

췌장염 병인론에서 선세포  
cytokine 발현에 대한  
활성산소와 NF- $\kappa$ B의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

유 지 훈

췌장염 병인론에서 선세포  
cytokine 발현에 대한  
활성산소와 NF- $\kappa$ B의 역할

지도교수 김 혜 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

유 지 훈

# 유지훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

## 감사의 글

공부의 길로 들어선지 얼마 되지 않았지만, 그 동안 많은 선생님들의 가르침 속에서 바른 연구자의 자세와 지금 해야하고 앞으로 나가야할 방향 등을 깊이 생각하게 되었고, 그 결과로 논문의 결실이 맺어진 것에 대해 그 동안 도움을 주신 많은분들과 기쁨을 나누고 싶습니다.

먼저 부족한 저에게 많은 학문적 지식과 경험을 얻도록 인격적 지도로 이끌어 주신 김혜영 선생님께 감사 드립니다. 세심한 관심과 도움을 아끼지 않으셨던 김경환 선생님, 지도와 도움을 주신 송시영 선생님께 감사 드립니다. 끊임없는 관심과 충고로 이끌어 주신 안영수 선생님, 김동구 선생님, 유경자 선생님, 이민구 선생님, 장정원 선생님, 서정택 선생님께도 감사를 드립니다.

서로 힘들고 어려울 때 도와주고 힘이 되어준 우리 실험실 동기 및 실원에게도 감사하고, 특히 임주원 선생님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

마지막으로 오늘이 있기까지 끊임없는 사랑과 지지를 보내주신 아버지, 어머니께 머리 숙여 감사 드리고, 항상 옆에서 힘이 되어준 희영이와 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

2002년 6월

# 목 차

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 실험동물 및 체장 선세포 분리 .....	4
2. 지질과산화물 및 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 측정 .....	5
3. 세포 핵추출액 분리 .....	5
4. 단백질분획 이동 분석법 .....	6
5. 역전사 중합효소 연쇄 반응법 .....	7
6. Western blotting법 .....	8
7. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법 ..	8
8. 통계처리 .....	9
III. 결 과 .....	10
1. Cerulein에 의한 지질과산화물과 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 의 생성 .....	10
2. Cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화와 I $\kappa$ B- $\alpha$ 분해 ..	11
3. Cerulein에 의한 cytokine mRNA 발현 .....	12
4. Cerulein에 의한 cytokine 단백질 생성 .....	13
5. Cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 항산화제와 PDTC의 효과 .....	13
6. Cerulein에 의한 cytokine mRNA 및 단백질 발현에 대한 항산화제와 PDTC의 효과 .....	15

IV. 고찰	17
V. 결론	19
참고문헌	20
영문초록	23

## 그림 차례

- 그림 1.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 시간에 따른 지질과산화물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 ..... 10
- 그림 2.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 시간에 따른 NF- $\kappa$ B 활성화 및 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 ..... 11
- 그림 3.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 시간 및 농도 별 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현 ..... 12
- 그림 4.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 시간에 따른 IL-6 단백 생성 ..... 13
- 그림 5.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 항산화제와 PDTC의 효과 ..... 14
- 그림 6.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현에 대한 항산화제와 PDTC의 효과 ..... 15
- 그림 7.** 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 IL-6 단백 생성에 대한 항산화제와 PDTC의 효과 ..... 16

## 췌장염 병인론에서 선세포 cytokine 발현에 대한 활성산소와 NF- $\kappa$ B의 역할

활성산소는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며, cerulein으로 유도된 급성 췌장염의 초기 단계에서 NF- $\kappa$ B 활성화가 된다고 알려져 있다. 나아가 NF- $\kappa$ B가 활성화되면 췌장염의 병인에 관여하는 염증성 cytokine 유전자 발현이 조절된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 쥐에서 분리한 췌장 선세포를 이용하여 cerulein에 의해 활성산소 및 지질과산화물 생성이 증가하고, NF- $\kappa$ B 활성화 및 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6) 발현이 유도되는지를 살펴보고, 또한 그 상관관계를 규명하고자 하였다. 연구결과 췌장 선세포에서 cerulein은 활성산소 및 지질과산화물 생성을 증가시켰으며, NF- $\kappa$ B가 활성화되었다. 또한 cerulein처치에 의하여 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA와 단백질 발현이 증가하였다. IL-1 $\beta$  및 IL-6의 발현 증가는 항산화제인 GSH, SOD, catalase 그리고 NF- $\kappa$ B 활성화의 억제제인 PDTC의 전처치에 의하여 농도 의존적으로 억제되었다. 결론적으로 췌장 선세포에서 cerulein에 의하여 증가하는 활성산소 및 NF- $\kappa$ B 활성화에 의하여 친염증성 cytokine의 발현 증가가 조절됨을 알 수 있었다.

---

핵심되는 말: 급성 췌장염, Cerulein, 활성산소, Cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6), Nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B)



# 췌장염 병인론에서 선세포 cytokine 발현에 대한 활성산소와 NF- $\kappa$ B의 역할

<지도교수 김 혜 영>

연세대학교 대학원 의과학사업단

유 지 훈

## I. 서 론

활성산소는 다양한 염증 반응을 야기시키는 인자로서,<sup>1</sup> 직접적으로 세포막을 공격하고 호중구를 침윤시키며,<sup>2</sup> 급성 췌장염의 병인으로서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>3</sup> 급성 췌장염의 초기에 산화적 스트레스가 발생하고,<sup>4</sup> 실험적 모델에서 항산화제의 효과가 보고된 바 있다.<sup>5</sup> 또한 급성췌장염환자의 담즙이나 췌장조직에서 지질과산화물 생성이 증가하고,<sup>6</sup> 혈액내 항산화 비타민의 감소가 보고되었다.

