

급성 췌장염의 병인론에서
호중구의 역할에 대한 생체의 실험

연세 대학교 대학원
의 학 과
조 세 행

급성 췌장염의 병인론에서
호중구의 역할에 대한 생체외 실험

지도 김 경 환 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

1999년 12월 일

연세 대학교 대학원

의 학 과

조 세 행

조세행의 박사학위 논문을 인준함

심사위원 _____	인

연세대학교 대학원

1999년 12월 일

감사의 글

진리를 향한 탐구의 길은 참으로 멀고도 험하다는 것을 느낍니다. 그리고 그 과정에서 솟아나는 의문은 해답과 더불어 또 다른 의문을 잉태하기에 진리는 좀처럼 모습을 드러내지 않습니다. 하지만 진리를 향해 나아가는 그 과정이 참으로 의미있는 여정이기에 인간은 끝없이 노력을 경주하게 됩니다. 그리고 그 위대한 진리 앞에서 한없이 작아집니다. 3년여의 긴 세월동안 항상 본 연구가 올바른 길로 향할 수 있도록 지도 편달하여 주신 김경환 교수님, 정재복 교수님, 이수곤 교수님, 김혜영 교수님, 그리고 김동구 교수님, 묵묵히 굳은 일도 마다하지 않고 본 연구를 성심껏 도와주신 약리학 교실원 여러분, 늘 정신적 지주가 되어 어려운 일이 닥쳐도 슬기롭게 극복하여 나갈 수 있도록 지원하여 주신 부모님... 이 모든 분들께 진심으로 감사를 드립니다.

저자 씀

목 차

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 췌장 선세포 분리	6
2. 호중구 분리	6
3. 호중구의 ROS 생성능 측정	6
4. 실험 protocol	7
5. Cytokines, LPO 및 H ₂ O ₂ 측정	7
6. NF-κB 활성화 측정	7
7. 통계 처리	8
III. 결과	9
1. 호중구의 ROS 생성능	9
2. 췌장 선세포에서의 산화성 손상 지표와 cytokine 생성	9
3. 췌장 선세포에서의 LPO와 cytokine 생성에 대한 NAC와 SOD의 영향	13
4. 췌장 선세포에서의 NF-κB 활성화	13
5. NAC와 SOD가 췌장 선세포에서의 NF-κB 활성화에 미치는 영향.....	18
IV. 고찰	21
V. 결론	24
영문 요약	29

표 목 차

Table 1. Oxidative stress indices and cytokine production in acinar cells treated with or without neutrophils at 2 hour- culture	11
--	----

그림 목 차

Figure 1. Measurement of luminol amplified chemiluminescence from neutrophils alone(A), PMA-primed neutrophils(B), pretreated with SOD(C) or NAC(D)	11
Figure 2. Concentration response of acinar cells to PMA-primed neutrophils for the productions of LPO, H ₂ O ₂ and TNF- α at 2 hour-culture	13
Figure 3. Time response of acinar cells to PMA-primed neutrophils for the productions of LPO, IL-1 β , IL-6 and TNF.	14
Figure 4. Effects of NAC and SOD on the productions of LPO and TNF- α in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour-culture.	15
Figure 5. Effects of NAC and SOD on the productions of IL-1 β and IL-6 in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour-culture	16
Figure 6. Time course of NF- κ B activation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils.	17
Figure 7. Specific NF- κ B complex formation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour - culture.	19
Figure 8. Effects of NAC and SOD on specific NF- κ B complex formation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour - culture.	20

급성 췌장염의 병인론에서
호중구의 역할에 대한 생체의 실험

췌장에 침윤된 호중구에서 생성되는 reactive oxygen species 는 췌장염의 발생과 병인론에서 중요한 인자로 간주되고 있다. 염증반응의 가장 대표적인 특징은 cytokine 유전자의 발현이며 이것은 산화물질에 민감한 전사 인자인 nuclear factor-kappa B(NF- κ B) 에 의하여 조절된다고 생각되고 있다. 본 연구에서는 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate(PMA)로 처리한 호중구가 췌장 선세포에서 H₂O₂ 및 lipid peroxide(LPO)의 생성, NF- κ B 활성화 그리고 cytokine 유도에 미치는 영향을 알아보고, 이러한 변화가 항산화제에 의하여 억제되는가를 알아보고자 하였다.

호중구의 reactive oxygen species 생성은 luminol amplified chemiluminescence 방법으로 측정하였고, H₂O₂는 ferrithiocyanate method 로, LPO는 colorimetric method 로, cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)은 ELISA 방법으로, 그리고 NF- κ B는 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)로써 각각 측정하였다. 호중구에 PMA 처리를 함으로 reactive oxygen species 의 생성이 증가하였으며 이는 항산화제인 N-acetylcysteine(NAC) 또는 superoxide dismutase(SOD)를 첨가로 억제되었다. 췌장 선세포에서의 H₂O₂, LPO 및 TNF- α 의 생성은 PMA 처리 호중구 농도가 높을수록 증가하였다. 또한 췌장 선세포와 PMA 처리 호중구의 비율을 10:1 로 하였을 경우 LPO, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성은 시간이 경과할수록 증가하였다. PMA 처리 호중구는 췌장 선세포에서 2가지의 NF- κ B dimer(p50/p65 heterodimer, p50 homodimer)를 활성화시켰으며 이러한 변화는 NAC 나 SOD 를 첨가함으로써 억제되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 호중구 자극으로 생성된 reactive oxygen species

는 NF- κ B 를 활성화시키고 이 결과 췌장 선세포에서 염증성 cytokine 을 증가시키는 것으로 추정된다. 췌장염의 발생과 진전에서 호중구의 역할은 호중구의 reactive oxygen species 생성으로 인한 NF- κ B 활성화에 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : NF- κ B, Cytokines, 췌장염, 항산화제, 췌장 선세포

급성 췌장염의 병인론에서 호중구의 역할에 대한 생체의 실험

< 지도 김 경 환 교수 >

연세 대학교 대학원 의학과

조 세 행

I. 서 론

호중구, 림프구 및 단핵구 등의 염증세포의 침윤은 췌장염 모델뿐만 아니라 (Adler 등, 1979; Okumura 등, 1982) 초기의 급성 및 만성 췌장염 환자에서도 관찰된다 (Uys 등, 1973; Aho 등, 1982). 이러한 염증세포 중에서도 호중구는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 가장 많이 생성하는 세포로 알려져있다. 실제로 급성 췌장염 환자에서 분리된 호중구의 ROS 생성은 정상인에 비하여 증가되어 있다고 보고되어 있다(Tsuji 등, 1994). 한편 만성 췌장염 환자에서는 혈중 glutathione 과 ascorbic acid 등의 내인성 항산화물질의 농도가 감소되어 있다(Gut 등, 1994). 실험적 췌장염 모델에서 superoxide dismutase(SOD)과 catalase 등의 ROS 제거 효소를 투여하면 췌장의 조직 손상이 방지됨이 보고된 바 있다(Sanfey 등, 1984). ROS 는 췌장염의 병인론과 발생에 있어서 중요한 조절인자로서 인식되고 있다(Fu 등, 1997). 그러나 실험적으로 ROS 단독으로는 췌장염이 유발되지는 않는다고 한다(Fu 등, 1997).

