

췈장 관세포 중탄산염 분비에서
칼슘신호의 역할

연세대학교 대학원
의과학사업단
남궁완

취장 관세포 중탄산염 분비에서
칼슘신호의 역할

지도 이 민 구 조교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 12 월

연세대학교 대학원

의과학사업단

남 궁 완

남궁완 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12 월

감사의 글

석사학위논문을 내면서 지난 2년간의 석사학위과정을 돌이켜 생각해 봅니다. 짧은 기간이었지만 정말 많은 일이 있었고, 참 많은 사람들의 도움을 받으면서 지냈던 소중한 시간이었습니다. 저와의 인연을 즐거운 마음으로 받아주셨고, 가장 커다란 가르침을 주셨던 이민구 교수님 그리고 큰아버지처럼 넓은 마음으로 저희를 돌봐주셨던 김경환 교수님 정말 감사합니다. 낯설어하는 저를 정겹게 대해주시고 많은 배려를 해주신 김혜영 교수님, 마라톤을 좋아하시는 멋진 안영수 교수님, 맘 좋은 아저씨 같아서 웬지 정이 가는 김동구 교수님, 늘 연구에 열심이신 장정원 교수님 그리고 이번 논문 심사에 많이 신경써주신 부드러운 인상이 좋았던 안덕선 교수님 진심으로 감사드립니다.

석사기간 내내 함께 생활하며 즐거운 일과 힘든 일을 함께한 우리 실험실 식구들: 처음부터 지금까지 하나하나 가르쳐주고 잘 챙겨준 고마운 주영누나, 겉으로는 잘 표현하지 않지만 항상 실험실 식구들에게 신경써주는 엄마 같은 우인이형, 늘 진리탐구를 외치던 명배우 진아, 때로는 동생 같고 때로는 친누나 같은 왕비 원선 누나, 가끔은 막내 동생 같고 가끔은 어르신 같은 알쏭달쏭 막내 지현이, 마음 편하게 말할 수 있는 인자한 마님 지하, 그리고 달콤하고 따뜻한 느낌이 좋은 영웅이 모두 너무 고맙고 감사합니다. 그리고 즐거운 실험실 생활을 함께한 지영누나, 은진누나, 영규형, 정범이형, 지훈이형, 진우형, 상희누나, 지연이, 세정이, 경하, 신영이, 재은이, 지혜누나, 정연누나, 이서울 선생님, 임주원 선생님 그리고 약리학 교실원 모두에게 진심으로 감사드립니다. 그동안 실험 잘하라고 실험기기를 고쳐 주신 맥가이버 임종수 선생님 그리고 이것저것 많이 도와준 착한 선혜누나 정말 고맙습니다.

몇 번을 생각해도 웃음 짓게 만드는 소중한 나의 친구들: 나의 든든한 후원자 오균이, 심심해하지 말라고 자주 찾아준 정현이 그리고 영조, 내 투정 받아주느라 고생한 윤정이, 마음 편하게 해주는 원정이, 은미 그리고 지이, 언제나 든든한 느낌이 드는 영재, 시원시원한 현정이, 군에서 고생한 재하 그리고 사랑스러운 우리 95 동기들 모두 너무 고맙고, 감사하게 생각하고 있단다.

지금에 나를 있게 해준 사랑하는 가족들: 세상 그 무엇도 대신할 수 없는 너무나 소중한 너무나 사랑하는 우리 엄마·아빠 그리고 태어나서 지금까지 함께해준 우리 누나 그리고 우리 막동이 또 듬직해서 마음이 편해지는 우리 매형 그리고 귀여운 혜원이 진심으로 사랑합니다.

목차

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 실험 재료 및 관류액	5
2. 세포 배양 및 Transfection	5
3. 세포내 칼슘신호 측정	6
4. 세포내 pH 측정	6
5. 역전사 증합효소 연쇄반응	7
6. 면역형광염색	8
III. 결과	9
1. 췌장 관세포주의 칼슘신호 측정	9
2. 칼슘에 의한 췌장 관세포 내강막 Cl^-/HCO_3^- 교환 변화	10
3. BAPTA에 의한 칼슘 억제제가 Cl^-/HCO_3^- 교환에 미치는 영향	12
4. Wild type CFTR 발현이 CFPAC-1 세포에서 칼슘에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환에 미치는 영향	14
5. 췌장 관세포주에 존재하는 anion exchanger 아형 검색	15
6. Anion exchanger 발현 세포주에서 칼슘신호에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 변동	15
IV. 고찰	19
V. 결론	23
참고문헌	24
영문요약	27

그림 차례

그림 1. 췌장 관세포주에서 P2R과 PAR의 활성이 칼슘신호에 미치는 영향	9
그림 2. 생리적 관류액에서 칼슘에 의한 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화	10
그림 3. 고농도 K^+ 관류액에서 칼슘에 의한 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화	11
그림 4. BAPTA와 H-89가 칼슘에 의한 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 미치는 영향	12
그림 5. Wild type CFTR을 발현하는 adenoviral vector transfection에 의한 CFPAC-1 세포에서의 CFTR 발현	13
그림 6. Wild type CFTR의 발현에 의한 CFPAC-1 세포의 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가	14
그림 7. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 발현하는 AE 아형	16
그림 8. 각 AE 아형이 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 미치는 영향	17

국문 요약

췌장 관세포 중탄산염 분비에서 칼슘신호의 역할

췌장 관세포는 100~140 mM 정도의 중탄산염 (HCO_3^-)을 포함하는 췌액을 분비한다. 췌액에 고농도로 존재하는 중탄산염은 강산인 위액을 중화시켜 십이지장이 손상되는 것을 막아준다. 그리고 췌장에서 분비되는 여러 소화효소와 mucin 등의 단백질이 췌액에 잘 녹을 수 있는 환경을 제공해서 mucin plugging에 의해 췌장관이 막히는 것을 방지하며, 소화효소 활성화에 의한 췌장관 손상을 막는 기능을 한다.

췌액 분비는 췌장의 5%를 차지하는 췌장 관세포에 의해 이루어지며, 중탄산염의 분비에 중요한 역할을 하고 있는 이온수송단백은 췌장 관세포 내강막에 다량 존재하는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)와 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (anion exchanger, AE)이다. 췌장 관세포에서 이들 이온수송단백을 통한 중탄산염 분비에 대표적인 신호는 세포내 cAMP 신호와 칼슘신호이다. 최근 cAMP 신호에 의하여 CFTR과 AE가 활성화됨이 알려졌고 이것이 cAMP 증가에 의한 중탄산염 분비의 주된 분자생물학적 기전임이 규명되었다. 그러나 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 CFTR 및 AE가 칼슘신호에 의하여 어떻게 조절되고, 이것이 중탄산염 분비에 어떠한 역할을 하는지 규명하고자 하였다.

본 실험에서는 Wild type CFTR을 발현하는 CAPAN-1 세포주와 손상된 (ΔF508) CFTR을 발현하는 CFPAC-1 췌장 관세포주를 사용하였다. 이들 세포주는 퓨린성 수용체 (purinergic receptor, P2R)와 protease-activated receptor 2 (PAR2)를 발현하며, P2R과 PAR2의 활성화는 세포내 칼슘 농도를 증가 시켰다. 고농도 (120 mM) Cl^- 를 포함하는 관류액을 흘려주다 Cl^- 가 없는 관류액으로 바꾸어 주면, AE를 통한 HCO_3^- 증가로 세포내 pH가 증가하는데, 이 때 pH 증가율로 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성 정도를 측정하였다. 그리고 전기적 중성 이동인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 선택적으로 측정하기 위하여 100 mM K^+ 을 함유

하는 관류액을 이용하였다. Wild type CFTR을 발현하는 CAPAN-1 세포에서 PAR2 및 P2R의 활성화는 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 크게 증가시켰지만, 손상된 CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에서는 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변동은 없었다. 그러나 손상된 CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에 adenoviral vector를 이용해 Wild type CFTR을 발현시킨 결과 P2R 및 PAR2 활성화에 의하여 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 크게 증가하였다. 그리고 AE 아형 중 칼슘에 의하여 활성화 되는 아형이 있는지 살펴보기 위해서 내재적인 CFTR이 없는 HEK-293 세포주에 각 AE 아형을 발현시켰다. 그 결과 AE4와 Pendrin 그리고 SLC26A6에서 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가를 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 췌장 관세포에서 CFTR 의존적으로 칼슘신호가 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 이 기전은 췌장 관세포 뿐만 아니라 다른 여러 상피세포에서 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비에 있어서도 중요한 분자생물학적 기전으로 작용할 것이라 생각한다.