NF- $\kappa$ B는 세포의 성장과 분화, 염증반응 및 면역반응에 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 전사조절인자이며, 최근에는 세포의 성장을 조절하는 물질로서 알려져 있다. NF- $\kappa$ B는 비 자극상태에서는 억제성 소단위인 I $\kappa$ B와 결합체를 이루어 세포질 내 존재하며, 세포가 자극을 받았을 경우 비활성 결합체로부터 NF- $\kappa$ B가 분리되어 핵안으로 이동된 후 DNA motif에 결합되어 활성을 나타낸다. IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 등의 cytokine과 활

성산소는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 대표적인 외부자극이며 NF- $\kappa$ B에 의하여 유도되는 인자로는 cytokine, 성장인자 및 유착분자 등이 있다.<sup>8</sup> N-acetylcysteine(NAC),<sup>9</sup> pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)<sup>10</sup>, catalase, glutathione (GSH), superoxide dismutase(SOD)등의 다양한 항산화제는 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하며, 췌장 선세포에서 NAC에 의하여 NF- $\kappa$ B 활성화가 억제됨이 보고되었다.<sup>11</sup> 최근 cholecystokinin(CCK) 유사물질인 cerulein을 처치한 췌장염 모델에서 NF- $\kappa$ B 활성화가 보고되었다.<sup>12</sup> Cerulein 췌장염모델은 여러 췌장염 동물모델 중에서 임상적 급성 부종성 췌장염의 증상과 생화학적, 형태학적, 병리학적으로 유사하여 가장 많이 사용되고 있는 췌장염 모델이다.<sup>13</sup> 고농도 CCK나 cerulein은 많은 양의 췌장 amylase 및 lipase<sup>14</sup>를 분비시키며, 이로 인하여 소화효소의 생성과 분비장애를 일으키고,<sup>15</sup> 췌장의 부종, 선세포의 공포화(vacuolization)와 출혈 및 조직괴사 등을 나타낸다.<sup>16</sup> 그러나 췌장 선세포에서의 cerulein에 의한 췌장 염증기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

본 연구는 cerulein에 의하여 생성된 cytokine 발현이 활성산소에 의하여 매개되는지 알아보고, NF- $\kappa$ B 활성화와 cytokine 발현과의 관계를 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 췌장 선세포 분리

실험동물로는 무게 200g 안팎의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 실험동물은 본 대학교 임상의학연구센터 동물실로부터 분양받았다. 흰쥐를 절두한 후 췌장을 적출하고, 췌장 선세포는 다음방법으로 분리하였다.<sup>17</sup> 즉 적출췌장에 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM glucose, 10mM pyruvate, 0.1% bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)과 0.2% soybean trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)를 함유한 분리용액을 주사한 후 잘게 분쇄하였다. 분쇄한 조직에 collagenase (75 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)가 함유된 분리용액 5 ml를 넣어 분산시킨 후 37°C에서 5 분간 산소포화(oxygenated) 상태에서 배양시킨 다음 상온에서 30 분간 방치한 뒤 상층액을 분리하고, 새로운 효소 10 ml를 넣어 10-15 분간 더 소화시켰다. 소화된 용액을 500 µm과 100 µm Nytex filter로 각각 여과한 뒤 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 췌장 선세포를 분리한 뒤 1% bovine serum albumin을 함유한 분리용액을 재분산시켜 원심분리하여 정제분리된 세포를 실험에 사용하였다. 분리한 췌장 선세포를 trypan blue dye exclusion방법으로 세포 생존율이 90% 이상인 경우 실험에 사용하였다. 췌장 선세포는 1×10<sup>6</sup>cell/ml 되도록 배지에 부유시켜 Matrygel film으로 coating한 Falcon Primaria plastic dishes(Falcon, NJ, U.S.A)에서 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배지를 갈아주어 배양시켰으며, 세포의 조직학적 변화를 현미경으로 관찰하였다. 배양액은 penicillin / streptomycin (100 U/ml ; 100 µg/ml), 15% fetal bovine serum, 0.1mg/ml soybean

trypsin inhibitor를 함유한 Ham's nutrient mixture F12 medium(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 사용하였다.

## 2. 지질과산화물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정

퀘장 선세포에 cerulein(10<sup>-8</sup>M; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)을 처치한 뒤 배양시간에 따른 선세포 손상을 관찰하기 위하여 배양액 내로 유리되는 지질과산화물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량을 측정하였다. 지질과산화물 측정을 위하여 분리한 배양액 100 $\mu$ l를 취하여 microcentrifuge tube에 넣고 4% sodium dodecyl sulfate 용액 100 $\mu$ l, 0.8% 4,6-dihydroxy-2-mercapto-pyrimidine (2-thiobarbituric acid) 용액 400 $\mu$ l과 20% acetic acid 용액 400 $\mu$ l를 넣고 95 $^{\circ}$ C 수조에서 60 분간 반응시킨 다음, tube를 찬 수돗물에 담귀 반응을 정지시켰다. 원심분리하여 상층액을 취하여 spectrofluorometer를 이용하여 여기파장 515 nm, 방출파장 553 nm에서 형광을 측정하여,<sup>18</sup> 지질과산화물의 양을 측정하였다. 배양액내 유리된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량은 Thurman (1982)<sup>19</sup>의 방법을 변형하여 발색법으로 측정하였다.

