CFTR과 NHE 상호작용에 의한 췌액 전해질 분비 조절

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 제 우

CFTR과 NHE 상호작용에 의한 췌액 전해질 분비 조절

지도 김 경 환 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 제 우

김제우의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 저에게 새로운 학문의 길을 열어 주신 김경환교수님께 삼가 깊은 존경과 감사를 드리며, 연구가 진행되는 동안 바쁘신 와중에서도 여러 가지 소중한 조언의 말씀을 아끼지 않으셨던 정기섭교수님, 정재복교수님, 안덕선교수님, 이민구교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 연구 결과가 작게나마 이 시대의 의학 발전에 기여하고, 의학을 연구하는 후학들에게 도움되는 귀중한 자료가 되기를 기원합니다. 또한 이 연구 논문이 병마로 고생하는 여러 환자들에게도 도움이 되어 질병의 치유에 있어서 하나의 새로운 희망과 등불이 될 수 있기를 기대합니다.

여기까지 저를 인도하여주신 하나님께 영광을 돌리며 마지막으로 길고 힘들었던 지금까지의 학업 과정 내내 저를 믿고 따라주신 부모님과 가족들에게도 깊은 감사를 드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약 1

I. 서 론 2

II. 재료 및 방법 3

1. 실험동물 3

2. 세포주 배양 및 이온수송단백 유전자 표현 4

3. 표준용액 4

4. 역전사 중합효소 연쇄반응 4

5. Western blotting 및 면역침강 5

6. 면역형광염색 5

7. 내강관류 생쥐 췌관의 제작 6

8. Microfluorometry를 이용한 세포내 pH 측정 6

III. 결 과 7

1. PS120 세포주와 생쥐 췌장의 NHERF/EBP50 존재 여부 7

2. CFTR-EBP50-NHE3의 결합여부 8

3. CFTR의 NHE3 작용조절 9

IV. 고 찰 12

V. 결 론 14

참고문헌 15

영문요약 17

그 림 차 례

그림 1. PS120 세포주와 생쥐 췌장의 NHERF/EBP50 7

그림 2. CFTR-EBP50-NHE3의 면역침강 8

그림 3. CFTR-EBP50-NHE3의 면역형광염색 9

그림 4. PS120 세포주에서 CFTR의 NHE3 작용조절 10

그림 5. 췌장 관세포 내강막에서 CFTR의 NHE3 작용조절 11

그림 6. 본 연구에 근거한 췌장 관세포 내강막에서의
HCO_3^- 분비기전 모델 13

국문요약

CFTR과 NHE 상호작용에 의한 췌액 전해질 분비 조절

췌장 관세포는 고농도의 HCO_3^-가 함유된 췌액을 분비한다. HCO_3^-는 장관에서 소화효소의 활성유지 및 위산의 중화에 중요한 역할을 하며, 췌장 및 소화기의 여러 질환이 관세포에서의 췌액분비 감소와 관련이 있다. 본 연구에서는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)와 내강막 Na^+/H^+ exchanger (NHE) 상호연결의 의미를 HCO_3^- 분비와 관련지어 살펴보았다.

RT-PCR 및 western blotting 실험에서 췌장 조직은 CFTR과 NHE를 연결할 수 있는 단백인 EBP50를 발현하고 있었으며, NHE 연구에 자주 이용되는 세포인 PS120 세포주도 이전의 보고와는 다르게 EBP50를 갖고 있었다. 면역침강 및 면역형광염색 방법으로 검색한 결과 CFTR-EBP50-NHE3는 PS120 세포주와 생쥐 췌장조직에서 단백복합체로 존재하고 있었으며, 특히 췌장 관세포에서는 내강막에 집중적으로 존재하는 것을 관찰하였다. 세포의 pH_i를 재는 방법으로 NHE 기능을 측정한 결과 PS120 세포주에서 CFTR은 cAMP의 NHE3 억제작용을 더욱 증가시켰으며 이 효과는 저농도의 cAMP에서 더욱 현저하였다. 또한 내강관류 췌관에서는 CFTR이 존재하는 wild type 생쥐의 경우 CFTR이 손상된 ⊿F508 생쥐에 비하여 cAMP가 내강막 NHE의 기능을 더욱 억제하였다.

결론적으로 본 연구결과를 볼 때 연결단백 EBP50를 통한 CFTR과 내강막 NHE의 상호작용이 췌장 관세포의 주 기능인 HCO_3^- 분비를 조절하고 있음을 알 수 있었고, CFTR 손상에 의한 HCO_3^- 분비감소가 여러 폐 · 췌장 질환과 관련 있음을 고려할 때 이 기전은 상피세포 전해질 분비조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 췌장, $HCO3^-$ 분비, Na^+/H^+ exchange, CFTR, EBP50

CFTR과 NHE 상호작용에 의한 췌액 전해질 분비 조절

<지도 김 경 환 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 제 우

I. 서 론

췌장 외분비선은 수분과 전해질을 분비하는 관 체계(ductal system)와 효소를 분비하는 선포(acini)로 구성되어 있다. 관세포에서 분비되는 췌액은 소화효소와는 달리 관세포를 지나가는 동안 그 전해질 조성은 많이 변동된다. 췌액내 전해질중 특히 HCO_3^-는 소화효소의 활성유지 및 위산의 중화에 중요한 역할을 한다. 췌장 및 소화기의 여러 질환에서 관세포의 이온 수송기능이 변동되며 역으로 관세포 기능이상은 만성 췌장염 등의 질환을 초래하기도 한다.[1]

수분과 HCO_3^-를 분비하는 관세포는 상피세포의 일종이다. 상피세포의 구조에서 가장 큰 특징은 세포가 tight junction에 의하여 구분되는 극성(polarization)구조를 이루고 있다는 점이다. 즉, 세포막이 외부환경과 연결된 내강막(luminal membrane)과 우리 몸의 내부와 연결된 측저막(basolateral membrane)으로 나누어져 있고 세포 안의 소기관들도 이에 맞추어 방향성을 갖는 구조를 유지하고 있다.[2]

상피세포의 이러한 극성구조에 의하여 물질의 방향성 이동(vectorial transport)이 나타난다. 이 방향성 이동은 우리 몸에 필요한 물질을 외부로부터 흡수하게 하고 또 세포배설물 혹은 생체 내강(lumen) 작용에 필요한 물질을 내강으로 분비하게 한다. 방향성 이동은 이온의 이동에 중요한 역할을 한다. 즉, 첫째, 여러 유기물질 및 물의 이동이 이온의 이동과 연결되어 있고, 둘째, 세포가 기능을 수행하는데는 정교한 이온 환경이 필수적이고, 셋째 체내 내강에서 분비액의 조성을 조절한다.