임상적으로 급성췌장염 환자의 혈청에 염증성 cytokine 인 IL-1 β , IL-6 과 TNF- α

가 증가하며, 이러한 혈청 cytokine 농도의 증가는 췌장염의 심한 정도와 밀접한 상관성이 있다(Gross 등, 1993;Health 등, 1993). 실험적 췌장염 모델에서 IL-1 수용체 길항제를 투여하면 IL-6 및 TNF- α 의 발현이 약화되며 이러한 결과는 췌장염에서 염증성 cytokine 이 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다(Heath 등, 1993). 최근 급성 췌장염의 초기에 췌장내 cytokine 농도 변동에 관한 연구가 이루어지고 있으나(Norman 등, 1994) 아직까지 췌장에서 cytokine 유전자의 활성화와 전사 인자와의 관련성을 추구하는 체계적인 연구는 없는 실정이다.

Cytokine 생성에서 가장 중요한 역할을 하는 조절인자는 전사 인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)이다(Meyer 등, 1993). NF- κ B 는 Rel homology domain 을 가지는 세포질 단백질로서, homo 또는 heterodimer 로서 DNA 에 결합하여 cytokines, growth factors, adhesion molecules 과 acute phase 단백 등의 세포내 스트레스 관련 유전자와 early response genes 등을 활성화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wulczyn 등, 1996;Barnes 등, 1997). NF- κ B 는 억제 단백질인 I κ B 와의 상호작용에 의하여 그 기능이 억제되고 cytokines, mitogens 등과 H₂O₂ 등의 ROS 에 의하여 활성화된다.

N-acetylcysteine(NAC)등의 항산화제는 NF- κ B 의 활성화를 억제할 수 있다는 연구가 보고되고 있으며 이같은 결과는 항산화제가 산화조건을 매개로하는 전사 인자의 활성화를 억제하여 cytokines 생성을 억제할 가능성이 있음을 시사한다(Meyer 등, 1993;Schenk 등, 1994; Blackwell 등, 1996). 최근에는 cerulein 으로 유발된 급성 췌장염 모델에서 NF- κ B 의 활성화가 보고된 바 있다(Gukovsk 등, 1998;Steinle 등, 1999). 따라서 NF- κ B 는 염증 반응을 억제하기 위한 약물 치료의 목표로서 설정될 수 있을 것이다. 또한 항산화제를 투여하여 염증 반응에 관여하는 NF- κ B target gene 을 억제함으로써 염증 반응을 완화시키는 데 기여할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 흰쥐에서 분리된 췌장 선세포를 이용하여 4 β -phorbol 12 β -

myristate 13 α -acetate(PMA)로 처리된 호중구가 산화성 손상 지표로서의 lipid peroxide(LPO) 생성과 H₂O₂ 생성, NF- κ B 활성화, 그리고 cytokine 생성에 미치는 영향과 호중구에 의하여 유도된 변화가 활성산소 제거 효소인 SOD 와 항산화제인 NAC 에 의하여 억제되는지 관찰함으로써 궁극적으로 체장염의 병인과 관련하여 체장 선세포에서 활성 산소를 생성하는 호중구의 역할을 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 췌장 선세포의 분리

실험 동물로는 연세 의료원 동물 실험실에서 사육한 체중 150-200g 의 수컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 이용하였다. 췌장 선세포는 Oliver 등의 방법으로 분리하였다(Oliver 등, 1987). 간단히 서술하면 분리된 선세포는 15% fetal bovine serum, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), streptomycin 0.1 mg/ml, penicillin 100U/ml 등을 첨가한 Ham's nutrient mixture F12 medium 에서 배양하였다. Cell viability 는 trypan blue dye exclusion test 로써 결정하였고 12 시간 배양 후 95%이상의 생존율을 보였다.

2. 호중구의 분리

호중구는 체중 150-200g 의 수컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐의 혈액을 채취하여 dextran 침전법을 이용하여 분리하였다. 분리된 호중구는 trypan blue exclusion 방법으로 95%이상의 생존율을 확인하였고, 순도는 acetic acid crystal violet staining 방법으로 98%이상임을 확인하였다(Szucs 등, 1994).

3. 호중구의 ROS 생성능 측정(Chemiluminescence assay)

호중구에서 생성되는 ROS 는 luminol dependent chemiluminescence(CL)로서 측정하였다(Suzuki 등, 1993). 즉 NAC(1 mM)나 SOD(300 U/ml)를 첨가하거나 하지않은 상태에서 1×10^5 개의 호중구를 포함하는 1 mL 의 Hank's balanced salts solution 을 13 μ M luminol 과 함께 15 분간 incubate 하였다. 그 후 PMA(1 μ g/ml)처리한 후 6-channel CL analyzer(AutoLumat LB953, Berthold, FRG)를 이용하여 CL count 를 지속적으로 기록하였다. 60 분간의 integrated CL count 로서 측정치를 산정하였다.

4. 실험 Protocol

선세포를 2×10^5 /ml 의 농도로 12 well tissue culture plate(Falcon 3047, Becton

Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA)에 넣고 호중구를 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 의 밀도로 PMA($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)와 같이 넣거나 PMA 없이 incubate 하였다. 선세포와 호중구의 직접적인 반응을 방지하기 위하여 두 세포군 사이에 $0.45 \mu\text{m}$ 크기의 culture plate(Millipore Products Division, Bedford, MA, USA)를 삽입하였다. PMA primed 호중구에 대한 선세포의 시간에 따른 반응을 보기 위하여 2 시간, 4 시간, 6 시간 동안 incubate 하였다. PMA를 처리한 호중구의 농도에 따른 선세포의 반응을 보기 위하여 호중구 : 선세포의 비율을 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1로 한 후 2 시간 동안 incubate 하였다. NAC와 SOD의 효과를 알아보기 위하여 NAC의 농도를 0, 1, 5, 10 mM로, SOD의 농도를 0, 300 U/ml로 다르게 하여 PMA를 처리한 호중구를 첨가한 채장 선세포에 투여한 후 2 시간 동안 incubate 하였다. 그 후 medium에서 H_2O_2 , LPO, IL-1 β , IL-6와 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 실험전에 PMA 처리한 호중구와 함께 또는 호중구만 선세포와 함께 incubate 한 후 H_2O_2 및 LPO의 농도를 각각 측정하였다.

5. Cytokines, LPO 및 H_2O_2 의 측정

Cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 농도는 enzyme linked immunosorbent assay kits(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. LPO 농도는 thiobarbiturate에 반응하는 LPO의 함량을 excitation 515 nm과 emission 553 nm에서 spectrofluorometer(SPF-500C, SLM Instruments, Urbana, IL, USA)로 측정하였다 (Yagi 등, 1976). H_2O_2 의 농도는 modified ferrithiocyanate method로 측정하였다 (Thurman 등, 1972).