핵심되는 말 : 중탄산염, CFTR, anion exchanger, 칼슘

췌장 관세포 중탄산염 분비에서 칼슘신호의 역할

<지도 이민구 조교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

남 궁 완

I. 서 론

췌장 관세포는 100~140 mM 정도의 중탄산염 (HCO_3^-)이 고농도로 포함되어 있는 췌액을 분비한다. 췌장 관세포에 의한 고농도 중탄산염의 분비는 여러 가지 면에서 매우 중요한 역할을 수행하고 있다. 우선, 강산인 위액을 중화시켜 십이지장이 손상되지 않도록 막아주는 기능을 하며, 췌장에서 분비되는 여러 소화효소와 mucin 등의 단백질이 췌액에 잘 녹을 수 있는 환경을 제공해서 mucin plugging에 의해 췌장관이 막히거나, 소화효소 활성화에 의해 췌장관이 손상되는 것을 방지한다.^{1,4}

췌액 분비는 췌장의 5%를 차지하는 췌장 관세포에 의해서 이루어 지는데, 이를 가능하게 하는 것은 췌장 관세포에 내강막에 존재하는 이온수송단백들의 상호작용이다. 특히 고농도 중탄산염의 분비에 중요한 역할을 하고있는 이온수송단백은 췌장 관세포 내강막에 다량 존재하는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)와 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (anion exchanger, AE)이며, CFTR과 AE 그리고 Na^+/H^+ exchanger (NHE)의 상호작용에 의해 중탄산염의 분비가 조절된다. 그리고 췌장에서 중탄산염의 분비 조절에 있어

CFTR은 AE와 NHE의 활성 조절을 통해 핵심적인 역할을 수행하고 있다. 즉, secretin 등의 자극에 의한 cAMP 신호에 의해 활성화된 CFTR은 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange를 증가시키고, NHE 활성을 억제해서 중탄산염의 분비를 촉진시킨다. 반대로 비활성화된 CFTR은 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 활성화하지 못하고, NHE 활성을 억제하지 못하기 때문에 중탄염 분비가 억제된다.^{5,6,13,16}

췌장 관세포에서 중탄산염 분비를 증가시키는 대표적인 신호는 세포내 cAMP와 칼슘신호이다. 지금까지 중탄산염 분비에 대한 연구는 cAMP에 의한 중탄산염 분비 기전에 대한 것이 대부분이었다. 최근 중탄산염의 분비에 관세포 내강막에 존재하는 AE와 Cl^- 통로 즉, CFTR 뿐만 아니라 Ca^{2+} activated chloride channel (CaCC)의 상호작용이 중요하다는 결과가 보고 되었다.⁸ 그러나 이러한 보고는 아직까지 칼슘에 의한 중탄산염의 분비에 AE와 CFTR 그리고 CaCC가 어떤 역할을 하고 있는지에 대해서 설명하지 못하고 있다. 따라서 본 실험에서는 췌장 관세포에서 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 AE와 CFTR 그리고 CaCC의 기능을 규명하고자 하였다.

II . 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 관류액

Fura-2-AM과 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM)은 Molecular Probes (Eugene, OR)로부터 구입하였으며, Synthetic peptides (SLIGRL-NH₂ and AYPGKF-NH₂)는 한국기초과학연구소 (Seoul, Korea)에서 제작하였다. ATP와 Trypsin을 포함하는 이외의 시약은 Sigma (St, Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. 기본관류액은 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-Glucose 그리고 10 mM HEPES로 구성되어 있으며, pH는 NaOH를 사용하여 7.4로 맞추었다. HCO₃⁻ 관류액은 120 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-Glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다. Cl⁻-free HCO₃⁻ 관류액은 120 Na⁺-gluconate, 5 K⁺-gluconate, 1 MgSO₄, 1 hemicalcium cyclamate, 10 D-Glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다. 고농도 K⁺ (100 mM K⁺), HCO₃⁻ 관류액은 HCO₃⁻ 관류액에서 95 mM NaCl이 95 mM KCl로 대체되었으며, 고농도 K⁺ (100 mM K⁺), Cl⁻-free HCO₃⁻ 관류액은 Cl⁻-free HCO₃⁻ 관류액에서 95 mM Na⁺-gluconate가 95 mM K⁺- gluconate로 치환되었다.

2. 세포 배양 및 Transfection

CAPAN-1, CFPAC-1 및 HEK-293 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 각각 RPMI 1640, IMDM 그리고 DMEM 배양액에 10% FBS 첨가한 후 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, CAPAN-1과 CFPAC-1 세포주는 배양 후 trypsin/EDTA를 사용해서 세포를 분리하였고 3×10⁵ cells/cm² 정도로 Transwell-Clear Pol membrane (0.4 m pore diameter, Costar)을 사용해서 만든 permeable supporter 위에서 4~5일 정도 키워서 단일층으로 tight junction을 이루는 기능적으로 분화된 극성을 가지는 췌장 관세포로 배양하였다. WT-CFTR의 transfection은 adenoviral vector를 CFPAC-1 세포 배양액에 3시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 갈아준 뒤 2일 후 실험

하였다. Anion exchanger 아형 clone은 HEK-293 세포를 coverslip 위에서, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액과 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양한 후 LipofectAMINE Reagent (Life Technologies)를 이용해서 transfection 하였고, transfection 후 48~72 시간 배양 뒤에 실험하였다.

3. 세포내 칼슘신호 측정

단일층으로 tight junction을 이루는 기능적으로 분화된 체장 관세포에 칼슘 형광 dye인 Fura 2/AM을 30 분간 상온에서 loading하였다. 그 후 표준 관류액으로 세척한 다음 Fura2가 loading된 세포를 관류 chamber에 장착한 후 표준관류액을 흘리면서 excitation 355 nm 및 380 nm와 emission 510 nm에서 Fura 2의 형광을 Delta Ram system (PTI, NJ, USA)을 이용해서 측정하였다. 이때 관류액에 ATP 또는 trypsin을 첨가하여 P2R과 PAR2에 의한 세포내 칼슘농도 증가를 관찰하였다.

4. 세포내 pH 측정

배양한 세포를 pH 측정용 형광물질인 BCECF /AM이 4 μM 함유된 PBS에서 10 분간 loading한 후 관류 chamber에 장착한 다음 HCO₃⁻가 존재하는 관류액에서 excitation 477 nm 및 442 nm와 emission 510 nm에서 BCECF의 형광을 측정하였다.

Cl⁻/HCO₃⁻ exchange 활성 측정 : 내강막과 측저막의 관류액을 차별적으로 흘려 줄 수 있게 만들어져 있는 chamber의 측저막 쪽에는 0 mM Cl⁻가 포함된 HCO₃⁻ 관류액으로 흘려주었다. 그리고 내강막 쪽에는 145 mM Cl⁻가 포함된 HCO₃⁻ 관류액을 흘려주다가 0 mM Cl⁻가 포함된 HCO₃⁻ 관류액으로 흘려주면, AE를 통해서 세포내의 Cl⁻가 내강막쪽 관류액으로 나오고, 내강막쪽 관류액에 있는 HCO₃⁻는 세포내로 들어가서 세포내 pH를 증가시키게 된다. 따라서 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환 활성은 단위시간에 증가되는 pH를 통해서 알 수 있었다. 그리고 100 mM의 K⁺을 포함하는 HCO₃⁻ 관류액을 사용하면, Cl⁻ 통로를 통한 Cl⁻의 분비를 막을 수 있기 때문에 중성적 이온수송 단백을 통한 Cl⁻ 수송을 측정할 수 있었다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응

CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에 Guanidinium thiocyanate phenol-chloroform (Trizol, Gibco BRL, USA) 용액을 처리해서 원심분리 후 상층액을 얻어 ethanol로 침전시켜 mRNA를 추출하였다. 그리고 추출한 RNA를 random hexamer와 reverse transcriptase (SuperscriptII; Gibco BRL)를 이용하여 역전사를 하였다. 제작된 cDNA와 각 AE 아형 특이적인 primer와 Taq DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin- elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 사용한 primer의 염기서열과 예상 PCR product의 크기는 다음과 같았다.

WT-CFTR: sense (5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC ATC TT-3')
antisense (5'-TAA TTT GGG TAG TGT GAA GGG TTC-3')
PCR product: 145 base pairs

ΔF508-CFTR: sense (5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC ATT GG-3')
antisense (5'-TAA TTT GGG TAG TGT GAA GGG TTC-3')
PCR product: 142 base pairs.

