

흰쥐 췌장 선세포에서 H_2O_2 가
아밀라제 분비과정에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 진 학

흰쥐 췌장 선세포에서 H_2O_2 가
아밀라제 분비과정에 미치는 영향

지도교수 서 정 택

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 진 학

이진학의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

이 논문을 위하여 바쁘신 가운데 시종 지도, 교열해 주신 서 정택 지도 교수님과 심신 양면으로 후원해 주신 구강생물학 교실 이승일 주임 교수님, 소아치과 이 제호 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

논문과 실험 때문에 제일 고생하시고 가장 많이 도움 주신 안 정미 선생님을 비롯한 우리 구강생물학 약리학 교실 식구들, 언제나 웃는 낯으로 친절하게 맞이해 준 구강생물학 생리학 교실 김 민석군과 조 해군께도 고맙다는 말씀을 전합니다.

항상 저를 믿고 대견스러워 하시는 부모님, 병원일과 학교 공부로 늦은 밤에 귀가하는 남편을 반갑게 맞아주며 격려해 준 제 아내, 너무나 사랑스러운 쌍둥이 예인이와 건이에게 이 논문을 바칩니다.

2004년 12월
저자 씀

차례

그림차례.....	ii
국문요약.....	iii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
1. 재료.....	5
2. 실험방법.....	5
가. 췌장 선세포 분리.....	5
나. 아밀라제 유리 측정.....	6
다. 세포내 칼슘 농도 측정.....	6
III. 결과.....	8
1. 췌장 선세포에서 아밀라제 유리에 대한 H ₂ O ₂ 의 영향.....	8
2. 췌장 선세포에서 아밀라제 유리에 대한 항산화제의 영향.....	8
3. H ₂ O ₂ 가 세포내 칼슘 변동에 미치는 영향.....	12
4. 췌장 선세포에서 CCK에 의한 칼슘변동에 H ₂ O ₂ 의 영향.....	14
5. CCK에 의한 췌장 선세포내 칼슘변동에 항산화제의 영향.....	16
IV. 고찰.....	20
V. 결론.....	24
참고문헌.....	25
영문요약.....	30

그림 차례

Figure 1. CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

Figure 2. Effect of H₂O₂ on CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

Figure 3. Effect of ROS scavengers on CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

Figure 4. Effect of various ROS scavengers on optical density.

Figure 5. Effect of H₂O₂ on intracellular calcium concentration in rat pancreatic acinar cells.

Figure 6. Effect of H₂O₂ on CCK-induced [Ca²⁺]_i oscillations in rat pancreatic acinar cells.

Figure 7. Effect of H₂O₂ on CCK-induced [Ca²⁺]_i increases in rat pancreatic acinar cells.

Figure 8. Effect of NAC on CCK-induced [Ca²⁺]_i oscillations in rat pancreatic acinar cells.

흰쥐 췌장 선세포에서 H_2O_2 가 아밀라제 분비과정에 미치는 영향

활성산소종 (reactive oxygen species)은 생체내 대사과정 중에 생성되는 부산물로서 당뇨병과 신경퇴행성질환과 같은 질병 유발에 관련이 있으며 동시에 세포의 생리적 작용을 매개하는 이차전령체로서의 역할도 가지고 있다. 그러나 활성산소종의 외분비 선세포에서의 생리학적인 역할에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 흰쥐 췌장 선세포에서 활성산소종인 H_2O_2 가 CCK (cholecystokinin)에 의한 아밀라제 유리에 미치는 영향과 그 기전을 알아보고자 하였다.

세포는 흰쥐의 췌장에서 collagen digestion 과정을 통해 얻었으며 아밀라제 유리는 전분을 기질로 이용하여 Bernfeld의 방법에 따라 측정하였다. 먼저 췌장 선세포를 CCK로 자극하여 아밀라제 유리에 대한 농도-반응 곡선을 구하고 30 μM H_2O_2 을 함께 처리하여 CCK에 대한 반응과 비교하였다. 30 μM H_2O_2 을 함께 처리하였을 때 저농도의 CCK (≤ 10 pM CCK)에서는 아밀라제 유리를 향진시키고 100 pM 이상 농도의 CCK에서는 아밀라제 유리를 억제하였다. 췌장 선세포가 CCK에 의해 활성화될 때 활성산소종이 생성되어 아밀라제 유리에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 세포내 활성산소종을 없애는 항산화제인 MnTBAP를 처리하였다. 10 μM MnTBAP는 저농도의 CCK에 대한 효과는 거의 없었으나 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 CCK를 단독 처리했을 때의 반응보다 증가하였다.

H_2O_2 의 영향으로 CCK에 의한 아밀라제 유리 변화가 세포내 칼슘농도의 변화와 관련이 있는지 알아보기 위하여 칼슘 농도에 민감하게 반응하는 형광물질인 fura-2를 이용하여 세포내 칼슘 농도를 측정하였다. 20 pM CCK에 의해 칼슘 oscillations이 나타날 때 30 μM H_2O_2 의 처리는 칼슘 oscillations의 빈도와 크기가

증가하는 양상을 보였지만 2 nM CCK에 의한 세포내 칼슘의 증가에는 영향을 미치지 못하였다. 또한 10 pM CCK에 의해 세포내 칼슘 oscillations가 유발될 때 항산화제인 1 mM NAC의 첨가는 칼슘 oscillations의 빈도에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과를 토대로 췌장 선세포에서 30 μ M H₂O₂가 직접 칼슘 oscillations를 유발하지는 않았지만, 저농도의 CCK가 IP₃ 의존성 칼슘 저장고로부터 칼슘 oscillations을 유발할 때 30 μ M H₂O₂가 IP₃ 의존성 칼슘저장고에 작용하여 칼슘 oscillations를 증가시키고 아밀라제 유리를 향진시킨 것으로 생각된다. 그러나 고농도의 CCK에서 30 μ M H₂O₂가 아밀라제 유리를 감소시킨 작용은 세포내에 아밀라제 유리에 관련된 단백질에 직접 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이는 앞으로 더 연구되어야 할 부분이다.

핵심되는 말 : H₂O₂, 활성산소종 (ROS), 항산화제, CCK, 아밀라제, 칼슘 oscillations, 췌장 선세포

흰쥐 췌장 선세포에서 H₂O₂가 아밀라제 분비과정에 미치는 영향

<지도교수 서정택>

연세대학교 대학원 치의학과

이진학

I. 서론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 생체 내 대사과정의 부산물로 생성되며 superoxide radical anion, singlet oxygen, hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical과 hypochlorous acid 등이 속한다 (Kourie, 1998). 또한 활성산소종은 NADPH oxidase, xanthine oxidase 등과 같은 특정한 효소작용에 의해서도 생성된다 (Droge, 2002). 그동안 활성산소종은 주로 근육, 내피 세포, 신경세포 등의 많은 세포에서 세포독성을 야기하고 다양한 질환의 발생에 관여하는 물질로 연구 대상이 되어왔다 (Hussain 등, 1994). 세포 내 독성 작용이 세포 내 활성산소종의 증가에 의해 이루어지고, 세포에 활성산소종을 첨가하거나 항산화제를 없앴을 때 세포고사가 일어나며, 많은 항산화제나 N-acetyl-L-cysteine (NAC)과 같은 free-radical scavenger의 처리로 TNF- α , 항암제 그리고 irradiation 등에 의해서 유발되는 세포고사를 막거나 연장시킨다는 연구들을 통해서 활성산소종이 세포고사에 관련이 있다는 것이 보고되어져 왔다.