이런 이온 이동 조절 기전에 관하여 최근 10여년간 세포·분자생물학이 급속도로 발전하면서 각 이온의 수송단백이 속속 cloning되고 있고 이들의 작용기전에 관하여도 많은 사실이 알려지고 있다. 이들 수송단백 중 현재 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)가 췌장 관세포의 이온 분비 기능에 있어 중추적 역할을 하는 것으로 밝혀

지고 있다.[3] CFTR은 서양인에 많은 유전병인 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)과 관련된 유전자로서 처음 발견되었으며 Cl^- 통로 기능을 갖고 있다고 알려졌다.[4] 그러나 그 후 이 단백이 상피 Na^+통로[5] 및 Cl^-/HCO_3^- 교환기[6] 등 상피세포막에 존재하는 여러 수송단백의 기능을 조절한다는 것도 밝혀졌다. 또한 임상적으로도 낭포성 섬유증뿐 아니라 세균 및 독소에 의한 설사질환,[7] 만성췌장염[1] 및 Salmonella 감염증[8] 등의 질환과 깊은 관련이 있음이 최근 알려졌다.

식후의 췌액분비 증가에 있어 CFTR이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되지만 이때 여러 관련이온과 이들의 수송단백이 어떤 방향으로 작용하는지는 구체적으로 밝혀져 있지 않다. 외분비 관세포 내강막에는 CFTR 외에도 Na^+/H^+ exchanger (NHE)가 존재하며[9,10] 이때 CFTR과 NHE가 HCO_3^- 분비에 있어서 상호작용할 가능성이 매우 높다. 즉 1) CFTR은 다른 여러 수송단백의 작용을 조절하는 작용이 있고, 2) 췌장 내강막의 NHE 기능은 HCO_3^- 분비에 중요한 역할을 하며,[10] 3) 연결단백(scaffolding protein)인 ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50, 다른 말로 NHE regulating factor)이 CFTR 및 NHE와 각각 결합하는 사실이 밝혀졌다.[11]

NHE regulating factor (NHERF)는 처음에는 토끼 콩팥세뇨관 세포의 내강막에서 NHE3의 기능을 조절하는 단백으로 알려졌다.[12] 계속된 연구에서 이것이 사람세포에서 세포골격구조와 결합하는 연결단백인 EBP50와 동일한 단백임이 밝혀졌고, 나아가 다른 여러단백 특히 CFTR과도 결합할 수 있음이 알려졌다.[13] 그러나 인체 주요기능 및 질병과 관련하여 NHE3와 CFTR이 동시에 존재하는 조직은 알려지지 않아서 이들의 관계에 관한 별다른 연구는 진행되지 않았다. 최근 Lee 등[10]은 CFTR이 존재하는 췌장관세포 내강막에 NHE3도 존재하는 것을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 CFTR과 NHE가 결합하는지를 세포주와 췌장 관세포에서 분자 생물학적으로 살펴보았으며 이들의 상호작용이 췌장 관세포의 주 기능인 HCO_3^- 분비에 어떤 역할을 하는지 세포 생리학적으로 검색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 C57 BL/6계 생쥐를 이용하였으며 모든 동물은 SPF 시설에서 사육하였다. ⊿F-508 생쥐[14]의 배양 및 genotype은 다음과 같다. Heterozygote (WT/⊿F)의 계대 배양에서 태어난 새끼 생쥐의 발가락(연령 1주) 및 꼬리(연령 3주)를 잘라서 proteinase K (20 mg/ml) 용액에서 8시간 이상 소화시켰다. 이때 digestion buffer의 조성은 다음과 같았다(mM): Tris-HCl 50, Na-EDTA 100, NaCl 100 (pH 8.0). 소화액으로부터 phenol/choroform extraction 방법을 이용하여 DNA를 추출하고 다음의 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다:

CF26-5'TTC AAG CCC AAG CTT TCG CGA G3', CF27-5'CTC CCT TCT TCT AGT CAC AAC CG3', CF28-5'CAT CTT GAT AGA GCC ACG GTG C3'. Wild type (WT)의 경우 CF27과 CF28 primer의 작용으로 430 bp의 PCR product가 검출되고, ⊿F의 경우에는 CF26과 CF27의 작용으로 300 bp band가 검출된다. 한 배에서 태어난 새끼 중 WT/WT과 ⊿F/⊿F를 실험에 이용하였다.

2. 세포주 배양 및 이온수송단백 유전자 표현

NHE 기능을 갖고 있지 않은 PS120 세포주[15]는 10 mM glucose가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-HG)에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 배양하였다. 이 세포주에 NHE3를 발현하는 pCMV-vector를 Lipofectamine reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)를 이용하여 transfection시켰다. Neomycin 저항성을 이용하여 G418로 transfection된 세포만을 선택하였으며, ammonuium pulse를 가하여 산성 pH에서도 살아남을 수 있는 NHE3 표현 세포를 다시 한번 선택하였다. 또한 균일한 NHE3 표현 세포주를 얻기 위하여 clonal selection을 실시하였다.

Adenoviral vector (Ad-CFTR)를 이용하여 wild type CFTR을 co-transfection하였으며, CFTR mutant를 갖고 있는 pCMV vector의 경우는 Green Fluorescent Protein (GFP)을 표현하는 vector (pGreen Lantern; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)를 co-transfection하여 유전자가 표현되는 세포만을 선택하여 실험하였다.

3. 표준용액

본 실험에 이용한 표준용액의 조성(mM)은 NaCl 140, KCl 5, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1, glucose 10, HEPES 10 (pH 7.4)이었으며, 내강관류 췌장관의 분리 및 dye loading에 이용한 pancreatic solution A (PSA)는 표준용액에 Na^+-pyruvate와 soybean trypsin inhibitor 및 bovine serum albumin을 각각 10 mM, 0.02%, 0.01%되게 첨가하여 제조하였다. NHE 기능 검색에 이용하는 Na^+-free 용액의 경우 Na^+ 이온을 N-methyl-D-glucamine$^+$ (NMG^+) 이온으로 대체하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

생쥐를 희생시킨 다음 개복하고 췌장을 적출하여 얼음냉각 PSA에 담구었다. 다른 종류 세포에 의한 오염을 방지하기 위하여 현미경하 미세조작을 통하여 순수 췌장 관세포를 얻은 후 guanidinium thiocyanate phenol-chloroform (Trizol; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 이 RNA로부터 random hexa-primer와 RNase H^--reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 제작하였으며, 이를 다시 생쥐 NHERF/EBP50에 대한 primer와 Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT,

USA)를 이용하여 증폭하였다. 생쥐 primer중 일부는(mEBP50-2) hamster 조직에서도 검출하였으며 그 서열은 다음과 같다: sense, 5'-CTA AGC CAG GCC AGT TCA TCC GAG CAG T-3'; antisense, 5'-TGG GGT CAG AGG AGG AGG AGG AGG TAG A-3'. 증폭된 DNA band는 agarose gel에서 전기영동 및 ethidium bromide 염색으로 검출하였고, dideoxynucleotide sequencing을 하였다. 또한 본 실험에서의 염기서열과 GenBank (NCBA, Bethesda, MD, USA)에 등록된 다른 종의 염기서열을 neighbor-joining 방법(Clustal X; EMBL, Heidelberg, Germany)으로 비교하여 검출된 유전자의 진위를 판별하였다.

