

Protease-Activated Receptor 활성화가
급성 췌장염의 병태생리에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

조 경 희

Protease-Activated Receptor 활성화가
급성췌장염의 병태생리에 미치는 영향

지도교수 김 경 환, 윤 방 부

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 경 희

조경희의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 학문적인 지도편달과 격려로써 돌보아 주신 김경환 교수님께 진심으로 감사드리며 특히 실험에 결정적인 도움을 주신 이민구 교수님 그리고 약리학 교실원 여러분 모두에게 감사드립니다.

의사로서 먼길을 보고 걸어가도록 인생의 사표로써 지도해주신 윤방부 교수님과 가정의학과와 선학의 길을 걸어가신 여러 선배님들께 진심으로 감사드립니다.

평생을 지켜주시는 존경하는 부모님, 사랑하는 아내 원견과 잘 자라주고 있는 윤수, 재영 그리고 모든 가족들에게 이 논문을 드립니다.

저자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 실험동물 및 췌장 선세포 분리	5
2. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 영향 검색	5
가. 췌장 선세포 일차배양	5
나. MTT 분석	6
다. NF- κ B활성측정	6
라. MAP kinase 활성측정	7
3. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 작용 검색	7
가. 세포 배양	7
나. 칼슘 신호측정	7
다. NF- κ B 측정	8
라. Cytokine 측정	8
마. Nitric oxide 측정	8
바. 역전사 중합효소연쇄반응 측정	8
4. 혈압 및 심박수 측정	10
III. 결과	11
1. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 영향 및 그 억제제의 효과	11
가. NF- κ B 활성	11
나. MAP kinase 활성	11

다. MTT 분석 결과	12
2. 급성체장염 전신부작용 발생에 대한 PAR의 작용기전	13
가. 칼슘 신호 변동	13
나. NF- κ B 활성 변동	13
다. Cytokine 변동	14
라. Nitric oxide 변동	15
마. eNOS, iNOS, IL-8 및 MCP-1의 변동	15
3. PAR의 생체 내 작용 검색	16
 IV. 고찰	 18
 V. 결론	 20
 참고문헌	 22
영문요약	27

그림 차례

그림 1. 췌장 선세포에서 trypsin 및 PAR2 효현제에 의한 NF- κ B 활성화	11
그림 2. 췌장 선세포에서 trypsin과 PAR2 효현제에 의한 JNK 및 ERK의 Western blotting	12
그림 3. 췌장 선세포에서 PAR2 효현제에 의한 MTT 측정	12
그림 4. HUVEC 및 THP-1 세포에서 PAR2 효현제와 trypsin에 의한 칼슘 농도의 변동	13
그림 5. THP-1 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 NF- κ B 활성화	14
그림 6. THP-1 세포주에 PAR2 효현제 처리 후 IL-8의 분비 변동	14
그림 7. HUVEC 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 Nitric oxide 변동	15
그림 8. HUVEC과 THP-1 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 eNOS, iNOS, IL-8 및 MCP-1 에 대한 RT-PCR	16
그림 9. 흰쥐에서 PAR2 효현제에 의한 혈압 및 심장 박동수 변동 . .	17

Protease-Activated Receptor 활성화가
급성췌장염의 병태생리에 미치는 영향

Protease-activated receptor(PAR)가 cloning된 이후로 PAR1부터 PAR4까지 4가지 아형이 cloning되었다. 그중 PAR1, PAR3, PAR4는 혈액의 thrombin에 의해, 그리고 PAR2는 췌장 trypsin에 의해 활성화되어 세포내 칼슘신호를 유발한다고 밝혀져 있다. 최근 PAR는 급성췌장염의 병인 기전에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 인정되고 있다. 그러나 PAR 활성화가 췌장 세포와 전신 세포, 혈관 내피세포 및 면역세포 등에서 염증반응을 유도할 수 있는지, 나아가 이들이 전신 조직 부작용과 관련 있는지에 대해서는 아직까지 구체적으로 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 췌장 선세포 손상에 대한 PAR의 영향 및 기전을 분자 생물학적 및 세포 생리학적인 방법을 이용하여 살펴보았다. 또 수용체 활성화로 인한 혈관 내피세포와 면역세포의 기능 변동과 흰쥐 실험에서 급성췌장염 전신부작용 발생을 알아보려고 하였다.

췌장 선세포에서 trypsin과 PAR 수용체 효현제를 투여한 결과 PAR2 활성화는 세포내 칼슘신호를 유발하고 NF- κ B를 활성화 하였지만 세포 손상지표의 변화는 없었다. 면역세포(THP-1, 호중구유래)와 내피세포(HUVEC)에서 trypsin과 PAR 수용체 효현제 투여는 PAR2를 활성화시켜 세포내 칼슘신호를 유발하였고, eNOS, iNOS, IL-8의 mRNA 생성을 증가시켰으며, Nitric oxide생성을 증가시켰다. 생체 실험에서 PAR2 효현제는 흰쥐의 혈압을 유의 있게 하강시켰다.

이상의 결과에서 PAR2 활성화는 췌장 선세포 자체에는 뚜렷한 손상을 유발하지는 않지만 염증전구신호를 활성화시켜 염증반응을 유도할 가능성이 있음을 발견하였으며 염증 관련 신호 및 cytokine 생성을 증가시키고 전신혈압을 하강시킴을 알 수 있었다. 결론적으로 PAR2는 급성췌장염에서 간질액으로 유리되는 trypsin에 의해서 활성화

화되고 이는 심한 전신부작용을 일으키는 중요기전으로 생각된다.