그러나 근래에는 활성산소종이 세포의 생리적 작용을 매개하는 이차전령체로서 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다. 처음으로 활성산소종이 생리학적으로

로 중요하다는 것은 활성화된 neutrophils이 박테리아에 대한 방어기전으로 활성산소종을 이용한다는 보고를 통해서였다 (Babior, 1978). 그 후 많은 연구를 통해서 활성산소종의 생성이 non-phagocytic 세포에서 epidermal growth factor (EGF) 수용체 (Bae 등, 1997), fibroblast growth factor (FGF) 수용체 (Lo and Cruz, 1995) 등 성장인자수용체 [RTKs (receptor tyrosine kinases)]를 통한 세포내 신호전환기전 (signaling cascades)의 활성화로 이루어짐이 밝혀졌다. 그 외 tumor necrosis factor (Lo and Cruz, 1995), γ -interferon (Tiku 등, 1990)과 같은 cytokine과 interleukin (Meier 등, 1989)이 활성산소종의 유도물질로 알려졌다. 세포 내 신호전환과정 중에서 활성산소종은 extracellular signal-regulated kinase (ERK)를 비롯하여 nuclear factor κ B (NF- κ B), protein kinase C 등에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 그 중에서도 거의 모든 종류의 세포에서 가장 널리 사용되고 있는 신호계인 칼슘신호계도 활성화시키는 것으로 보고 되었다 (Sauer 등, 2001).

세포내 칼슘은 세포의 수정, 분화, 성장 뿐 아니라 근육의 수축, 분비선세포로부터의 분비, 기억과 배움, 나아가 세포 고사에 이르기까지 다양한 세포기능을 조절하는 이차전령체이다 (Berridge 등, 1998). 췌장 및 타액선세포와 같은 외분비선세포는 음식물의 소화과정에서 fluid 및 소화효소를 분비하여 고등동물의 에너지 섭취에 필수적인 역할을 하는데 이러한 외분비 과정에서도 세포내 칼슘증가가 중요한 역할을 한다. 즉, 췌장 선세포에서 아밀라제 등을 포함하고 있는 분비과립의 exocytosis 과정이 칼슘의존적이며 타액선세포에서는 fluid 분비의 직접적인 원동력이 되는 Cl^- 통로의 개방이 칼슘 의존적이다. 외분비세포에서 세포내 칼슘농도를 증가시키는 기전은 주로 세포내 IP_3 수용체 활성화를 통한 세포내 칼슘 저장고로부터의 칼슘유리가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, IP_3 수용체를 통한 칼슘 유리는 G-단백 연결 수용체 또는 receptor tyrosine kinase 자극으로 phospholipase $\text{C}\beta$ 또는 phospholipase $\text{C}\gamma$ 가 활성화되어 세포막 인지질인 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate

(PIP₂)로부터 IP₃가 생성됨으로써 이루어진다.

췌장 선세포 (pancreatic acinar cells)는 비홍분성인 외분비 선세포로서 구조적으로 명확한 극성, 첨단부위 (apical domain)와 기저부위 (basolateral domain)를 갖고 있다. 또한 다양한 효소를 생성하고 저장하며 십이지장에 있는 음식물을 소화시키기 위해 이 효소들을 분비하는 분비세포이다. 소화 효소는 효소원 과립 (zymogen granule)이라 일컫는 과립에 저장되어 있으며 대부분 첨단부위에 위치해있다. 췌장 선세포는 세포내 칼슘을 증가시키는 CCK와 같은 호르몬이나 신경전달물질에 대한 수용체를 갖고 있으며 칼슘의 증가가 도관 (lumen) 내 효소원 과립의 분비에 중요한 역할을 하기 때문에 칼슘과 분비과정에 관련된 연구에 유용한 모델이 되고 있다 (Tsunoda 등, 1990). CCK와 같이 췌장 선세포에 작용하는 분비촉진제 (secretagogues)에 대한 수용체는 모두 G-단백과 연결되어 있는데 이것은 α , β , γ 세 개의 subunit으로 구성되어 있다. 그 중 α subunit은 또 다시 네 개의 family로 나뉘게 되는데 G_q, G_s, G_{i/o} 그리고 G₁₂가 그것이다 (Morris and Malbon, 1999). 칼슘에 의한 소화효소 분비에 관여하는 G-단백은 G_q단백이라 알려지고 있지만 최근에는 G_s단백도 경우에 따라 이 과정에 참여하는 것으로 보고 되고 있다 (Williams 등, 2001). CCK에 의해 생성된 IP₃는 칼슘저장고인 소포체 막의 IP₃ 수용체와 결합하면 그로부터 칼슘이 세포질내로 유리된다. 소포체는 주로 세포의 기저부위에 밀집되어 있으나 효소원 과립이 고농도로 존재하는 첨단부위까지 뻗어 있으므로 칼슘은 그곳에서 집중적으로 증가하여 효소원과립의 유출을 일으킨다.

활성산소종이 칼슘통로를 활성화한다거나 phospholipase C를 활성화하여 IP₃를 생성함으로써 세포내 칼슘을 증가시킨다는 보고가 있다. 이러한 보고의 대부분은 활성산소종에 의해 증가된 세포내 칼슘이 세포독성을 나타내거나 세포고사를 매개함을 보여주지만 (Okabe 등, 1989; Maki 등, 1992; Bielefeldt 등, 1997), 최근 활성산소종이 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘증가를 매개한다는 보고도 있다. 즉, 혈관내피세포에서 histamine 수용체 자극으로 NADPH

oxidase가 활성화되어 활성산소종을 생성하고 이렇게 생성된 활성산소종 또는 외부에서 첨가한 H_2O_2 가 칼슘 oscillation을 유발한다는 보고가 있다 (Hu 등, 1998; 2000; 2002). 이러한 실험적 근거는 활성산소종이 혈관내피세포에서 생리적 범위의 칼슘신호계를 활성화함을 보여주는 중요한 발견이라고 할 수 있으나 아직까지 혈관내피세포 이외에 활성산소종이 생리적으로 의미 있는 칼슘 oscillation을 발생시킨 보고는 거의 없으며 또한 활성산소종이 작용하는 표적 단백질 (target protein)이 어디인지도 알려져 있지 않다.

그러므로 본 연구에서는 활성산소종이 흰쥐 췌장 선세포에서 아밀라제 유리에 어떤 영향을 미치는지 CCK와 비교하여 확인하고 그 기전이 세포의 생리적 작용을 매개하는 이차전령체로서 칼슘신호전달계를 활성화시켜 영향을 미치는를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험동물은 200-300 g Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 충분한 물과 먹이를 공급하여 실험에 사용하였다.

Cholecystokinin (CCK), collagenase (type IV), soybean trypsin inhibitor (SBTI), N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N`-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), D-glucose, N-acetyl-cysteine (NAC), glutathione (GSH) 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA)과 pyruvic acid는 Amresco (Solon, OH, USA)에서, Mn(III)tetrakis(4-Benzoic acid)porphyrin Chloride [MnTBAP]는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, 그리고 Fura-2/AM는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 췌장 선세포 분리

수컷 흰쥐를 diethyl ether로 마취시켜 경추 탈골로 희생시킨 후 즉시 췌장을 적출, 지방조직을 제거하여 BSA가 포함된 HEPES-buffered saline 용액 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 11.1 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 0.1 % BSA, 0.1 % pyruvic acid, 0.015 % SBTI, pH 7.4)에 넣고 가위로 최대한 잘게 잘랐다. 이것을 37 °C의 75 U/ml collagenase가 포함된 용액이 들어 있는 시험관에 넣은 후 10분간 세게 흔들면서 세포를 분리시켰다. Collagenase를 제거하기 위해 BSA가 포함된 HEPES-buffered saline 용액으로 씻어준 후 nylon mesh로 걸러주어 큰 조직을 제거하였다. 다시 같은 용액으로 2회 씻어준 후 얻어진 세포들을 5 ml의 용액에 넣어 실험에 이용할 때까지 얼음에 넣어두었다.