6. NF- κ B 활성화 측정(Electrophoretic mobility shift assay)

5×10^6 개의 선세포를 직경 10 cm petri dish에 이식한 후 PMA($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 처리한 호중구로 채장 선세포(neutrophil : acinar cells, 10:1)를 1, 2, 3, 4 시간동안 처리하였다. NAC와 SOD가 NF- κ B의 활성화에 미치는 효과를 평가하기 위하여 2 시간 자극한

것을 기준으로 하였다. Electrophoretic mobility shift assay 를 위하여 채장 선세포로부터 Dignam 등의 방법에 의하여 핵단백을 추출하였다(Dignam 등, 1983). 핵단백을 NF- κ B 의 결합부위인 *I κ k* gene 에 해당되는 ³²P-labelled DNA(GATCGAGGGGGACTTTCCC TAGC ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 poly(dI-dC)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN., USA)를 함께 반응시켰다. 이 혼합물을 nondenaturing polyacrylamide gel 에 놓고 -70°C 에서 6-18 시간동안 자가감광시켰다. NF- κ B 의 DNA 결합 능력은 NF- κ B band 의 ³²P 의 방사능을 densitometry 로써 측정하였다. Competition experiment 에서 PMA 를 처리한 호중구로 자극한 채장 선세포로부터 추출한 핵단백을 100 배의 unlabelled probe(wild type NF- κ B oligonucleotide), mutant type NF- κ B oligonucleotide 또는 unrelated oligonucleotide(Oct-1 or AP-1; Santa Cruz Biotechnology)와 함께 ³²P-labeled oligonucleotide probe 를 첨가하여 30 분간 반응시켰다. 활성화된 NF- κ B dimer 의 Rel 단백질의 구성을 결정하기 위하여 2 개의 Rel 단백질(p50, p65)에 대한 항체를 이용하여 supershift assay 를 시행하였다. DNA 와 함께 p50 과 p65 에 대한 항체를 ³²P-labeled oligonucleotide probe 에 각각 첨가하여 30 분간 preincubation 시킨 후 상기 기술한 바와 같은 방법으로 반응을 시작하였다.

7. 통계 처리

ANOVA test 와 Newman-Keul's test 를 이용하여 통계학적 의미를 분석하였다(Zar 등, 1984). 모든 수치는 평균±표준오차로서 나타내었고 p value 가 0.05 보다 적을 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는것으로 정하였다.

III. 결과

1. 호중구의 ROS 생성능

자극하지 않은 안정상태의 호중구의 ROS 생성능은 52 ± 1.0 CL value 이었고, PMA 처리에 의하여 201 ± 1.4 로 증가하였다. SOD 와 NAC 는 PMA 에 의한 ROS 생성 증가를 억제하였다. 이로서 본 연구에 분리하여 사용한 호중구가 ROS 를 생성하는 능력이 있다는 것을 확인할 수 있었으며, PMA 를 처리하지 않은 호중구에서는 ROS 가 검출되지 않았던 것으로 보아 호중구 분리 정제과정에서는 활성화되지 않았다고 볼 수 있다(Figure 1).

2. 선세포에서의 산화성 손상 지표와 Cytokine 생성

자극하지 않은 호중구에 의해서는 췌장 선세포로 부터의 H_2O_2 , LPO 및 cytokine 생성은 증가되지 않았다(Table 1). 그러나 PMA 를 처리한 호중구는 선세포에서 cytokines 과 산화성 손상 지표등의 생성을 현저하게 증가시켰다. 2 시간 incubate 후 췌장 선세포에 첨가한 PMA 처리 호중구의 비율이 증가할수록 H_2O_2 , LPO 및 TNF- α 생성이 증가되었다(Figure 2). 췌장 선세포에서 유리된 배지에서 측정된 H_2O_2 의 농도는 선세포 단독일 경우와 PMA 처리한 호중구와 선세포의 비가 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 의 경우 각각 0.55 ± 0.08 , 2.6 ± 0.1 , 4.5 ± 0.5 , 12.9 ± 1.0 , 21.7 ± 3.0 , 36.8 ± 4.0 (nmol/ml) 이었다. 췌장 선세포에서 유리된 배지에서 측정된 LPO 농도는 선세포 단독일 경우 1.57 ± 0.5 (nmol/ml)이었고 이것은 PMA 처리한 호중구와 선세포의 비가 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 의 경우 각각 5.5 ± 0.7 , 7.5 ± 0.7 , 12.7 ± 1.0 , 24.0 ± 2.5 , 35.6 ± 4.0 (nmol/ml) 이었다. 췌장 선세포에서 유리된 배지에서 측정된 TNF- α 의 농도는 선세포 단독일 경우와 PMA 처리한 호중구와 선세포의 비가 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 의 경우 각각 2.6 ± 0.1 , 10.0 ± 0.3 , 18.5 ± 2.0 , 22.4 ± 2.0 , 30.0 ± 3.0 , 43.0 ± 5.1 (pg/ml) 이었다. 또한 PMA 처리한 호중구와 선세포의 비가 10:1 의 배양 조건에서 LPO, IL-1 β , IL-6

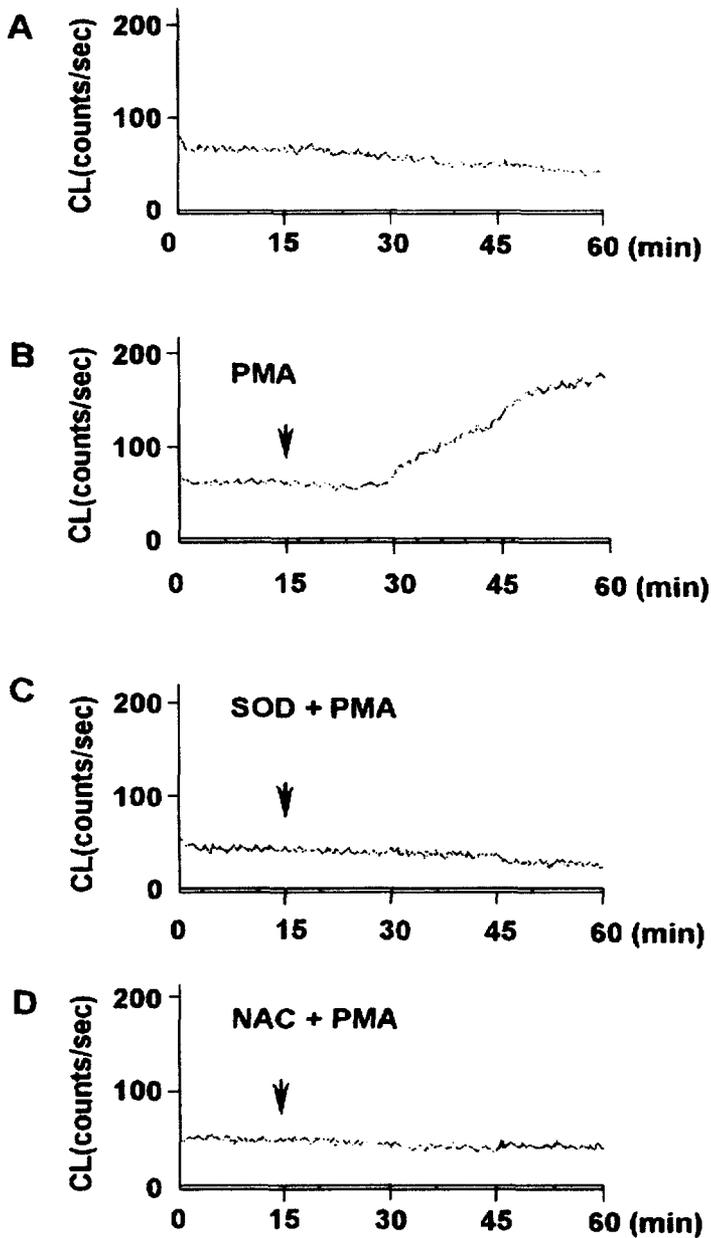


Figure 1 Measurement of luminol amplified chemiluminescence (CL) from neutrophils alone (A), PMA-primed neutrophils (B), pretreated with SOD (C) or NAC (D). PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate; NAC, N-acetylcysteine; SOD, superoxide dismutase.