AE1: sense (5'-CCC TAG ACC CTC CCC CAC CAT TCC AC-3')
antisense (5'-GCC TTT GCT TCT ACC CCT GCC TGT GC-3')
PCR product: 319 base pairs

AE2: sense (5'-ATG CCG CCC AAA CAC CAC CCA GAT G-3')
antisense (5'-CGG CTG TCC CTC GGT GGC GGC TAC A-3')
PCR product: 317 base pairs

AE3: sense (5'-GGA GTT GGG GGG CTC TGA GGC GAC-3')
antisense (5'-TCG GAC ACG CCC ATC AGC CCC TCG-3')
PCR product: 243 base pairs

AE4: sense (5'-AGC GCT TGG ACT GCC TTG GTA TGT-3')
antisense (5'-AGG GGG AAG ATG ATG GCT GCA GGG GTA GAC-3')
PCR product: 432 base pairs

DRA: sense (5'-TGC CAC AGC CAA CAG AAA AAT CAA A-3')
antisense (5'-GGG GGA ATG TCG ACC AGC AGA G-3')
PCR product: 330 base pairs

Pendrin: sense (5'-GTT TAC TAG CTG GCC TTA TAT TTG GAC TGT-3')
antisense (5'-AGG CTA TGG ATT GGC ACT TTG GGA ACG-3')
PCR product: 484 base pairs

SLC26A6: sense (5'-TAG GGG AGG TTG GGC CAG GGA TGC-3')
antisense (5'-TGC CGG GAA GTG CCA AAC AGG AAG TAG AT-3')
PCR product: 456 base pairs

6. 면역형광염색

CAPAN-1과 CFPAC-1 세포를 투과성 막에 배양하여 극성이 유지되도록 한 뒤 methanol (0.5 ml, 10 분, -20. C)로 처리하여 고정하고 permeabilization 시켰다. 그 후 Phosphate-buffered saline (PBS)으로 두 번 세척한 후 blocking 용액 (5% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% gelatin in PBS, 상온)에서 1 시간 동안 배양한 후 다시 membrane을 PBS로 두 번 세척하고 CFTR 특이적 일차항체 (anti-human CFTR monoclonal antibody, mouse IgG; R&D systems Inc. USA)를 blocking 용액에 1:100 희석한 용액에서 90 분간 배양하였다. 배양 후 PBS로 세 번 세척하고 이차항체 (anti-mouse goat IgG tagged with Fluorescein; Jackson Laboratories, West Grove, PA)를 1:100으로 희석한 용액으로 1 시간 배양한 뒤 PBS로 세 번 세척하고 Mounting media로 cover slip을 슬라이드에 고정시켜 밤새 말린 다음 Zeiss LSM 510 공초점 현미경로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 췌장 관세포주의 칼슘신호 측정

췌장 관세포 내강막에 존재하는 AE에 의한 내강막의 Cl^- 의존적 중탄산염 분비 기전에 대해서 연구하기 위하여 우선 췌장 관세포 기원인 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에 존재하는 칼슘신호 유발 수용체에 대한 실험을 수행하였다. 췌장 관세포는 다양한 P2R을 내강막과 측저막 모두에 가지고 있으며,^{9,11,14} PAR2를 측저막에 발현하고 있다.^{7,10,12} P2R 효현제인 ATP와 PAR2 효현제인 trypsin을 처리한 결과, CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 칼슘신호를 유발하는 P2R이 내강막과 측저막에 존재하였고, PAR2가 측저막에 발현함을 확인하였다 (그림 1).

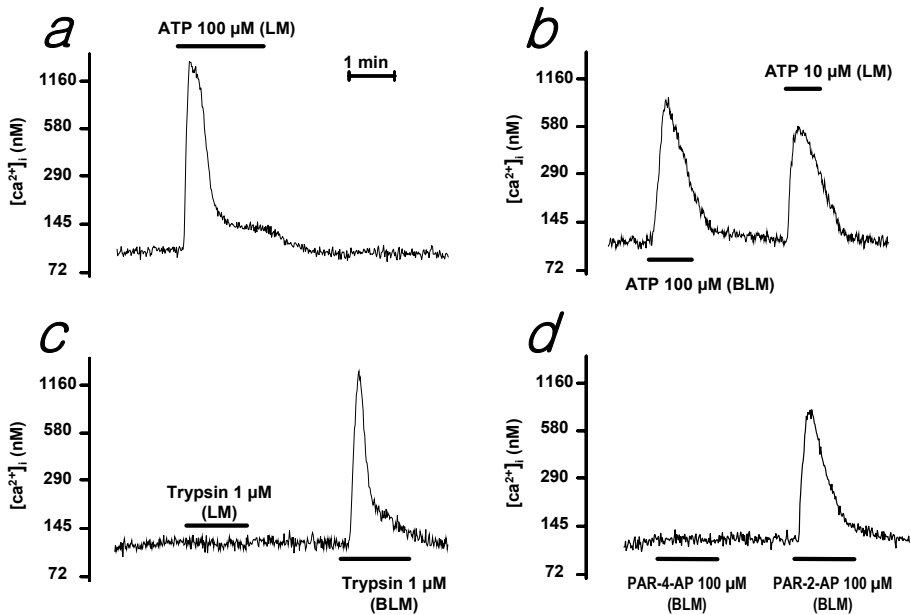


그림 1. 췌장 관세포주에서 P2R과 PAR의 활성이 칼슘신호에 미치는 영향. 분화된 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에 관류액을 기저막과 측저막으로 나누어 관류하며 Fura-2를 이용하여 칼슘신호를 측정하였다. a, 췌장 선세포에서 ATP는 biphasic 칼슘 증가를 일으켰다. b, 내강막과 측저막 모두 ATP에 의해 칼슘 증가가 일어났다. c, Trypsin은 측저막에서만 칼슘 증가를 일으켰다. d, PAR 수용체 중 PAR2 수용체가 칼슘 증가를 유발하였다. a와 d는 CAPAN-1 세포에서 그리고 b,와 c는 CFPAC-1 세포에서 수행하였다. LM: 내강막 (luminal membrane), BLM: 측저막 (basolateral membrane).

고농도 (100 μM)의 ATP를 내강막 쪽에 계속 관류할 경우 30~60 초 가량 짧고 높은 세포내 칼슘 증가를 나타내다 그 후 낮고 지속적인 칼슘 증가를 보이는 biphasic 칼슘 증가를 일으켰다(그림 1a). CAPAN-1과 CFPAC-1 세포의 ATP에 의한 칼슘 증가의 EC_{50} 값은 CAPAN-1의 경우 내강막 3.1 μM 측저막 20.6 μM 그리고 CFPAC-1의 경우 내강막 6.1 μM 측저막 19.9 μM 로 두 세포 모두 내강막 쪽에서 ATP에 대한 높은 친화력을 보였다. 최근들어 PAR 수용체의 생리적 그리고 병리적 기능이 매우 중요하게 생각되어 지는데, CAPAN-1과 CFPAC-1 세포는 PAR 수용체 중 칼슘 증가를 유발하는 수용체로 PAR2 수용체를 측저막에 발현하고 있었다 (그림 1 c, d). 그러나 PAR1, PAR3 그리고 PAR4 수용체의 효현제인 thrombin에 의해서는 내강막과 측저막 모두에서 칼슘 증가를 유발하지 못하였다 (자료 표시 안함).

2. 칼슘에 의한 췌장 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화

CAPAN-1과 CFPAC-1 세포를 투과성 막에서 3~4 일간의 배양을 통해

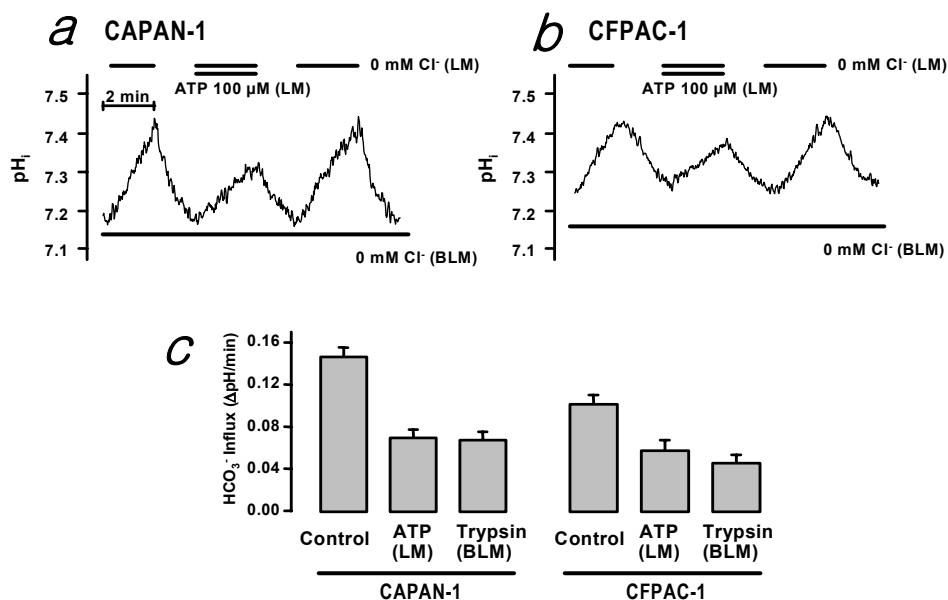


그림 2. 생리적 관류액에서 칼슘에 의한 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화. 단일 세포 층으로 분화된 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 관류액을 기저막과 측저막으로 나누어 관류하며 BCECF를 사용해서 pH 변화를 측정하였다. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포 모두 내강막 ATP에 의해 AE 활성이 감소하였으며 (a, b), 또한 측저막 trypsin에 의해서도 AE 활성이 현저히 감소하였다 (c). †: 표준오차, LM: 내강막, BLM: 측저막.