나. 아밀라제 유리 측정

아밀라제 유리 실험을 위해서 췌장 선세포 분리 마지막 단계에서 분리한 세포를 분리용액에서 BSA만 뺀 용액으로 넣어주었다. 각각의 silicon 처리된 vial에 1 ml씩 담고 각 효현제를 처리하여 37 °C에서 60 회/분으로 shaking waterbath에서 반응시켰다. 항산화제를 이용한 실험에서는 항산화제를 30분 동안 미리 세포에 전처리한 세포를 이용하였다. 반응이 끝난 후 일정량을 얻어 원심분리 (500 x g, 2 분)하여 상층액과 세포층으로 분리하고 상층액은 얼음에 보관하여 아밀라제 유리 측정에 이용하였다. 세포층은 분리용액에서 BSA만 뺀 용액을 넣어 초음파 분쇄기로 파괴하여 실험에 이용하였다. 아밀라제는 Bernfeld (1955)의 방법에 따라 전분 기질에서 유리되는 maltose를 dinitrosalicylic acid로 발색시켜 spectrophotometer를 이용하여 540 nm로 측정하였다. 상층액과 세포내에서 측정된 아밀라제 양의 합을 총 아밀라제 양으로 하여 30분간 자극유리 후 용액 내로 유리된 아밀라제 양을 총 아밀라제 양에 대한 백분율로 표시하고 기초유리시 용액으로 유리된 아밀라제 양을 빼주어 순수 자극에 의한 아밀라제 유리량을 계산하여 나타내었다.

$$\text{아밀라제 유리량 (\%)} = [(A-B)/(A+C)] * 100$$

A는 자극유리 후 상층액내의 아밀라제 양, B는 기초유리 후 상층액내의 아밀라제 양, 그리고 C는 자극유리 후 세포 내의 아밀라제 양을 의미한다.

다. 세포내 칼슘 농도 측정

칼슘 농도 변화에 민감하게 반응하는 형광물질인 fura-2를 세포내에 축적시키기 위하여 fura-2/AM을 최종 농도가 2 μM이 되도록 세포가 있는 BSA를 포함한 HEPES-buffered saline 용액에 넣고 실온에서 40분 동안 산소를 공급하면서 기다렸다. Fura-2의 세포 내 축적이 끝나면 위와 같은 용액으로 세포를 씻어 1 ml의 용액에 넣고 실험에 사용할 때까지 얼음에 보관하였다. 세포를 perfusion chamber 내 glass coverslip 위에 올려놓고 세포가 부착될 때까지 약 2-3분 기다린 후, 세포가 coverslip에 부착되면 spectrofluorometer (PTI, NJ, USA)와 연결된 역상현미경 (Nikon, Japan) 위에 고정시키고 분당 2 ml의 속도로 용액을 흘려주었다. 세포

내 칼슘 농도의 변화는 컴퓨터와 연결된 CCD 카메라를 이용하여 연속적으로 기록하였다. 세포내 칼슘 농도를 측정하기 위하여 excitation wave length는 340 nm 와 380 nm로 그리고 emission wavelength는 510 nm가 되도록 하였다. F_{340}/F_{380} 의 비는 다음과 같은 공식을 이용하여 세포 내 칼슘 농도로 환산하였다 (Grynkiewicz, 1985).

$$[Ca^{2+}]_i = K_d [(R-R_{min})/(R_{max}-R)] F_0/F_S$$

R은 세포에서 측정된 형광 강도 비율이고 R_{max} 와 R_{min} 은 세포 내 칼슘이 최대, 최저로 존재할 때 두 파장의 비율이며 K_d 는 형광물질과 측정이온 결합체 해리상수로 fura-2는 칼슘에 대해 224 nM의 값을 갖는다. F_0 는 칼슘이 없을 때, F_S 는 칼슘이 포화되었을 때 380 nm에서의 파장강도를 의미한다.

III. 결과

1. 췌장 선세포에서 아밀라제 유리에 대한 H₂O₂의 영향

췌장 선세포에서 CCK는 생리학적 작용으로 아밀라제 분비를 자극한다고 알려져 있다. 우선 본 실험에서 췌장 선세포를 1 pM부터 10 nM까지 여러 농도의 CCK로 자극하였을 때의 아밀라제 유리에 대한 영향을 확인하였다. CCK를 처리하지 않은 대조군에서는 세포에 포함되어 있는 전체 아밀라제 양에 대하여 5 % 정도의 아밀라제 분비가 이루어짐을 보였고, 농도-반응 곡선을 구한 결과 1 pM부터 100 pM까지 아밀라제 유리를 증가시키고 그 이상의 농도에서는 오히려 아밀라제 유리를 감소시키는 결과를 얻었다 (Fig. 1). 이와 같은 CCK의 아밀라제 유리 효과가 활성산소종에 의해 어떤 영향을 받는지 확인하기 위하여 30 μ M H₂O₂를 CCK와 함께 처리하여 위의 결과와 비교하였다 (Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 10 pM CCK에 의한 아밀라제 유리는 30 μ M H₂O₂에 의해 항진되는 양상을 보였지만 100 pM 이상의 CCK 자극에서의 효과는 오히려 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 활성산소종이 생리적인 농도 (저농도)의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 항진시키고 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 억제함을 의미한다.

2. 췌장 선세포에서 CCK에 의한 아밀라제 유리에 대한 항산화제의 영향

활성산소종이 CCK에 의한 아밀라제 유리에 영향을 미치므로 CCK로 췌장 선세포가 활성화될 때 활성산소종이 생성되어 아밀라제 유리를 항진시키거나 억제할 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여 항산화제인 1 mM N-acetyl-cysteine (NAC)와 10 μ M MnTBAP를 처리하여 CCK에 의한 아밀라제 유리가 억제 또는 증가되는지 알아보았다. 항산화제는 얻어진 세포에 CCK와 함께 처리하기 전에 30

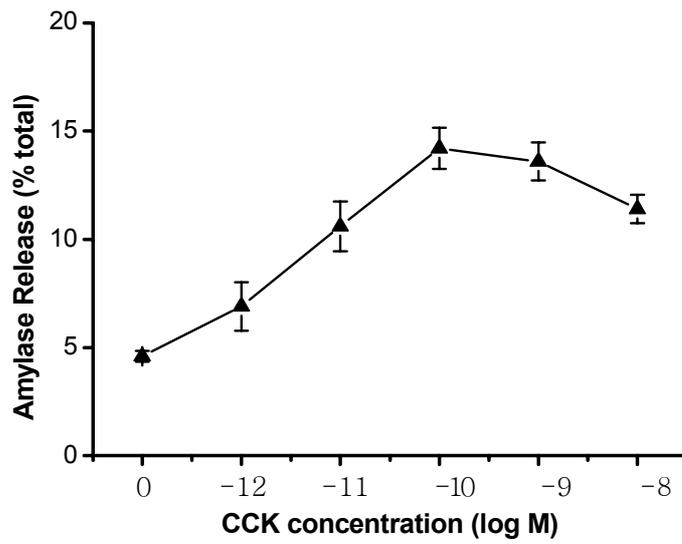


Fig 1. CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

CCK caused amylase release dose-dependently at concentrations lower than 100 pM. Higher concentrations of CCK than 100 pM induced an inhibition of amylase release in rat pancreatic acinar cells (n = 5).

