

실험적 췌장염에서 IL-1 $\beta$  발현에  
대한 JAK/STAT의 역할

연세대학교 대학원

의과학과

이종화

# 실험적 췌장염에서 IL-1 $\beta$ 발현에 대한 JAK/STAT의 역할

지도교수 김 경 환

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

이 종 화

# 이종화의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

## 감사의 글

‘혼자 이를 수 있는 것은 아무 것도 없었다.’라는 걸 배운 시기였던 것 같습니다. 짧은 시간 동안 항상 부족한 저를 여기까지 오게 해주신 모든 분들에게 감사를 전하려 합니다.

저를 믿어 주시고 처음 연구계획에서부터 완성에 이르기까지 학문적 기틀을 잡아 주시고 친절하고 소상한 가르침을 베풀어 주시기를 아끼지 않으셨던 김혜영 교수님께 감사와 제가 공부한 부분에서 가장 잘 알고 있는 사람이 되도록 해주신 지도교수이신 김경환 교수님께 고마움을 우선 표현 합니다. 실험에 있어 많은 조언과 공부하는 사람의 모범을 보여 주셨던 안영수 교수님, 김동구 교수님, 이민구 교수님, 박경수 교수님, 김철훈 교수님께 감사드리고 약리학 교실의 큰 기둥이시며 학자의 참된 모습을 보여주신 이우주 교수님께도 감사드립니다. 학위 논문의 심사위원으로 올바른 지도와 격언을 주신 정재복 교수님께도 감사드립니다.

실험에 있어서 최고의 카리스마를 보여주는 임주원 교수님, Lab의 전설미인이신 정혜연 선생님, 멋쟁이 이장원 선생님, 여러 분야 팔방미인이신 서정연 선생님, 처음부터 아무것도 모르는 저를 가르치느라 고생하신 유지훈 선생님, Lab의 말년니로 수고하신 서지혜 선생님, 항상 최선을 다하시며 바른 길을 잡아주신 친형 같이 도와주신 주경돈 선생님, 실험적으로나 정신적으로나 항상 도움만 받았던 완!소! 내친구 차보람. 재치덩어리 그녀 장성희, 만능꾼 심동휘, 잘 챙겨주지도 못한 선배를 잘 따라주었던 후배들 이쁜 막둥이 이선은, ‘날개’ 달린 털프가이 최상용, lab을 runway로 만든 model 한지연, 새로 함께 lab을 잘 이끌어 나가실 올리브 박경숙, 최지연 선생님께 감사드립니다.

약리학교실에 있으며 학교 생활에 여러 많은 도움을 받은 옆방의 다현이 아빠 남궁완 선생님, 김주영 선생님, 이성희 선생님,, 이정수 선생님, 윤계석 선생님, 지현영 선생님, 김준오 선생님, 남자지현, 여자지현, 아라

레 누나 이정남선생님 쿠스 박현우, 밤토리 김승근, 맞은 방의 배우기봉 이 서기호, 애리 유리 임미경, 이정호 선생님, 김인숙 선생님 건넛방의 약리학교실 히메 최지하 선생님, 푸우 장성복, 황토방 갈치 정효선, S라인 걸 이윤정, 모범적인 모습을 보여주신 유상배 선생님, 카리스마 형님 김재구 선생님, 재치 최고인 김남열 선생님과 약리학교실에서 없어서는 안 될 임종수 선생님, 민선해 선생님, 김건태 선생님에게 고마움을 전합니다.

언제나 정신적으로 항상 힘이 되 준 10년 지기 보람이 친구들, 철들어라 김주환, 이 녀석도 빨리 장가가야 철들텐데 장홍석, 어디로 튈지 모르는 강아지 강지현, 얼굴 좀 보며살자 할배 김건우, 축구시키 어찌 살고 있나? 김유진, 남은 학기도 수고 김태진, 효도는 언제 하나? 엄마 서현주, 만인의 자기 신운주, 한번에 필히 합격! 당근 오효진, 올해는 결혼하지? 조수영, 항상 건강 조심 하시고 공주 신현진, 진실로 친절한 금자씨 최금자, 항상 행복하시게 남양 윤희주부부, 올해는 바람도 한군데 정착해야지 이 동주, 언제나 자신 있게 힘내라 이주현, 연애하면 바빠? 치와와 장치영, 이젠 항상 좋은 일만 있을거다 이뿌이 할매 박석영, 이쁘고 귀여운 누리, 다인이 두 자매 엄마 아빠 홍병준, 이안나 행복하길, 대구 지킨다고 수고하는 우리 윤중관, 학부친구 락커 김남호 경미도 잘 있지?, 분리공학의 대가 김태영, 너두 빨리 졸업해라 손주완, 그냥 그렇지? 좋은 일만 있길 김정욱, 살 좀 쪼요 전부남 선배, 후배 같지 않던 문병산, 실미도 그때가 그림네 김윤정, 황선영 기숙사 방돌이 이성오, 신일섭과 항상 도움만 받는 동형이형, 승민이 엄마 동주누나에게 고마움을 전합니다.

늘 가까이서 지켜봐주시며 돌보아주신 큰집, 고모네 가족, 친지들과 이쁜 조카 소정, 지민, 저를 늘 지켜봐 주셨던 송현동 큰아버지, 외할아버지와 여기에 적지 못한 저를 아시는 모든 분들께 감사의 글을 전합니다.

소중한 사람 최애란과 따뜻한 사랑과 믿음으로 저를 키워주신 아버지, 어머니, 마음도 이쁜 동생 영은이에게 항상 사랑한다는 말을 드립니다.