5. Western blotting 및 면역침강

배양 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻은 후 lysis buffer (NaCl 200 mM, Triton X-100 1%, DTT 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, leupeptin 1 μg/ml, aprotinin 1 μg/ml, phenylmethanesulfonyl fluoride 40 μg/ml, pepstatin A 1 μg/ml)를 투여하고 얼음 위에 10분간 두었다. Cell scraper로 세포를 모아 Eppendorf tube에 옮기고 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 단백질 1 mg을 취하여 4°C에서 Anti-CFTR 항체 0.5 μg과 protein A/G Sepharose bead를 넣고 4°C에서 두시간 동안 반응시켰다. 원심분리(13,000 rpm, 1분)하여 세 차례 세척한 후 2.5x SDS sample buffer (DTT 1.25 M, Tris 300 mM, pH 6.8, sodium dodecyl sulfate 10%, bromophenol blue 0.05%, benzamidine 100 mM, soybean trypsin inhibitor 0.3%)를 넣고 5분간 끓인 후 SDS-PAGE를 시행하였다. Gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후 anti-EBP50 항체 또는 anti-NHE3 항체를 처리하고 peroxidase가 붙은 2차 항체를 처리하였다. ECL system (Amershan Pharmacia, Buckinghamshire, UK)으로 발색하여 단백을 검출하였다.

6. 면역형광염색

췌장 관세포에서 CFTR, NHE3, NHERF/EBP50의 존재부위를 검색하기 위하여 동결조직 절편에 대한 면역형광염색을 실시하였다. 실험동물로부터 적출한 조직을 바로 동결 고정액(OCT; Miles, Eikhart, IN, USA)에 담근 후 액체질소로 동결시키고 이로부터 5 μm 두께의 조직절편을 만들어 사용할 때까지 −20°C 건조한 곳에서 보관하였다. 슬라이드에 부착된 동결조직 절편을 냉각 methanol (0.5 ml, 10분, −20°C)로 처리하여 고정(fixation)과 permeabilization을 하였다. PBS로 두번 세척한 다음 glycine 용액(50 mM glycine in PBS, 상온)에 10분간 담근 후 blocking 용액(5% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% gelatin in PBS, 상온)에 1시간 동안 처치하였다. 슬라이드를 PBS로 두 번 세척한 후 수송단백 아형특이 일차항체를 blocking 용액으로 1 : 100~1 : 500 희석한 용액에 1~2시간 동안 처리하였다. 다시 PBS로 두 번 세척 후 이차항체(anti-rabbit goat IgG tagged with fluorescein; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA)를 1 : 100으로 희석한 용액에서 1시간 처리하였

으며, double labelling을 위하여 다른 종류의 항체로 다시 한번 반복 염색하였다. 두번째 염색때에는 Rhodamine-X가 표지된 이차항체를 이용하였으며 또한 핵을 염색하기 위하여 benzimide 10 μg/ml를 첨가하였다. Mounting media로 cover slip을 슬라이드에 고정시키고 밤새 슬라이드를 건조시킨 다음 confocal microscope (TCS-NT system; Leica U.K., Ltd., Milton Keynes, U.K.)으로 형광염색을 관찰하였다.

7. 내강관류 생쥐 췌관의 제작

몸무게 25 g 안팎의 생쥐를 마취(Ketamine 100 mg/kg 및 Xylazine 10 mg/kg, i.m.)한 후 복부를 열어 총 췌담관(common pancreaticobiliary duct)의 십이지장 개구부를 노출시켰다. 수술현미경 하에서(10~40배) 개구부에 polyethylene tube와 연결된 31 G 바늘을 삽입하고 주 췌관과 만나는 곳 상부의 총 췌담관을 결찰하였다. 췌장 및 주변 조직을 적출하여 냉각 PSA 용액에 담그고 수술현미경 하에서 dissecting forcep으로 주 췌관을 분리하였다. 분리한 췌관을 관류 chamber로 옮긴 다음 내강은 25 μl/min의 속도로 관류액을 역행 관류시키고 bath chamber는 6 ml/min의 속도로 용액을 관류하였다.

8. Microfluorometry를 이용한 세포내 pH 측정

췌관에 pH 측정용 형광물질인 BCECF가 함유된 용액(5 μM BCECF-AM in PSA)을 5분 동안 내강관류시켜 췌관세포에 형광물질을 loading하였다. 현미경(400배)하에서 pH_i를 잴 부위를 결정한 다음 excitation wavelength 490 nm와 440 nm에서 나오는 형광을 emission wavelength 510 nm에서 photon counter (PTI Delta Ram, NJ, USA)로 검출하였으며 490/440 nm의 형광비(fluorescence ratio)를 측정하였다. 실험 후 pH를 6.4~7.6으로 맞춘 KCl 145 mM, Hepes 10 mM, nigericin 5 μM 용액을 이용한 calibration을 실시하여[3] 490/440 nm의 형광비를 실제의 pH 값으로 환산하였다.

세포주를 이용한 실험에서는 세포가 부착된 cover slip을 BCECF용액(1 μM BCECF-AM in PSA)에 담그어 형광물질을 세포에 loading하였다. 관류 chamber에 cover slip을 조립한 다음 췌관과 동일한 방법으로 pH_i를 측정하였다. 한편 transient transfection한 세포를 이용할 때는 먼저 475 nm에서 GFP의 형광을 관찰하고, 현미경하에서 GFP가 보이는 세포만을 선택하여 실험하였다.[6]

NHE의 기능 측정은 HCO_3^-를 함유하고 있지 않은 관류액에서 Na^+의 농도를 145 mM로부터 0 mM로 낮추고서(Na^+를 NMG^+로 대치함) NH_4Cl pulse를 가하여 세포의 pH를 낮추었다. 여기에 다시 145 mM Na^+ 용액을 관류시키면 Na^+가 들어오면서 H^+를 세포외부로 배출시켜 세포의 pH가 올라가며 이때 증가되는 pH 기울기로 NHE의 활성도를 측정하였다.