## 3. 세포 핵추출액 분리

Cerulein를 처치한 세포를 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 dish에서 떨어 뜨린 뒤 원심분리하여 세포를 모은 다음 차가운 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주고 1 packed cell volume (PCV)의 저장성 완충액 A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 1 $\mu$ g/ml aprotinin)에서 부유시켜 얼음 위에서 10분간 방치하고 27-gauge 바늘에 5번 통과시켜 세포막을 파괴시켰

다. 그리고 원심분리하여 세포핵을 침전시킨 후 얻은 핵 침전물을 완충액 A로 두 번 씻어주었다. 핵 침전물에 2/3 PCV의 차가운 완충액 B (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25% glycerol, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml aprotinin)를 넣어 얼음 위에 30분간 방치하고 자주 진탕해 주어 핵 단백질이 추출되도록 하였다. 차가운 2/3 PCV의 완충액 C (10 mM HEPES, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin)를 tube에 첨가한 후 4°C에서 15,000 x g에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이와 같이 얻은 핵 추출물을 새로운 tube에 분주하고, -70°C에서 보관하였다. 시료의 단백질 농도는 Bradford 법으로 정량하였다.<sup>20</sup>

#### **4. 단백질 이동 분석법(electrophoretic mobility shift assay)**

핵 전사조절 단백질인 NF-κB의 활성화 정도는 단백질 이동 분석법을 통해 확인하였다. [<sup>32</sup>P]-ATP로 표지한 NF-κB consensus oligonucleotide (5-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3) 0.0175 pmoles (>10<sup>4</sup> CPM)와 1 µg의 poly dI·dC를 포함한 20 µl의 binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol)를 5 µg의 핵 단백질과 섞어주었다. 상온에서 30분간 반응시킨 다음 반응물을 6% non-denaturing 겔에 부하하였다. 부하 전 200 V에서 1시간 먼저 전기영동한 후, 부하 후 180 V에서 2시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 겔을 건조시킨 후 자가 방사법으로 NF-κB 활성화를 관찰하였다.

## 5. 역전사 중합효소 연쇄반응법 (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR)

췌장 선세포의 cytokine mRNA 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 측정하였으며, 내부 대조물질로서  $\beta$ -actin을 같이 증폭하여 실험하였다. 췌장선세포의 총 RNA는 guanidine thiocyanate 추출법에 의하여 추출하였다.<sup>21</sup> Random hexamer primer 50 pg(Promega, Madison, WI, U.S.A), deoxynucleotide triphosphate 혼합물 500  $\mu$ M, RNase inhibitor 25 U, Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase 200 U (Promega, Madison, WI, U.S.A)를 함유한 반응용액에 2  $\mu$ g의 total RNA를 넣고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. RNA 160 ng과 동량의 cDNA에 각 흰쥐 IL-1 $\beta$  또는 IL-6에 특이한 primer 및  $\beta$ -actin에 대한 primer 그리고 Tag polymerase(Promega, Madison, WI, U.S.A)를 함유한 반응 용액을 넣고 PCR를 시행하였다. PCR은 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초로 30-35 cycle로 IL-1 $\beta$  또는 IL-6에 대한 mRNA를 증폭시켰다.

IL-1 $\beta$ 의 primer sequences는 5-TCCTAGGAAACAGCAATGGTCG-3 (forward primer), 5-TTCATCCCATACACACGGACAAC-3 (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 363 염기쌍이었다. IL-6의 primer sequences는 5-CTGGTCTTCTGGAGTTCCGTTTC-3 (forward primer), 5-CATAGCACACTAGGTTTGCCGAG-3 (reverse primer)이었으며, PCR 생성물의 크기는 301 염기쌍이었다.  $\beta$ -Actin의 primer sequences는 5-ACCAACTGGGACGACATGGAG-3 (forward primer), 5-GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC-3 (reverse primer)이었으며, PCR 생성물의 크기는 349 염기쌍이었다. PCR를 한 후 PCR 생성물을 0.5 $\mu$ g/ml ethidium bromide를 함유한 1.5% agarose 겔에 부하시킨 뒤

전기영동하여 UV 투과법으로 IL-1 $\beta$  또는 IL-6 mRNA에 대한 발현양을 측정하였다.

## **6. Western blotting법**

Cerulein를 처치한 세포를 차가운 PBS로 두 번 씻은 다음 50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.2 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin이 함유한 단백질 추출 완충액을 넣고 얼음 위에서 10분간 방치하였다. 그리고 15,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 단백을 정량을 하였다. 50  $\mu$ g의 단백질을 10% polyacryl-amide 젤에 부하시킨 뒤 전기영동하여 단백을 분리하고, nitrocellulose membrane에 옮겼다. Membrane를 3% 탈지분유를 함유한 TBS-T 용액 (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.15% Tween 20)에 상온에서 2 시간 담근 뒤 I $\kappa$ B- $\alpha$  (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)를 3% 탈지분유를 함유한 TBS-T 용액으로 1:1000으로 희석한 용액 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 담근 후 horse radish peroxidase anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)에 반응시킨 후 enhanced chemiluminiscence (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 양을 측정하였다.

## **7. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법**

배양액내 IL-6의 양은 ELISA 법으로 측정하였다. 즉, 채장 선세포에 cerulein ( $10^{-8}$ M)을 처치하고 배양액을 분리한 후 배양액의 IL-6의 양은 쥐의 IL-6에 대한 ELISA kit (Biosource International 사, Camarillo, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 8. 통계처리

모든 자료값은 "평균±표준오차(mean±S.E.)"로서 표현하고, 각 실험군 간의 변동 양상을 비교 검토하기 위해서 analysis of variance를 응용하고, F 값이 의의가 있을 때에는 Fisher's least significant difference법으로 각 군의 값을 비교하였다. 또한 Student's *t*-test가 알맞을 때에는 그 방법을 이용하고, 어느 경우든지 p 값이 0.05이하일 때에는 의의 있는 변동으로 규정하였다.