분화된 단일 세포층으로 만든 후 mini-Ussing chamber를 이용하여 관류액을 내강막과 측저막으로 나누어 관류하며 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정하였다.¹⁵ 우선 측저막 쪽에 Cl^- 가 없는 HCO_3^- 관류액을 계속 흘려주고, 내강막 쪽에 HCO_3^- 관류액을 흘려주다가 Cl^- -free HCO_3^- 관류액으로 바꾸어 흘려주어 세포내의 Cl^- 가 밖으로 나오고, 내강막 쪽의 HCO_3^- 가 세포내로 들어가 세포내의 pH를 높이는 정도로 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변동을 측정하였다.¹⁶ 이 때 모든 관류액은 5% CO_2 로 포화시켜서 수용액에 HCO_3^- 가 일정하게 유지되도록 하였다. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포의 기초 pH는 각각 7.11 ± 0.06 과 7.23 ± 0.05 이었으며, 측저막 쪽의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환은 매우 미약하여 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화 측정에 거의 영향을 주지 않았다. 생리적인 관류액 상황 하에서 ATP와 trypsin에 의한 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 변동은 현저히 감소하였다 (그림 2). 이러한 ATP와 trypsin에 의한

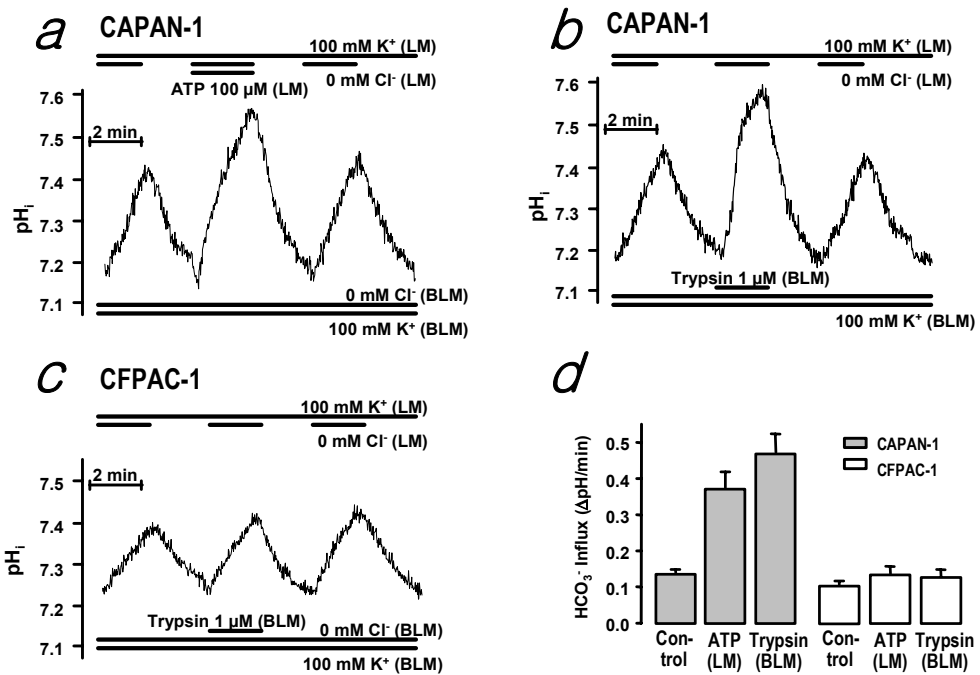


그림 3. 고농도 K^+ 관류액에서 칼슘에 의한 관세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화. 고농도 K^+ (100 mM K^+) 관류액으로 electrogenic 또는 K^+ -coupled pathway를 통한 Cl^- 이동을 막은 후 ATP와 trypsin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정하였다. CAPAN-1 세포의 경우 ATP와 trypsin에 의해 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 현저히 증가하였으며(a, b), CFPAC-1 세포에서는 변화가 없었다(c). \bar{x} : 표준오차, LM: 내강막, BLM: 측저막.

Cl⁻/HCO₃⁻ 교환 활성 감소는 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포의 내강막에 다량 존재하는 CaCC가 ATP와 trypsin에 의한 세포내 칼슘 증가에 의해 활성화 되어 세포내 Cl⁻를 세포 밖으로 이동시켜 AE를 통해 이동할 Cl⁻가 줄었기 때문이라 생각되었다. 따라서 이와 같은 가정 하에 CaCC와 CFTR을 통한 electrogenic Cl⁻ 이동을 억제한 100 mM K⁺을 포함하는 HCO₃⁻ 관류액 상황 하에서 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환을 측정하였다. 그 결과 ΔF508-CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에서는 ATP와 trypsin에 의한 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환에 변화가 없었고, WT-CFTR을 발현하는 CAPAN-1 세포에서만 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환이 증가하였다 (그림 3).

3. BAPTA에 의한 칼슘 억제가 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환에 미치는 영향

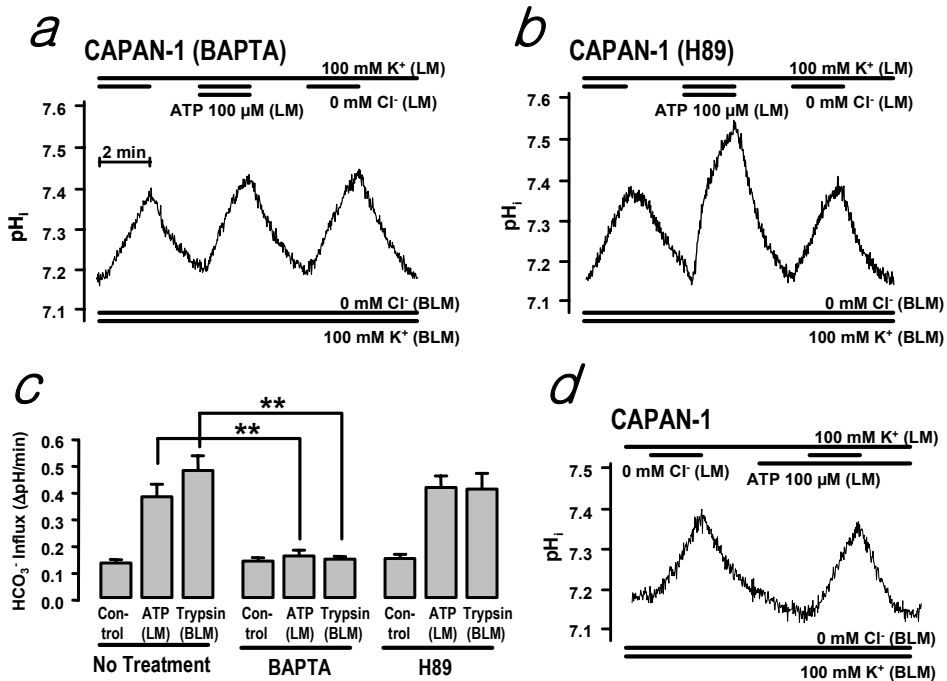


그림 4. BAPTA와 H-89가 칼슘에 의한 관세포 내강막 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환에 미치는 영향. Calcium chelator인 BAPTA-AM (a, 50 μM로 30분 전처리)과 PKA 억제제인 H-89 (b, 30 μM로 1시간 전처리)를 사용하여 CAPAN-1 세포에서 ATP로 인한 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환 변화를 측정하였다. BAPTA-AM은 ATP로 인한 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환 활성을 효과적으로 봉쇄하였으며, H-89는 ATP의 효과를 봉쇄하지 못했다 (c). CAPAN-1 세포에서 ATP를 2분간 전처리한 경우 ATP에 의한 Cl⁻/HCO₃⁻ 교환 활성 증가는 없었다 (d). **p<0.01, ±: 표준오차, LM: 내강막, BLM: 측저막.