2007년 1월 이 종화

# 목 차

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 췌장 선세포 배양 .....	6
2. 실험동물 .....	6
3. 역전사 중합효소 연쇄반응 .....	7
4. Enzyme-linked immunosorbent assay법 .....	7
5. Western blotting법 .....	8
6. 통계처리 .....	8
III. 결 과 .....	9
1. Cerulein에 의한 JAK2와 STAT3의 활성화 유도 ..	9
2. Cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현과 단백질 유도 .....	10
3. Cerulein에 의한 JAK2와 STAT3의 활성화에 대한 AG490의 효과 .....	11
4. Cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ mRNA 발현 및 단백질 생성에 대한 AG490의 효과 .....	12

5. 흰쥐에서 cerulein에 의한 STAT3의 활성화에 대한 AG490의 효과 .....	14
6. 흰쥐에서 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 단백질의 변화와 AG490의 효과. ....	15
<b>IV. 고찰</b> .....	17
<b>V. 결론</b> .....	20
참고문헌 .....	21
영문요약 .....	26

## 그림 차례

<b>그림 1.</b> Cerulein 자극에 의한 JAK2 및 STAT3 인산화 변동. ....	9
<b>그림 2.</b> Cerulein 자극에 의한 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 및 단백 발현. ....	10
<b>그림 3.</b> AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 JAK2 및 STAT3 인산화 변동. ....	11
<b>그림 4.</b> AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 IL-1 $\beta$ mRNA 및 단백 변동. ....	13
<b>그림 5.</b> 흰쥐에서 AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 STAT3 인산화 변동. ....	14
<b>그림 6.</b> 흰쥐에서 AG490에 의한 IL-1 $\beta$ 단백 변동. ....	16



## 국문요약

### 실험적 췌장염에서 IL-1 $\beta$ 발현에 대한 JAK/STAT의 역할

췌장염은 췌장 소화효소의 활성화로부터 일어나 췌장의 손상을 시작으로 다장기부전(multiple organ failure)으로 이르는 질병이다. 실험적으로 많이 사용되고 있는 cerulein에 의한 췌장염 모델은 소화효소 생성의 조절 장애, 세포질 내의 공포화, 부종형성, 췌장 선세포의 죽음, 췌장으로 염증 세포의 침윤 등의 인간의 임상적인 부종성 췌장염 특징과 생화학적, 형태학적, 병리학적으로 유사하여 널리 사용되고 있다. Celurein에 의해 췌장 선세포는 여러 염증성 cytokine을 발현한다. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription(JAK/STAT)경로는 여러 세포와 조직에서 다양한 염증반응을 매개한다고 알려져 있다. 본 연구는 cerulein 처리에 의해 췌장 선세포주인 AR42J와 흰쥐에서 JAK/STAT 신호를 활성화하는 것을 측정하였으며, cerulein이 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현을 유도하는 것을 확인하였다. 그리고 JAK2 억제물질인 AG490을 사용하여 JAK/STAT 신호경로가 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 의 발현을 매개하는 지를 확인하였다. AR42J 세포와 흰쥐에 cerulein 처리에 의한 JAK/STAT의 활성화를 Western blotting 분석법을 통해 인산화된 JAK2와 STAT3를 측정해 보았다. AR42J 세포와 흰쥐의 혈청에서 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 측정하며 단백 수준을 ELISA법을 통하여 확인하였다. 결과적으로 AR42J 세포에서 cerulein에 의해 JAK2와 STAT3의 활성화와 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유도되어지며 JAK2 억제물질인 AG490의 처리로 이들의 활성화와 발현을 막을 수 있었다. 흰쥐에서도 AG490이 cerulein에 유도된 STAT3의 활성화와 IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제하였다. 결론적으로 JAK2, STAT3 경로는 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증성

cytokine을 유도하여 췌장염 발생 기전에 관여할 것으로 생각하며 JAK2 억제물질은 췌장염의 증상을 완화시켜 주는 물질로 응용 가능할 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말: Cerulein, IL-1 $\beta$ , JAK/STAT, AG490, 췌장 선세포

# 실험적 췌장염에서 IL-1 $\beta$ 발현에 대한 JAK/STAT의 역할

<지도교수 김 경 환 >

연세대학교 대학원 의과학과

## 이 종 화

### I . 서 론

췌장염은 알코올, 담석, 고지혈증 등의 다원적인 질병으로 췌장에서 소화효소의 방출과 조직순환에 상승된 염증성 cytokine의 생산과 방출 등으로 인한 국소 및 전신적 증상을 나타낸다.<sup>1,2,3</sup> 췌장의 선세포는 소화효소를 합성, 분비하는 세포이며 췌장염 시 췌장 내에서 활성화된 소화효소를 검출할 수 있다는 사실에 근거하여 췌장염이 췌장 내 소화효소의 활성화에 따른 자가소화에 의해 유발된다고 알려져 있다. 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6의 국소 및 전신의 발현이 췌장염에서 중요한 매개체임이 밝혀졌다.<sup>4,5,6</sup> 국소적으로 췌장염은 활성화된 췌장 조직 내 대식세포에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 등의 cytokine 발현을 유도하여 췌장 조직의 손상을 악화시킨다. 그리고 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6가 함께 모세혈관의 투과성을 증가시키고, 호중구의 접착성과 침투를 촉진하여 다장기부전(multiple organ failure)을 야기한다.<sup>4,11</sup> 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 췌장염의 발생에 있어 세포 내 발생기전은 명확하게 규명되어 있지 않다.

질병의 모델은 사람에서 접할 수 있는 질환과 그 발현양상이 유사하고 반복적으로 재현성이 있어야 하며, 취급하기 용이한 것이 이상적이다. 여러 췌장염 모델 중에서도 cerulein 췌장염 모델은 임상적으로 급성 부종성 췌장염의 증상과 생화학적, 형태학적, 병리학적으로 유사하여 가장 많이 사용되고 있는 췌장염 모델이다. Cholecystokinin(CCK)과 CCK 유도체인 cerulein이 대량으로 투여할 경우 췌장은 소화효소의 생성과 분비장애를 일으키고, 췌장의 부종형성, 선세포의 공포화(vacuolization)와 출혈 및 조직괴사 등의 특징을 나타낸다.<sup>12</sup> Cerulein은 여러 염증성 cytokine 발현을 유도한다고 알려져 있으며 염증세포가 없는 췌장 선세포에 cerulein이 처리되었을 때, cytokine들(IL-1 $\beta$ , IL-6)의 발현이 증가됨이 보고 되었다. 본 연구는 cytokine 발현에 관여하는 Janus kinase/signal transducers and activators of transcription(JAK/STAT) 경로를 췌장염의 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현과 관련하여 알아보자 하는 것이다.