핵심되는 말 :protease-activated receptor(PAR), 선세포, 면역세포, 내피세포,

급성췌장염

Protease-Activated Receptor 활성화가 급성췌장염의 병태생리에 미치는 영향

<지도교수 김경환, 윤방부>

연세대학교 대학원 의학과

조 경 희

I. 서론

급성췌장염의 원인에 관한 많은 연구에도 불구하고 췌장염을 유발 및 악화시키는 병인론은 아직까지 확실하지 않다. 역학 조사에 의하면 구미의 경우 최근 발병빈도가 점차 증가하여 현재 매년 10만명 당 40명의 환자가 발생하고 있다¹. 급성췌장염 환자의 10-15%는 심한 전신증상과 합병증을 나타내며 중증의 경과를 밟게 되면 사망률이 20-30%에 이르고 있다². 치료로는 아직까지는 통증 완화, 수액요법, 금식, 비위관 흡입술 등 췌장을 휴식시키는 방법과 전신 및 국소 합병증 예방에 초점을 맞추고 있다. 자가소화 기전에 따른 cholecystinin (CCK) 수용체 과도활성화와 활성산소 등이 병인기전에 중요인자로 인식되고 있으나 이의 억제 물질들은 실제 임상성적에서 좋은 결과를 나타내고 있지 못하고 있다. 다만 세포간질 및 혈액으로 유리되는 trypsin을 억제하는 단백분해효소 억제제만이 제한적으로 임상에 응용되고 있다³. 최근 연구에 따르면 급성췌장염의 병인 기전에 있어 protease-activated receptor (PAR)가 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁴. PAR는 1991년 cloning된⁵ 이후로 PAR1부터 PAR4까지 4가지 아형이 cloning되었

다. 그중 PAR1, PAR3, PAR4는 혈액의 thrombin에, 그리고 PAR2는 췌장 trypsin에 의해 활성화되어서 세포내 칼슘신호를 유발한다고 밝혀져 있다⁷⁻⁹.

췌장 선세포의 초기 손상에서 췌장염 유발인자(과도한 CCK 수용체흥분, 과도한 신경자극, 허혈, 췌관 압력증가, 알콜, 바이러스, 약제 및 독소)는 선세포에서 비정상적으로 크고 지속적인 칼슘신호를 유발하며 소화효소는 내강을 통하여 분비되지 않고 대신 측저막을 통하여 trypsin등의 단백분해효소가 세포 간질 및 혈액으로 유리된다⁷⁻⁹. 이때 간질로 유리된 trypsin은 trypsinogen과 인접 선세포의 PAR를 활성화시켜 다시 비정상적인 칼슘신호를 유발시키고 연속적인 악순환을 유발할 수 있다. 췌장 선세포의 PAR2 활성화는 일시적인 칼슘신호를 유발하며, 선세포에서 소화효소 분비를 촉진하고 관세포에서 anion exchanger (AE) 기능을 증가시켜 췌액 분비를 촉진한다. 이는 췌장 조직 자체에 대해서는 trypsin에 의한 PAR2 활성화가 일시적인 방어 기전으로 작용할 수도 있음을 뜻한다¹⁰. 그러나 과도한 PAR 활성화가 췌장 세포와 전신 혈관 내피세포 및 면역세포 등에서 염증반응을 유도할 수 있는지, 나아가 이로 인해 전신 부작용을 가져오는지에 대해서는 아직까지 구체적인 내용이 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 췌장 선세포 손상에 대한 PAR의 영향 및 기전을 분자 생물학적 및 세포 생리학적인 방법을 이용하여 살펴보았다. 또 수용체 활성화로 인한 혈관 내피세포와 면역세포의 기능 변동과 흰쥐 실험에서 급성췌장염 전신부작용 발생을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 췌장 선세포 분리

실험동물로는 실험실 환경에 1주일 이상 적응시킨 체중 200-250g Sprgue-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 선세포 분리 및 세포내 칼슘 측정은 Lee등¹¹의 방법을 이용하였다. 흰쥐를 단두하여 희생시킨 다음 개복하여 췌장을 적출하고 얼음 위에서 지방조직을 제거하였다. 가위로 췌장 조직을 잘게 썬 다음 50 U/ml collagenase를 포함하고 있는 8 ml의 pancreatic solution A(PSA) 용액에서 37. C 100% O₂ 공급하에 15 분간 소화시켰다. Collagenase를 씻어낸 다음 소화된 조직을 가는 체로 걸러서 잘게 분리된 선세포만을 채취하였다.

2. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 영향 검색

가. 췌장 선세포 일차배양

췌장 선세포를 무균적으로 분리한 후 PSA로 씻은 다음 wash하고 complete culture media에서 resuspension 시켜서 2 ml (900 μ g, -1×10^6 cells)씩 soluble collagen이 coating 되어 있는 6 well plate에 심었다. Trypan blue dye exclusion 법을 이용하여 세포 생존율이 95% 이상임을 확인하였다. 세포는 10% Fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 1 mM putrescine, 10 μ g/ml dexamethasone, 50 ng/ml epidermal growth factor가 함유된 Waymouth's MB 752/1 medium으로 유지하였다.

나. MTT 분석

62.5 μ l의 5 mg/ml 3-(4,5-di-methylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St.Louis, MO, USA) stock solution을 250 μ l의 세포 배양액을 포함하는 24 well plate에 각각 첨가하여 2시간 37 C에서 incubation한 후, 20% sodium dodecyl sulfate 와 50% N,N-dimethylformamide가 함유된 extraction buffer 250 μ l를 첨가하여 formazan을 37. C, 20시간 이상 용해시킨 후 ELISA reader (MolecularDevices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 최고 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 구하였다.