III. 결 과

1. PS120 세포주와 생쥐 췌장의 NHERF/EBP50 존재 여부

췌장 관세포에 존재하는 수송단백인 CFTR과 NHE의 상호 관계를 보기 위하여 먼저 heterologous expression system (PS120 세포주)과 *in vivo* model (생쥐 췌장)에서 NHERF/EBP50가 존재하는지 확인하였다. Western blotting 결과 PS120 세포주와 생쥐 췌장에서 모두 EBP50가 존재하는 것을 볼 수 있었다(그림 1A). 이전의 연구에서 일부 연구자들을 PS120 세포주에 EBP50가 없다고 주장하였었는데,[16] 그림 1A의 결과는 이들의 주장과 정반대되는 결과였다. 따라서 PS120 세포에 EBP50가 표현되는지 더욱 정확히 알아보기 위하여 RT-PCR과 nucleotide sequencing을 실시하였다.

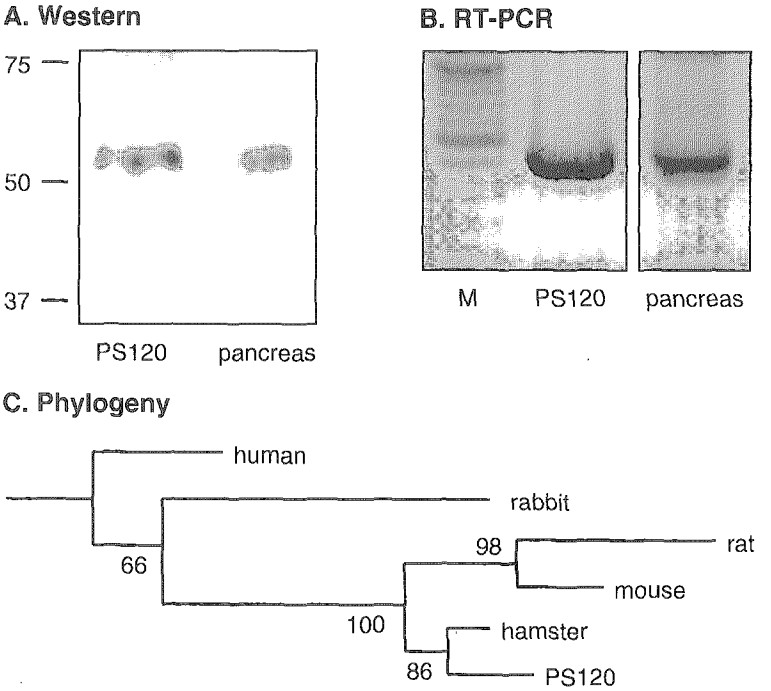

그림 1. PS120 세포주와 생쥐 췌장의 NHERF/EBP50. A. Western blotting한 결과 PS120 세포주와 생쥐 췌장 모두에서 50 kD의 EBP50가 검출되었다. B. RT-PCR 시행 결과 PS120 세포주가 EBP50 mRNA를 발현하고 있었다. C. B의 band를 sequencing하여 비교한 결과 PS120 세포주의 band는 host이었던 hamster의 EBP50와 거의 동일함을 볼 수 있다. 따라서 PS120 세포가 EBP50를 원래 발현하고 있음을 알 수 있다.

생쥐 EBP50에 대한 primer중 mEBP50-2 primer는 PS120 세포주가 유래된 햄스터 췌장에서도 작용하였으며, 이를 사용한 결과 PS120 세포주에서 정확한 크기의 PCR product가 검출되었다(그림 1B). PS120 세포주의 EBP50 염기서열은 본 연구에서 밝힌 햄스터의 염기서열과 거의 동일하였으며 생쥐와 92%, 흰쥐와도 91%의 높은 동질성을 보였다(그림 1C).

2. CFTR-EBP50-NHE3의 결합여부

CFTR이 NHE3와 상호작용을 할 수 있는지 그 결합여부를 co-immuno-precipitation 방법으로 살펴보았다. 먼저 어떤 종류의 NHE도 가지고 있지 않은 PS120 세포주에 pCMV-NHE3 vector를 transfection하여 stable cell line을 만든 다음 adenoviral vector (Ad-CFTR)를 이용하여 CFTR을 발현시켰다.

그림 2A에서는 이전의 연구자들이 다른 종류의 세포조직에서 보고한 것처럼 PS120 세포주와 췌장에서도 CFTR과 EBP50가 서로 결합하고 있음을 볼 수 있다. 다음으로 CFTR과 NHE3의 관계에 관하여 검색하였는데, 그림 2B에서 보는 것처럼 CFTR이 NHE3와도 결합하여 단백복합체를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다.

이런 CFTR-EBP50-NHE3 복합체 형성이 실제 체내 조직에서 일어날 수 있는지 그리고 췌장의 경우 어느 부위에서 형성되는지 관찰하기 위하여 면역형광염색을 췌장조직에서 시행

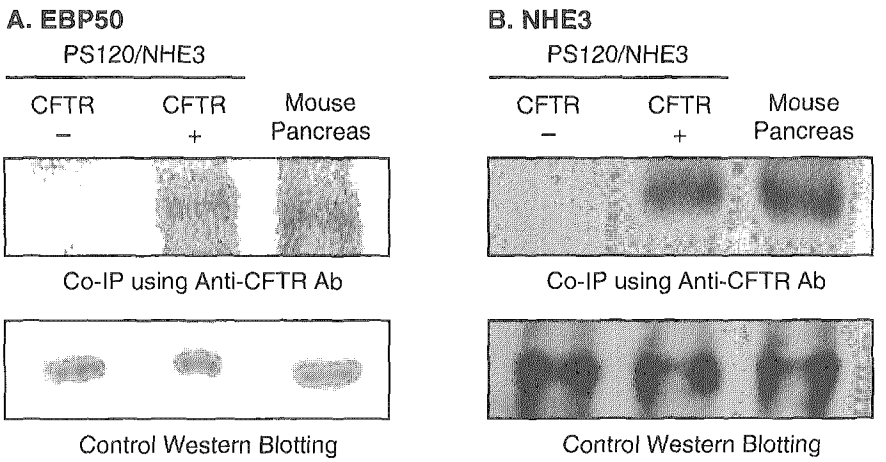

그림 2. CFTR-EBP50-NHE3의 면역침강. A. CFTR과 EBP50의 단백 복합체 형성. 각 세포 및 조직으로부터 얻은 단백시료를 CFTR에 대한 항체로 침강시킨 다음, 침강된 단백을 EBP50에 대한 항체로 검출하였다. PS120/NHE3 세포주의 경우 adenoviral vector로 CFTR이 함께 발현된 세포에서만 EBP50가 검출되므로 이 두 단백이 복합체를 이루고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또 동일한 복합체가 실제 생쥐 췌장조직에서도 관찰되었다. B. A와 동일한 방법으로 CFTR과 NHE3의 복합체 형성에 대하여 검색하였다. CFTR이 PS120 세포주와 생쥐췌장에서 NHE3와 단백복합체를 형성함을 볼 수 있다.