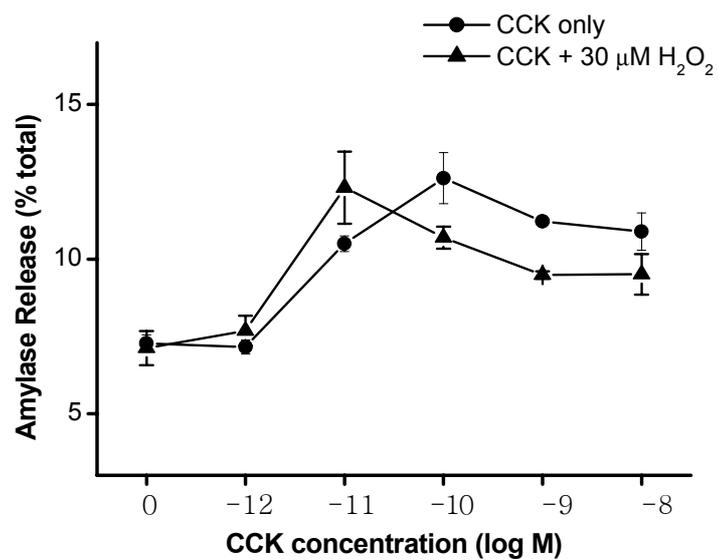


Fig 2. Effect of H₂O₂ on CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

CCK (10 pM)-induced amylase release was enhanced by the addition of 30 μM H₂O₂ but higher concentration of CCK (≥100 pM)-induced amylase release was inhibited by 30 μM H₂O₂ (n = 5).

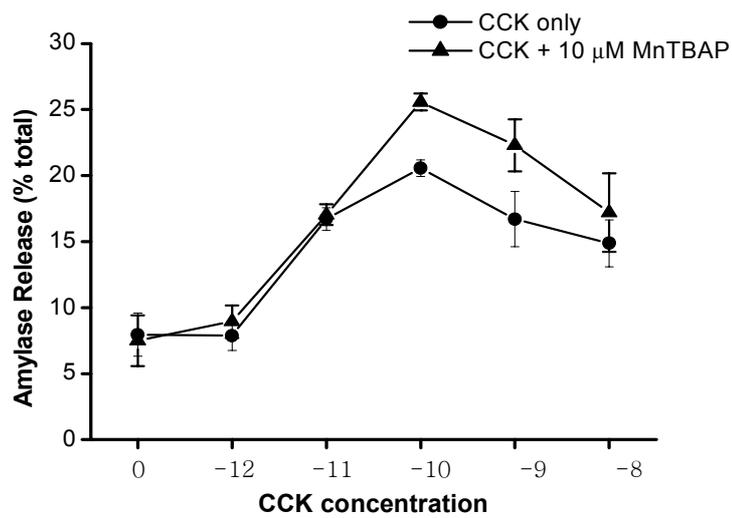
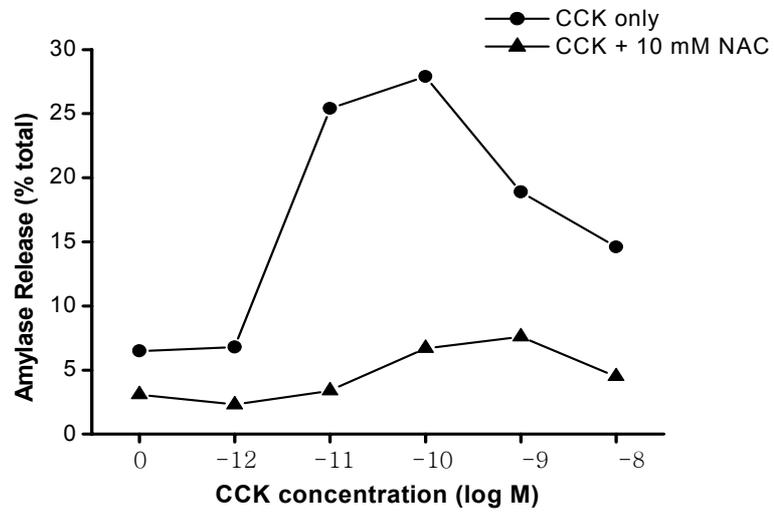


Fig 3. Effect of ROS scavengers on CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells.

ROS scavengers such as n-acetyl cysteine (NAC) and MnTBAP exerted different effect on CCK-induced amylase release in rat pancreatic acinar cells (n = 5, each).

분 동안 전처리를 한 후 사용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 NAC를 CCK와 함께 처리했을 때 CCK에 의한 아밀라제 유리를 크게 감소시키는 결과를 얻었다. 그러나 MnTBAP의 경우에는 100 pM 이상의 고농도 CCK에 의한 아밀라제 유리를 항진시키는 결과를 보여 두 항산화제는 CCK에 의한 아밀라제 유리에 일치하지 않는 결과를 나타내었다.

실험에 사용한 항산화제가 CCK의 아밀라제 유리 효과에 미치는 영향이 약물에 따라 다르게 나타나므로 항산화제가 아밀라제 측정 과정에 직접 영향을 미칠 가능성이 있어 이를 확인하였다. 각각의 시험관에 아밀라제 1 unit을 넣고 1 mM NAC, 10 μ M MnTBAP, 100 μ M rebamipide와 1 mM glutathione (GSH) 등의 항산화제를 첨가하여 15분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 흡광도를 측정한 결과 MnTBAP와 rebamipide는 흡광도에 영향을 미치지 않았으나 NAC과 GSH는 흡광도 측정을 크게 간섭하여 OD 값이 크게 감소하였다 (Fig. 4). 따라서 1 mM NAC과 1 mM GSH가 첨가된 경우에는 아밀라제의 양을 정확히 나타낼 수 없음을 확인하였다. 또한 rebamipide는 흡광도 측정을 간섭하지는 않았으나 췌장선세포의 CCK 수용체에 작용하여 칼슘 oscillations를 유발하는 것으로 알려져 있어 본 실험에 사용하기에 적절하지 않았다. 따라서 본 연구에서 아밀라제 측정을 위해 사용하기 적절한 항산화제는 MnTBAP이었다. Fig. 3에서 얻은 결과에서 보면 MnTBAP가 저농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리에는 거의 영향을 미치지 않았으나 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 CCK만 사용했을 때 보다 증가하여 고농도의 CCK가 아밀라제 유리를 억제하는 기전에 항산화제의 생성이 관여할 가능성이 있음을 보였다.

3. H₂O₂가 세포내 칼슘 변동에 미치는 영향

췌장 선세포에서 분비과정은 세포내 증가된 칼슘에 의해서 유도된다고 알려져 있다. 따라서 H₂O₂를 처리하여 아밀라제 분비의 영향을 본 실험 (Fig. 2)에서 저농

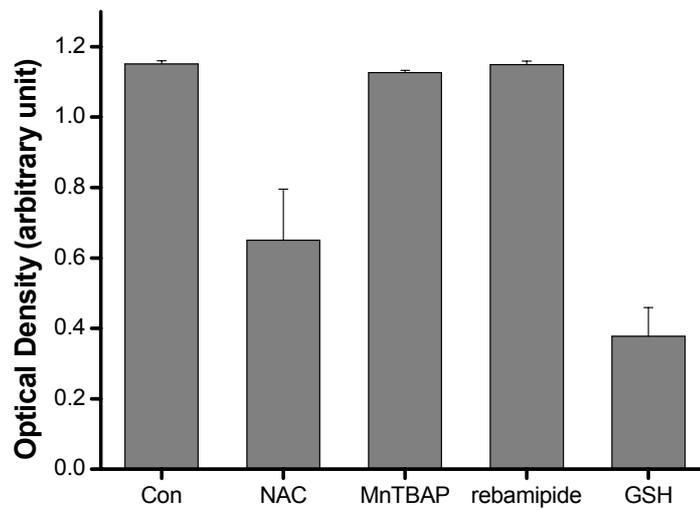


Fig 4. Effect of various ROS scavengers on optical density.

Some ROS scavengers such as n-acetyl-cysteine (NAC) and glutathione (GSH) significantly lowered the optical densities measured using 1 unit amylase (n = 5).