다. NF- κ B활성측정

세포(2×10^6 cell/well)를 ice-cold phospholate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고 100 μ l의 고염액(high salt buffer)에 재분산시켰다. 얼음 위에서 15분간 방치한 후 cell lysates는 원심분리하고 상층액은 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 10 μ g의 단백질을 함유한 세포 핵추출액을 NF- κ B specific 32 P-labeled oligonucleotide와 함께 배양하였다. 결합반응은 2 μ g poly(dI-dC), 20 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 4% Ficoll과 3000-6000 cpm을 갖는 random primer-labeled oligonucleotide와 함유한 20 μ l 부피로 수행하였다. 실온에서 20분간 방치후 시료는 4% non-denaturing polyacrylamide gel에 loading하여 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 행하였다. 반응후 gel을 건조시킨 후 X-ray film에 하루 밤 노출시켰다. 활성화되는 NF- κ B의 type을 결정하기 위하여 NF κ B의 antibody인 p65 및 p50을 NF- κ B 반응액에 자극을 받은 세포 추출액과 함께 반응시킨 후 super-shift assay를 수행하였다

라. MAP kinase 활성측정

세포를 Phosphate buffered saline으로 2회 씻고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 2 mM PMSF, 1 µg/µl aprotinin, 1 µg/µl leupeptin)를 넣고 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 세포를 20000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 세포액을 추출한 후 상층액만 떼서 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하였다. 50 µg 단백질을 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해 분리하고 nitrocellulose membrane에 transblotting kit (Bio Rad)를 이용하여 전이하였다. 이렇게 만들어진 blot를 5% non-fat dry milk 용액으로 blocking한 뒤, 인산화가 이루어진 protein kinase의 항체(anti-phospho ERK rabbit IgG, anti-phospho JNK rabbit IgG, anti-phospho p38 rabbit IgG; Promega)를 반응시킨 후 다시 2차 항체인 HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시켰다. Enhanced chemiluminescence system을 이용해 발색하였다.

3. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 작용 검색

가. 세포 배양

호중구에서 유래한 THP-1 세포주와 사람 제대혈관에서 유래한 HUVEC 세포주는 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양하였다.

나. 칼슘신호 측정

Fura 2/AM 용액 (5 µM in PSA, 2 ml)을 20분간 상온에서 내피세포와 호중구에 loading한 다음 표준 관류액으로 1회 세척하였다. Fura 2가 loading된 세포에 표준 관류액을 흘리면서 excitation 355 nm 및 380 nm 그리고 emission 510 nm

에서 나오는 Fura 2의 형광을 Delta Ram system (PTI, NJ, USA)을 이용하여 측정하였다. 이때 관류액에 PAR1 (SFLLRN), PAR2 (SLIGKV), PAR3 (TFRGAP) 효현 펩타이드 혹은 trypsin을 첨가하여 PAR 활성화에 의한 세포내 칼슘농도 증가를 관찰하였다.

다. NF- κ B 활성 측정

나-3과 동일한 EMSA방법으로 NF- κ B의 활성을 측정하였다. AP-1의 경우는 c-Fos와 c-Jun에 특이한 32 P-labeled oligonucleotide를 이용하여 실험하였다.

라. Cytokine 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 측정하였다. ELISA plate에 각각의 흰쥐 cytokine(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α)에 대한 단일항체를 하룻밤 동안 coating하였다. Plate는 10 mM phosphate-buffered saline(pH 7.4) (PBS) - 0.05% (v/v) Tween 20을 3회 세척하고 10% (v/v) fetal calf serum을 함유한 배양액으로 37°C에서 90분간 blocking하였다. 배양액을 제거한 후, 각 cytokine에 특이적인 goat polyclonal immunoglobulin G 희석액을 각 well에 첨가하고 37°C에서 60분간 배양하였다. Well을 10 mM PBS(pH 7.4) - 0.05% (v/v) Tween 20으로 세척하고 alkaline phosphate-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin G를 첨가하였다. 각 well당 기질 용액(0.5 mM MgCl₂, 1 M diethanolamine buffer, pH 9.5, 1 mg disodium p-nitrophenyl phosphate)을 첨가하여 상온에서 배양하고, 3 M NaOH를 첨가하여 반응을 정지시켰다. ELISA reader로 각 well에서 흡광도 405 nm로 cytokine 함량을 측정하였고 각각의 흰쥐 재조합 cytokine을 표준으로 사용하였다.

마. Nitric oxide(NO) 측정

NO에 반응하는 형광물질을 이용하여 세포내 NO 생성을 측정하였다. 내피세포

혹은 호중구에 10 μ M DAF-2 DA를 30분간 배양하여 dye를 loading한 다음 세포를 poly-lysine coating한 coverslip에 부착하였다. Coverslip을 관류 chamber에 조립한 다음 microfluorometer(Delta Ram, PTI, NJ, USA)로 excitation 495 nm, emission 515 nm에서 측정하였다.

바. 역전사 중합효소연쇄반응 측정

cytokine mRNA 발현은 역전사중합효소연쇄반응 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 이용하여 측정하였으며, 내부대조물질로서 β -actin을 같이 증폭하여 실험하였다. 총 RNA를 guanidium isothiocyanate 추출법에 의하여 분리한 후, random hexamer 50 pg, deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 500M, RNase inhibitor 25 U, reverse transcriptase 200 U를 함유한 반응액에 RNA 2 μ g을 넣어 최종 양이 25 μ l이 되도록 맞추어 넣고 37. C에 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. RNA 160ng과 동량의 cDNA를 각각 IL-8 또는 MCP-1에 특이한 primer와 β -actin에 특이한 primer 및 Tag polymerase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 중합효소반응법을 하였다. 중합효소반응법은 95. C 30초, 60. C 30초, 72. C 30초로 25-30 cycle로 IL-8 또는 MCP-1에 대한 mRNA를 증폭시켰다. IL-8의 primer sequences는 5' -ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' (forward primer), 5' -TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소 생성물의 크기는 297 염기쌍이었다. MCP-1의 primer sequence는 5' -AAGCTGTGATCTTCAAGACCATTG-3' (forward primer), 5' -TTAAGGCATAATGTTTCACATCAACAA-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 269 염기쌍이었다. β -actin의 primer sequences는 5-ACCAACTGGGACGACATGGAG-3 (forward primer), 5-GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC-3 (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 349 염기쌍이었다.

4. 혈압 및 심박수 측정

Urethane(1.25 g/kg)으로 흰쥐를 마취시킨 후 내경정맥내에 polyethylene tube를 삽입하여 PAR2-AP를 주입한 뒤 경동맥에 연결된 transducer를 통해 혈압 및 심박동수를 측정하였다.