### III. 결 과

#### 1. Cerulein에 의한 지질과산화물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성

췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 후 배양액을 분리하여 배양액에 유리된 지질과산화물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하였다. Cerulein을 처리한 세포의 배양액내 지질과산화물의 양(nmol/ml)은 배양 2, 4, 6, 8, 16시간에 각각  $0.17\pm 0.02$ ,  $0.48\pm 0.05$ ,  $0.61\pm 0.04$ ,  $0.67\pm 0.03$ ,  $2.07\pm 0.04$ ,  $2.86\pm 0.05$ 이었다. 대조군의 지질과산화물은 배양 2, 4, 6, 8, 16시간에 각각  $0.17\pm 0.01$ ,  $0.20\pm 0.01$ ,  $0.28\pm 0.02$ ,  $0.28\pm 0.02$ ,  $0.32\pm 0.01$ ,  $0.33\pm 0.02$ 이었다(그림 1A). Cerulein을 처리한 배지내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량(nmol/ml)은 배양 2, 4, 6, 8, 16 시간에 각각  $1.23\pm 0.75$ ,  $9.47\pm 1.02$ ,  $10.09\pm 1.26$ ,  $10.84\pm 0.77$ ,  $15.81\pm 6.66$ ,  $17.88\pm 6.33$ 이었다(그림 1B). 그러므로 췌장 선세포에는 cerulein의 처리에 의하여 지질과산화물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성은 시간 의존적으로 증가함을 알 수 있었다.

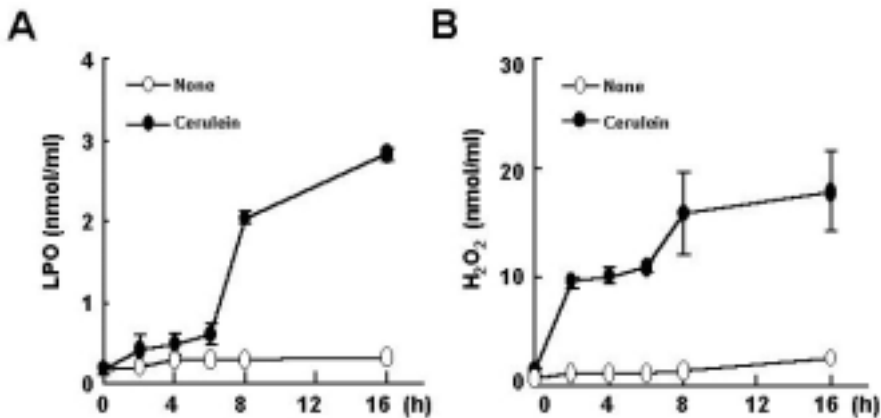


그림 1. 췌장 선세포에서 cerulein 처리 후 배양에 따른 지질과산화물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성. 췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M) 처리 후 배양시간에 따라 배지내 지질과산화물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 측정하였다. 각각의 양은 평균±표준오차로 표시하였다. None=cerulein을 처리하지 않은 군, Cerulein=cerulein을 처리한 군.

## 2. Cerulein에 의한 NF-κB 활성화와 IκB-α 분해

췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리하고 세포에서 핵단백을 분리한 후 단백질 이동 분석법을 이용하여 NF-κB 활성화를 측정하였다. 실험 결과 cerulein에 의하여 배양 30 분에 활성화가 가장 크게 나타남을 확인하였다(그림 2B). Cerulein를 처리한 세포에서 단백을 추출하여 Western blotting법을 이용하여 세포 단백 내의 IκB-α의 양을 측정한 결과 30 분에서 IκB-α 분해가 나타남을 확인하였다(그림 2A). 이런 결과는 NF-κB의 활성이 30 분에서 가장 크게 나타난 것과 일치하였다. Cerulein 처리에 의하여 세포질 내에서 NF-κB와 결합하고 있는 IκB-α가 분리되고, NF-κB가 핵으로 이동되어 NF-κB의 활성이 유도됨을 재확인 할 수 있었다.

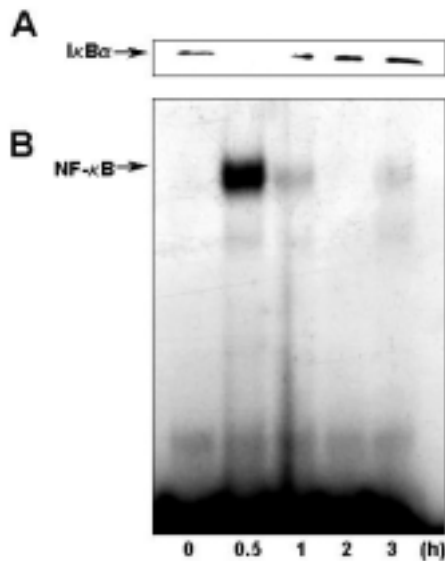


그림 2. 췌장 선세포에서 cerulein 처리 후 시간에 따른 NF-κB 활성화와 IκB-α 분해. 췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 3 시간까지 처리한 후 NF-κB 활성을 핵단백에서 단백질 이동 분석법을 이용해서 측정하였고, IκB-α 단백을 세포 균질액에서 Western blotting법을 이용하여 측정

하였다.

### 3. Cerulein에 의한 cytokine mRNA 발현

췌장 선세포에서 cerulein을 처치한 후 세포에서 총 mRNA를 분리하여 역전사 증합효소 연쇄 반응법을 이용하여, IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현양을 측정하였다. 실험 결과 cerulein 처치에 의하여 IL-1 $\beta$ 는 2 시간 이후부터 증가하였으며, IL-6 mRNA는 1 시간 이후부터 발현양이 증가하였다(그림 3A). IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현은 cerulein  $10^{-11}$ M부터 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다(그림 3B).