Table 1. Oxidative stress indices and cytokine production in acinar cells treated with or without neutrophils at 2 hour-culture

	None	Neutrophils	PMA-primed neutrophil
H ₂ O ₂ (nmol/ml)	1.5±0.2	1.8±0.1	12.7±1.1*
LPO(nmol/ml)	0.5±0.1	0.7±0.1	12.9±0.4*
IL-1β(pg/ml)	2.6±0.1	3.5±0.3	22.4±2.0*
IL-6(pg/ml)	3.9±0.3	4.3±0.3	52.0±4.0*
TNF-α(pg/ml)	3.1±1.6	4.0±1.8	45.2±5.1*

Values are means±SE of triplicate samples from six different experiments

* p < 0.05 vs none

PMA, 4β-phorbol 12β-myristate 13α-acetate

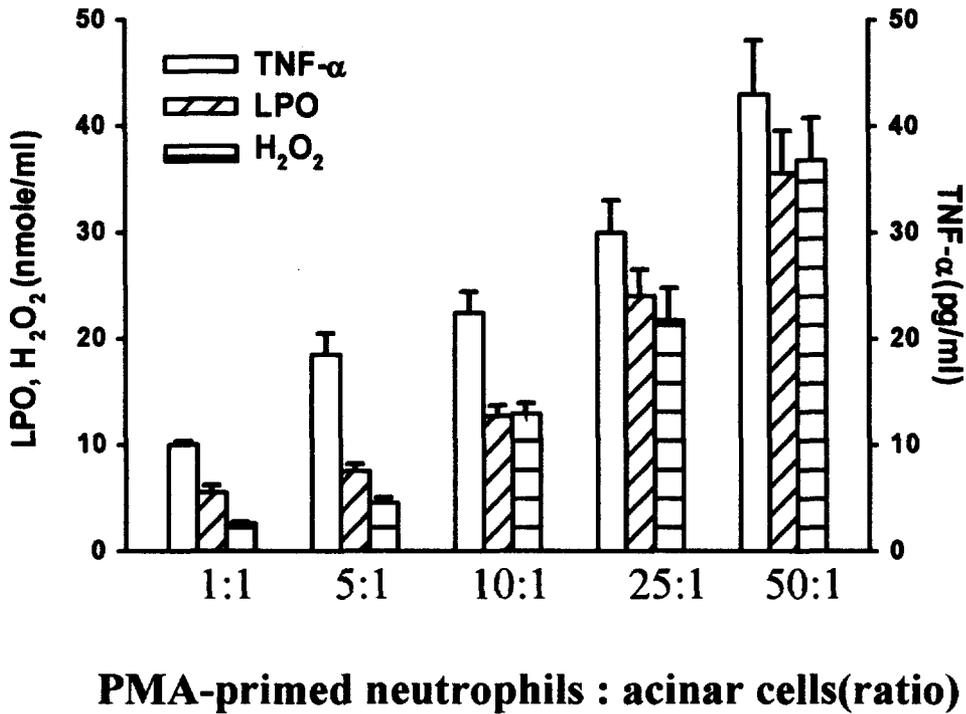


Figure 2 Concentration response of acinar cells to PMA-primed neutrophils for the productions of LPO, H₂O₂ and TNF- α at 2 hour-culture. Each point represents means \pm SE of triplicate samples from six different experiments. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate

과 TNF- α 는 시간이 경과할수록 생성이 증가되었다(Figure 3). incubation 을 시작할 때와 2, 4, 6 시간 경과후의 LPO 농도는 각각 1.5 ± 0.5 , 12.7 ± 1.0 , 22.0 ± 3.0 , 36.0 ± 4.4 (nmol/ml)이었고 TNF- α 농도는 각각 2.6 ± 1.0 , 22.4 ± 3.5 , 31.4 ± 4.0 , 45.0 ± 5.1 (pg/ml)이었으며 IL-6 농도는 각각 3.1 ± 1.6 , 45.2 ± 8.0 , 86.6 ± 12.0 , 143.6 ± 21.0 이었고, IL-1 β 의 농도(pg/ml)는 각각 3.9 ± 0.3 , 52.0 ± 6.3 , 80.4 ± 9.0 , 105.1 ± 14.0 (pg/ml) 이었다. 그러므로 NAC 와 SOD 가 배지에서 LPO 와 cytokines 의 생성을 억제하는 가를 알아보기 위한 실험의 조건은 PMA 처리한 호중구와 선세포의 비를 10:1 로 하였고 incubation 시간은 2 시간으로 하였다.

3. 췌장 선세포에서의 LPO 와 cytokine 생성에 미치는 NAC 와 SOD 의 영향

상기 조건에서 측정된 LPO(nmol/ml), TNF- α (pg/ml), IL-6(pg/ml)과 IL-1 β (gp/ml)의 농도는 각각 12.7 ± 0.8 , 22.4 ± 2.5 , 45.2 ± 5.0 , 52.0 ± 4.0 이었다(Figure 4, 5). 여기에 NAC 를 투여하였을 경우 투여 용량에 비례하여 LPO 와 cytokines 의 증가가 억제되었다. NAC 를 투여한 후 측정된 LPO, TNF- α , IL-6 과 IL-1 β 의 농도는 NAC 의 농도가 1mM 일 때 각각 8.2 ± 0.5 , 9.0 ± 0.9 , 21.2 ± 4.0 , 25.0 ± 2.1 이었고, 5mM 일 경우 각각 5.3 ± 0.5 , 6.7 ± 0.5 , 15.8 ± 1.5 , 19.7 ± 1.5 이었으며, 10mM 일 경우 각각 3.5 ± 0.3 , 4.4 ± 0.3 , 9.4 ± 0.8 , 12.4 ± 1.0 이었다. SOD 를 투여한 후 측정된 LPO, TNF- α , IL-6 과 IL-1 β 의 농도는 각각 4.1 ± 0.4 , 5.1 ± 0.3 , 11.2 ± 1.1 , 15.5 ± 1.1 이었다.