III. 결과

1. 췌장 선세포 손상에 대한 PAR 영향 검색

가. NF- κ B 활성화:

췌장 선세포를 분리 안정화시킨 다음 trypsin과 PAR2-AP (activating peptide)로 PAR2를 활성화시킨 후 각 시간대의 NF- κ B 활성을 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용해 측정하였다. trypsin과 PAR2-AP 자극 15분에 p50-65 heterodimer가 활성화되고 60분 이후에는 p50-50 homodimer가 활성화되었다(그림 1).

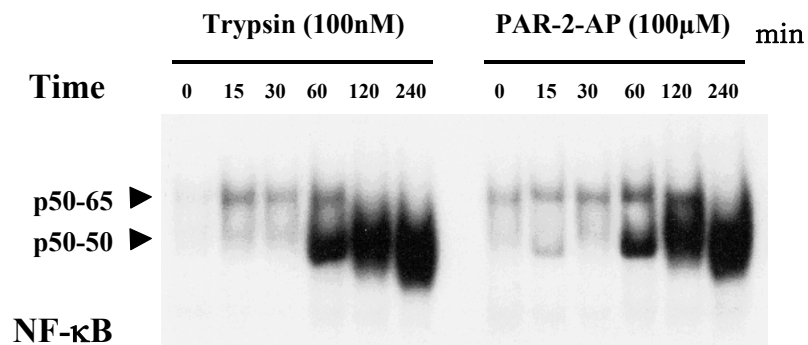


그림 1. 췌장 선세포에서 trypsin 및 PAR2 효현제에 의한 NF- κ B 활성화

나. MAP kinase 활성화:

췌장 선세포를 분리 안정화시킨 다음 trypsin과 PAR2-AP로 PAR2를 활성화시킨 후 각 시간대의 MAPK 활성을 Western blotting으로 확인하였다. Trypsin과 PAR2-AP 자극 60분에 JNK의 인산화가 증가되고, Trypsin과 PAR2-AP 자극

15분에 ERK의 인산화가 증가되었다(그림 2).

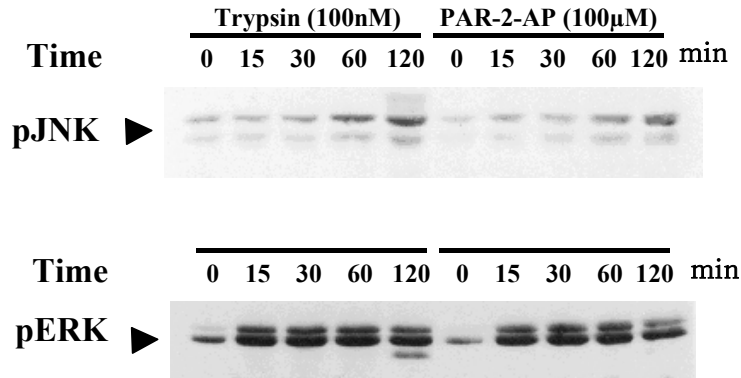


그림 2. 췌장 선세포에서 trypsin과 PAR2 효현제에 의한 JNK 및 ERK의 Western blotting

다. MTT 분석 결과

췌장 선세포를 무균적으로 분리하여 Ca^{2+} chelator인 BAPTA를 전처리한 후 PAR2-AP에 의한 PAR2 활성화에 따른 세포 손상 여부를 배양 24시간 후 MTT법으로 분석하였다. PAR2-AP는 1, 10, 100 및 500μM 처치로도 세포 생존율의 유의 있는 차이가 없었다. 즉 PAR2의 활성화는 선세포 사멸에 직접적인 영향이 없었다(그림3).

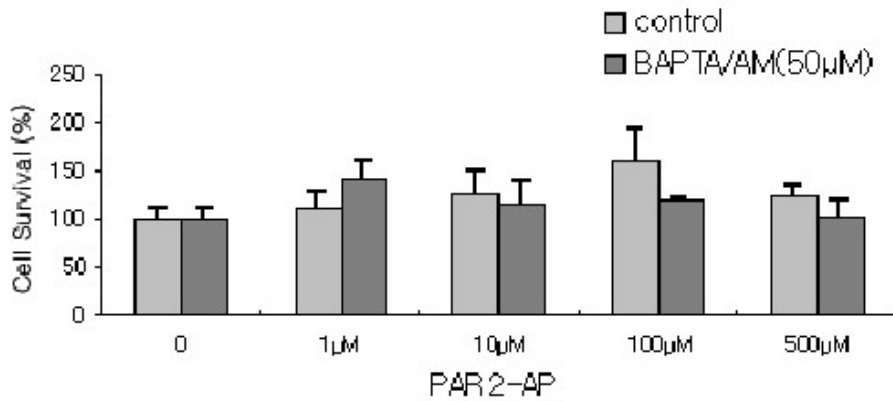


그림 3. 췌장 선세포에서 PAR2 효현제에 의한 MTT 측정

2. 급성췌장염 전신부작용 발생에 대한 PAR 작용기전

가. 칼슘신호 변동

내피세포에서 유래한 HUVEC 세포와 면역세포에서 유래한 THP-1 세포에 PAR2 수용체가 존재하는지 칼슘신호 측정을 통해 검색하였다. HUVEC 세포주는 cover slip 위에서 culture 한 뒤 Ca^{2+} dye (Fura2/AM)를 loading한 후 관류 chamber에 장착해서 PAR2-AP와 Trypsin에 의한 칼슘신호를 측정하였다. THP-1 세포주는 Poly-L-Lysine으로 cover slip 위에 붙인 후 HUVEC과 동일한 방법으로 칼슘신호를 측정하였다. 그 결과 HUVEC과 THP-1 세포주 모두 trypsin과 PAR2-AP에 의하여 칼슘신호가 유발되었으며 이로서 이들 세포에 PAR2가 존재하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