고농도 K^+ , HCO_3^- 관류액에서 보여진 ATP와 trypsin에 의한 CAPAN-1 세포 내강막 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가가 칼슘 의존적인 반응인지를 살펴보기 위해서 칼슘 chelator인 BAPTA-AM (50 μM)을 30 분간 전처리한 후 고농도 K^+ , HCO_3^- 관류액에서 ATP와 trypsin에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 변동을 측정하였다. 그 결과 ATP와 trypsin에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가가 억제되었다 (그림 4a). BAPTA에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 억제가 칼슘 때문인지 아니면 P2R과 PAR2 수용체가 Gs 단백을 활성화시켜 내인성 cAMP/PKA pathway를 증가시켜 일어나는 반응인지를 알아보기 위해서 PKA 억제제인 H-89 (30 μM)를 한 시간 전처리한 후 50 nM의 H-89를 포함하는 관류액으로 Cl^-/HCO_3^- 교환 변화를 측정하였다. 그 결과 ATP와 trypsin에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가를 억제하지 못하였다 (그림 4b). 따라서 ATP와 trypsin에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 활성화는 칼슘 의존적인 현상이며, 이는 CAPAN-1 세포에서 ATP를 2분간 전처리해서 낮은 칼슘 농도를 나타낼 때 Cl^-/HCO_3^- 교환 변동을 측정하였을 때 Cl^-/HCO_3^- 교환이 증가하지 않는 것과 잘 부합하였다 (그림 4d).

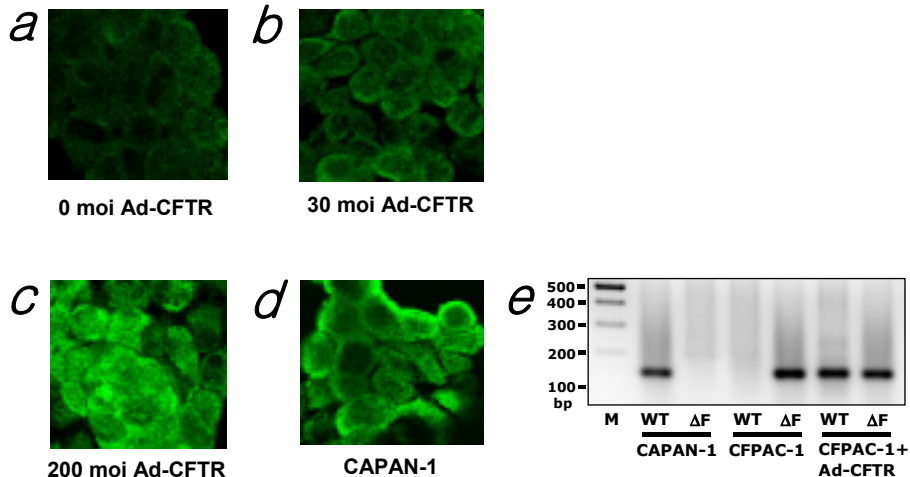


그림 5. Wild type CFTR을 발현하는 adenoviral vector (Ad-CFTR) transfection에 의한 CFPAC-1 세포에서의 CFTR 발현. Ad-CFTR을 200 moi로 $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에 transfection한 결과 wild type과 $\Delta F508$ -CFTR mRNA를 모두 발현하는 것을 관찰하였다 (e). CFTR에 대한 immunoblotting은 Ad-CFTR transfection 48 시간 후에 수행하였으며, R-domain에 특이적인 mouse 단일클론 항체를 사용하였다. 각 형광염색 사진은 Zeiss LSM510 공초점 현미경을 이용하여 동일한 image acquisition 상황에서 촬영되었다 (a~d). Ad-CFTR 200 moi를 transfection한 CFPAC-1 세포는 CAPAN-1 세포보다 1.4 배 많은 형광을 띠었다 (c, d).

4. Wild type - CFTR 발현이 CFPAC-1 세포에서 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 미치는 영향

CAPAN-1 세포에서 보이는 ATP와 trypsin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성 증가가 CFPAC-1 세포에서는 나타나지 않았는데 그 이유가 CFTR 때문인지를 알아보기 위하여 CFPAC-1 세포에 WT-CFTR을 발현하는 adenoviral vector (Ad-CFTR)를 transfection해서 실험하였다. 먼저 Ad-CFTR이 CFPAC-1 세포에서 정상적으로 발현하는지를 살펴보기 위해서 RT-PCR과 면역형광염색을 수행하였다. Ad-CFTR을 200 moi로 CFPAC-1 세포에 transfection한 후 24 시간 뒤에 총 mRNA를 얻어 cDNA를 합성하고 PCR을 수행한 결과, Ad-CFTR을 transfection한 CFPAC-1 세포에서 WT-CFTR과 ΔF508 -CFTR transcript가 모두 발현되었다 (그림 5e). 또한 CFTR R-domain에 특이적인 mouse 단일클론 항체를 사용하여 Ad-CFTR을 30 그리고 200 moi로

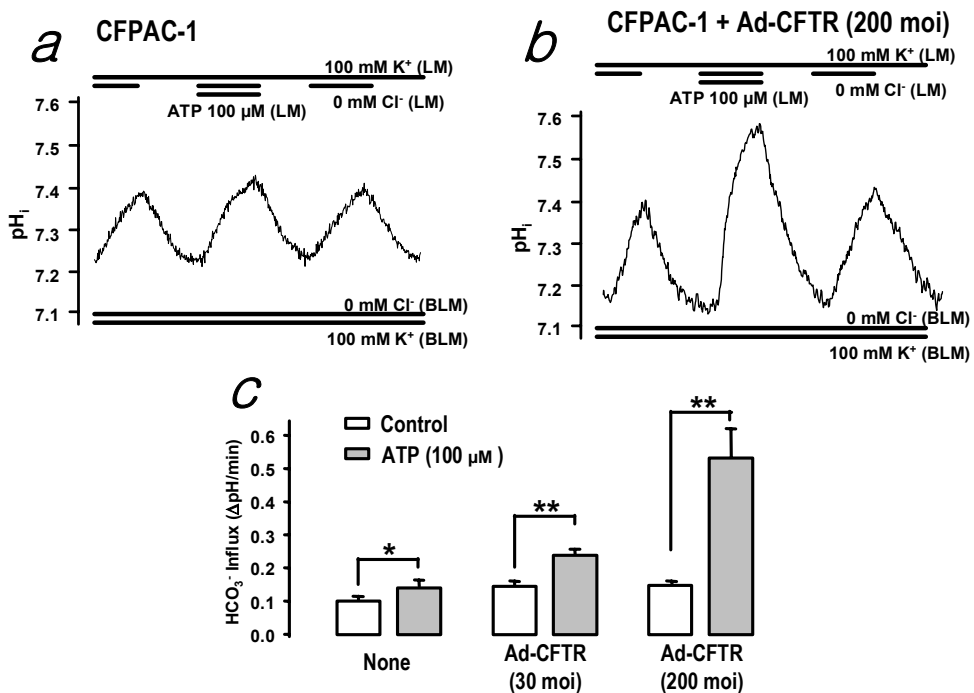


그림 6. Wild type CFTR의 발현에 의한 CFPAC-1 세포의 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가. Ad-CFTR transfection에 의해서 ATP 자극에 의한 CFPAC-1 세포 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 증가하였으며, Ad-CFTR 200 moi로 transfection한 경우 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 증가하였다 (b, c). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, \pm : 표준오차, LM: 내강막, BLM: 측저막.

CFPAC-1 세포에 transfection한 후 48 시간 뒤에 면역형광염색을 수행한 결과 넣어준 Ad-CFTR의 양에 비례하여 CFTR의 발현양이 증가하는 양상을 보였다. Ad-CFTR 200 moi를 transfection한 CFPAC-1 세포는 CAPAN-1 세포보다 1.4 배 많은 형광을 띠어 CAPAN-1 세포보다 약간 많은 양의 CFTR을 발현함을 관찰하였다 (그림 5). 이로써 실험에 사용한 Ad-CFTR이 정상적으로 CFPAC-1 세포에서 발현함을 확인하였다. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에 WT-CFTR을 발현하는 Ad-CFTR을 transfection한 후 고농도 K^+ , HCO_3^- 관류액에서 Cl^-/HCO_3^- 교환을 측정할 결과 ATP 자극에 의해서 CFPAC-1 세포 내강막 Cl^-/HCO_3^- 교환이 크게 증가하였다 (그림 6). 따라서 칼슘에 의한 췌장 관세포 내강막 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가에 CFTR이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 하지만 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포가 가지고 있는 AE의 아형이 다를 것이고, 칼슘과 CFTR에 의해서 활성이 조절 되는 AE 아형이 존재할 수도 있기 때문에, 이러한 현상을 구체적으로 설명 하기 위해서 CFTR 뿐만 아니라 각 세포가 가지고 있는 AE 아형과 각 아형의 칼슘신호에 대한 반응을 살펴보았다.