도의 CCK만을 처리한 것과 비교하였을 때, 아밀라제 분비가 증가한 결과를 토대로 H₂O₂ 처리시의 세포내 칼슘변동에 대하여 알아보았다. 세포 내 칼슘의 변화는 세포내에서 칼슘과 결합하여 형광을 내는 fura-2에 의해서 측정되어질 수 있다. 췌장 선세포를 fura-2/AM을 이용하여 fura-2를 축적시키고 perfusion chamber에 장착한 후 우선 HEPES buffer 용액으로 흘려주었다. 세포를 안정화시키고 2 분이 지난 후 30 μ M H₂O₂가 포함된 용액으로 흘려주었고 계속해서 100 μ M H₂O₂, 1 mM H₂O₂를 처리하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 H₂O₂를 첨가하지 않은 상태에서 췌장 선세포의 세포내 칼슘 농도는 53 ± 6.8 nM 이었으며 H₂O₂의 농도가 30 μ M 이하인 경우에 세포내 칼슘 농도의 증가가 거의 나타나지 않았으나 (10 μ M H₂O₂ : 53 ± 7.6 nM, 30 μ M H₂O₂ : 58 ± 8.7 nM) 100 μ M H₂O₂에 의해서는 세포내 칼슘 농도가 천천히 증가하여 95 ± 15.4 nM에 도달하였으며 1 mM H₂O₂의 투여로는 세포내 칼슘 농도가 즉시 증가하여 288 ± 35.2 nM에 도달한 후 유지되거나 더욱 증가하는 양상을 보임으로써 세포에 손상이 가해졌음을 암시하였다.

4. 췌장 선세포에서 CCK에 의한 칼슘변동에 H₂O₂의 영향

췌장 선세포에서 활성산소종 (30 μ M H₂O₂)에 의하여 저농도의 CCK (10-30 μ M CCK)에서는 아밀라제 유리가 증가하고 고농도의 CCK (≥ 100 pM CCK)에 의한 아밀라제 유리를 감소시킨 결과 (Fig. 2)를 토대로 CCK에 의한 칼슘 변동에 대한 활성산소종의 영향을 확인하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 췌장 선세포에 20 pM CCK로 처리하면 칼슘 oscillations이 나타났는데 이 때 30 μ M H₂O₂을 첨가하면 칼슘 oscillations의 빈도 또는 크기가 증가하는 양상을 보였다. 이는 30 μ M H₂O₂가 단독으로 투여되었을 때에는 세포내 칼슘에 큰 영향을 나타내지 않지만 (Fig. 5) CCK에 의한 칼슘 oscillations은 좀 더 활성화시킴을 확인하였다. 췌장 선세포에 고농도의 CCK (1 nM 이상)를 처리하면 세포 내에 급격한 칼슘증가가 이루어진 후 서서히 감소하여 CCK를 처리하지 않았을 때와 비교하여 높은 상태를 유지하는 경향을 보였다. 본 실험에서 2 nM CCK를 처리하여 칼슘이 증가했다

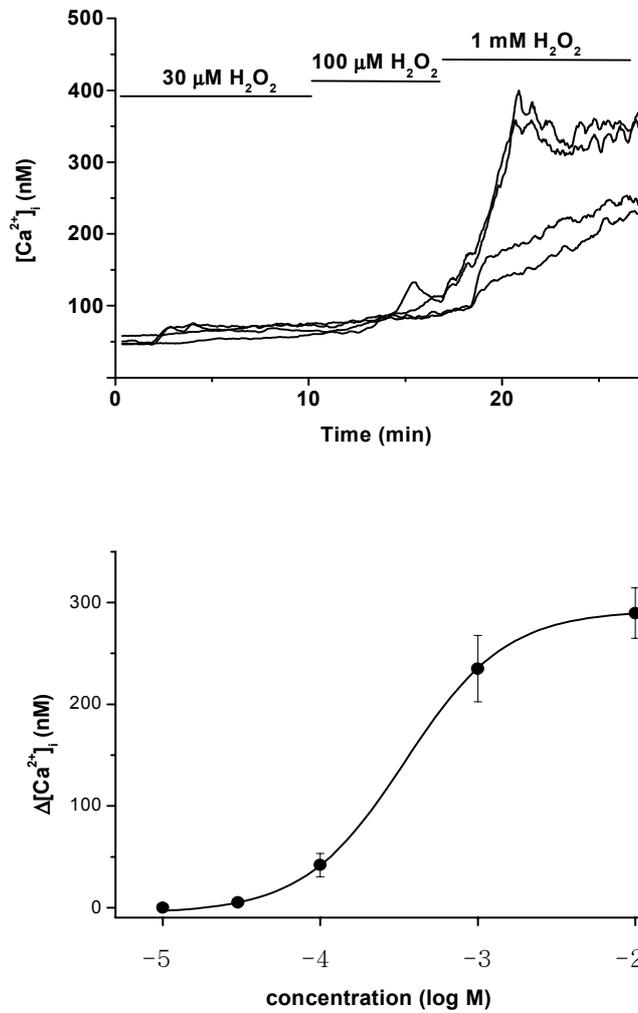


Fig 5. Effect of H_2O_2 on intracellular calcium concentration in rat pancreatic acinar cells.

H_2O_2 increased $[Ca^{2+}]_i$ at concentrations higher than $100 \mu M$ ($n = 4$, upper panel). Lower panel shows the dose-response curve for H_2O_2 in rat pancreatic acinar cells.

가 감소한 상태에서 30 μM H_2O_2 을 첨가하여 세포 내 칼슘 변동을 확인하였는데 고농도의 CCK에 의한 세포내 칼슘의 증가에는 30 μM H_2O_2 가 아무런 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 7).

5. CCK에 의한 췌장 선세포내 칼슘변동에 항산화제의 영향

저농도의 CCK에 의해 세포내 칼슘 oscillations가 유발될 때 항산화제가 영향을 미치는지 알아보기 위하여 세포내 칼슘농도를 fura-2를 이용하여 측정하였다. 췌장 선세포에 10 pM CCK를 처리하여 세포내 칼슘 oscillations를 유발시키고 이때 1 mM NAC를 첨가하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 10 pM CCK에 의해 유발된 칼슘 oscillations는 1 mM NAC 처리에 의해 빈도와 크기에 아무런 영향을 받지 않았다.

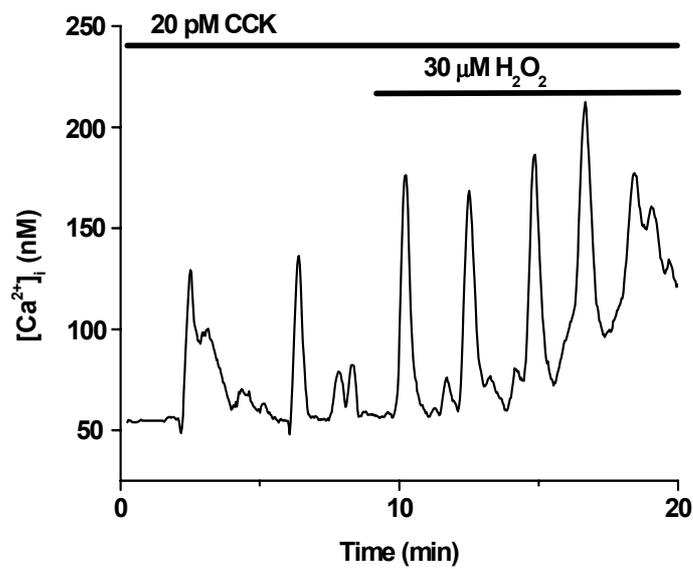


Fig 6. Effect of H_2O_2 on CCK-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in rat pancreatic acinar cells.