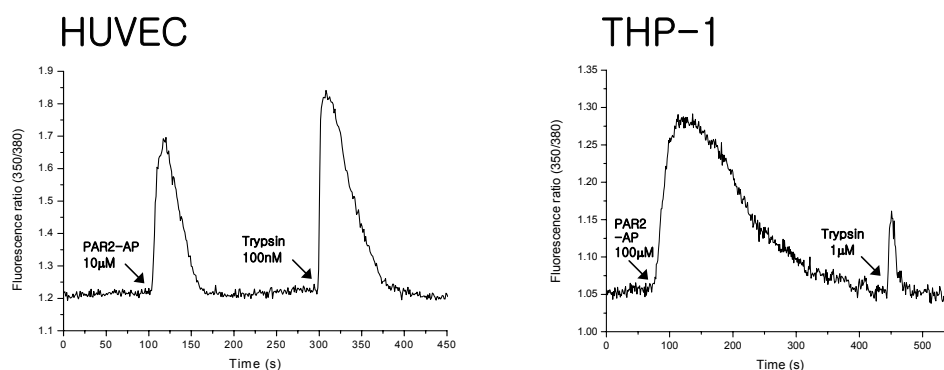


그림 4. HUVEC 세포와 THP-1 세포에서 PAR2 효현제와 trypsin에 의한 칼슘농도의 변동

나. NF- κ B 활성 변동:

THP-1 세포주에 PAR2-AP를 100 μ M 처리 후 각 시간대의 NF- κ B 활성을 EMSA로 검색하였다. 그 결과 THP-1 세포주는 PAR2-AP 자극에 의하여 60분에 p50-65 heterodimer와 p50-50 homodimer가 활성화되었다(그림 5).

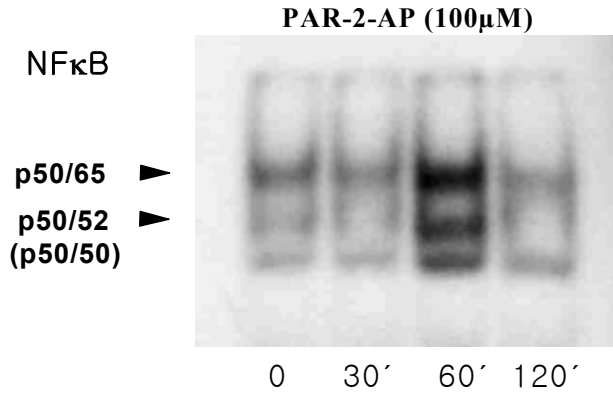


그림 5. THP-1 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 NF κ B 활성화 변동

다. Cytokine 변동:

THP-1 세포주에 PAR2-AP를 100 μ M 처리한 뒤 24시간 배양 후 배양액만을 얻어 ELISA kit을 사용하여 배양액 속에 함유된 IL-8의 양을 측정하였다. THP-1 세포주에서 PAR2는 6시간부터 활성화되었으며 12시간에 IL-8의 분비량을 최고로 증가시키는 것을 관찰하였다 (그림 6).

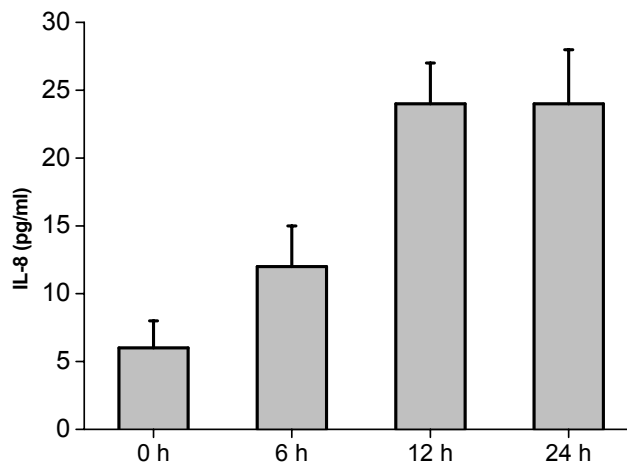


그림 6. THP-1 세포주에 PAR2 효현제 처리 후 IL-8의 분비 변동

라. Nitric oxide(NO) 변동:

Cover slip 위에서 배양한 HUVEC 세포주를 10 μ M의 NO dye (CM-H₂DCFDA)로 30분간 loading한 다음 cover slip을 관류 chamber에 조립한 후 microfluorometer (Delta Ram, PTI, NJ, USA)로 excitation 495 nm, emission 515 nm에서 측정한 바 PAR2-AP 에 의한 PAR2의 활성화는 NO 생성을 촉진하였다(그림 7).

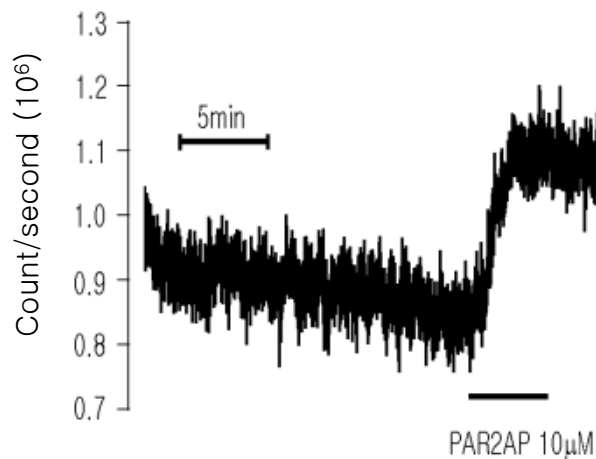


그림 7. HUVEC 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 Nitric oxide 변동

마. eNOS, iNOS, IL-8 및 MCP-1의 변동

HUVEC과 THP-1 세포주에 100 μ M PAR2-AP를 처리하고 24시간 배양한 후 동량의 mRNA를 사용해서 RT-PCR을 수행하였다. THP-1 세포주에서 PAR2의 활성화는 IL-8 및 MCP-1의 발현을 소량 증가시켰다. HUVEC 세포주에서 PAR2의 활성화는 eNOS와 iNOS, 및 IL-8의 발현을 증가시켰다 (그림 8).