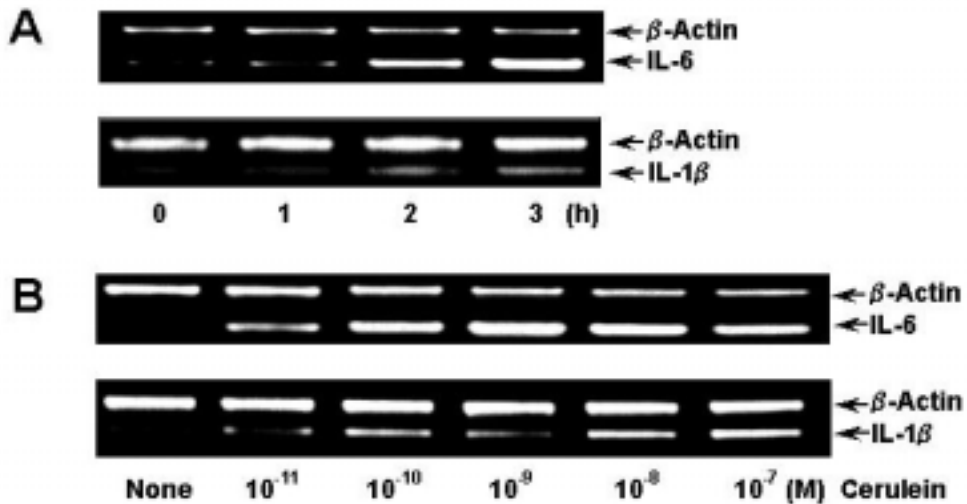


그림 3. 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 시간 및 농도별 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현. 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처치한 후 역전사 증합효소 연쇄 반응법을 이용해 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현을 측정하였다(A). 췌장 선세포에서 여러 농도의 cerulein( $10^{-11}$ M- $10^{-7}$ M)을 3 시간동안 처치한 후 역전사 증합효소 연쇄 반응법을 이용하여 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현을 측정하였다(B). None=cerulein을 처치하지 않은 군.

#### 4. Cerulein에 의한 cytokine 단백질 생성

췌장 선세포에서 cerulein( $10^{-8}$ M)을 처리한 후 세포 배양액을 분리하여 ELISA법을 이용하여 IL-6 단백질의 양을 측정하였다. 실험 결과 cerulein을 처리한 배지내 IL-6 단백질양(pg/ml)은 배양 2, 4, 6, 8, 16시간에서 각각  $4.4\pm 0.3$ ,  $57.9\pm 0.9$ ,  $62.9\pm 1.5$ ,  $98.7\pm 2.0$ ,  $132.2\pm 1.6$ ,  $262.7\pm 7.3$ 으로 측정되어, 시간 의존적으로 IL-6 단백질이 증가함을 알 수 있었다(그림 4).

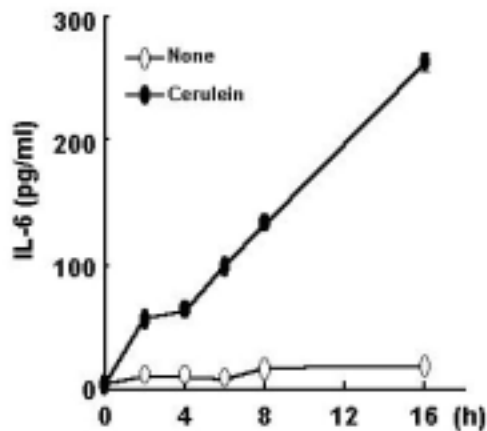


그림 4. 췌장 선세포에서 cerulein 처리 후 시간에 따른 IL-6 단백질 생성. 췌장 선세포에 cerulein을 처리한 후 시간에 따라서 세포의 배양액을 분리하여 IL-6 단백질 생성을 측정하였다. 각각의 양은 평균±표준오차로 표시하였다. None=cerulein을 처리하지 않은 군, Cerulein=cerulein  $10^{-8}$ M을 처리한 군.

#### 5. NF- $\kappa$ B 활성 증가에 대한 항산화제 및 PDTC의 효과

췌장 선세포에서 항산화제인 GSH, SOD와 catalase를 전처리하고 세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 30 분 처리한 후 핵단백을 분리하여 NF- $\kappa$ B 활성도를 측정한 결과 GSH의 전처리에 의하여 cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B 활성 증가가 농도 의존적으로 억제되었으며, SOD 및 catalase (1000U/ml)

에 의해서도 억제되었다(그림 5). 이러한 결과로서 cerulein에 의한 증가하는 활성산소에 의하여 NF- $\kappa$ B의 활성이 증가함을 알 수 있었다. 또한 NF- $\kappa$ B 억제제인 PDTC의 전처치에 의해서도 cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B 활성 증가가 농도 의존적으로 억제되었다.

