *Johnson LR, ed. Physiology of the Gastrointestinal Tract. Volume 1. 2nd ed. New York: Raven, 831-871, 1981*
- Göke B, Fenchel K, Knobloch S, Arnold R and Adler G: *Increased CCK-response to proteinase inhibitor feeding after induction of pancreatic hypertrophy in rats.* *Pancreas* 3: 576-579, 1988
- Göke B, Printz H and Koop I: *Endogenous CCK release and pancreatic growth in rats after feeding a proteinase inhibitor(camostat).* *Pancreas* 1: 509-515, 1986
- Groblewski G, Wang Y, Kent C and Williams JA: *Regulation of CTP: Phosphocholine cytidyl transferase in isolated rat pancreatic acinar cells.* *Pancreas* 7: 739, 1992
- Herzig KH, May K, Louie DS, Takahashi T, Göke B and Owyang C: *Intracellular mechanism res-*

- possible for reduced enzyme secretion from camostat-induced hypertrophied pancreas. *Digestion* 46: 195-201, 1990
- Hootman SR and Williams JA: *Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus*. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Volume 1. 2nd ed. New York: Raven, 1129-1146, 1987
- Huckle WR, Prokop CA, Dy RC, Herman B and Earp S: *Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner*. *Mol Cell Biol* 10: 6290-6298, 1990
- Hunter T: *Protein kinase classification*. in *Methods in enzymology*. Volume 200. Academic, 3-37, 1991
- Hunter T and Cooper JA: *Protein-tyrosine kinase*. *Annu Rev Biochem* 54: 897-930, 1985
- Jena BP, Padfield PJ, Ingebritsen TS and Jamieson JD: *Protein tyrosine phosphatase stimulates Ca⁺⁺ dependent amylase secretion from pancreatic acini*. *J Biol Chem* 266: 17744-17746, 1991
- Keim V, Göke B and Adler G: *Changes in pattern of enzyme secretion by rat pancreas during repeated trypsin inhibitor treatment*. *Am J Physiol* 255: G236-241, 1988
- Clueppelberg UG, Gates LK, Gorelick FS and Miller LJ: *Agonist regulated phosphorylation of the pancreatic cholecystokinin receptor*. *J Biol Chem* 266: 2403-2408, 1991
- Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Leeb-Lundberg LM and Song XH: *Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells*. *J Biol Chem* 266: 7746-7749, 1991
- Liddle RA, Goldfind ID and Williams JA: *Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: Effects of food, trypsin inhibitor and alcohol*. *Gastroenterology* 87: 542-549, 1984
- Louie DS, May D, Miller P and Owyang C: *Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats*. *Am J Physiol* 250: G252-G259, 1986
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L and Randall RJ: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 193: 265-269, 1951
- Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT and Miller LJ: *A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell*. *J Biol Chem* 268: 11119-11124, 1993
- Nairn AC and Palfrey HC: *Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2*. *J Biol Chem* 262: 17299-17303, 1987
- Otsuki M, Ohki A, Okabayashi Y, Suehiro I and Baba S: *Effect of synthetic protease inhibitor camostat on pancreatic exocrine function in rats*. *Pancreas* 2: 164-169, 1987
- Otsuki M and Williams JA: *Amylase secretion by isolated pancreatic acini after chronic cholecystokinin treatment in vivo*. *Am J Physiol* 244: G683-688, 1983
- Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Stein J, Caspary WF and Zeuzem S: *Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5-IP₃ production and amylase release in pancreatic acini*. *Am J Physiol* 266: G363-G371, 1994
- Rivard N, Level D, Laine J and Morisset J: *Regulation of pancreatic tyrosine kinase and phosphatase activities by cholecystokinin and somatostatin*. *Am J Physiol* 266: G1130-G1138, 1994
- Rivard N, Rydzewska G, Lods JS, Martinez J and Morisset J: *Pancreas growth, tyrosine kinase, and PLD involve high affinity CCK-receptor occupation*. *Am J Physiol* 266: G62-G70, 1994
- Sahal D, Ramachandran J and Fujita-Yamaguchi Y: *Specificity of tyrosine protein kinases of the structurally related receptor for insulin and insulin-like growth factor 1; Tyr-containing synthetic polymers as specific inhibitors of substrates*. *Arch Biochem Biophys* 260: 416-426, 1988

- Sung CK, Hootman SR, Stuenkel EL, Kuroiwa C and Williams JA: *Downregulation of protein kinase C in guinea pig pancreatic acini; effects on secretion. Am J physiol* 254: G242-G248, 1988
- Sung CK and Williams JA: *Cholecystokinin stimulates a specific ribosomal S6 kinase in rat pancreatic acini. Pancreas* 5: 668-676, 1990
- Tamura Y, Hirado M, Okamura K, Minato Y and Fuji S: *Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin and C1 esterase. Biochem Biophys Acta* 484: 417-422, 1977
- Trowbridge IS: *CD45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. J Biol Chem* 266: 23517-23520, 1991
- Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, Dehaye JP, Winand J and Christophe J: *Phosphorylation of 3 particulate proteins in rat pancreatic acini in response to vasoactive intestinal peptide (VIP), secretin and cholecystokinin(CCK-8). Peptides* 5: 359-365, 1984
- Wisner JR, McLaughlin RE, Rich KA, Ozawa S and Renner IG: *Effects of L-354,718, a new cholecystokinin receptor antagonist, on camostat-induced growth of the rat pancreas. Gastroenterology* 94: 109-113, 1988
- Wooten MW, Nel AE, Goldschmidt-Clermont PJ, Galbraith RM and Wrenn RW: *Identification of a major endogenous substrate for phospholipid/ Ca^{++} dependent kinase in pancreatic acini as Gc(vitamin D-binding protein). FEBS Lett.* 191: 97-101, 1985
- Yamada A, Streuli M, Saito H, Rothstein DM, Schlossman SF and Morimoto C: *Effect of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells. Eur J Immunol* 20: 1655-1660, 1990