4. 췌장 선세포에서 NF- κ B 의 활성화

췌장 선세포에서의 NF- κ B 활성도를 electrophoretic mobility gel shift assay 후 자가 감광(autoradiography)법으로 얻은 결과는 Figure 6 에 표시하였다. incubation 초기에는 NF- κ B 의 활성도가 거의 측정되지 않았으나 PMA 처리 호중구를 첨가한 후 2 개의 서로 다른 NF- κ B 의 band 를 관찰할 수 있었다. PMA 처리 호중구를 선세포에

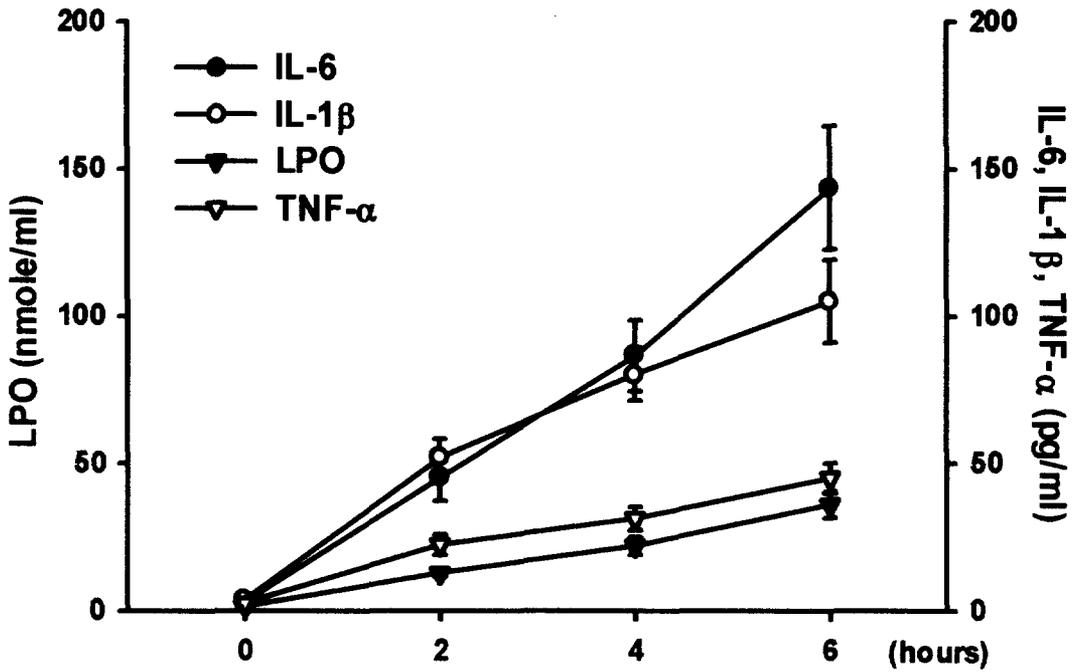


Figure 3 Time response of acinar cells to PMA-primed neutrophils for the productions of LPO, IL-1 β , IL-6 and TNF- α at the ratio of neutrophils : acinar cell, 10:1. Each point represents means \pm SE of triplicate samples from six different experiments. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate

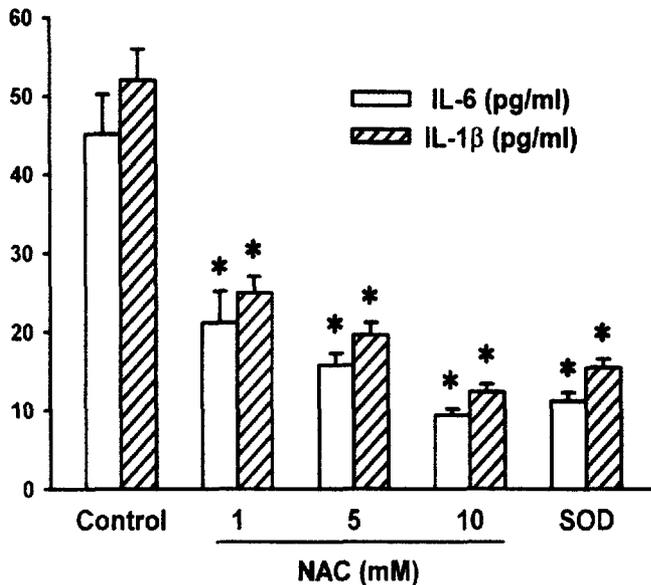


Figure 5 Effects of NAC and SOD(300 U/ml) on the productions of IL-1 β and IL-6 in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour-culture. Each point represents means \pm SE of triplicate samples from six different experiments. * $p < 0.05$ vs control. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate; NAC, N-acetylcysteine; SOD, superoxide dismutase.

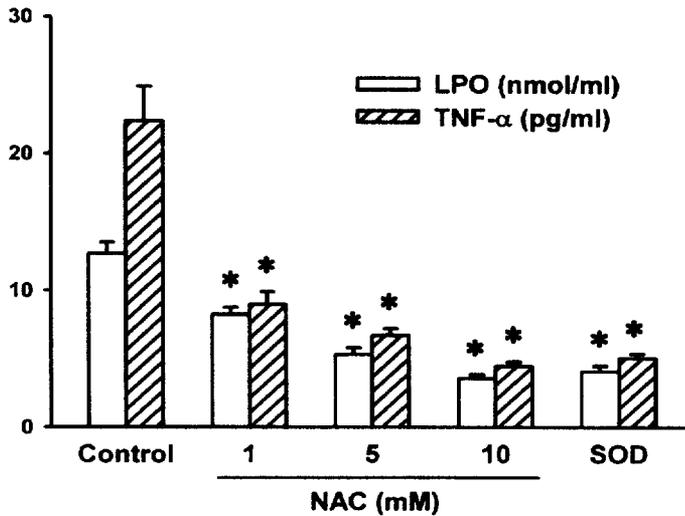


Figure 4 *Effects of NAC and SOD(300 U/ml) on the productions of LPO and TNF- α in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour-culture. Each point represents means \pm SE of triplicate samples from six different experiments. * p <0.05 vs control. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate; NAC, N-acetylcysteine; SOD, superoxide dismutase.*

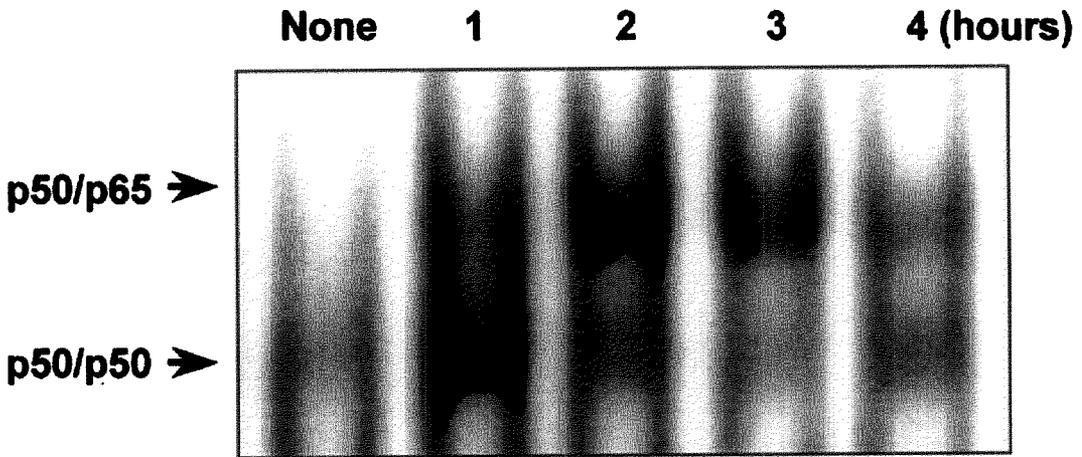


Figure 6 Time course of NF- κ B activation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils. Activated NF- κ B bands(p50/p65 heterodimer and p50 homodimer)are indicated by arrows. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate

첨가한 1 시간 만에 NF- κ B 의 활성화가 관찰되었고 2 시간 후 최대치에 도달하였다. NF- κ B 의 Rel 단백 조성을 알기 위하여 2 종의 Rel 단백질(p50, p65) 대한 항체를 이용하여 supershift assay 를 시행하였다. Figure 7A 와 같이 활성화된 NF- κ B 의 상위 band 는 anti-p50 에 대하여 부분적인 supershift 를 보였고 anti-p65 에 대하여 완전한 supershift 를 보였다. 활성화된 NF- κ B 의 하위 band 는 오로지 anti-p50 에 대해서만 supershift 를 나타냈다. 따라서 상위 band 는 p50/p65 NF- κ B heterodimer 이고 하위 band 는 p50 homodimer 임을 알 수 있었다. PMA 처리 호중구로 2 시간 동안 처리한 선세포의 핵추출물을 이용한 competition assay 에서 NF- κ B 에 결합하는 32 P-labeled oligonucleotide probe 의 결합이 unlabeled probe(wild type NF- κ B oligonucleotide)를 첨가하였을 경우 완전히 억제되었으나 mutant type NF- κ B oligonucleotide 또는 unrelated oligonucleotide(Oct-1 or AP-1)를 첨가하였을 경우는 억제 효과가 없었다(Figure 7B).

5. NAC 와 SOD 가 췌장 선세포에서의 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

ROS 제거물질인 NAC 와 SOD 를 투여하였을 경우 NF- κ B complex 형성이 억제되었다(Figure 8A). NAC(10 mM)와 SOD(300 U/ml)를 투여한 선세포의 32 P-labeled NF- κ B 의 radioactivity 는 p50/p65 heterodimer 에서 각각 대조치의 45%와 40%이었고 p50 homodimer 에서는 각각 control value 의 55%와 60%를 나타내었다(Figure 8B).

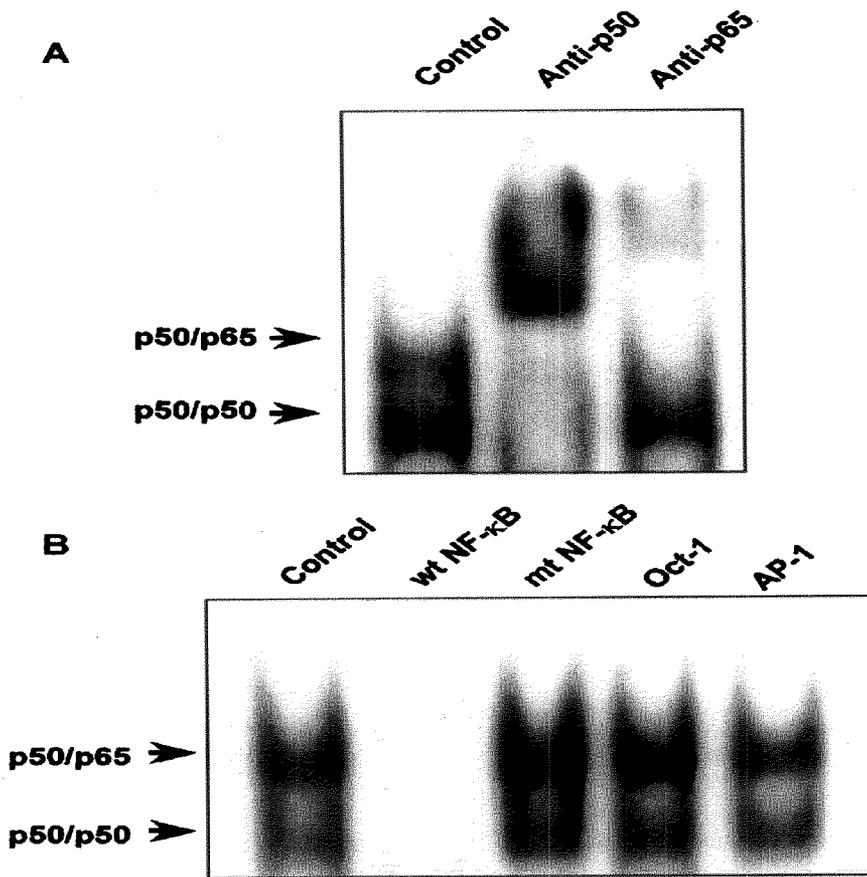


Figure 7 *Specific NF- κ B complex formation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2 hour-culture. Binding reactions were performed using antibodies against two Rel proteins(p50,p65) (A) or an unrelated wild type(wt), mutant type(mt) NF- κ B probe, an unrelated oligonucleotide(Oct-1, AP-1) or no reagent(control)(B). Activated NF- κ B bands(a p50/p65 heterodimer and a p50 homodimer) are indicated by arrows. PMA, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate.*

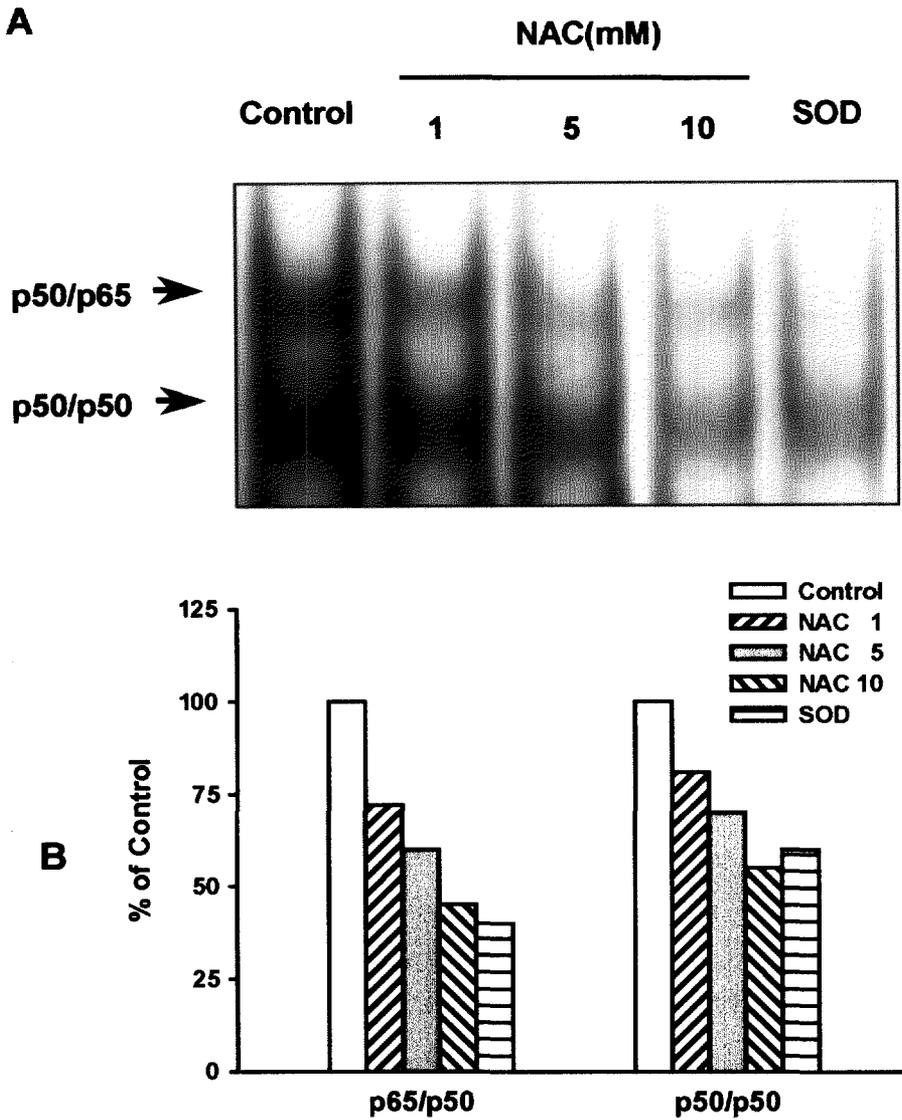


Figure 8 Effects of NAC and SOD(300 U/ml) on specific NF- κ B complex formation in acinar cells treated with PMA-primed neutrophils at 2hour-culture. Activated NF- κ B bands(p50/p65 heterodimer and p50 homodimer) are indicated by arrows (A) and expressed as % of control density(B)