The frequency and amplitude of Ca^{2+} oscillations caused by 20 pM CCK was increased by 30 μ M H_2O_2 in rat pancreatic acinar cells. The result is a representative of four independent experiments.

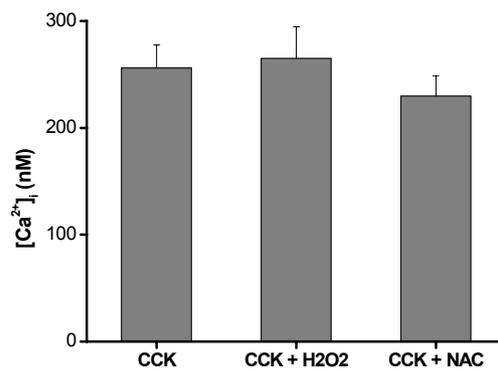
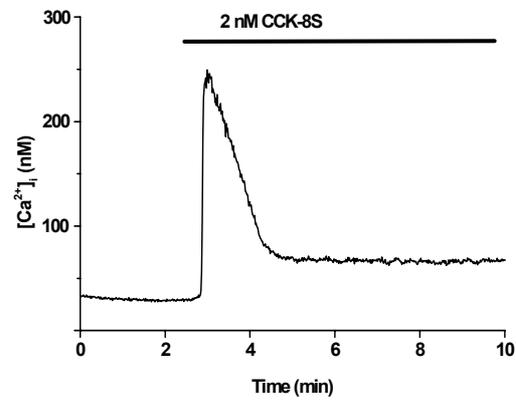


Fig 7. Effect of H₂O₂ on CCK-induced [Ca²⁺]_i increases in rat pancreatic acinar cells.

High concentration (2 nM) of CCK induced a rapid increase in Ca²⁺ followed by a decrease to a sustained elevated level (upper panel). The amplitude of Ca²⁺ increase caused by 2 nM CCK was not affected by the addition of 30 μM H₂O₂ or 1 mM NAC in rat pancreatic acinar cells (n = 5, lower panel).

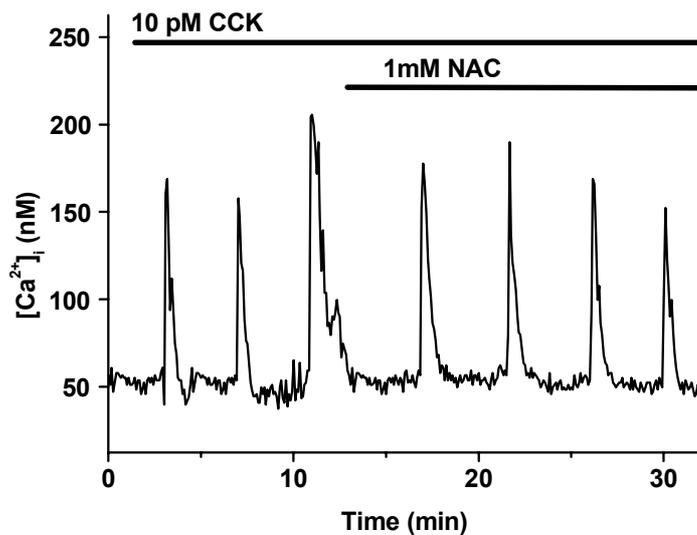


Fig 8. Effect of NAC on CCK-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in rat pancreatic acinar cells.

The frequency and amplitude of Ca^{2+} oscillations caused by 10 pM CCK was not affected by 1 mM NAC in rat pancreatic acinar cells. The result is a representative of four independent experiments.

IV. 고찰

활성산소종은 세포독성을 유발하는 작용과 세포의 생리적 역할을 매개하는 서로 상반된 작용을 동시에 가지고 있다. 현재까지 주로 세포독성과 관련된 연구가 주종을 이루어 많은 연구업적을 이루었으나 생리적 기능을 매개하는 이차전령체로서의 역할에 관한 연구는 아직 시작단계에 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 외분비선 세포인 췌장 선세포에서 CCK에 의한 아밀라제의 유리 및 칼슘농도변화에 활성산소종이 어떤 영향을 미치는지 알고자 하였다. 췌장 선세포를 우선 CCK로 자극하여 아밀라제 유리에 대한 실험을 하였다 (Fig. 1). CCK는 위내장관계 (gastrointestinal system)와 신경계 (nervous system)에서 호르몬과 신경전달단백 (neuropeptide)으로써 주요한 역할을 한다 (Poosti 등, 2000). CCK의 수용체는 크게 CCK1 수용체와 CCK2 수용체로 나누는데 흰쥐 췌장 선세포에는 CCK1 수용체가 존재한다. 또한 CCK1 수용체는 CCK에 대한 상대적인 친화도 (affinity)에 따라 두 가지의 형태로 나누는데 고친화성 수용체 (high affinity receptor)와 저친화성 수용체 (low affinity receptor)로 나눈다. 흰쥐 췌장 선세포에서 각 수용체가 아밀라제 유리에 미치는 영향에는 차이가 있는데 100 pM 이하의 CCK는 고친화성 수용체에 결합함으로써 아밀라제 유리를 증가시키고 그 이상 농도의 CCK는 저친화성 수용체에 결합함으로써 아밀라제 유리를 억제하는 양상을 보이는 것으로 알려져 있다 (Bianchi 등, 1994). 본 실험에서도 저농도의 CCK, 즉 1 pM부터 100 pM까지의 CCK는 흰쥐 췌장 선세포로부터 아밀라제 유리를 농도에 비례하여 증가시키고 100 pM 이상의 농도에서는 아밀라제 유리를 억제하는 양상을 보였다. CCK에 의한 아밀라제의 유리에 활성산소종의 역할을 알아보하고자 30 μ M H₂O₂를 처리한 결과 저농도 CCK에 의한 아밀라제 유리는 증진되었고 고농도의 CCK와 함께 처리한 경우에는 CCK 단독 처리에 의한 아밀라제 유리 보다 감소되는 경향을 보였다. 외부에서 인위적으로 투여한 H₂O₂가 CCK에 의한 아밀라제 유리량을 변동시켰으므로 만약 CCK로 세포를 활성화시킬 때 세포 내에서 활성산소종 생성이 증가한다면 생성된 활성산소종이 아밀라제 유리에 영

향을 미칠 가능성도 있다. 수용체 활성화로 활성산소종이 생성되고 이것이 세포의 생리적 현상을 매개하는 예는 이미 존재하는데 혈관내피세포에서 histamine 수용체 자극으로 활성산소종을 생성하고 이렇게 생성된 활성산소종이 칼슘 oscillation을 유발한다는 보고가 있다 (Hu 등, 1998; 2000; 2002). 따라서 CCK에 의해 췌장 선세포가 활성화될 때 활성산소종이 생성되어 아밀라제 유리에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 세포내 활성산소종을 없애는 항산화제 (1 mM NAC, 10 μ M MnTBAP)를 처리하였다. NAC의 경우 CCK에 의한 아밀라제 유리를 억제하는 듯한 결과를 나타내었으나 NAC 자체가 흡광도를 측정하는데 간섭작용을 나타내는 것이 확인되어 NAC에 의한 흡광도의 감소가 아밀라제 유리를 억제하여 나타난 결과가 아니었음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 NAC에서만 나타나는 현상은 아니었으며 GSH과 같은 항산화제도 NAC과 마찬가지로 흡광도에 영향을 주었다. 따라서 흡광도에 영향을 주지 않는 항산화제로서 MnTBAP를 이용한 실험의 결과를 분석하였는데 이 실험에서는 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리를 증가함을 보였다. 이와 같은 결과는 고농도의 CCK가 아밀라제 유리를 억제하는 기전에 활성산소종의 생성이 관여할 가능성이 있음을 나타낸다.