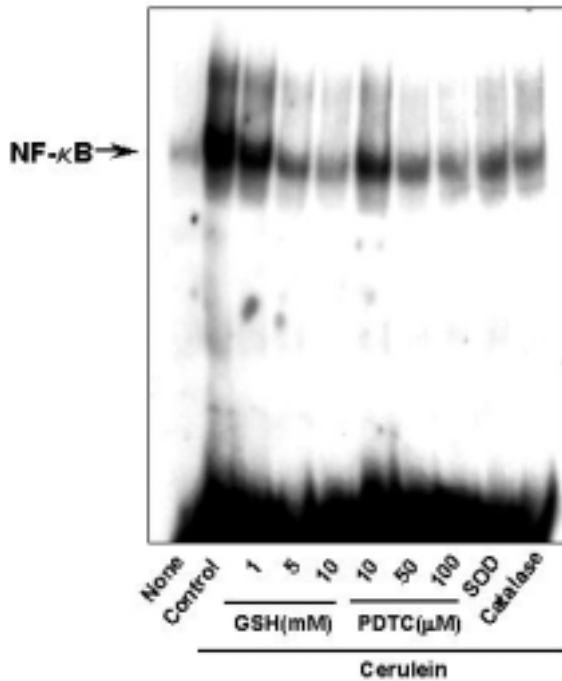


그림 5. 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 항산화제와 PDTC의 효과. GSH(1, 5, 10mM), PDTC(10, 50, 100 $\mu$ M), SOD (1000U/ml) 또는 catalase(1000U/ml)를 전 처치한 후 췌장 선세포에 cerulein ( $10^{-8}$ M)을 30 분 처리하여, NF- $\kappa$ B 활성의 억제를 핵단백에서 단백질획 이동 분석법을 이용해서 측정하였다. None=cerulein을 처치하지 않은 군, Control=cerulein  $10^{-8}$ M만을 처치한 군, PDTC=pyrrolidine dithio-carbamate, SOD=superoxide dismutase, GSH=glutathion.

## 6. Cytokine mRNA 및 단백질 발현에 대한 항산화제와 PDTC의 효과

췌장 선세포에 항산화제인 GSH, SOD, catalase 또는 NF- $\kappa$ B 활성 억제제인 PDTC를 전처리한 후 cerulein를 처리하여 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현 및 단백질 변화를 측정함으로써, cerulein에 의한 cytokine 발현 증가에 대한 활성산소 및 NF- $\kappa$ B의 역할을 관찰하였다. 실험 결과 항산화제 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제제의 전처리에 의하여 cerulein에 의한 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA의 발현증가가 농도 의존적으로 억제되었다(그림 6). Cerulein에 의한 IL-6 단백질증가 역시 항산화제 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제제 전처리에 의하여 농도 의존적으로 억제되었다(그림7)( $p < 0.05$ ). 이와 같은 결과로 cerulein에 의한 활성 산소 및 NF- $\kappa$ B 활성 증가가 IL-1 $\beta$  및 IL-6 발현에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

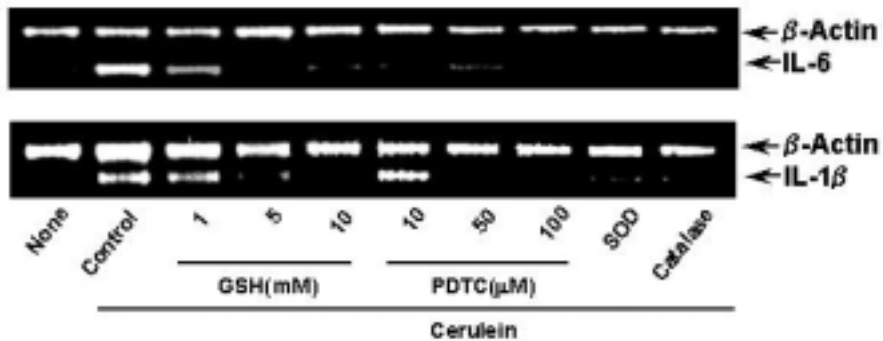


그림 6. 췌장 선세포에서 cerulein 처리 후 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현에 대한 항산화제와 PDTC의 효과. GSH(1, 5, 10mM), PDTC(10, 50, 100 $\mu$ M), SOD(1000U/ml) 또는 catalase (1000U/ml)를 전처리한 후 췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 30 분간 처리하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 세포내 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현을 측정하였다. None=cerulein을 처리하지 않은 군, Control=cerulein  $10^{-8}$ M만을 처리한 군, SOD=superoxide dismutase, PDTC=pyrrolidine dithiocarbamate, GSH=glutathion.

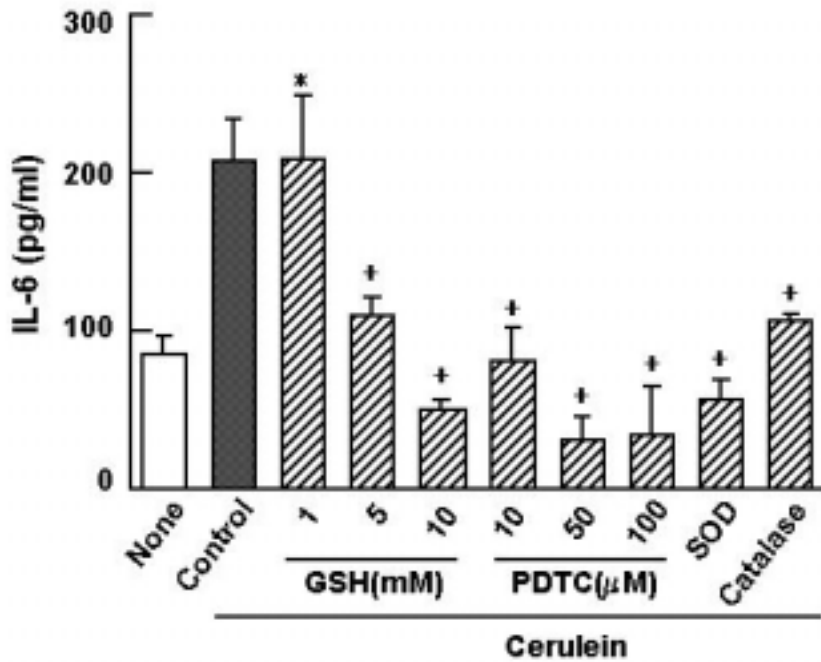


그림 7. 췌장 선세포에서 cerulein 처치 후 IL-6 단백 생성에 대한 항산화제와 PDTC의 효과. GSH(1, 5, 10mM), PDTC(10, 50, 100μM), SOD (1000U/ml), catalase (1000U/ml)를 전처치한 후 췌장 선세포에 cerulein( $10^{-8}$ M)을 16 시간 처치한 다음 ELISA법을 이용해 배양액내 IL-6 단백질 함량을 측정하였다. None=cerulein을 처치하지 않은 군, Control=cerulein  $10^{-8}$ M만을 처치한 군, SOD=superoxide dismutase PDTC=pyrrolidine dithiocarbamate, GSH=glutathion.