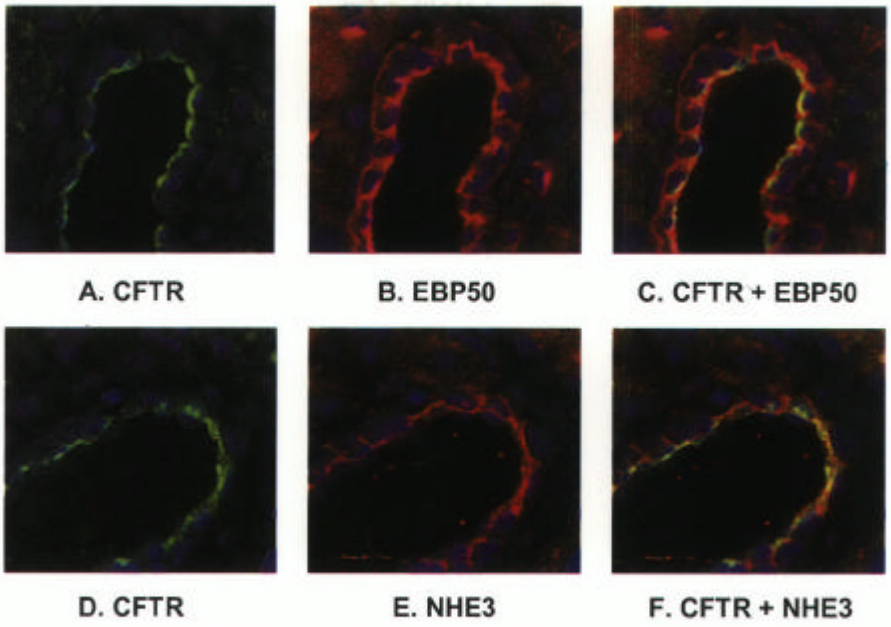

그림 3. CFTR-EBP50-NHE3의 면역형광염색. A. CFTR이 췌장 관세포의 내강막에 존재하고 있다. B. EBP50은 측저막에 일부 존재하지만 주로 내강막에 존재하고 있다. C. A와 B의 합성 영상으로 CFTR과 EBP50이 췌장 관세포의 내강막에 같이 존재하는 것을 볼 수 있다. D~F. CFTR과 NHE3가 췌장 관세포의 내강막에 공존하는 것을 볼 수 있다.

하였다. 그림 3A 및 3D에서 보는 것처럼 췌장의 소엽내도관 내강막에는 다량의 CFTR이 표현되어 있는 것을 볼 수 있었다. 그림 3B에서는 세포막 주변의 연결단백인 EBP50가 췌장 관세포에서는 측저막보다 내강막에 훨씬 많이 존재하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 두 그림을 합성할 경우 관세포 내강막이 노란색으로 염색되어 두 단백이 이 곳에서 공존하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3C).

NHE3 단백의 경우도 관세포 내강막에 존재하는데(그림 3E), 이 역시 CFTR과 공존하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3F). 이 사실은 CFTR-EBP50-NHE3 복합체가 췌장 관세포 조직에서 형성되고 있음을 나타내주고 있다.

3. CFTR의 NHE3 작용조절

CFTR은 다른 여러 세포막 수송단백의 기능을 조절하는 작용이 있으므로 CFTR-EBP50-NHE3 복합체 형성이 NHE3의 기능에 어떤 영향을 미치는지 heterologous expression system과 targeted mutation을 일으킨 생쥐에서 검색하였다. 특히 이때 1) CFTR은 cAMP에 의하여 활성화되며, 2) EBP50는 cAMP가 NHE3를 억제하는데 있어 매개 단백으로 작용하므로[16] CFTR이 이 과정에 어떤 영향을 주는지 살펴보았다.

그림 4A는 CFTR이 없는 PS120/NHE3 대조군 세포에서 NHE의 기능을 살펴본 것이다.

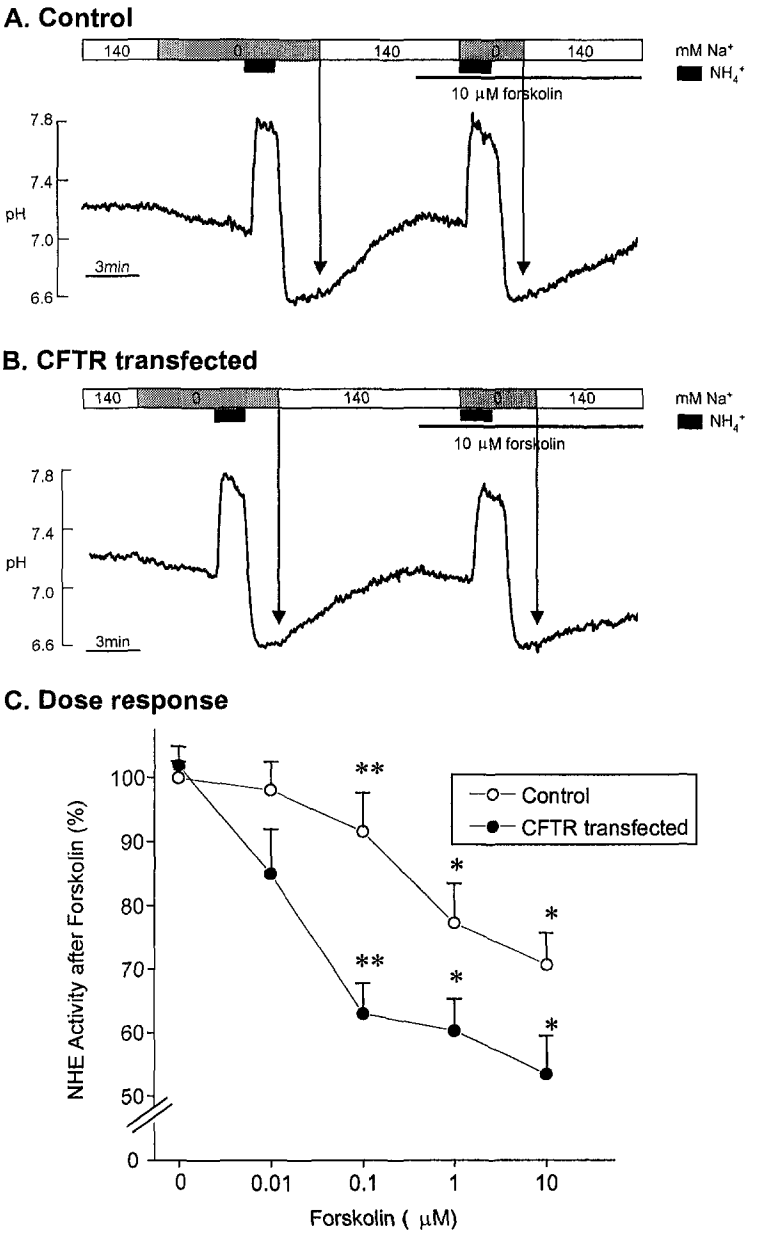

그림 4. PS120 세포주에서 CFTR의 NHE3 작용조절. NH_4^+ pulse를 주어 세포를 산성화 한 다음 Na^+ 함유 용액을 주었을 때 회복되는 pH_i로 NHE 기능을 측정하였다. A. CFTR이 없는 경우 저농도(0.1 μM) forskolin에 의하여 NHE 활성이 별 영향을 받지 않는다. B. CFTR이 있는 경우 0.1 μM forskolin이 NHE 활성을 억제시킨다. C. A 및 B실험의 요약으로 CFTR이 cAMP 자극(forskolin)에 의한 NHE3 작용억제를 더욱 증강시키는 것을 볼 수 있다. 특히 이는 저농도의 forskolin 자극시 더욱 현저하였다. **P<0.01, *P<0.05