JAK/STAT신호 경로는 수많은 cytokine의 면역반응을 매개한다. 또한 성장인자와 호르몬과 같은 비 면역 자극을 활성화한다. 이 JAK/STAT 경로는 세포 외부의 polypeptide에 반응하여 신호를 전달하는데, STAT의 활성화를 통하여 유전 발현을 조절한다. JAK과 STAT분자의 특이 subunit들은 각기 다른 신호에 의해 활성화되고 그로 인해 각각의 특이 반응을 보인다.<sup>11,14</sup> JAK은 tyrosine kinase의 활성을 가지고 있으며 세포 표면에 위치한 cytokine 수용체와 결합하고 있다. 이 수용체와 결합물질의 결합으로 활성화된 수용체 복합체 형성을 유도하고 수용체와 관계된 JAK(JAK1, JAK2, JAK3, TYK2)의 인산화도 유도한다. JAK의 인산화는 STAT의 결합 위치를 제공하게 되고, STAT의 tyrosin과 serine 잔기를 인산화 하게 된다. 이 아미노산의 인산화는 STAT 활성화에 필수적이다. 인산화된 STAT은 수용체 복합체로부터 이형체의 형태를 이루어 방출되어 진다. 이형체는 핵으로 전위하여 특이 목표 유전자의 promoter 지역에 직접 결합하여 면역반응에 관여하는 유전자의 전사를 조절한다.<sup>14-17</sup> 췌장염

의 기전연구에서 JAK/STAT 경로의 역할은 정확히 알려져 있지 않다.

AG490은 JAK2를 억제하는 물질이다. 이는 tyrosine kinase 억제물질인 tyrphostin family에서 유도 합성된 것이다.<sup>18,19</sup> AG490이 여러 백혈병 세포주의 DNA 합성을 효과적으로 막아줄 뿐 아니라, 급성 림프구성 백혈병 환자에서 얻은 B cell에 존재하는 활동 항진 상태의 JAK2를 저농도의 AG490으로 억제하여 세포의 성장을 완전히 막는 것이 보고 되었다.<sup>20</sup> 과립성 대식세포의 colony stimulating factor에 의해 자극된 호산구에서 AG490이 JAK2를 억제하였고,<sup>21</sup> AG490이 angiotensin II에 의해 활성화된 혈관 평활근세포와 심장근세포에서 JAK2 활성화를 억제하였다.<sup>22,23</sup> AG490은 mycosis fungoides 세포주의 STAT3의 활성화를 효과적으로 봉쇄하였다.<sup>24</sup>

IL-1 $\beta$ 는 잘 알려진 면역반응에 중요한 cytokine으로 대식세포, 단핵구, 등에 의해 분비된다. Cerulein 췌장염에서 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가하였으며 췌장염에서 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 는 국소지역의 췌장의 손상과 염증을 악화시킨다고 알려져 있다.<sup>25</sup> 외부에서 들어온 항원에 반응하여 IL-1 $\beta$ 는 면역세포들이 감염부위에 쉽게 들어올 수 있게 내피세포의 부착인자들의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다. IL-1 $\beta$ 가 내부의 발열원으로 작용하며 시상하부의 체온조절 기관을 조절하여 체온이 올라가게 한다. JAK/STAT과 IL-1 $\beta$ 의 관한 연구로 cytokine과 같이 염증반응을 매개할 수 있는 phosphatidic acid를 대식세포에 처리함으로써 JAK/STAT 경로를 활성화 시키고 이 결과로 염증성 cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생산을 증가 시킨다는 보고가 있다.<sup>26</sup>

본 연구에서는 췌장 선세포와 실험동물을 이용하여 실험적으로 췌장염을 유도한 후, 염증성 cytokine의 발현을 보며 이로부터 JAK/STAT의 역할을 규명하고자 하였다. 이를 위해 췌장 선세포와 실험동물에 cerulein과 JAK2 억제물질인 AG490을 투여하여 JAK/STAT 활성화와 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$  발현을 비교하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 췌장 선 세포 배양

췌장 선 세포주인 AR42J(pancreatoma, ATCC CRL 1492)는 American Type Culture Collection(Manassas, VA USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10% fetal bovine serum(GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)와 antibiotics(100 U/ml penicillin and 100 $\mu$ g/ml streptomycin)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. AR42J 세포에 cerulein(10<sup>-8</sup>M, Clabiochem, La Jolla, CA, U.S.A)을 처리한 후, IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현과 단백질 발현을 관찰하였다. Cerulein을 처리하기 2시간 전 AG490(50 $\mu$ M)을 처리한 군과 처리하지 않은 군의 JAK2 인산화와 STAT3 인산화를 Western blotting법으로 확인하였고, IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현과 단백질 발현을 보기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응과 배지 내 유리된 단백질에 대한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 수행하였다.