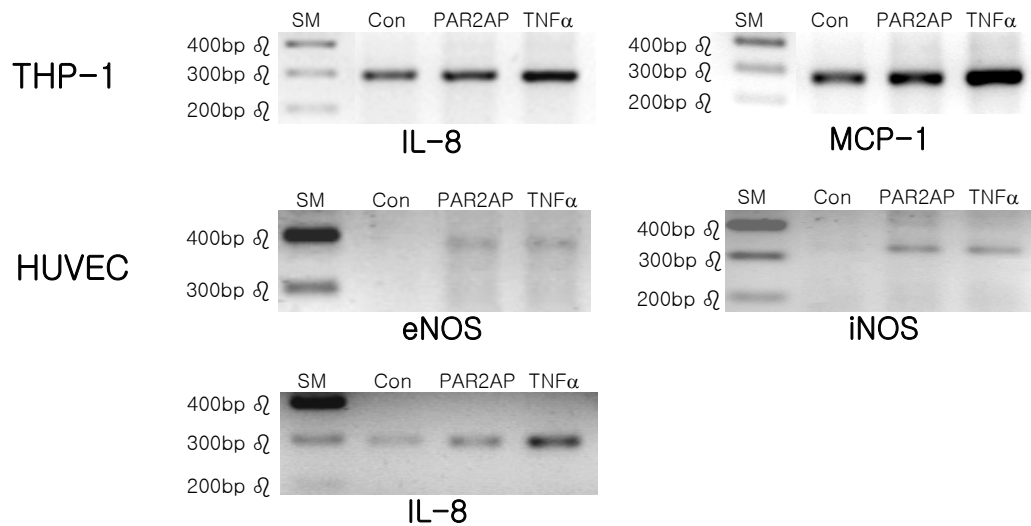


그림 8. HUVEC과 THP-1 세포주에서 PAR2 효현제 처리 후 eNOS, iNOS, IL-8 및 MCP-1 변동의 RT-PCR

3. PAR의 생체내 작용

Urethane(1.25g/kg)으로 흰쥐를 마취시킨 후 내경정맥내에 polyethylene tube를 삽입하여 PAR2-AP를 주입한 뒤 경동맥에 연결된 transducer를 통해 혈압 및 심장 박동수를 측정된 결과 흰쥐의 혈압은 PAR2 효현제 농도에 비례하여 감소하였고, 심장 박동수는 약간 증가하는 것을 관찰하였다 (그림 9).

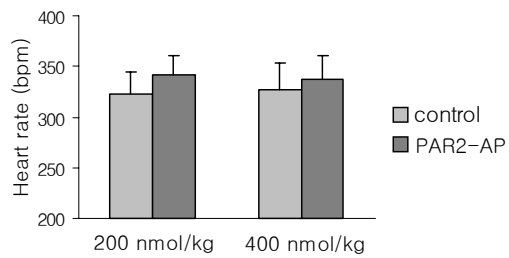
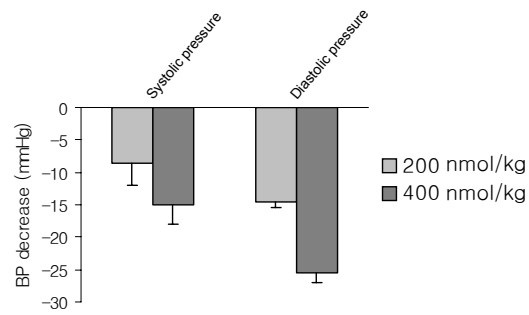
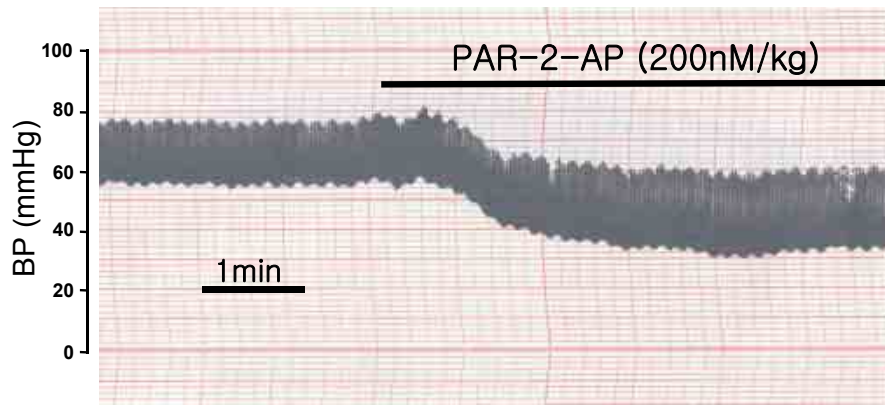


그림 9. 흰쥐에서 PAR2 효현제에 의한 혈압 및 심장 박동수 변동

IV. 고찰

PAR는 생체 내의 여러 세포에 의한 다양한 조직에서 수용체로 작용하여 성장과 발달, 유사 분열 생식, 염증 반응, 혈관 근육 긴장도 및 혈압 조절과 같은 여러 병태 생리 과정에 관여하고 있다^{6,16-21}. 사람 혈소판은 PAR1과 PAR4가 발현되어 있고, 쥐의 혈소판에는 PAR3 와 PAR4가 발현되어 있으면서 thrombin 수용체로 작용하고 있다¹⁵. 소화기관에서는 PAR2 mRNA가 있어 이것이 활성화되면 타액분비가 일어나게 되며, 또한 PAR1 과 PAR2는 십이지장 운동을 조절함이 알려져 있다^{12, 22-23}.