NHE는 산성 pH_i에서 그 기능을 관찰하기가 용이하므로 먼저 NHE가 기능을 하지 못하도록 Na^+-배제용액을 관류하고 여기에 NH_4^+ pulse를 가하여 세포를 산성화하였다. 이 상태에서 Na^+이 함유된 정상관류액을 투여하면 NHE의 작용에 의하여 세포가 Na^+ 의존적으로

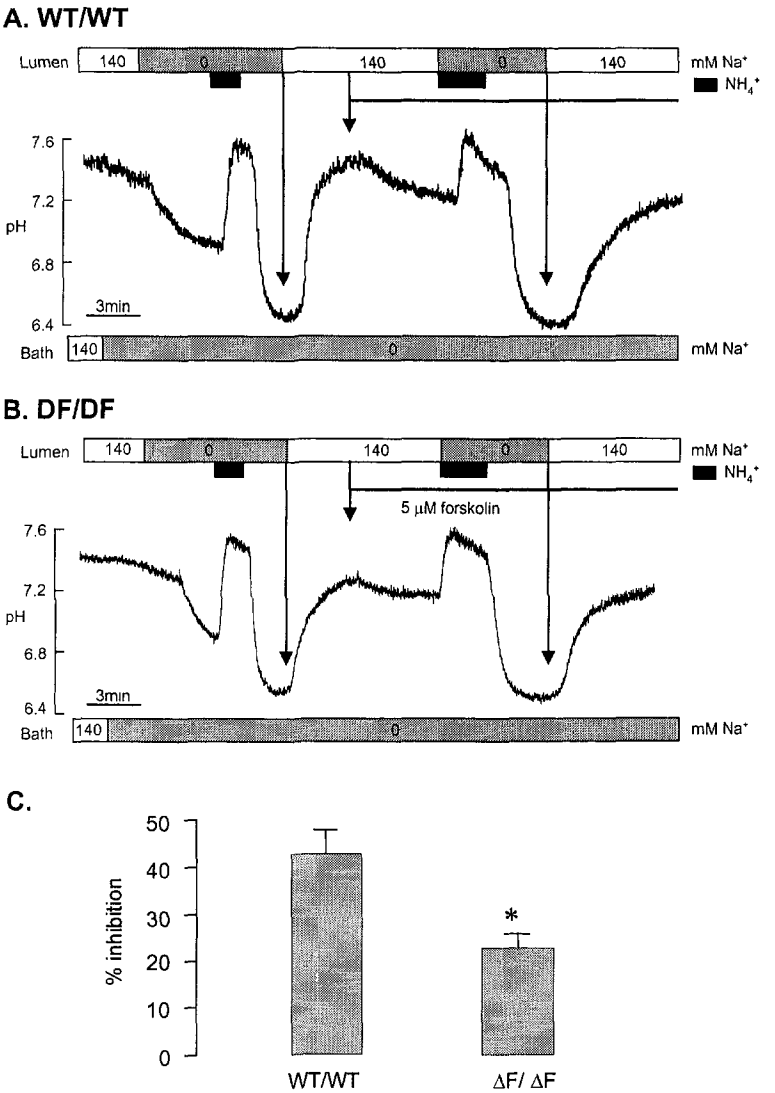

그림 5. 췌장 관세포 내강막에서 CFTR의 NHE3 작용조절. 췌장 관세포 내강막에서 NHE 기능을 측정하였다. A. CFTR이 정상인 wild type 생쥐의 경우 내강막 NHE의 기능이 5 μM forskolin에 의하여 현저이 억제된다. B. CFTR이 손상된 ΔF 생쥐의 경우 forskolin에 의한 NHE 억제가 작은 것을 볼 수 있다. C. A 및 B실험의 요약으로 생체에서도 CFTR이 forskolin 유발 cAMP 자극에 의한 NHE3 작용억제를 더욱 증강시키는 것을 볼 수 있다. *$P < 0.05$

pH를 빠르게 회복하였다. 다음으로 세포내 cAMP를 높이는 forskolin을 투여한 후 같은 과정을 반복하면 forskolin이 NHE3의 기능을 감소기킨 것을 볼 수 있었다. 똑같은 실험을 CFTR을 발현시킨 세포에서 시행하면 forskolin의 NHE3 억제효과가 훨씬 증강된 것을 관찰하였다(그림 4B). 다양한 농도의 forskolin으로 용량-반응관계를 살펴본 결과 낮은 농도의 forskolin에서 CFTR의 NHE3 억제 증강 효과가 현저하였으며(그림 4C), 이 결과는 실제 생리적 농도의 cAMP 증가에서 CFTR이 커다란 역할을 할 수 있음을 알 수 있다.

다음으로 실제 *in vivo*에서도 동일한 현상이 발견되는지 내강관류 췌장관에서 동일한 실험을 시행하였다(그림 5). 췌장관세포에는 내강막과 측저막 모두에 NHE 기능이 존재하는데, 본 실험에서는 측저막쪽(bath)에는 Na^+-배제 용액을 투여하여 이 곳에서의 NHE 기능을 정지시키고 내강막쪽의 NHE 기능만 측정하였다. 그림 5A는 내강막에 CFTR이 존재하는 wild type 생쥐에서의 결과이고 그림 5B는 CFTR 유전자를 targeted mutation으로 손상시킨 ΔF/ΔF 생쥐에서의 결과이다. PS120 세포주와 마찬가지로 실제 생체에서도 CFTR이 있는 경우(WT/WT) CFTR이 없는 경우에 비하여 cAMP에 의한 NHE3 억제가 더욱 현저하였다.

IV. 고 찰

본 연구에서는 CFTR과 내강막 Na^+/H^+ exchanger (NHE) 상호연결의 생리적 역할을 췌장관세포와 PS120 세포주에서 검색하였다. 면역형광염색, 면역침강, 돌연변이생성을 이용한 분자생물학적 연구에서 EBP50를 통한 CFTR과 NHE3의 물리적 연결을 확인하였고, 기능적 연구에서는 CFTR이 세포주 및 자연조직 모두에서 cAMP에 의한 NHE3의 억제를 더욱 증가시키는 것을 발견하였다.