췌장 선세포에서 아밀라제 분비에 관련한 이전의 연구들을 보면, 대표적으로 CCK, secretin, ACh와 같은 다양한 호르몬과 신경자극에 의하여 이루어진다고 하였다. 이와 같은 분비촉진제는 모두 G 단백질 연결 수용체로서 IP_3 생성을 통한 칼슘의 증가가 아밀라제 유리에 중요한 역할을 한다 (Williams, 1978; 2001). G 단백질 연결 수용체의 자극으로 phospholipase $C\beta$ 가 활성화되고 IP_3 와 diacylglycerol (DAG)이 생성된다. IP_3 는 세포내 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 있는 IP_3 수용체와 결합하여 칼슘을 세포질 내로 유리시키고 유리된 칼슘은 아밀라제 분비에 중요한 매개자로 역할을 한다. 반면에 DAG는 protein kinase C (PKC)를 활성화시킨다. PKC는 췌장 선세포에서 아밀라제 분비를 자극하고 칼슘에 의한 분비도를 올릴 수 있는데 (Bruzzone, 1990; Hootman and Williams, 1987), PKC family 중에 PKC- δ 가 아밀라제 분비와 관련이 있다는 보고가 있다 (Li 등, 2004). 따라서 세포 내 칼슘이 아밀라제 분비에 중요한 매개자 역할을 하는 것에 기초하여 활성산소종이 세포 내 칼슘을 변동시켜 아밀라제 유리에 관여하는지를 확인하였다.

H₂O₂를 첨가하지 않은 상태에서 췌장 선세포의 세포 내 칼슘 농도는 53 ± 6.8 nM 이었으며 H₂O₂의 농도가 30 μM 이하인 경우에 세포내 칼슘 농도의 증가가 거의 나타나지 않았으나 (10 μM H₂O₂ : 53 ± 7.6 nM, 30 μM H₂O₂ : 58 ± 8.7 nM) 100 μM H₂O₂에 의해서는 세포내 칼슘 농도가 천천히 증가하여 95 ± 15.4 nM에 도달하였으며 1 mM H₂O₂의 투여로는 세포내 칼슘 농도가 즉시 증가하여 288 ± 35.2 nM에 도달한 후 유지되거나 더욱 증가하는 양상을 보였다. 이는 사람의 대동맥 내피세포에서 100-500 μM H₂O₂에 의해 칼슘 oscillations이 나타나는 것 (Hu 등, 1998)과 차이가 있어 췌장 선세포에서는 대동맥 내피세포에서와 같은 칼슘 oscillations을 보이지 않고 고농도에서 지속적인 칼슘 증가만이 나타났다. 이는 활성산소종 자체만으로는 세포의 생리적 작용을 매개하지 못하며 오히려 고농도의 활성산소종이 세포에 손상을 주어 세포내 칼슘을 지속적으로 증가시키는 것으로 생각된다. 그러나 이와는 달리 췌장 선세포에서 저농도의 CCK (20 pM CCK)에 의해 칼슘 oscillations이 나타날 때 30 μM H₂O₂의 첨가는 칼슘 oscillations의 빈도와 크기가 증가하는 양상을 보였다. 따라서 30 μM H₂O₂ 자체는 아밀라제 유리시키지도, 세포내 칼슘을 증가시키지도 못하지만 저농도의 CCK에 의해 유도된 칼슘 oscillations에 대해서는 30 μM H₂O₂가 칼슘 oscillations의 빈도와 크기를 증가시킴으로써 아밀라제 분비를 향진시킨 것으로 생각할 수 있다. 그러나 고농도 CCK에 의해 증가되는 세포 내 칼슘에 대해서는 30 μM H₂O₂가 영향을 미치지 못하였다. 따라서 이와 같은 결과는 고농도의 CCK에 30 μM H₂O₂를 첨가하였을 때 아밀라제 유리가 감소하는 현상은 H₂O₂가 세포내 칼슘증가를 억제하기 때문이 아니라 다른 기전이 관여함을 암시한다.

CCK 자극으로 인해 활성산소종이 생성되어 아밀라제 유리를 조절할 가능성을 확인하였으므로 생성된 활성산소종이 세포내 칼슘변화에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 항산화제가 CCK에 의한 칼슘농도변화에 영향을 미치는지 실험한 결과 10 pM CCK에 의해 세포 내 칼슘 oscillations이 유발될 때 항산화제인 1 mM NAC의 첨가는 칼슘 oscillations의 빈도에는 영향을 미치지 않았으며 고농도 (2 nM)의 CCK에 의한 칼슘농도 증가에도 영향을 미치지 못하였다. 저농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리에 항산화제가 아무런 영향을 미치지 않은 결과와 종합해

불 때 저농도의 CCK에 의해서는 활성산소종의 생성이 거의 없거나 마약하여 세포내 칼슘 oscillations 발생이나 아밀라제 유리에 영향을 미치지 못할 가능성이 크다. 그러나 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 항산화제에 의해 증가하여 고농도의 CCK가 활성산소종을 생성하고 이것이 아밀라제 유리를 억제하지만 이러한 현상이 세포내 칼슘농도에 영향을 미치지 때문은 아님을 확인하였다. 따라서 고농도의 CCK에 의해 생성되는 활성산소종은 아밀라제 유리 과정에 관여하는 세포내 신호변환과정 중 칼슘증가 이후의 과정에 작용하여 아밀라제 유리를 억제하는 것으로 생각된다. 그러나 세포 내 칼슘증가가 선세포에서 외분비 작용을 어떻게 조절하는가에 대한 연구가 미비한 상태여서 활성산소종의 표적단백이 무엇인지 밝히기에는 큰 어려움이 따를 것으로 보인다. 다만, 아밀라제를 포함하고 있는 분비과립의 exocytosis 과정에 칼슘이 과립 막에 존재하는 SNARE 단백을 활성화시키는 것으로 알려져 있으므로 CCK에 의해 생성되는 활성산소종이 이 부위를 봉쇄함으로써 아밀라제 유리를 억제할 가능성이 있다.

췌장 선세포에서의 분비는 분비 과립이 세포막으로 이동, 세포막에 docking, 세포막과 이 분비 과립의 fusion 과정을 포함하는 복잡한 과정이다 (Williams, 1999). 이 과정에는 다양한 kinase와 serine/threonine phosphatase가 관여하여 분비과립을 조절하고 있다 (Meyer-Alber 등, 1995). 또한 actin cytoskeleton도 외분비 과정에 중요한 역할을 하는데 actin 결합 단백을 방해하는 물질을 사용함으로써 효소 분비를 억제시킬 수 있다 (Valentijn 등, 1999; Torgerson 등, 2000). 따라서 CCK에 의해 생성이 증가하는 활성산소종이 과립의 분비과립에 관여하는 kinase나 phosphatase에 작용하거나 과립의 이동에 관여하는 actin cytoskeleton에 작용하여 궁극적으로 아밀라제 유리를 억제할 가능성 또한 배제할 수 없다.

이상의 결과를 바탕으로 췌장 선세포에서 활성산소종이 저농도의 CCK가 세포내에 칼슘 oscillations을 나타낼 때 칼슘저장고에 작용하여 칼슘 oscillations을 증가시켜 아밀라제 유리를 항진시키고 고농도의 CCK는 활성산소종의 생성을 증가하여 아밀라제 유리를 오히려 감소시키는 경향이 있음을 밝혔다. 그러나 활성산소종이 외분비 과정 중 어느 부분에 작용하여 영향을 주었는지에 대한 연구는 더 이루어져야 할 부분이다.

V. 결론

활성산소종의 생리적 역할로서 H_2O_2 가 흰쥐 췌장 선세포에서 CCK에 의한 아밀라제 유리에 미치는 영향과 그 기전에 대하여 알아보려고 하였다.