### 2. 실험동물

실험동물로는 무게 200-250g의 Spague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 12시간의 빛의 유무 cycle과 23  $\pm$  2 $^{\circ}$ C의 온도를 갖춘 실내의 표준 cage 내에서 사육하였다. 표준 실험 먹이와 자유롭게 먹을 수 있는 물이 주어지고 무작위로 대조군과 실험군을 배정하였다. 췌장염은 한 시간의 간격을 두고 cerulein(50 $\mu$ g/kg)을 7번의 복강 주사를 주어 유도되었다.<sup>19</sup> Cerulein을 처리한 후 3일 뒤에 흰쥐를 죽인 후 췌장 적출 및 정맥혈을 채취하였다. 모든 쥐들은 실험 12시간 전에 공복상태로 두고 물은 자유로이 먹게 하였다. AG490(20mg/kg)은 cerulein 첫 주사 2시간 전에 한 번 주사하여 주었다. 혈청의 IL-1 $\beta$ 의 발현은 ELISA를 통하여 측정하

였다. 췌장 조직에 대한 JAK2와 STAT3의 인산화와 비 인산화된 단백질은 Western blotting 방법으로 확인하였다.

### 3. 역전사 중합효소 연쇄반응

IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse-transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR)을 이용하여 측정하였다. 췌장 선세포와 흰쥐의 IL-1 $\beta$  mRNA의 유전자 발현을 보기 위하여 내부 대조물질로 GAPDH를 같이 증폭하여 실험하였다. 총 RNA는 cerulein을 처리한 군과 처리하지 않은 군 그리고 AG490을 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 guanidine thiocyanate 추출법을 사용하여 분리하였다. 총 RNA는 IL-1 $\beta$ 와 GAPDH primer, PCR을 통해 DNA로 역전사 되었다. IL-1 $\beta$  primer의 sequence는 5'-TCCTAGGAAACAGCAATGGTCG-3' (forward primer)와 5'-TTCATCCCATACACACGGACAAC-3' (reverse primer)이며, PCR 생성물의 크기는 363 염기쌍이다. GAPDH의 primer sequence의 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward primer)와 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverse primer)이며 PCR 생성물의 크기는 460 염기쌍이다. PCR은 32 cycle로 denaturaion cycles 95°C 30초, annealing 60°C 30초, extention 72°C 30초로 증폭시켰다. 첫 번째 cycle에서 95°C 단계의 시간을 5분으로 연장하였다. PCR 생성물은 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide를 함유한 1.5% agarose gel에 부하시킨 뒤 전기 영동하여 UV 투과법으로 IL-1 $\beta$ 와 GAPDH에 대한 발현량을 측정하였다.

### 4. Enzyme-linked immunosorbent assay법

배양액 및 혈청 내 IL-1 $\beta$  단백질량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit(R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 5. Western blotting 법

세포 내 단백질 발현 측정을 위하여 추출한 총 단백을 8% polyacrylamide 겔에 부하시킨 후 전기 영동하여 단백을 분리하였고, nitrocellulose membrane(Amersham Inc., Arlington Heights, IL, U.S.A)에 옮긴 후 5% 탈지분유를 함유한 TBS-T 용액(10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.15% Tween 20)을 넣고 상온에서 3 시간 blocking한 후 JAK2, STAT3, phospho-JAK2, phospho-STAT3(SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A)의 항체를 1:500 혹은 1:1000으로 희석한 후 4°C에서 한밤 동안 표지하였다. TBS-T로 세척 후 horse radish peroxidase로 conjugate된 goat anti-rabbit 2차 항체를 결합시켰다. 발광 반응의 측정에 enhanced chemiluminiscence kit(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 사용하였다. 정확히 같은 양의 단백을 정량하기 위하여 Bradford 방법을 사용하여 정량하였다.<sup>30</sup>

## 6. 통계처리

통계 검정은 one-way ANOVA와 Newman-Keul's test를 사용하여 결정하였다. 모든 자료는 평균±표준오차(mean±S.E.)로 표현하였다.



### III. 결 과

#### 1. Cerulein에 의한 JAK2와 STAT3의 활성화 유도

AR42J 세포에 cerulein을 처리한 후 각각 시간에서 AR42J 세포의 단백을 분리하여 JAK2와 STAT3의 인산화를 Western blotting법을 이용하여 측정하였다. 실험결과 AR42J 세포에서 cerulein에 의해 JAK2와 STAT3의 인산화가 15분 부터 60분까지 지속적으로 발현되었다(그림1 A, B).

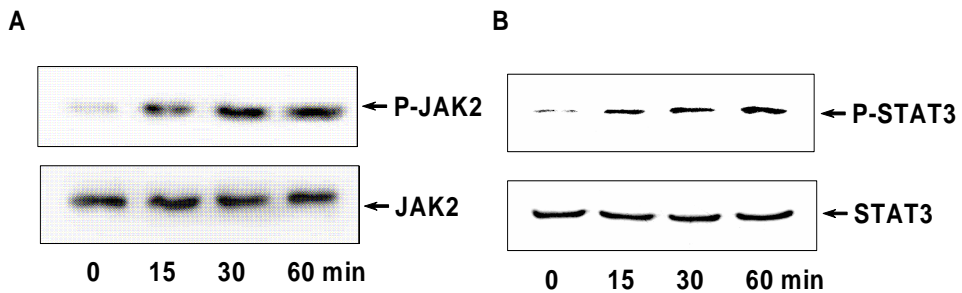


그림 1. Cerulein 자극에 의한 JAK2 및 STAT3 인산화 변동.

AR42J 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 0분, 15분, 30분, 60분 다음 각 세포에서 단백을 분리하여 JAK2 및 STAT3의 Western blotting법을 실시하였다.

## 2. Cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현과 단백질 유도

AR42J 세포에 cerulein을 처리한 후 각각의 시간에서 AR42J 세포의 IL-1 $\beta$  mRNA 및 단백질 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응법 및 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, cerulein에 의한 IL-1 $\beta$  mRNA 발현이 2시간부터 4시간까지 증가하였다(그림 2A). IL-1 $\beta$  단백질은 4, 8, 12, 16, 24시간에서 각각  $24.7 \pm 1.8$ ,  $35.7 \pm 2.0$ ,  $40.8 \pm 1.5$ ,  $72.1 \pm 1.3$ ,  $110.5 \pm 5.2$ (pg/ml)으로써 시간 의존적으로 cerulein에 의해 IL-1 $\beta$  단백질이 증가함을 알 수 있었다(그림 2B).