5. 췌장 관세포주에 존재하는 anion exchanger 아형 검색

CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에 존재하는 AE 아형을 검색하기 위해서 지금까지 알려진 높은 Cl^-/HCO_3^- 교환 기능을 가지고 있는 SLC4 family에 속하는 AE1, AE2, AE3, AE4 그리고 SLC26 family에 속하는 DRA (SLC26A3), Pendrin(SLC26A4, PDS), SLC26A6 (PAT1)을 대상으로 RT-PCR을 수행하였다.²⁴⁻²⁷ 그 결과 CAPAN-1 세포는 AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였고, CFPAC-1 세포는 AE2~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였다 (그림 7). CAPAN-1과 CFPAC-1 세포 모두에서 DRA의 발현은 없었으며 양성 대조군인 T-84 cell에서 DRA가 발현함을 확인하였다.²⁸ CAPAN-1 세포에서만 발현하는 AE 아형은 AE1이 있었다.

6. AE 유전자 발현 세포주에서 칼슘신호에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 변동

CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 발현하고 있는 anion exchanger 아형 AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 human embryonic kidney 세포인

HEK-293 세포에 LipofectAMINE Reagent를 사용하여 각 clone을 transient transfection한 후 48~72 시간 후에 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하였다. 이 때 HEK-293 세포를 6 well plate에 cover-slip을 넣고 그 위에 같은 수를 붙여서 하루 동안 배양하였다. 그 후 각 clone을 $1\mu\text{g}$ 씩 transfection 하였다. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 측정은 HCO_3^- 관류액을 사용하여 이루어졌으며, HEK-293 세포 자체는 내재적 CFTR 활성화에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성이 거의 없으며, ATP 자극에 의해서 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포와 같이 짧고 높은 칼슘 증가를 나타냈다. 따라서 HEK-293 세포를 이용한 시스템을 사용해서 CFTR을 배제한 칼슘에 의한 각 AE 아형의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정할 수 있었다. HEK-293 세포에 각 AE 아형을 transfection한 결과 ATP 자극에 의해서 AE1, AE2 그리고 AE3에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성의 증가는 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 비해 유의할만한 변화를 보이지

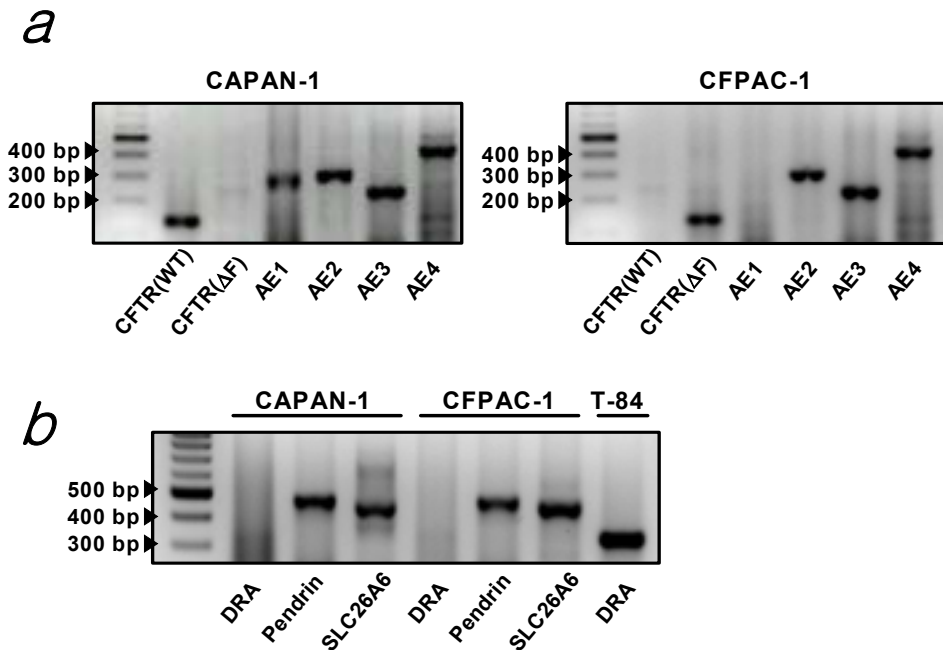


그림 7. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 발현하는 AE 아형. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포로부터 얻은 cDNA를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 CAPAN-1 세포는 AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였고, CFPAC-1 세포는 AE2~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였다 (a, b).

않았다. 그러나 AE4, Pendrin 그리고 SLC26A6은 ATP 자극에 의해서 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성의 증가를 나타내었다 (그림 8). 물론 모든 AE 아형에서 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환은 Mock vector를 transfection한 HEK-293 세포의 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환보다 3~6 배 정도 증가하였다(그림 8b).

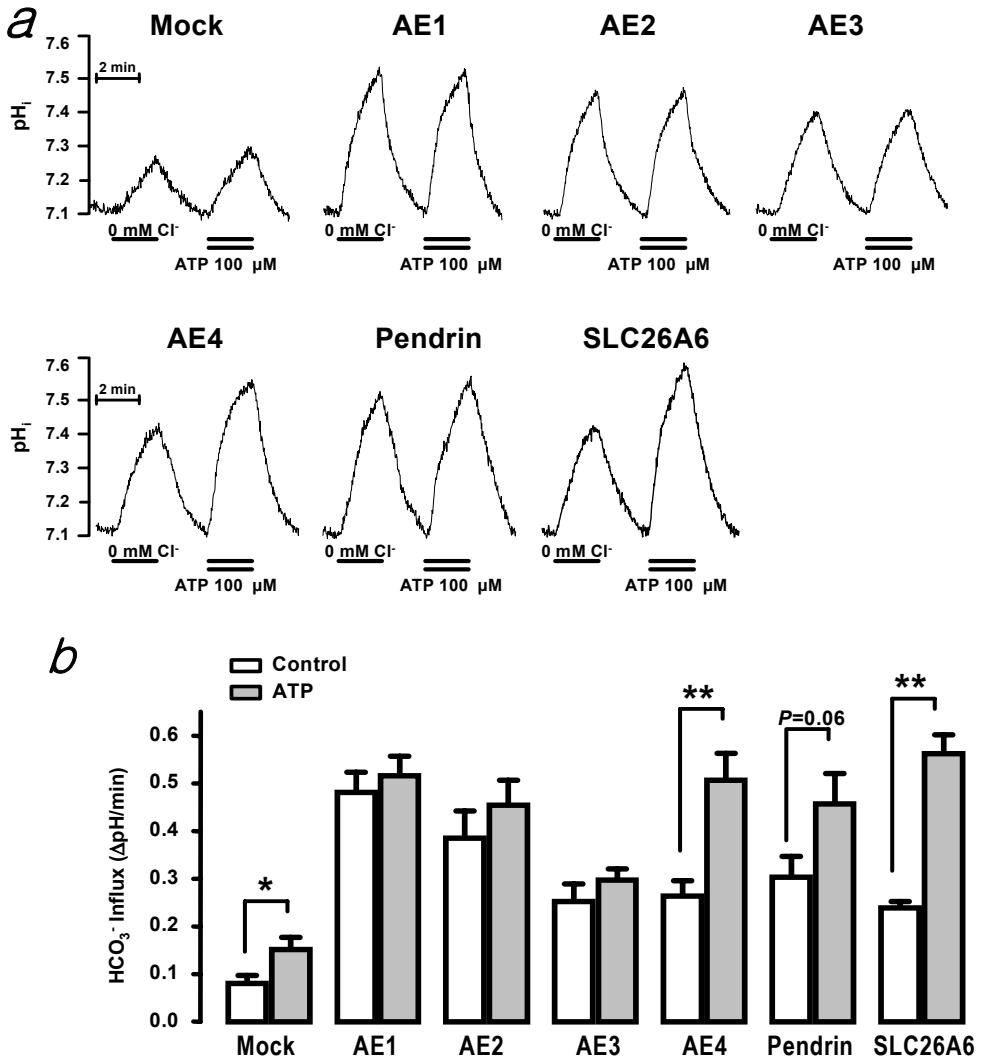


그림 8. 각 AE 아형이 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 미치는 영향. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 발현하는 anion exchanger 아형을 HEK-293 세포에 transient transfection 후 48~72 시간 뒤에 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성을 측정하였다 (a). AE4, Pendrin 그리고 SLC26A6가 ATP 자극에 의해 HEK-293 세포의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성을 증가시켰다 (b). *p<0.05, **p<0.01, $\bar{\pm}$: 표준오차.