췌장 조직 손상시 세포 간질액 및 혈액으로 유출되는 단백분해효소와 관련하여 근래 연구되고 있는 사실은 이들이 인체 여러 곳에 존재하는 PAR를 활성화시켜 세포내 칼슘 농도 변동을 유발시킬 수 있다는 것이다. 즉 여러 원인에 의한 세포 손상과 이의 후속 과정에 일어나는 염증 및 회복반응에서 세포내 칼슘농도 변동이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다¹³. 특히 급성췌장염의 경우 자가소화기전이 췌장염 발생에 중요한 역할을 하는데 칼슘이 소화효소 분비를 일으키는 신호물질이므로 그 중요성이 매우 크다^{9,14}. 췌관압력증가, 알코올, 저산소증, 바이러스 등에 의한 자극인자는 췌장 선세포에서 크고 지속적인 세포 내 칼슘농도 변동을 유발하며⁷ 이러한 세포 내 칼슘농도 변동은 세포내의 trypsinogen을 trypsin으로 활성화시켜 췌장손상을 일으키며 세포 간질 및 혈액으로 활성화된 trypsin을 유리하는데 이는 췌장 선세포와 관세포에 존재하는 PAR2 뿐만 아니라 대부분의 조직에서 발현되는 PAR2를 활성화시켜 다양한 전신 반응을 유발할 수 있다.

췌장 조직에서 PAR활성화에는 일시적인 칼슘신호를 유발하며, 선세포에서 소화효소 분비를 촉진하고 관세포의 AE 기능을 활성화시켜 췌액의 분비를 촉진한다고 밝혀져 있다⁸. 이는 췌장조직 자체에 대해서는 trypsin에 의한 PAR2의 활성

화가 다량의 알칼리성 체액을 분비함으로써 독소를 제거하는 작용을 하며 따라서 일종의 체조직 보호기전으로 작용할 수 있다고 밝혀져 있다. 그러나 PAR의 자극은 체장세포와 혈관내피세포 그리고 면역세포에서 eNOS, iNOS, IL-8의 염증전구신호를 활성화하여 염증반응을 유도할 수 있음이 발견되었으며²⁴⁻²⁶ 특히 혈관내피세포에서의 NO의 의의 있는 증가는 전신 혈압을 하강시키는 작용으로 발견되었다²⁷. 본 실험에서 흰쥐를 이용한 생체 실험에서의 PAR2의 활성화는 약물농도에 비례해서 혈압이 감소하는 것으로 나타났으며 심장 박동수는 약간 증가하는 것으로 나타났으나 이는 혈압감소에 따른 교감신경의 보상작용으로 판단된다. PAR2 효현제에 의한 농도 비례의 혈압 저하는 심한 급성 체장염에서 나타나는 다발성 장기 부전의 중요한 원인이 될 수 있다. 즉 세포간질 및 혈액으로 유리된 trypsin은 본 실험에서 관찰한 혈관내피세포와 면역세포 이외에도 다른 조직(기도, 골, 심혈관계 기관, 표피, 외분비선, 담낭, 위장, 신장, 신경계, 요도 등)에 발현하고 있는 PAR2를 활성화시켜 근육의 수축 또는 이완 유발, 세포의 증식 유도, 여러 신호 물질 분비 등 다양한 반응을 일으킬 수 있다.

따라서 급성체장염시 세포간질 및 혈액으로 유리된 trypsin에 의한 PAR-2의 비정상적인 활성화는 NO 생성에 의한 혈압하강을 유발시킬 수 있으며, 염증유발 물질 분비를 증가시켜 급성체장염에서 나타나는 전신 부전의 주요 기전으로 작용할 수 있다. 그리고 최근 급성체장염 치료에 세포간질 및 혈액으로 유리되는 trypsin을 억제하는 단백분해효소가 효과가 있음이 보고된 것을 볼 때 급성체장염 치료에 PAR-2 길항제가 보다 효과적인 치료를 가능하게 할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

급성췌장염에서 PAR 활성이 췌장 선세포에 미치는 영향 및 급성췌장염 전신부작용 발생에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구로서, PAR2 활성이 선세포 손상 및 사멸에 미치는 영향과 혈관 내피세포와 면역세포의 기능 변동에 미치는 영향 그리고 흰쥐를 이용한 생체 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 췌장 선세포에서 PAR-2의 활성은 MAPK (ERK, JNK)와 NF- κ B를 활성화시키며, 췌장 선세포 사멸에는 직접적인 효과가 없었다.
2. 면역세포 (THP-1, 호중구유래)와 내피세포 (HUVEC)는 PAR-2를 발현하며, PAR-2 활성은 각 세포에서 칼슘신호를 유발하였다.
3. 면역세포 (THP-1)에서 PAR-2의 활성은 NF- κ B를 활성화시키며, cytokine (IL-8, MCP-1)의 생성 및 분비를 촉진하였다.
4. 내피세포 (HUVEC)에서 PAR-2의 활성은 NO 생성을 유발하고, eNOS와 iNOS 발현을 증가시키며, 염증유발 물질인 IL-8의 발현을 증가시켰다.
5. 흰쥐 경동맥에 PAR-2 효현 펩타이드를 주입해서 PAR-2를 활성화시키면, 혈압이 크게 하강하고, 심장 박동수가 약간 증가하였다.

이상의 결과 PAR2 활성화는 췌장 선세포 자체에는 뚜렷한 손상을 유발하지 않았다. 하지만 혈관 내피세포에서 PAR2의 활성은 NO 생성 및 IL-8 등과 같은 염증유발물질 분비를 촉진시킬 수 있었으며, 면역세포에서 염증유발물질 분비를 증가시켜

염증반응을 유도할 수 있었다. 따라서 급성췌장염시 세포 간질액으로 유리되어 나오는 trypsin에 의한 PAR2의 활성화는 NO 생성에 의한 혈압하강에 따른 전신 허혈을 유발시킬 수 있었으며, 염증유발물질 분비를 증가시켜 심한 전신부작용을 일으킬 수 있는 주요기전으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, Sutton R: Acute pancreatitis. The substantial human and financial costs. *Gut* 1998;42:886-91
2. Baron TH, Morgan DE: Acute necrotizing pancreatitis. *N Engl J Med* 1999;340:1412-17
3. Bassi C, Falconi M, Caldiron E, Salvia R, Sartori N, Butturini G, et al. Assessment and treatment of severe pancreatitis. Protease inhibitor. *Digestion* 1999;60 Suppl 1:5-8.
4. Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, et al. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J.* 1996;314:2009-16.
5. T. K. Vu, D. T. Hung. V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin: Molecular, Cloning of a Functional Thrombin Receptor Reveals a Novel Proteolytic Mechanism of Receptor Activation. *Cell* 1991;64:1057-68.
6. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW: Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 1998;274:C1429-52.
7. Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, Sutton R: Is an elevated concentration of

acinar

cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis?