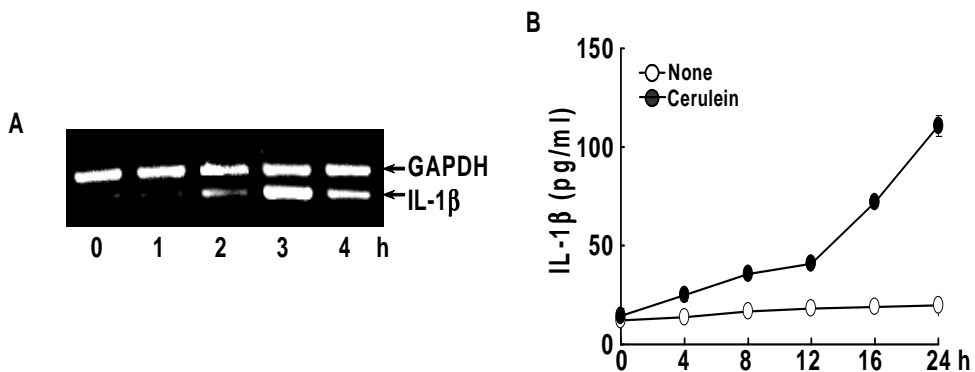


그림 2. Cerulein 자극에 의한 IL-1 $\beta$  mRNA 및 단백질 발현.

**A.** AR42J 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 다음 세포에서 총 RNA를 분리하여, 역전사 중합효소 반응법을 이용하여 IL-1 $\beta$ 에 대한 mRNA 발현을 4시간까지 측정하였다. **B.** AR42J 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 다음 세포 배양액을 분리하여, IL-1 $\beta$  단백질량을 24시간까지 측정하였다. 결과는 네 번의 다른 실험을 통하여 오차막대는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ S.E.)로 표현하였다. None: cerulein 처리하지 않는 군, Cerulein : cerulein을 처리한 군.

### 3. Cerulein에 의한 JAK2와 STAT3의 활성화에 대한 AG490의 효과

AR42J 세포에 AG490을 전처리하고 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 뒤 JAK2와 STAT3의 활성화를 Western blotting법으로 측정하였다. 실험결과, JAK2 억제물질인 AG490 전처리에 의해 cerulein에 유도된 JAK2, STAT3의 인산화가 억제되었다(그림 3A, B). 췌장 선세포에서 AG490이 JAK2/ STAT3 염증 신호경로의 활성화를 억제하는 역할을 한다는 것을 확인하였다.

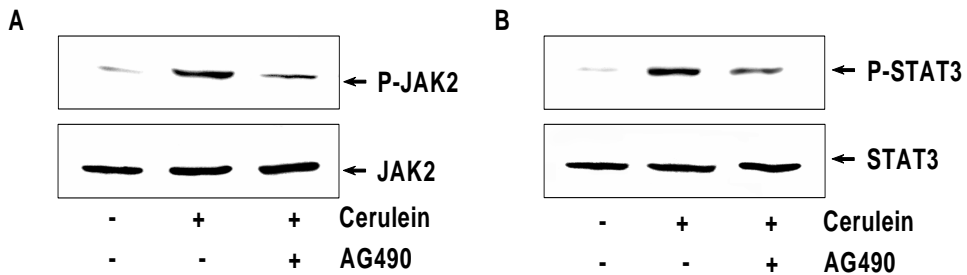


그림 3. AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 JAK2 및 STAT3 인산화 변동.

AR42J 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)만 처리한 군과 cerulein 처리 2시간 전에 JAK2 억제물질인 AG490( $50\mu$ M) 처리 후 cerulein 자극을 주어 60분 배양한 뒤 세포에서 단백을 분리하여 JAK2 및 STAT3의 Western blotting법을 실시하였다.

#### 4. Cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ mRNA 발현 및 단백 생성에 대한 AG490의 효과

AR42J 세포에 cerulein을 처리한 군과 AG490을 전처리하고 cerulein을 처리한 군의 세포에서 총 mRNA를 분리하여 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현량을 측정하였고, 세포 배양액을 분리하여 ELISA법을 이용하여 AR42J 세포의 IL-1 $\beta$ 의 단백 발현을 측정하였다. 실험결과, JAK2 억제물질인 AG490을 전처리한 후 cerulein을 처리한 세포에서 cerulein만을 처리한 세포보다 IL-1 $\beta$  mRNA와 단백질 발현이 억제됨을 보았다(그림 4A).

IL-1 $\beta$ 의 배지 내 단백질량(pg/ml)은 cerulein과 AG490을 처리하지 않은 배지에  $13.1 \pm 1.7$ , cerulein만 처리한 배지에서  $111.2 \pm 4.3$ , AG490을 전처리 후 cerulein을 처리한 배지에서  $44.6 \pm 2.7$ 이었다. AG490이 JAK2/STAT3의 염증 신호를 억제함으로써 cerulein에 의한 AR42J 세포의 IL-1 $\beta$ 의 단백질발현도 억제하는 것을 확인하였다(그림 4B).

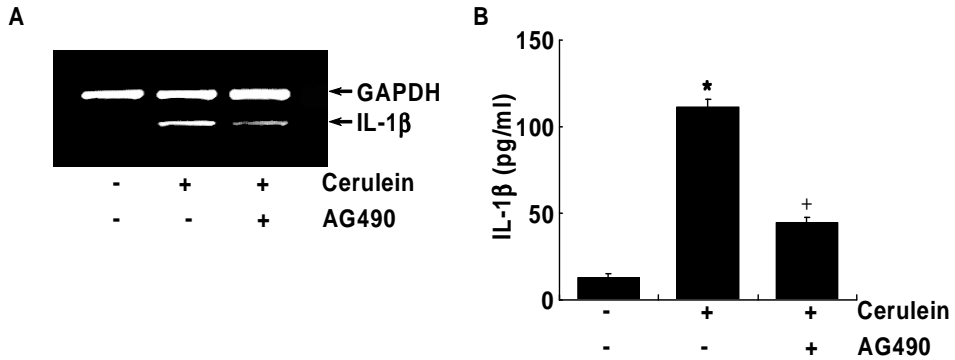


그림 4. AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 IL-1β mRNA 및 단백 변동.

Cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 세포와 cerulein 처리 2시간 전 JAK2 억제물질인 AG490( $50\mu\text{M}$ ) 처리 후 cerulein( $10^{-8}$ M)을 주고 3 시간 후에 세포에서 총 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 IL-1β의 mRNA 발현을 측정하고 cerulein을 처리 24시간 후에 각 세포의 배지를 분리하여 IL-1β의 단백량을 ELISA법을 통하여 측정하였다. 결과는 다섯 번의 다른 실험을 통하여 오차막대는 평균±표준오차 (mean±S.E.)로 표현하였다. \* $P < 0.05$  vs. cerulein을 처리하지 않은 군과 AG490을 처리하지 않은 군. \* $P < 0.05$  vs. cerulein을 처리한 군과 AG490을 처리한 군.

## 5. 흰쥐에서 cerulein에 의한 STAT3의 활성화에 대한 AG490의 효과

흰쥐에 AG490(20mg/kg)을 전 처리하고 cerulein(50 $\mu$ g/kg)을 반복적으로 복강 투여한다. 3일 후에 췌장조직을 분리하여 STAT3의 활성화를 Western blotting법으로 측정하였다. 실험결과 JAK2 억제물질인 AG490 전 처리에 의해 cerulein에 유도된 STAT3의 인산화를 억제하였다.

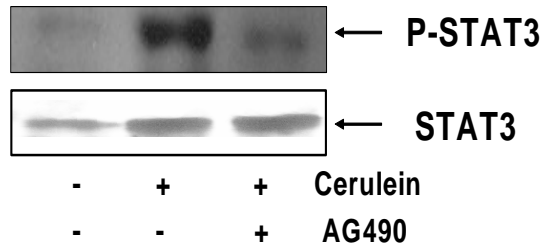


그림 5. 흰쥐에서 AG490 전처리에 의한 cerulein 유도 STAT3 인산화 변동.

Cerulein(50 $\mu$ g/kg)은 하루에 7번 한 시간마다 한 번씩 흰쥐 복강 내로 투여하였으며 JAK2 억제물질인 AG490(20mg/kg)은 cerulein 주사 2시간 전에 투여하였다. 각 동물은 cerulein 최종 주사 후 3일째 희생시켜 췌장을 적출하였으며 단백을 분리하여 Western blotting법을 실시하였다.

## 6. 흰쥐에서 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 단백질 변화와 AG490의 효과

흰쥐에 cerulein을 반복적으로 복강 주사하여 처리한 군과 AG490을 전처리하고 2시간 후에 cerulein을 한시간 복강 주사한 군의 혈액을 cerulein 투여 3일 뒤 분리하여 ELISA법을 통해 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 단백질 변화량을 측정하였다. 실험결과 cerulein만 처치한 군에서 IL-1 $\beta$ 의 발현이 높게 증가하였고 AG490의 전처리 후 cerulein을 처치한 군에서는 cerulein에 의해 유도된 IL-1 $\beta$ 의 발현이 억제되는 것을 확인하였다.

Cerulein과 AG490을 처리하지 않은 혈액 내 IL-1 $\beta$ 의 수준(pg/ml)은  $17.0 \pm 1.6$ 이고 AG490 없이 cerulein만을 처리한 군에서는  $119.0 \pm 5.6$ 이며 AG490 전처리 후 cerulein을 처리한 군은  $50.2 \pm 5.7$ 으로 측정되었다. AG490이 흰쥐에서 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 의 단백질 생산을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

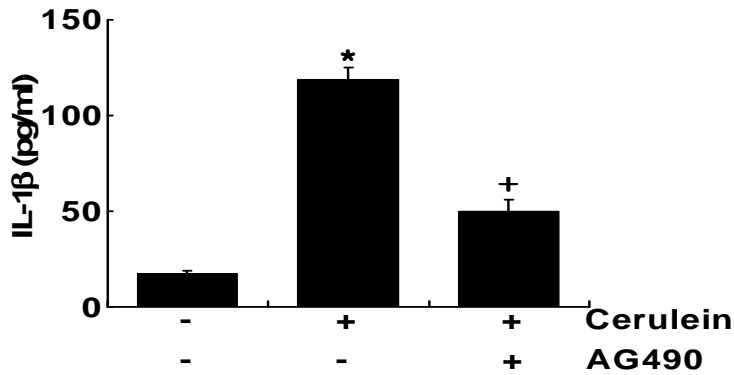


그림 6. 흰쥐에서 AG490에 의한 cerulein 유도 IL-1 $\beta$  단백질 변동.

Cerulein(50 $\mu$ g/kg)은 하루에 7번 한 시간마다 한 번씩 흰쥐 복강 내로 투여하였으며 JAK2 억제물질인 AG490(20mg/kg)은 cerulein 주사 2시간 전에 투여하였다. 각 동물은 cerulein 최종 주사 후 3일째 희생시켜 혈액을 분리하여 IL-1 $\beta$ 의 단백량을 ELISA법을 통하여 측정하였다. 결과는 다섯 번의 다른 실험을 통하여 오차막대는 평균 $\pm$ 표준오차 (mean $\pm$ S.E.)로 표현하였다. \*P<0.05 vs. cerulein을 처리하지 않은 군과 AG490을 처리하지 않은 군. †P<0.05 vs. cerulein을 처리한 군과 AG490을 처리한 군.