특히 CAPAN-1 세포에서만 발현하고 있는 AE1의 경우, CAPAN-1 세포에서 보이는 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가를 가장 잘 설명할 수 있는 anion exchanger 아형으로 기대했었다. 하지만 실제 ATP에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정 한 결과 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가는 없었다. 따라서 지금까지의 결과를 살펴볼 때 CAPAN-1 세포에서 관찰되는 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성 증가는 CFTR에 의한 조절일 가능성이 크다고 생각할 수 있었다. 그림 7에서 보여주진 않았지만, HEK - 293 세포에 anion exchanger를 transient transfection한 방법으로 WT-CFTR을 발현하는 PCMV-CFTR을 transfection한 후 ATP에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 관찰한 결과 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 비해 3 배 정도 증가하였다.

IV. 고찰

췌장 관세포는 최고 140 mM의 중탄산염이 고농도로 포함되어 있는 췌액을 분비하며, 중탄산염의 분비는 mucin plugging에 의해 췌장관이 막히거나, 소화효소 활성화에 의해 췌장관이 손상되는 것을 방지한다. 현재 이러한 고농도 중탄산염 분비 기전에는 크게 두 가지 기전이 중요할 것이라고 생각되고 있다. 첫째 CF 환자에서 보여지는 심한 췌액의 중탄산염 결핍 현상을 통해 CFTR이 중탄산염 분비에 중요한 역할을 할 것이라는 것과,^{2,3} 둘째 췌장 관세포 내강막 AE가 췌장 중탄산염 분비에 있어 적어도 70~80 mM의 중탄산염 분비를 가능하게 할 수 있다는 것이 그 것이다.¹³ 이는 최근 보고되고 있는 CFTR 발현 의존적인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성화에 대한 연구와 CFTR 의존적 중탄산염 분비가 췌장관 가지의 patency 유지에 중요한 기능을 하고 있다는 일련의 연구 성과와 잘 부합한다.^{2,3,17}

지금까지 CFTR 의존적 중탄산염 분비에 대한 많은 연구들은 secretin 또는 vasoactive intestinal peptide (VIP) 등에 의한 세포내 cAMP 증가가 CFTR과 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 주로 설명하고 있다. 최근 cholecystokinin (CCK)과 acetylcholine 같이 세포내 칼슘을 증가시킬 수 있는 약물이 췌액과 중탄산염 분비를 증가시킨다는 보고는 있었지만,^{1,18,30} 칼슘에 의한 중탄산염 분비에 대한 분자기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 본 실험은 칼슘 효현제에 의한 췌장 관세포 내강막 중탄산염 분비에 대한 분자기전을 밝히는데 그 의의가 있다고 하겠다.

실험에 사용한 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포는 permeable supporter에서 3~4 일간의 배양을 통해 내강막과 측저막으로 완전히 분화된 상태였기 때문에 실제 췌장 관세포에서 일어나는 현상을 보다 잘 나타낼 수 있는 실험 모델이었다. 이들 췌장 관세포주 모두에서 PAR2 수용체가 측저막에만 발현하고 있었다는 것이 실험에 사용한 세포가 완전히 분화된 세포였음을 보여준다 (그림 1).⁷ KCl을 5 mM 포함하는 HCO_3^- 관류액에서 ATP와 trypsin에 의해서 감소한 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성화는 오히려 ATP와 trypsin 자극에 의한 칼슘 증가가 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성을 감소시켜 중탄산염 분비를 억제하는 것처럼 보였다 (그림 2). 하지만 이 결과는

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하는 방법이 실제 췌장 관세포에 일어나는 중탄산염 분비 방향과는 반대로 Cl^- 는 세포 안에서 밖으로 그리고 HCO_3^- 는 세포 밖에서 안으로 이동하였기에 나타난 현상으로 설명할 수 있다. 즉, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 측정 당시 Cl^- 가 세포 안쪽에 고농도로 존재하고 세포 외부에는 Cl^- 가 전혀 존재하지 않기 때문에 칼슘 증가에 의해서 CaCC가 활성화되어 AE를 통해 이동할 Cl^- 가 대부분이 CaCC를 통해 이동했기 때문이다.⁸ 그러나 실제 췌장 관세포에서 AE를 통한 Cl^- 는 세포 밖에서 안으로 그리고 HCO_3^- 는 세포 안에서 밖으로 이동하기 때문에 칼슘에 의한 CaCC의 활성화는 중탄산염 분비를 촉진할 수 있다. 본 실험에서는 CFTR이나 CaCC를 통한 전기생성적인 Cl^- 이동을 막은 후 전기중성적인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환만을 측정하기 위해서 100 mM KCl을 포함하는 HCO_3^- 관류액을 사용하였다. 이때 WT-CFTR을 발현하는 CAPAN-1 세포에서 ATP 자극에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환은 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환보다 164% 증가하였고, ΔF508 -CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포에서는 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환은 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환에 비해서 27% 증가하였다 (그림 3). CAPAN-1 세포에서 나타난 ATP 자극에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가가 ATP와 trypsin에 의해 증가된 세포내 칼슘 때문이지를 확인하기 위해 칼슘 chelator BAPTA를 처리하였다. 그 결과 ATP와 trypsin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가가 억제되었다. 또한 Gs 단백을 활성화에 의한 내재적인 cAMP/PKA pathway를 증가시켜 일어나는 반응인지를 알아보기 위해서 PKA 억제제인 H-89를 처리한 결과 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가를 거의 억제하지 못하였다.¹⁹ 이로써 CAPAN-1 세포에서 보여지는 ATP와 trypsin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가는 칼슘에 의해 크게 영향 받음을 확인 할 수 있었다 (그림 4). 그리고 CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 보여진 ATP 자극에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화가 CFTR 때문인지 알아보기 위해 CFPAC-1 세포에 Ad-CFTR을 transfection한 결과 200 moi에서 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환보다 246% 증가하였다 (그림 6). Ad-CFTR 200 moi를 transfection한 CFPAC-1 세포는 면역형광염색 결과 CAPAN-1 세포보다 1.4 배 많은 형광을 띠었는데 이 결과는 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가 결과와도 잘 일치했다 (CAPAN-1: 164%, Ad-CFTR CFPAC-1: 246%). 이상의 결과로 볼 때 췌장 관세포 내강막에서 칼슘에 의한 중탄산염 분비에 있어 CFTR이 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

중탄산염 분비에 있어 CFTR과 같이 중요한 역할을 하고 있는 단백질의 하나로 anion exchanger (AE)가 있다. 따라서 AE 아형이 각각의 세포에 어떻게 발현하고 있는지와 세포내 칼슘 증가에 의해 각 AE 아형의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 어떻게 변화 되는지를 살펴보아야만 칼슘에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가 기전을 올바르게 이해할 수 있기 때문에 AE 아형에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과 CAPAN-1 세포는 AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현했고, CFPAC-1 세포는 AE2~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였다 (그림 7). AE 아형 중 AE1만이 CAPAN-1 세포에 특이적으로 발현하고 있었는데, ATP에 의한 칼슘 증가는 AE1의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 증가에 거의 영향을 주지 못하였다. 단지 각 세포에 모두 발현하고 있는 AE4, Pendrin 그리고 SLC26A6만이 ATP에 의한 칼슘 증가에 의해 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 증가하였다. 따라서 이들 아형들이 세포내 칼슘 신호에 의해 그 활성이 조절되는 AE일 가능성이 크며, 이들이 CFTR 존재시 단백질 발현이 증가하거나 혹은 활성이 증가되는지는 후속 연구에서 밝혀야 할 것으로 생각된다.

본 실험의 결과는 비단 췌장 관세포 뿐만 아니라 다른 상피세포에서의 중탄산염 분비 기전에도 적용될 것으로 생각된다. 즉, CF 환자의 경우 중탄산염 분비 결핍으로 인해 산성이고 고장성인 땀을 분비하는데,²⁰ 땀샘에서 땀 분비 신호는 cAMP가 아닌 콜린성 수용체에 의한 칼슘신호가 주요 기전이다. 그런데 CFTR은 cAMP에 의해 활성화되는 Cl^- 통로로 알려져 왔기 때문에 이러한 현상을 설명하기가 힘들었다.^{21,22} 하지만 본 실험 결과 세포내 칼슘 증가에 의한 중탄산염 분비에 있어서 CFTR이 핵심적인 역할을 수행하고 있음을 생각해 볼 때 위의 현상을 설명하는데 도움이 될 수 있을 것이다. 그리고 CCK와 acetylcholine에 의한 중탄산염 분비 증가에 있어 본 실험 결과는 그 기전을 적절히 설명할 수 있다. 즉, 콜린성 수용체의 자극에 의해 췌장 관세포의 칼슘 증가뿐만 아니라 췌장 선세포의 zymogen granule이 세포 외로 유출되면서 zymogen granule 속에 포함되어 있는 고농도의 ATP에 의해 췌장 관세포 내강막의 P2R이 활성화되어 칼슘 신호가 일어나고 이는 중탄산염 분비를 더욱 촉진시킬 수 있을 것이다.^{11,29} 또한 최근 들어 주목을 받고 있는 PAR2 수용체의 생리적 역할을 생각해 볼 수 있다. 췌장염 등에 의해 mast cell이 활성화되면 mast cell에서 분비되는 tryptase나 췌장 선세포에서 분비되는 auto-activated trypsin은

PAR2를 활성화할 수 있다. 이러한 PAR2의 활성화 역시 췌장 관세포 내강막의 중탄산염 분비를 증가시킬 수 있으며, 이는 췌장염에 있어 일시적인 방어기전으로 작용할 수 있다.^{7,23}

이상의 결과를 종합하여 볼 때 췌장 관세포에서 CFTR 의존적으로 칼슘 신호가 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 이 기전은 췌장 관세포 뿐만 아니라 다른 여러 상피세포에서 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비에 있어서도 중요한 분자생물학적 기전으로 작용할 것이라 생각한다.