IV. 고찰

본 연구에서 관찰된 중요한 결과는 (1) PMA 처리 호중구가 췌장 선세포에서의 H_2O_2 , LPO 의 생성 및 NF- κ B 의 활성화를 유도하며, 염증성 cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성을 촉진시킨다는 것과 (2) NAC 는 SOD 와 유사하게 ROS 에 의하여 유도되는 NF- κ B 의 활성화를 억제함으로써 결과적으로 PMA 처리 호중구에 의한 cytokines 생성을 감소시킨다는 것이다. ROS 가 췌장염의 발생 및 진행에 중요한 역할을 할 것임이 제시된 바 있다(Tsuji 등, 1994;Fu 등, 1997). 또한 췌장염 환자에서 분리된 PMA 처리 호중구의 superoxide 생성이 건강인으로 부터 분리한 호중구의 superoxide 생성 보다 의의 있게 항진되어 있음이 보고된 바 있다(Tsuji 등, 1994). ROS 중에서도 H_2O_2 가 NF- κ B 활성화의 주매개체로 보고되고 있다(Wulczyn 등, 1996). 또한 PMA, IL-1 β , IL-8 과 자외선등과 같은 몇몇 상관성이 없는 자극원도 NF- κ B 를 활성화시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Bauerle 등, 1996;Neurath 등, 1998). 이는 서로 다른 많은 종류의 세포에서 NF- κ B 가 다양한 작용을 할 수 있음을 시사한다. 본 연구에서는 PMA 처리 호중구에서 ROS 가 생성됨을 알 수 있었고, 이것이 췌장 선세포 배지에서 측정된 높은 농도의 LPO 및 H_2O_2 생성을 촉진시켰다고 생각할 수 있다. 본 연구에서의 NF- κ B 의 활성화는 H_2O_2 를 포함한 ROS 의 직접적인 효과와 췌장 선세포에서 생성된 cytokines 에 의한 간접적인 효과라고 생각할 수 있다. 본 연구의 이전 실험에서 PMA 처리 호중구 단독으로는 염증성 cytokine 생성이 증가되지 않는다고 보고되었다(발표되지 않은 data). PMA 처리 호중구와 함께 incubation 한 췌장 선세포에서 LPO 및 H_2O_2 증가와 함께 IL-1 β , IL-6 과 TNF- α 의 증가가 나타남은 ROS 와 cytokine 의 직접적인 관련성을 입증하여 준다. 췌장염의 초기에 췌장내 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α 의 농도가 급격히 증가하는 것이 보고되었으며(Norman 등, 1994), 실험적 췌장염 모델에서도 IL-1 β 와 TNF- α 는 초기에 췌장내에서

발견되었고 IL-6 는 진행된 궤장염 상태에서 생성된다고 한다(Norman 등, 1994). 실험적 궤장염에서 cytokine 생성에 있어 약간의 시간차이가 있지만 본 연구에서의 생체의 실험에서 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α 생성이 거의 같은 시점에서 일어남을 보여주었다. 이와 같은 결과는 염증성 cytokine 생성에 대한 생체내 매개체의 관여 가능성을 나타내준다.

NF- κ B 는 면역 신호나 염증 신호에 반응하는 다양한 유전자의 활성화를 조절하는 Rel family 전사 인자의 하나이다(Schreck 등, 1991). 사람의 Rel 단백질은 p50, p52, Rel(c-Rel), Rel A(p65)와 Rel B 로 이루어져 있다. 활성화된 NF- κ B 는 주로 p50 과 p65 의 소단위로 이루어진 heterodimer 이다(Barnes 등, 1997). 본 연구에서도 궤장 선세포에서 관찰된 활성화된 NF- κ B 는 p50/p65 NF- κ B heterodimer 와 p50 NF- κ B homodimer 로 구성되어 있음을 관찰할 수 있었다.

궤장 선세포에서의 염증성 cytokine 의 생성을 담당하는 NF- κ B 의 활성화를 ROS 가 매개한다는 가설을 규명하고자 항산화제인 NAC 와 SOD 가 호중구에 의하여 자극된 궤장 선세포에서의 ROS 유리, NF- κ B 활성화와 cytokine 생성 에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. NAC 는 효율적으로 NF- κ B 의 활성화를 억제하였고 그 결과 cytokine 생성이 감소하였다. NAC 의 효과는 LPO 생성을 억제하는 정도와 비례하였다. NAC 는 세포내의 glutathione store 를 증가시킬 수 있으므로 세포내부의 항산화방어기전을 향상시킬 수 있다. 뿐만 아니라 NAC 는 직접 염증세포에서 생성되는 ROS(hydroxyl radicals, hypochlorous acid)를 제거할 수 있다(Ben-Baruch 등, 1995). 최근 Villagrasa 등은 사람의 호중구에서 NAC 는 PMA 에 대한 superoxide 생성을 감소시켰고 세포내 glutathione 함량을 증가시켰다고 보고하였다(Villagrasa 등, 1997). SOD 투여시에도 호중구로 유도되는 궤장 선세포의 손상에 대한 비슷한 억제현상을 관찰하였는데 이러한 결과는 ROS, NF- κ B 활성화와 cytokine 생성간의 상호 관계에 대한 Gressier(1994)의 연구결과와 일치한다. 궤장염의 발병 및 진행에

있어서 cytokine 이 관여한다는 실험은 많았으나(Morris 등, 1994;Wulczyn 등, 1996) 이것의 signal transduction pathway 를 체계적으로 증명한 실험은 거의 없었다. 본 실험은 cytokine gene 의 활성화와 이것의 transcription factor 를 직접 비교하는 체계적인 실험이었다는 것에 본 실험의 의미가 있으며, ROS 의 췌장염 발병에 대한 관여 시점을 나타내주는 중요한 결과이다.

이상을 종합하여 볼 때 췌장에 침윤한 호중구에서 생성된 ROS 는 췌장 선세포의 NF- κ B 를 활성화시켜 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 췌장의 염증 반응을 매개하는 cytokine 을 upregulation 시킨다고 생각하며 나아가 췌장염의 치료를 위하여 산화물질을 매개로 하는 NF- κ B 의 활성화를 억제할 수 있는 물질을 실험적으로 시도하여 볼 수 있다고 생각한다.