## IV. 고 찰

본 연구의 목적은 cerulein에 의한 췌장 선세포 AR42J와 흰쥐에서 IL-1 $\beta$ 의 발현이 JAK2/STAT3의 활성화를 매개하는지 확인하고 이 경로에서 JAK2 억제물질인 AG490의 효과를 보기 위함이다. JAK/STAT 신호경로는 cytokine에 의해 염증반응을 매개함이 보고 되어 왔으며 최근에는 성장인자, 호르몬 등의 여러 세포반응에도 관계한다고 알려져 있다.<sup>25,26</sup>

Cerulein은 cholecystokinin(CCK)의 유도체이며 CCK 수용체에 작용한다. CCK 수용체는 7개의 helix구조로 이뤄진 membrane-spanning 수용체로 G단백과 결합되어 있는 G단백 결합 수용체(GPCR)이다. 수용체는 CCK<sub>A</sub> 수용체와 CCK<sub>B</sub> 수용체 두가지가 있다. CCK<sub>A</sub> 수용체는 췌장 소화효소의 분비를 매개하는 동시에 섭식 행동과 포만에도 관련되어 있으며 amylase, lipase 등의 효소를 분비하는 외분비 효과와 관련이 있다. CCK<sub>B</sub> 수용체는 위산 생성을 자극하며 소화 펩티드 호르몬의 분비효과가 있다. 최근에는 유사분열과 항 자기괴사를 매개한다고 밝혀졌다.<sup>30</sup> 여러 G단백 결합 수용체가 JAK/STAT 경로와 관련 있음이 보고 되었으며 췌장 tumor 세포주에서 CCK<sub>B</sub> 수용체가 발현되며 이 수용체에 의해 JAK2/STAT3 신호경로의 활성화를 유도한다고 보고 되었다. CCK 수용체의 Gq 단백질이 JAK 단백을 활성화 시킬 것이라 예상하고 있으며 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다.<sup>31</sup>

JAK/STAT 경로는 cytokine 수용체에 의해 활성화되어 진다고 잘 알려져 있다. 그리고 면역반응, 분화, 세포생존, 세포 분열, 발암 등의 여러 생물학적인 효과를 매개한다고 알려져 있다. JAK 단백질의 활성화의 기전은 cytokine 수용체라고 잘 알려져 있다. 수용체에 ligand가 결합함으로써 수용체가 oligomer를 형성하며 수용체에 관계된 JAK 단백질이 인산화 된다. 활성화된 JAK 단백질은 STAT 단백을 인산화 하며 인산화 된 STAT

단백은 이형체를 형성하여 세포 핵 내로 이동한다. 이동한 STAT 단백질은 면역반응에 관련 특정 유전자의 전사를 조절한다.

본 연구에서는 cerulein이 JAK2/STAT3 경로를 활성화하고 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현을 유도하였다. AR42J 세포에서 cerulein이 JAK2와 STAT3의 활성화를 유도하였다. 일반적으로 cerulein은 CCK 수용체를 통하여 분비와 염증의 면역반응을 일으키게 되고 또한 AR42J 세포에서 CCK 수용체가 JAK2/STAT3를 활성화 시킨다는 보고가 있다.<sup>28</sup> AR42J 세포에 cerulein을 처리하여 유도된 JAK2와 STAT3의 인산화를 JAK2 억제물질인 AG490가 효과적으로 억제하였다. 이 결과를 통해 cerulein이 CCK 수용체를 통하여 JAK2/STAT3를 활성화 시킨 것이라 예측할 수 있다. 또한 cerulein에 의한 염증반응의 척도로 AR42J의 배지에서 IL-1 $\beta$ 의 단백질 발현 수준을 측정하였다. AR42J에서 cerulein에 의해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가하였고 AG490이 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$ 의 발현을 효과적으로 억제하였다.

Cerulein을 흰쥐에 투여하여 췌장 조직에서 STAT3의 활성화를 확인하였다. AG490을 전처리하였을 때 cerulein에 의한 STAT3의 활성화가 효과적으로 억제되었다. Cerulein을 처리한 흰쥐에 혈청을 분리하여 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가함을 보았고 JAK2 억제물질인 AG490에 의해 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$  발현 또한 억제되는 것을 확인하였다. 췌장 선세포와 흰쥐에서 cerulein에 의해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 JAK2와 STAT3의 활성화가 연관이 있음을 확인하였다.

췌장 선세포인 AR42J와 랫드에 cerulein 처리에 의해 JAK2와 STAT3의 인산화가 유도되었고 JAK2 억제물질인 AG490이 JAK2와 STAT3의 인산화를 억제하였다. Cerulein에 유도된 IL-1 $\beta$ 의 발현도 AG490이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

결론적으로 급성췌장염을 이해하는 분자적 기전으로 JAK2/STAT3의 활성화를 제시할 수 있을 것이고 JAK2 인산화의 억제가 아래 경로인

STAT3의 인산화와 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현을 모두 억제하는 것을 보아, JAK2의 억제제가 급성췌장염의 염증을 억제하는 데에 기여할 것으로 보인다.

## V. 결 론

실험적 췌장염에서 IL-1 $\beta$  발현에 대한 JAK/STAT의 역할을 규명하고자 AR42J 세포와 흰쥐에 cerulein과 JAK2 억제물질인 AG490을 처치하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Cerulein 처리로 AR42J 세포에서 JAK2와 STAT3가 활성화 되었다.
2. Cerulein 처리로 AR42J 세포에서 IL-1 $\beta$  발현이 증가하였다.
3. AG490은 AR42J 세포에서 cerulein에 의한 JAK2와 STAT3의 활성화와 IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제시켰다.
4. AG490은 흰쥐의 췌장조직에서 cerulein에 의한 STAT3의 활성화와 IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제시켰다.