## IV. 고 찰

본 연구에서는 흰쥐에서 분리한 췌장 선세포에 cerulein을 처치함으로써 활성산소의 생성이 증가하였으며, 아울러 지질과산화물 생성과 NF- $\kappa$ B의 활성화가 나타났으며, 염증성 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 증가를 확인하였다. Cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성 증가는 항산화제(GSH, SOD, catalase)의 전처치에 의하여 억제되었다. 그러므로 cerulein에 의하여 증가하는 활성산소가 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도함을 알 수 있었다. 또한 cerulein에 의한 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6) 단백질 생성의 증가는 항산화제 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제제 처치에 의하여 억제되어, cerulein에 의하여 생성되는 활성산소 및 NF- $\kappa$ B의 활성증가가 염증성 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6)의 유전자 발현을 조절함을 알 수 있었다. 이들 결과들로 cerulein에 의하여 유도되는 급성췌장염에서 염증반응의 중요한 요인인 염증성 cytokine 및 NF- $\kappa$ B의 활성을 매개하는 물질이 활성산소임을 알 수 있었다.

활성산소는 췌장염을 일으키고, 진행시키는데 중요한 인자로서 보고되고 있다.<sup>22</sup> 활성산소중 과산화수소는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 인자로 제시된다. Cerulein에 의하여 생성된 활성산소는 빠른 시간에 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며, 지질과산화물 생성을 증가시킨다. NF- $\kappa$ B는 cerulein 처치 30 분 후에 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해로 활성화되고, 이러한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동을 조절한다고 보고된 바 있다.<sup>23</sup> 활성산소는 직접적으로 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고,<sup>24</sup> 이에 따라 염증성 cytokine 발현이 유도된다. 본 연구에서는 췌장 선세포에서 cerulein에 의해서 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6)의 mRNA 발현과 IL-6 단백질의 생성이 증가함을 관찰하였다. 이는 최근 *in vivo* 실험에서 급성췌장염의 초기에 IL-1 $\beta$  및 IL-6 단백질 생성이 빠르게 증가된다<sup>25</sup>는 보고와 일치하는 결과이다.

NF- $\kappa$ B는 면역이나 염증관련 자극에 의하여 다양한 유전자의 활성



을 조절하는 전사조절인자로서 Rel family에 속하며, p50, p52, Rel (c-Rel), Rel A(p65) 및 Rel B 등이 알려져 있다. 활성화된 NF- $\kappa$ B의 전형적인 형태는 p65와 p50의 heterodimer로서 알려져 있고, 췌장 선세포를 활성화된 neutrophil에 의하여 자극할 경우 췌장 선세포내 활성화된 NF- $\kappa$ B가 p65/p50 heterodimer와 p50 homo dimer임이 보고되었다.<sup>11</sup> 본 연구에서는 췌장 선세포에 염증성 cytokine 생성을 조절하는 NF- $\kappa$ B 활성화와 활성산소의 역할에 대하여, cerulein으로 유발된 췌장염모델에서 항산화제인 GSH, SOD, catalase와 NF- $\kappa$ B 활성 억제제인 PDTC를 처치하여 억제효과를 관찰하였으며, 이러한 항산화제와 NF- $\kappa$ B 활성 억제제는 cerulein 처치에 의하여 유도되는 NF- $\kappa$ B 활성화와 염증성 cytokine의 발현을 감소됨을 확인하였다. 그러므로 항산화제에 의하여 NF- $\kappa$ B 활성화가 억제되어, IL-6의 조절 접합부위에 NF- $\kappa$ B가 결합하여 조절하는 IL-6 mRNA 발현을 억제시킴을 알 수 있었으며,<sup>26</sup> 이는 이전의 연구들과 일치하는 결과이다.

요약하면, 본 실험에서 췌장 선세포에서 cerulein에 의하여 생성되는 활성산소는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고, 이는 염증성 cytokine 유전자 발현을 유도함을 확인하였다. 또한 항산화제로 활성산소를 억제하고, NF- $\kappa$ B 활성 억제제로서 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제함으로써, 췌장 선세포에서 염증성 cytokine 유전자 발현이 억제됨을 확인하였다.

## V. 결 론

췌장염 병인론에서 선세포의 cytokine 발현에 대한 활성산소와 NF- $\kappa$ B의 역할을 규명하고자 쥐에서 분리한 췌장 선세포에 cerulein을 처치하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 췌장 선세포에 cerulein을 처치함으로써 지질과산화물 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성이 증가되었다.
2. 췌장 선세포에 cerulein을 처치함으로써 NF- $\kappa$ B가 활성화 되었다.
3. 췌장 선세포에 cerulein을 처치함으로써 염증성 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6)의 발현이 증가하였다.
4. 항산화제(GSH, SOD, catalase)는 cerulein에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제시켰다.
5. 항산화제 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제제(PDTC)는 cerulein에 의한 염증성 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6)의 발현 증가를 억제시켰다.

이상의 결과를 보아 cerulein에 의하여 유도되는 급성췌장염에서 활성산소 생성에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화는 염증반응의 중요한 요인으로 cytokine의 발현을 조절함을 확인하였다.