Lancet 1995;346:1016-19.

8. Ward JB, Sutton R, Jenkins SA, Petersen OH. Progressive disruption of acinar cell

calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice.

Gastroenterology 1996;111:481-91.

9. Raraty M, Ward JB, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemes JP, Sutton T, et al.

Calcium dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. PNAS USA 2000;97:13126-31.

10. Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett

NW: Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. J Clin Invest 1999;103:261-9.

11. Lee MG, Xu X, Zeng W, Diaz J, Wojcikiewicz RJ, Kuo TH, et al: Polarized expression of Ca^{2+} channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of $[Ca^{2+}]$ waves. J. Biol. Chem. 1997;272:15765-70.

12. Kawabata A, Kuroda R, Hollenberg MD. Physiology of protease-activated receptors

(PARs): involvement of PARs in digestive functions. Nippon Yakurigaku

Zasshi - Folia Pharmacologica Japonica. 1999;114 Suppl:173-9.

13. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998;395:645-8.
14. Kruger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathology* 2000;157:43-50.
15. Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chintala M, Zhang RM, Chatterjee M, et al. Evidence for the presence of proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1996;79:581-588
16. Carr MJ, Schechter NM, Udem BJ. Trypsin-induced, neurokinin-mediated contraction of guinea pig bronchus. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1662-1667
17. Al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Detection of functional receptors for the proteinase-activated receptor 2 activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1203-1207
18. Roy SS, Saifeddine M, Loutzenhiser R, Triggle CR, HollenbergMD. Dual endothelium dependent vascular activities of proteinase-activated receptor 2 activating peptides: evidence for receptor heterogeneity. *Br J Pharmacol* 1998;123:1434-1440.
19. Hamilton JR, Chow JM, Cocks TM. Proteinase-activated receptor-2

turnover stimulated independently of receptor activation in porcine coronary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 127:617-622

20. Hamilton JR, Nguyen PB, Cocks TM. Atypical proteinase-activated receptor mediated endothelium-dependent relaxation of human coronary arteries. *Circ Res* 1998;82:1306-1311.

21. Sobey CG, Moffatt JD, Cocks TM. Evidence for selective effects of chronic hypertension on cerebral artery vasodilatation to proteinase-activated receptor-2 activation. *Stroke* 1999; 30: 1933-1940.

22. Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, et al. Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea pig myenteric neurons through proteinase-activated receptor-1 and -2. *J Physiol* 1999;517:741-756.

23. Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, et al. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 1997;100:1383-1389

24. Steinhoff M, Covera CU, Thoma MS, Kong W, Caughey GH, Ansel JC, et al. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 1999; 8:282-294.

25. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, et al. Agonist of proteinase-activated receptor 2 induced inflammation

by a neurogenic mechanism. *Nature Med* 2000;6:151-158

26. Linder JR, Kahn ML, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, et al. Delayed onset of inflammation in proteinase-activated receptor-2 deficient mice. *J Immunol* 2000; 165:6504-6501.

27. Sobey CG, Cocks TM. Activation of proteinase-activated receptor-2 elicits nitric oxide-dependent dilatation of the basilar artery in vivo. *Stroke* 1998;29:1439-1444.

Abstract

Effects of the Activation of Protease-Activated Receptor-2 on the Pathophysiology of Acute Pancreatitis

Kyung Hee Cho

*Department of Medicine(Medical Science)
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyung Hwan Kim, Bang Boo Youn)

After protease-activated receptor (PAR) was cloned, 4 subtypes of PARs, i.e., PAR1, PAR2, PAR3, and PAR4, were cloned. Among these PARs, it was revealed that PAR1, PAR3 and PAR4 are activated by thrombin in blood and PAR2, by trypsin from the pancreas to induce the Ca² signal within cells. Recently, it is accepted that PARs play an important role in the pathophysiologic mechanism of acute pancreatitis. However, no specific information was obtained on whether the activation of PARs could induce inflammatory reactions in pancreatic cells and cells in the body, i.e., vascular endothelial cells and immune cells, and especially whether they are related with systemic complications. Thus, the effects of PARs on pancreatic acinar cells and the mechanism involved were examined in the present study according to biologic and cellular physiologic methods. In addition, changes in functions of vascular endothelial cells and immune cells and systemic complications in acute pancreatitis were also

investigated in rats.

When pancreatic acinar cells were treated with trypsin and PAR2 agonist, the activation of PAR2 induced the Ca^{2+} signal within cells and activated NF- κ B but did not change cellular injury index. Immune cells (THP-1, originated from neutrophils) and vascular endothelial cells (HUVEC) treated with trypsin and PAR-2 agonist activated PAR2 and the Ca^{2+} signal within cells; and increased the synthesis of inflammatory signal mRNAs of eNOS, iNOS, and IL-8 and the production of nitric oxide(NO). PAR2 agonist significantly decreased blood pressure in the *in vivo* study using rats.

According to these results, the activation of PAR2 did not clearly induce injury in pancreatic acinar cells but activated pre-inflammatory responses, having the possibility of inducing inflammatory reactions. It also increased the signal related with inflammatory reactions and cytokine production and decreased blood pressure. Thus, we concluded that PAR-2 activated by trypsin freed into interstitial fluid in acute pancreatitis plays an important role in the development of systemic complications.

Key words: Protease-activated receptors(PARs), pancreatic acinar cells, immune cells, vascular endothelial cells, acute pancreatitis