이상의 결과를 보아 AR42J 세포와 흰쥐에서 cerulein이 JAK/STAT 활성을 증가시키며 JAK/STAT의 활성화에 의해 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현을 유도하며 AG490은 JAK2를 억제하는 물질로써 JAK/STAT의 활성화를 억제하며 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제한다. JAK2와 STAT3 경로는 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증성 cytokine을 유도하여 췌장염 발생기전에 관여할 것으로 생각되며, JAK2 억제물질은 췌장염의 증상을 완화시켜 주는 물질로 응용 가능할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997;40:1-4.
2. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995;82:6-13.
3. Frossard JL, Hadengue A, Pastor CM. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:162-170.
4. Viedma JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Caballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 1992;33:1264-1267.
5. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993;34:41-45.
6. Sameshima H, Ikei S, Mori K, Yamazuchi Y, Ezami H, Misumi M, *et al.* The role of tumor necrosis factor-alpha in the aggravation of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1993; 14:107-115.
7. McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83:919-923.
8. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *Proc*

Soc Exp Biol Med 1992;200:233-239.

9. Zamir O, Hasselgren PO, Kunkel SL, Frederick J, Higashimochi T, Fisher JE. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. *Arch Surg* 1992; 127:170-174.
10. Schirmer WJ, Schirmer JM, Fry DE. Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia. *Arch Surg* 1989;124:445-448.
11. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994;76:253-262.
12. Gorelick FS, Adler G, Kerin HF. Cerulein-induced pancreatitis. In : Go VW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. *The pancreas: biology, pathobiology, and Disease* (2nd ed.). New York: Raven Press 1993;501-526.
13. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 2002;82(10):1359-1368.
14. Igaz P, Toth S, Falus A. Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm Res* 2001;50:435-441.
15. Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, *et al.* Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J* 2001;20:91-100.
16. Park C, Schindler, C. Protein-DNA interactions in interferon-

- gamma signaling. *Methods* 1998;15: 175-188.
17. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241-250.
  18. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 1989; 32:2344-2352.
  19. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782-1788.
  20. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot, Z, *et al.* Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a JAK-2 inhibitor. *Nature* 1996;379:645-648.
  21. Simon HU, Yousefi S, Dibbert B, Levischaffer F, Blaser K. Anti-apoptotic signals of granulocyte-macrophage colony stimulating factors are transduced via JAK2 tyrosine kinase in eosinophils. *Eur J Immunol* 1997;27:3536-3539.
  22. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun JM, Harp JB, Ling BN. Role of Janus kinase signal transducer and activator of transcription and mitogenactivated protein kinases cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 1997;272:24684-24690.
  23. McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM. The type I angiotensin II receptor couples to STAT1 and STAT3 activation through JAK2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2513-2524.
  24. Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T,

- et al.* Constitutive activation of a slowly migrating isoform of STAT3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits STAT3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6764-6769.
25. Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines—new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis. *Hepatology* 1993;40:522-530.
26. Lee Ch, Lim H, Sakong J, Lee Y, Kim J, Baek S. Jannus kinase—signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin(IL)-1 $\beta$  and IL-6 production *Mol Pharmacol* 2006;69:1041-1047.
27. Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnelle JE. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8555-8559.
28. Kessler DS, Veaks SA, Fu XY, Leavy DE. Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev* 1990;4:1753-1765.
29. Audrey F, Aline KC, Claudine B, Chantal E, Anne M, Ghislaine P, *et al.* A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R. *J Biol Chem* 2005;280:10710-10715.
30. Bradford JC, Duszenkova IV, Nagaradova NK. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of



protien utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

31. Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, *et al.* International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. Pharmacol Rev. 1999;51:745-781.
32. Ferrand A, Kowaski-Chauvel A, Bertrand C, Escricut C, Mathieu A, Portolan G, *et al.* A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R. J Biol Chem 2005;280: 10710 -10715.

**Abstract**

**JAK/STAT Signaling in IL-1 $\beta$  Expression  
in Experimental Pancreatitis**

Jong Hwa Lee

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

(Directed by professor Kyung Hwan Kim)

Acute pancreatitis is characterized by initial pancreatic injury resulting from the activation of digestive enzymes and later widespread inflammation to distant organs. Cerulein-induced pancreatitis is similar to human edematous pancreatitis with dysregulation of the digestive enzyme production, cytoplasmic vacuolization, death of acinar cells, edema formation, and infiltration of inflammatory cells into the pancreas. Cytokines are up-regulated in pancreatic acinar cells stimulated with cerulein. In various cells and tissues, Janus kinase/signal transducer and activator of transcription(JAK/STAT) pathway mediates inflammatory processes. In the present study, it was aimed to investigate whether the activation of JAK/STAT signaling mediates IL-1 $\beta$  expression in pancreatic acinar AR42J cells stimulated with cerulein *in vitro* as well as the rats with cerulein-induced pancreatitis *in vivo* using AG490, the JAK2 inhibitor. Activation of JAK2 and STAT3 were monitored by Western

blotting analysis for phosphorylation of JAK2 and STAT3. The mRNA expression and protein level of IL-1 $\beta$  were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and enzym-linked immunosorbant assay(ELISA). Serum IL-1 $\beta$  levels of the rats were determined by ELISA. As a result, cerulein induced activation of JAK2 and STAT3 as well as IL-1 $\beta$  expression, which were inhibited by the treatment of AG490 in AR42J cells. In cerulein-induced pancreatitis of the rats, increased serum levels of IL-1 $\beta$  were suppressed by AG490 treatment. In conclusion, JAK2/STAT3 pathway inducing cytokines such as IL-1 $\beta$  might be involved in the pathogenesis of pancreatitis, and JAK2 inhibitor might be a therapeutic candidate for acute pancreatitis.

---

Key Words : Cerulein, IL-1 $\beta$ , JAK/STAT, AG490, Pancreatic acinar cells