## 참고문헌

1. Petrone, W. F.; English, D. K.; Wong, K. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**:1159-1163; 1980.
2. Guice, K. S.; Oldham, K. T.; Caty, M. G. Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann. Surg.* **210**:740-747; 1989.
3. Schoenberg, M. H.; Buchler, M.; Gasper, M. The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis. *Gut* **31**:1138-1143; 1990.
4. Gough; D. B.; Boyle, B.; Joyce, W. P. Free radical inhibition and serial chemiluminescence in evolving experimental pancreatitis. *Br. J. Surg.* **77**:1256-1259; 1990.
5. Sanfey, H.; Bulkeley, G. B.; Cameron, J. L. The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann. Surg.* **201**:63-69; 1985.
6. Guyan, P. M.; Udern, S.; Braganza, J. M. Heightened free radical activity in pancreatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **8**:347-54; 1990.
7. Barnes, P.J.; Karin, M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1066-1071; 1997.
8. Meyer, M.; Schreck, R.; Baeuerle, P. A. Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**:2005-2015; 1993.
9. Schenk, H.; Klein, M.; Erdbrugger, W. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1672-1676; 1994.
10. Blackwell, T. S.; Blackwell, T. R.; Holden, E. P. *In vivo* antioxidant treatment suppresses nuclear factor- $\kappa$ B activation and

- neutrophilic lung inflammation. *J. Immunol.* **157**:1630–1637; 1996.
11. Kim, H.; Seo, J. Y.; Roh, K. H.; Lim, J. W.; Kim, K. H.;  
Suppression of NF- $\kappa$ B activation and cytokine production by  
N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Rad. Biol. Med.*  
**29**:67–683; 2000.
  12. Steinle, A. U.; Weidenbach, H.; Wagner, M. NF- $\kappa$ B/Rel activation  
in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* **116**:420–430; 1999.
  13. Gorelick, F. S.; Adler, G.; Kerin, H. F. Cerulein-induced  
pancreatitis. In: Go, V. W.; DiMagno, E. P.; Gardner, J. D.;  
Lebenthal, E.; Reber, H. A.; Scheele, G. A., eds. *The pancreas:  
biology, pathobiology, and Disease (2nd ed.)*. New York: Raven  
Press; 1993:501–526.
  14. Jensen; R. T.; Wank; S. A.; Rowley; W. H.; Sato; S.; Gardner; J.  
D. Interaction of CCK with pancreatic acinar cells. *Trends  
Pharmacol. Sci.* **10**:418–423, 1989
  15. Rinderknecht, H. Pancreatic secretory enzymes. In: Go, V. W.;  
DiMagno, E. P.; Gardner, J. D.; Lebenthal, E.; Reber, H. A.;  
Scheele, G. A., eds. *The pancreas: biology, pathobiology, and  
Disease (2nd ed.)*. New York: Raven Press; 1993:219–253.
  16. Lerch; M. M.; Adler; G.; Experimental animal models of acute  
pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* **15**:159–170; 1994.
  17. Oliver, C.; Waters, J. F.; Tolbert, C. L. Growth of exocrine acinar  
cells on a reconstituted basement membrane gel. *In Vitro Cell Dev.  
Biol.* **23**:465–473; 1987.
  18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal  
tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2)  
:351–358
  19. Thurman RG, Ley HG, Scholz R. Hepatic microsomal ethanol  
oxidation. *Eur J Biochem* 1972;25:420–430
  20. Bradford; M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation  
of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein  
dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254, 1976
  21. Chomczynski; P.; Sacchi; N. Single-step method of RNA isolation  
by acid guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.*

*Biochem.* **162**:156-159, 1987 1987

22. Okumura, N.; Sakakibara, A.; Hayakawa, T. Pancreatic endocrine function in experimental pancreatolithiasis in dogs. *Am. J. Gastroenterol.* **77**:392-396; 1982.
23. Neurath, M. F.; Becker, C.; Barbulescu, K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* **43**:856-860; 1998.
24. Li, N.; Karin, M. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* **13**:1137-1143; 1999.
25. Heath, D. L.; Cruickshank, D. H.; 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.
26. Ben-Baruch, A.; Michiel, D. F.; Oppenheim, J. J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **270**:11703-11706; 1995.

**abstract**

**ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND TRANSCRIPTION FACTOR  
NF- $\kappa$ B ON CYTOKINE PRODUCTION IN PANCREATIC ACINAR CELLS  
: RELATION TO THE PATHOGENESIS OF PANCREATITIS**

**Ji Hoon Yu**

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

(Directed by associate professor Hyeyoung Kim)

Reactive oxygen species (ROS) has been considered as an important regulator in the pathogenesis and development of pancreatitis and as an activator of transcription factor, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) regulating inflammatory cytokine gene expression. NF- $\kappa$ B activation was demonstrated in cerulein pancreatitis which rapidly induces an acute, edematous form of pancreatitis. Present study aims to investigate whether cerulein induces ROS generation, production of lipid peroxide (LPO), NF- $\kappa$ B activation and the expression of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6) in pancreatic acinar cells, and whether these alterations are inhibited by antioxidants and an inhibitor of NF- $\kappa$ B activation. As a result, cerulein generated ROS and increased LPO production in acinar cells. It resulted in NF- $\kappa$ B activation and induction of cytokine gene expression in acinar cells. Cerulein-induced NF- $\kappa$ B activation was in parallel with I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation. Both antioxidants(GSH, SOD, catalase) and NF- $\kappa$ B inhibitor(PDTC) inhibited cerulein-induced, oxidant-mediated alterations in acinar cells. In conclusion, ROS, generated by cerulein activates NF- $\kappa$ B, resulting in upregulation of inflammatory cytokines gene expression in acinar cells. Inhibition of NF- $\kappa$ B by scavenging ROS might alleviate the inflammatory response in pancreatic acinar cells by suppressing

cytokine gene expression.

---

**Keywords**—Reactive oxygen species, Cerulein, NF- $\kappa$ B, Cytokine, Pancreatic acinar cells