NHE3 조절인자(NHERF)로 알려진 EBP50 단백이 CFTR과도 결합할 수 있음이 알려진 이후에[13,17] CFTR과 NHE3 사이에 관련이 있을 가능성이 제시되어 왔다. 그러나 CFTR과 NHE3가 동시에 존재하며 생리학적 혹은 병태생리학적으로 중요한 장기가 발견되지 않아서 이 가능성에 대하여 그 동안 별 연구가 진행되지 못하였다. 그 보다는 연결단백들이 각각의 이온수송 단백에 어떤 영향을 주는지에 대하여 많은 연구가 진행되었다. EBP50 및 두 번째의 NHERF로 알려진 E3KARP는 두 개의 PDZ (PSD-95, *Dlg*, ZO-1) domain과 한 개의 MERM (merlin, ezrin, radixin, moesin) domain을 갖고 있다.[18] 첫 번째 PDZ domain은 CFTR과 결합하고 두 번째 PDZ domain은 NHE3와 결합한다. 또한 MERM domain을 통하여 ezrin 등과 결합하는데 이 단백은 다시 세포골격(F-actin) 및 protein kinase A (PKA) II와 결합하게 된다.[19] 따라서 세포골격 및 cAMP에 의한 각 수송단백 조절에 이들 연결단백이 중요하다는 보고가 계속 발표되고 있다. 특히 이들 단백이 PKA II와 NHE3를 연결하여 줌으로써 NHE3가 훨씬 효율적으로 인산화되고 이것이 cAMP가 NHE3의 기능을 억제하는데 중

요한 역할을 할 것으로 인식되고 있다.[16,20]

최근 Lee 등[10]은 CFTR을 표현하는 조직인 췌장 관세포의 내강막에 NHE3를 포함하는 Na^+/H^+ exchange 기전이 있음을 보고하였다. 내강막에 있는 NHE는 H^+ 이온을 내강으로 분비하고 이것은 HCO_3^-와 결합한 이후에 carbonic anhydrase에 의하여 CO_2와 H_2O를 형성한다. CO_2와 H_2O는 세포막을 잘 통과하므로 결국 내강막을 통하여 세포내로 재흡수하게 된다. 이러한 현상은 식후에는 HCO_3^-를 분비하는 조직인 췌장 관세포 내강막에 공복시에는 HCO_3^-를 흡수하는 조절기능이 있음을 뜻한다. 사람이나 동물이 식사를 하면 위장 호몬인 secretin과 신경전달 물질인 vasoactive intestinal polypeptide (VIP)가 분비된다. 이들이 췌장 관세포의 수용체를 흥분시키면 세포내 cAMP를 증가시키며 이에 따라 CFTR과 anion exchange 기능이 활성화되어 다량의 HCO_3^-가 내강으로 분비하게 된다.[3] 이 때 HCO_3^-를 흡수하는 내강막의 NHE는 cAMP에 의하여 억제됨으로써 효율적으로 HCO_3^-가 분비되는 것이다.[10]

본 연구의 결과 CFTR과 EBP50이 복합체를 형성함으로서 효율적으로 cAMP에 의하여 내강막 NHE가 억제됨을 알 수 있었다. 이 작용을 좀더 추론하면 NHE3-EBP50-MERM-PKA 복합체에 CFTR이 결합할 경우 복합체의 구조가 안정화되면서 PKA에 의한 NHE 인산화가 훨씬 효율적으로 이루어질 것이라는 모델을 설정할 수 있다. 그러나 cAMP에 의하여 활성화된 CFTR이 직접적으로 내강막 NHE를 억제할 가능성을 배제할 수 없으며 이에 대하여는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다(그림 6).

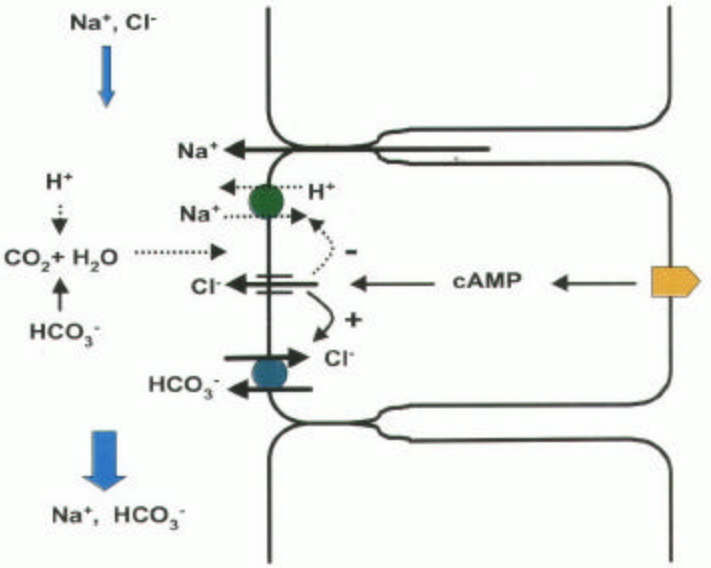

그림 6. 본 연구에 근거한 췌장 관세포 내강막에서의 HCO_3^- 분비기전 모델(자세한 내용은 본문참조).

CFTR 유전자의 변이는 낭포성 섬유증,[21] 만성 췌장염[22] 및 기관지 확장증[23] 등의 중요한 질환을 유발한다. 이들 질환의 공통점은 장기의 도관 구조가 막히면서 반복적 염증과 조직의 섬유화가 유발되어 결국 장기의 기능이 상실되고 많은 경우 목숨을 잃게 된다. 낭포성 섬유증 환자의 췌액의 가장 큰 특징은 췌액량과 췌액 속의 HCO_3^- 농도가 매우 감소하는 것이다.[24] 이에 따라 낭포성 섬유증에 의한 췌장염의 경우 내강액의 산성화와 소화효소 농도의 증가가 주된 병인이라는 주장이 제기된 바 있다.[25] 또한 최근 CFTR 유전자가 손상될 경우 1) 분비액 감소에 따른 mucin 농도의 상승과, 2) HCO_3^- 농도 감소에 의한 도관의 산성화가 mucin 응집을 촉진시킬 것이라는 주장이 제기되었다.[6] 이 기전은 췌장염뿐만 아니라 mucin을 분비하는 모든 상피세포에서 CFTR 변이에 의한 병변을 폭 넓게 설명하는데 적용될 수 있다. 실제로 담낭의 경우 내강의 산성화와 mucin 농도 증가가 담낭 점액의 점도를 매우 증가시킨다는 것이 입증된 바 있다.[26] 이런 관점에서 볼 때 낭포성 섬유증, 만성 췌장염 및 기관지 확장증 등의 질환에서 내강내 HCO_3^- 농도를 감소시키는 작용을 하는 내강막 NHE 기능을 선택적으로 억제하는 것이 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구결과 연결단백 EBP50를 통한 CFTR과 내강막 NHE의 상호작용이 췌장 관세포의 주 기능인 HCO_3^- 분비를 조절하고 있음을 알 수 있었다. 즉, 췌장조직과 PS120 세포주에서 CFTR-EBP50-NHE3는 단백복합체로 존재하고 있었으며, CFTR은 cAMP에 의한 내강막 NHE 억제 작용을 더욱 증가시킴을 알 수 있었다. 이러한 작용은 결과적으로 췌장 관세포에서 췌액으로의 HCO_3^- 분비를 증가시키는 방향으로 작용하게 되며, CFTR 손상에 의한 HCO_3^- 분비감소가 여러 폐·췌장 질환을 유발하는 것으로 보아 이 기전은 상피세포 전해질 분비조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 PS120 세포주와 생쥐 췌장 관세포에서 CFTR과 NHE가 결합하는지를 분자 생물학적인 방법으로 살펴보았으며 이들의 상호작용이 췌장 관세포의 주 기능인 HCO_3^- 분비에 어떤 역할을 하는지 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 췌장 조직은 다량의 NHERF/EBP50를 발현하고 있었으며, NHE 연구에 자주 이용되는 세포인 PS120 세포주도 이전의 보고와는 다르게 EBP50를 갖고 있었다.