1. 췌장 선세포에서 CCK에 의한 아밀라제 유리에 대한 농도-반응 곡선을 구하였으며 아밀라제 유리에 대한 활성산소종의 영향을 확인한 결과, $30 \mu M H_2O_2$ 를 처리하였을 때 저농도의 CCK ($\leq 10 \text{ pM}$ CCK)에서는 아밀라제 유리를 향진시키고 100 pM 이상 농도의 CCK에서는 아밀라제 유리를 억제하였다.

2. 항산화제 ($10 \mu M$ MnTBAP)의 처리는 저농도의 CCK에 대한 아밀라제 유리에는 영향을 미치지 않았으나 고농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리는 단독의 CCK에 의한 반응보다 증가시켰다.

3. $30 \mu M H_2O_2$ 단독으로는 세포내 칼슘 oscillation을 유발하지는 않았지만 20 pM CCK에 의해 유도된 칼슘 oscillations의 빈도와 크기를 증가시키는 양상을 보였고 2 nM CCK에 의한 세포내 칼슘의 증가에는 영향을 미치지 못하였다.

4. 10 pM CCK에 의한 칼슘 oscillations와 2 nM 에 의한 세포내 칼슘증가에 대해 1 mM NAC는 아무런 영향을 미치지 않았다.

결론적으로 췌장 선세포에서 $30 \mu M H_2O_2$ 는 세포내 칼슘을 증가시켜 저농도의 CCK에 의한 아밀라제 유리를 향진시킨 것으로 생각된다. 그러나 고농도의 CCK에 의한 반응에 $30 \mu M H_2O_2$ 의 작용은 세포내 아밀라제 유리에 관련된 단백질에 직접적으로 영향을 미쳐 아밀라제 유리를 억제하는 것으로 생각되지만 이는 앞으로 더 연구하여야 할 부분이다.

참고문헌

- Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 298 (12): 659-668, 1978.
- Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG: Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation *J Biol Chem* 272 (1): 217-221, 1997.
- Bernfeld P: Amylase α and β . Method in enzymology. Vol. 1, 1955, pp. 149-150, Academic press.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P: Calcium—a life and death signal. *Nature* 395: 645-648, 1998.
- Bianchi BR, Miller TR, Witte DG, Lin CW: Novel CCK analogues and bombesin: a detailed analysis between phosphoinositide breakdown and high-dose inhibition of pancreatic enzyme secretion in three rodent species. *J Pharmacol Exp Ther* 268 (2): 996-1002, 1994.
- Bielefeldt K, Whiteis CA, Sharma RV, Abboud FM, Conklin JL: Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272 (6 Pt 1): G1439-450, 1997.
- Bruzzone R. The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology* 99: 1157-1176, 1990.

- Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 (1): 47-95, 2002.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 (6): 3440-3450, 1985.
- Hootman SR and Williams JA: Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (2nd ed.), edited by Johnson LR, Christensen JM, Jackson M, Jacobson ED, and Walsh JH. 1987, p. 1129-1146, New York: Raven.
- Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, Cerutti P: Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 9 (8): 2277-2281, 1994.
- Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC: Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 97 (3): 268-275, 1998.
- Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC: NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca^{2+} stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275 (21): 15749-15757, 2000.
- Hu Q, Yu ZX, Ferrans VJ, Takeda K, Irani K, Ziegelstein RC: Critical role of

- NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating Ca^{2+} oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J Biol Chem* 277 (36): 32546-32551, 2002.
- Kourie JI: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275: C1-24, 1998.
- Li C, Chen X, Williams JA: Regulation of CCK-induced amylase release by PKC- δ in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 7(4): G764-71, 2004.
- Lo YY, Cruz TF: Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270 (20): 11727-11730, 1995.
- Maki A, Berezesky IK, Fargnoli J, Holbrook NJ, Trump BF: Role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *FASEB J* 6 (3): 919-924, 1992.
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG: Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- α . *Biochem J* 263 (2): 539-545, 1989.
- Meyer-Alber A, Höcker M, Fetz I, Fornefeld H, Waschulewski IH, Fölsch UR: Differential inhibitory effects of serine/threonine phosphatase inhibitors and a calmodulin antagonist on phosphoinositol/calcium- and cyclic adenosine monophosphate-mediated pancreatic amylase secretion. *Scand J*

Gastroenterol 30: 384-391, 1995.

Morris AJ, Malbon CC: Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79 (4): 1373-1430, 1999.

Okabe E, Sugihara M, Tanaka K, Sasaki H, Ito H: Calmodulin and free oxygen radicals interaction with steady-state calcium accumulation and passive calcium permeability of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther* 250 (1): 286-292, 1989.

Poosti R, di Malta L, Gagne D, Bernad N, Galleyrand JC, Escrieut C, Silvente-Poirot S, Fourmy D, Martinez J: The third intracellular loop of the rat and mouse cholecystinin-A receptors is responsible for different patterns of gene activation. *Mol Pharmacol* 58 (6): 1381-1388, 2000.

Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ, Grabstein KH: Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J Exp Med* 166 (6): 1734-1746, 1987.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J: Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11 (4): 173-186, 2001.

Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM: Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J Immunol* 145 (2): 690-696, 1990.

- Torgerson RR, McNiven MA: Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini. *J Cell Physiol* 182: 438–447, 2000.
- Tsunoda Y, Stuenkel EL, Williams JA: Oscillatory mode of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 258 (1 Pt 1): C147–155, 1990.
- Valentijn KM, Gumkowski FD, Jamieson JD: The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J Cell Sci* 112: 81–96, 1999.
- Williams JA: Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 63: 77–97, 2001.
- Williams JA, Korc M, and Dormer RL: Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol* 235: 517–524, 1978.
- Williams JA: Intracellular regulatory mechanisms in pancreatic acinar cellular function. *Curr Opin Gastroenterol* 15: 383–391, 1999.

Abstract

**Effect of H₂O₂ on amylase secretion
in rat pancreatic acinar cells**

Jin Hak Rhie

*Department of Dentistry, The Graduate school,
Yonsei University*

(Directed by Professor, Jeong Taeg Seo)

Reactive oxygen species (ROS) are known to be involved in the mediation of physiological functions in a variety of cell types. However, little has been known about the physiological role of ROS in exocrine cells. Therefore, in the present study, the effect of ROS on cholecystokinin (CCK)-evoked amylase release was investigated in rat pancreatic acinar cells. Cells were obtained from rat pancreas and amylase release from the cells was measured using a modification of methods described by Bernfeld. Stimulation of the acinar cells with CCK induced biphasic increase in amylase release. Addition of 30 μ M H₂O₂ enhanced amylase release caused by 10 pM CCK, but inhibited the amylase release induced by CCK at concentrations higher than 100 pM. An ROS scavenger, 10 μ M MnTBAP, increased amylase release caused by CCK at concentrations higher than 100 pM, although lower concentrations of CCK-induced amylase release was not affected by 10 μ M MnTBAP. To examine

whether the effect of ROS on CCK-induced amylase release was due to the modulation of intracellular Ca^{2+} signaling, we measured the changes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in fura-2 loaded acinar cells. Addition of 30 μM H_2O_2 increased the frequency and amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations caused by 20 pM CCK, but had little effect on 2 nM CCK-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. ROS scavenger, 1 mM N-acetyl-cysteine, did not affect $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes induced by 20 pM or 2 nM CCK.

Therefore, it was concluded that, although 30 μM H_2O_2 did not induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations, it increased the low concentrations of CCK-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations and amylase release. However, the inhibitory effect of ROS on high concentrations of CCK-induced amylase release did not appear to be mediated by inhibition of Ca^{2+} signaling.

Key Words : H_2O_2 , ROS, Antioxidant, CCK, amylase, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations, pancreatic acinar cells