V. 결 론

본 연구에서는 췌장 관세포 중탄산염 분비에 있어서 칼슘 신호가 어떠한 역할을 하는지에 대한 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에서 칼슘신호를 유발하는 P2R 수용체는 내강막과 측저막 모두에 발현하였고, PAR2 수용체는 측저막에만 발현하였다.
2. 고농도 K^+ 함유 관류액에서 ATP와 trypsin에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 변화를 측정된 결과 CAPAN-1 세포는 ATP와 trypsin에 의해 Cl^-/HCO_3^- 교환이 현저히 증가하였으며, CFPAC-1 세포는 변화가 없었다.
3. CAPAN-1 세포를 Calcium chelator인 BAPTA 처리 후 ATP로 인한 Cl^-/HCO_3^- 교환 변화를 측정된 결과 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가가 효과적으로 억제되었고, PKA 억제제인 H-89는 ATP로 인한 Cl^-/HCO_3^- 교환 증가를 억제하지 못하였다.
4. CFPAC-1 세포에 Ad-CFTR transfection한 결과 ATP 자극에 의한 내강막 Cl^-/HCO_3^- 교환이 증가하였으며, Ad-CFTR 200 moi로 transfection 한 경우 basal Cl^-/HCO_3^- 교환보다 246% 증가하였다.
5. CAPAN-1과 CFPAC-1 세포에 발현하고 있는 AE 아형을 RT-PCR을 통해서 확인하였으며, 그 결과 CAPAN-1 세포는 AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였고, CFPAC-1 세포는 AE2~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 발현하였다.
6. AE1~4, Pendrin 그리고 SLC26A6를 HEK-293 세포에 transient transfection 후 칼슘신호에 의한 AE 활성 변화를 측정된 결과 AE4, Pendrin 그리고 SLC26A6에서만 ATP 자극에 의해 Cl^-/HCO_3^- 교환이 증가하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 췌장 관세포에서 CFTR 의존적으로 칼슘 신호가 Cl^-/HCO_3^- 교환을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 이 기전은 췌장 관세포 뿐만 아니라 다른 여러 상피세포에서 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비에 있어서도 중요한 분자생물학적 기전으로 작용할 것이라 생각한다.

참고문헌

1. Argent, B. E., and Case, R. M. Physiology of the Gastrointestinal Tract. 3rd Ed. New York: Raven Press; 1994 p. 1473-1497
2. Johansen PG, Anderson CM, Hadorn B. Cystic fibrosis of the pancreas. A generalised disturbance of water and electrolyte movement in exocrine tissues. Lancet. 1968 Mar 2;1(7540):455-6
3. Kopelman H, Durie P, Gaskin K, Weizman Z, Forstner G. Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. N Engl J Med. 1985 Feb 7;312(6):329-34
4. Quinton PM. The neglected ion: HCO_3^- . Nat Med. 2001 Mar;7(3):292-3
5. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S. Regulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. J Biol Chem. 1999 Feb 5;274(6):3414-21
6. Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Choi JY, Moe OW, Milgram SL, Muallem S, Lee MG. Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO_3^- salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. J Biol Chem. 2001 May 18;276(20):17236-43
7. Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett NW. Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. J Clin Invest. 1999 Jan;103(2):261-9
8. Zsembery A, Strazzabosco M, Graf J. Ca^{2+} -activated Cl^- channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion. FASEB J. 2000 Nov;14(14):2345-56
9. Luo X, Zheng W, Yan M, Lee MG, Muallem S. Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells. Am J Physiol. 1999 Aug;277(2 Pt 1):C205-15
10. Kawabata A, Nishikawa H, Kuroda R, Kawai K, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion in vivo in rats and mice. Br J Pharmacol. 2000 Apr;129(8):1808-14
11. Sorensen CE, Novak I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. J Biol Chem. 2001 Aug 31;276(35):32925-32

12. Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Bunnett NW, et al Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J.* 1996 Mar 15;314 (Pt 3):1009-16
13. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. HCO₃⁻ transport in a mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol.* 2000 Jul 1;176(1):77-100
14. Lee MG, Zeng W, Muallem S. Characterization and localization of P2 receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):32951-5
15. Ko WH, Law VW, Wong HY, Wilson SM. The simultaneous measurement of epithelial ion transport and intracellular free Ca²⁺ in cultured equine sweat gland secretory epithelium. *J Membr Biol.* 1999 Aug 1;170(3):205-11
16. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):14670-7
17. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):94-7
18. Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM, Steward MC. Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol.* 2001 Sep 15;535(Pt 3):795-807
19. Jia Y, Mathews CJ, Hanrahan JW. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem.* 1997 Feb 21;272(8):4978-84
20. Quinton, P. M. Suggestion of an abnormal anion exchange mechanism in sweat glands of cystic fibrosis patients *Pediatr Res* 1982 16: 533-537
21. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature.* 1983 Feb 3;301(5899):421-2
22. Bijman J, Quinton PM. Predominantly beta-adrenergic control of equine sweating. *Am J Physiol.* 1984 Mar;246(3 Pt 2):R349-53
23. Vergnolle N. proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Mar;14(3):257-66

24. Lohi H, Kujala M, Kerkela E, Saarialho-Kere U, Kestila M, Kere J. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics*. 2000 Nov 15;70(1):102-12
25. Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK. The AE gene family of Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers. *J Nephrol*. 2002 Mar-Apr;15 Suppl 5:S41-53
26. Parker MD, Ourmozdi EP, Tanner MJ. Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Apr 20;282(5):1103-9
27. Wang Z, Petrovic S, Mann E, Soleimani M. Identification of an apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Mar;282(3):G573-9
28. Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Seidler U, et al. Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*. 2002 Mar;122(3):709-24
29. Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM, et al. Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol*. 2001 Sep 15;535(Pt 3):795-807
30. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Luminal ATP stimulates fluid and HCO₃⁻ secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J Physiol*. 1999 Sep 1;519 (Pt 2):551-8

Abstract

Role of calcium signaling in pancreatic bicarbonate secretion

Wan Namkung

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Assistant Professor Min Goo Lee)

Pancreatic duct cells secrete bicarbonate-rich fluids, which are important for maintaining the patency of pancreatic ductal trees as well as the intestinal digestive function. The bulk of bicarbonate secretion in the luminal membrane of duct cells is mediated by a Cl^- -dependent mechanism ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange). In the present study, we provide comprehensive evidence that calcium signaling also activates the same CFTR- and Cl^- -dependent HCO_3^- transport. ATP and trypsin evoked intracellular calcium signaling in pancreatic duct-derived cells through the activation of purinergic and protease-activated receptors, respectively. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity was measured by recording pH_i in response to $[\text{Cl}^-]_o$ changes of the perfusate. In perfusate containing high concentrations of K^+ , which blocks Cl^- movement through electrogenic or K^+ -coupled pathways, ATP and trypsin highly stimulated luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity in CAPAN-1 cells expressing wild type (WT)-CFTR, but not in CFPAC-1 cells which have defective (ΔF508) CFTR. Notably, adenoviral transfection of WT-CFTR in CFPAC-1 cells completely

restored the stimulatory effect of ATP on luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. In addition, the chelation of intracellular calcium by BAPTA treatment abolished the effect of calcium agonists on luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. Among known anion exchanger, AE1~4, pendrin and SLC26A6 were expressed in pancreatic duct cells. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activities of SLC26 family were activated either by ATP or trypsin treatment. However, none of SLC4 family except AE4 were activated by calcium. These results provide a molecular basis for calcium-induced bicarbonate secretion in pancreatic duct cells and highlight the importance of CFTR in epithelial bicarbonate secretion induced by various stimuli.

Key Words : bicarbonate, CFTR, anion exchanger, calcium signaling