2. CFTR-EBP50-NHE3는 PS120 세포주와 생쥐 췌장조직에서 단백복합체로 존재하고 있었으며, 특히 췌장 관세포에서는 내강막에 집중적으로 존재하였다.

3. PS120 세포주에서 CFTR은 cAMP의 NHE3 억제 작용을 더욱 증가시켰다.

4. 췌장 관세포에서 CFTR이 존재하는 경우 없을 경우에 비하여 cAMP가 내강막 NHE의 기능을 더욱 억제하였다.

결론적으로 본 연구결과를 볼 때 연결단백 EBP50를 통한 CFTR과 내강막 NHE의 상호

작용이 췌장 관세포의 주 기능인 HCO_3^- 분비를 조절하고 있음을 알 수 있었고, CFTR 손상에 의한 HCO_3^- 분비감소가 여러 폐·췌장 질환과 관련 있음을 고려할 때 이 기전은 상피세포 전해질 분비조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N Engl J Med 1998;339:645-52.
2. Reuss L. Epithelial transport. In Handbook of Physiology, Section 14: Cell Physiology, Chap 8. Hoffman JF, Jameison JD eds. New York: Oxford University Press; 1997. p.389-440.
3. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S. Regulation of Cl^-/HCO_3^- exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. J Biol Chem 1999;274:3414-21.
4. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. Science 1991;251:679-82.
5. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995;269:847-50.
6. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl^-/HCO_3^- exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. J Biol Chem 1999;274:14670-7.
7. Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl^- channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. EMBO J 1994;13:1065-72.
8. Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 1998; 393:79-82.
9. Lee MG, Schultheis PJ, Yan M, Shull G, Bookstein C, Chang E, Donowitz M, Park K, Muallem S. Membrane limited expression and regulation of Na^+-H^+ exchanger isoforms by P2 receptors in the rat submandibular duct. J Physiol (London) 1998;513:341-57.
10. Lee MG, Ahn W, Choi JY, Luo X, Seo JT, Schultheis PJ, Shull GE, Kim KH, Muallem S. Na^+-dependent transporters mediate HCO_3^- salvage across the luminal membrane of the main pancreatic duct. J Clin Invest 2000;105:1651-8.
11. Fanning AS, Anderson JM. Protein modules as organizers of membrane structure. Curr Opin Cell Biol 1999;11:432-9.
12. Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, Shenolikar S. Structure-function of recombinant Na/H exchanger reguatory factor (NHE-RF). J Clin Invest 1998;101:2199-206.
13. Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram

S. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. J Biol Chem 1998;273:19797-801.
14. Zeiher BG, Eichwald E, Zabner J, Smith JJ, Puga AP, McCray PB Jr, Capecchi MR, Welsh MJ, Thomas KR. A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis. J Clin Invest 1995;96:2051-64.
15. Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. A specific mutation abolishing Na^+/H^+ antiporter activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:4833-7.
16. Yun CHC, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na^+/H^+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3010-5.
17. Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). FEBS Lett 1998;427:103-8.
18. Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, Pinney D, Candia C, Solomon F, Gusella J, Ramesh V. NHE-RF, a regulatory cofactor for Na^+-H^+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. J Biol Chem 1998;273:1273-6.
19. Bretscher A. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. Curr Opin Cell Biol 1999;11:109-16.
20. Lamprecht G, Weinman EJ, Yun CH. The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. J Biol Chem 1998;273:29972-8.
21. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245:1066-73.
22. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N Engl J Med 1998;339:653-8.
23. Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. Hum Mol Genet 1995; 4:635-9.
24. Johansen PG, Anderson CM, Hadorn B. Cystic fibrosis of the pancreas. A generalised disturbance of water and electrolyte movement in exocrine tissues. Lancet 1968;1:455-60.
25. Scheele GA, Fukuoka SI, Kern HF, Freedman SD. Pancreatic dysfunction in cystic fibrosis occurs as a result of impairments in luminal pH, apical trafficking of zymogen granule membranes, and solubilization of secretory enzymes. Pancreas 1996;12(1):1-9.
26. Smith BF, Peetermans JA, Tanaka T, LaMont JT. Subunit interactions and physical properties of bovine gallbladder mucin. Gastroenterology 1989;97:179-87.

Abstract

Regulation of pancreatic electrolyte secretion by interactions between CFTR and luminal Na^+/H^+ exchanger

Je Woo Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung Hwan Kim)

Bicarbonate (HCO_3^-) has an important role in the regulation of pH and viscosity of the secreted fluid which performs critical function in digestive systems. In the present work, it was aimed to examine the significance of the association between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and luminal Na^+/H^+ exchange (NHE) mechanisms in relation to HCO_3^- secretion in a heterologous expression system (PS120 cell) and the mouse pancreactic duct cells.

The PS120 cell lines as well as mouse pancreata showed a native expression of the cellular scaffold, ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50, other name NHERF). CFTR-EBP50-NHE3 complexes were detected in PS120 cells and pancreata by both immunoprecipitation and double-immunostainings. Notably, the co-expression of CFTR augments the cAMP-induced inhibition of NHE activities in PS120/NHE3 cells and the luminal membrane of pancreatic ducts. Considering the facts that the luminal NHE works as a HCO_3^--absorbing transporter and HCO_3^- governs the viscosity of the luminal fluid, above results have enormous implications in CFTR-related diseases.

Key Words: pancreas, bicarbonate, Na^+/H^+ exchanger, CFTR, EBP50