V. 결론

흰쥐의 췌장 선세포를 분리하고, 분리된 췌장 선세포에 PMA 를 처리한 호중구를 함께 incubation 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PMA 를 처리한 호중구는 췌장 선세포에서의 H_2O_2 및 LPO 의 생성을 증가시켰다.
2. PMA 를 처리한 호중구는 췌장 선세포에서 NF- κ B 의 활성화를 유도하며, 염증성 cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성을 항진시켰다.
3. 항산화물질인 NAC 와 SOD 는 PMA 를 처리한 호중구에 의한 NF- κ B 의 활성화를 억제하였다.
4. NAC 와 SOD 는 PMA 처리된 호중구에 의한 cytokine 생성을 감소시켰다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 호중구에서 생성된 ROS 가 췌장 선세포의 NF- κ B 를 활성화시켜 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 췌장의 염증 반응을 매개하는 cytokine 을 증가시키는 것으로 생각된다. 염증성 cytokine 생성에 NF- κ B 가 중요한 전사인자로 생각되므로 NF- κ B 계열을 목표로 삼아 이것의 활성화를 억제시키는 방법을 췌장염 치료를 위하여 실험적으로 시도할 필요가 있다.

참고 문헌

- Adler G, Hupp T, Kern HF : Course and spontaneous regression of acute pancreatitis. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 382:31-47, 1979
- Aho HJ, Nevalainen TJ, Havia VT : Human acute pancreatitis. A light and electron microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A* 90:367-373, 1982
- Barnes PJ, Karin M : Nuclear factor- κ B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071, 1997
- Bauerle PA, Baltimore D. NF- κ B : ten years after. *Cell* 87:13-20, 1996
- Ben-Baruch A, Michel DF, Oppenheim JJ : Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 270:1173-1176, 1995
- Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP : In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor- κ B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 157:1630-1637, 1996
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG : Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acids Res* 11:1475-1489, 1983
- Fu K, Sarras MP Jr, De Lisle RC : Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during cerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol* 273:696-705, 1997
- Gressier B, Cabanis A, Lebegue S : Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils : comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find Clin Pharmacol* 16:9-13, 1994
- Gross V, Leser HG, Heinisch A. Inflammatory mediators and cytokines-new

- aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 40:522-530, 1993
- Gut A, Shiel N, Kay PM : Heightened free radical activity in blacks with chronic pancreatitis at Johannesburg, South Africa. *Clin Chim Acta* 230:189-199, 1994
- Gukovsk I, Gukovskaya AS, Blinman TA : Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 275:G1402-414, 1998
- Health DL, Cruickshank DH, Gudgeon M : Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 66:41-45, 1993
- Kim HY, Seo JY, Kim KH : Effects of mannitol and dimethylthiourea on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production in gastric cells. *Pharmacology* 58(in press), 1999
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA : Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells ; AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 12:2005-2015, 1993
- Morris PE, Bernard GR : Significance of glutathione in lung disease and implications for therapy. *Am J Med Sci* 307:119-27, 1994
- Neurath MF, Becker C, Barbulescu K : Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43:856-860, 1998
- Norman J, Franz M, Riker A : Rapid elevation of systemic cytokines during acute pancreatitis and their origination within the pancreas. *Surg Forum* 45:148-150, 1994
- Okumura N, Sakakibara A, Hayakawa T : Pancreatic endocrine function in experimental pancreatolithiasis in dogs. *Am J Gastroenterol* 77:392-396, 1982

- Oliver C, Waters JF, Tolbert CL : Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane gel. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:465-473, 1987
- Sanfey H, Bulky GB, Cameron JL : The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 200:405-413, 1984
- Schenk H, Klein M, Erdbrugger W : Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1672-1676, 1994
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA : Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258, 1991
- Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M : NF- κ B/Rel activation in cerulein induced pancreatitis. *Gastroenterology* 116:420-430, 1999
- Sugita H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okawa M : Effects of propentofylline on tumor necrosis factor- α and cytokine-induced neutrophil chemoattractant production in rats with cerulein-induced pancreatitis and endotoxemia. *Pancreas* 14(3):267-275, 1997
- Suzuki M, Miura S, Suematsu M : Helicobacter pylori elicits gastric mucosal cell damage associated with neutrophil-derived toxic oxidants. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5(Suppl):S35-39, 1993
- Szucs S, Varga C, Ember I : The separation of the granulocytes from different rat strains. A comparative study. *J Immunol Method* 167:245-251, 1994
- Thurman RG, Ley HG, Scholz R : Hepatic microsomal ethanol oxidation. *Eur J Biochem* 25:420-430, 1972
- Tsuji N, Watanabe N, Okamoto T, Niitsu Y : Specific interaction of pancreatic

elastase and leukocytes to produce oxygen radicals and

its implication in pancreatitis. *Gut* 35:1659-1664, 1994

Uys CJ, Bank S, Marks IN : The pathology of chronic pancreatitis in Cape Town.

Digestion 9:454-468, 1973

Villagrasa V, Cortijo J, Marti-Cabrera M : Inhibitory effects of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes.

J Pharm Pharmacol 49:525-529, 1997

Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C : The NF- κ B/Rel and I κ B gene Families ; mediators of immune response and inflammation.

J Mol Med 74:749-769, 1996

Yagi KA : Simple fluorometric assay for lipiperoxide in blood plasma.

Biochem Med 15:212-216, 1976

Zar BH : Biostatistical Analysis, 2nd ed. Englewood Cliffs ,

Prentice-Hall, 1984, pp70-85

Abstract

The role of neutrophil in the pathogenesis of experimental pancreatitis, an *in vitro* study

Se Haeng Cho

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung Hwan Kim)

Reactive oxygen species(ROS), generated by infiltrated neutrophils, are considered as an important regulator in the pathogenesis and development of pancreatitis. A hallmark of the inflammatory response is the induction of cytokine gene expression, which may be regulated by oxidant-sensitive transcription factor, nuclear factor κ B(NF- κ B). This study was aimed to investigate whether neutrophils primed by 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate(PMA) affect the productions of H₂O₂ and lipid peroxide(LPO), NF- κ B activation and cytokine production in pancreatic acinar cells, and whether these alterations were inhibited by antioxidants. ROS generation from neutrophils were measured as luminol amplified chemiluminescence. H₂O₂ was measured by ferrithiocyanate method; LPO by colorimetric method; cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α) by enzyme-linked immunosorbent assay and NF- κ B activation by electrophoretic mobility shift assay in acinar cells treated with or without PMA-

primed neutrophils in the absence or presence of NAC(1,5,10 mM) or SOD(300U/ml). As a result, ROS generation in neutrophils increased by PMA, which was inhibited by NAC and SOD. The productions of H₂O₂, LPO and TNF- α were increased with the ratio of PMA-primed neutrophils to acinar cells while the productions of LPO, IL-1 β , IL-6 and TNF- α increased with time. PMA-primed neutrophils resulted in the activation of two species of NF- κ B dimers(p50/p65 heterodimer and p50 homodimer). Both NAC and SOD inhibited neutrophil-induced alterations in acinar cells. In conclusion, it is suggested that ROS, generated by neutrophils, activates NF- κ B, resulting in upregulation of inflammatory cytokines in acinar cells. The role of neutrophil, in the initiation and development of pancreatitis, seems to be closely related to the activation of NF- κ B in the pancreatic acinar cells.

Key Words : NF- κ B ; cytokine ; pancreatic acinar cells ; neutrophils ; antioxidant