

췌장 선세포에서 Cerulein에 의한
Cytokine 발현의 신호전달체계

연세대학교 대학원

의과학과

서 정 훈

췌장 선세포에서 Cerulein에 의한
Cytokine 발현의 신호전달체계

지도교수 정 재 복

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

서 정 훈

서정훈의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

숨가쁘게 달려온 지난 시간이 앞으로의 시간을 말해 주는 듯 새로운 마음을 가져옵니다. 그동안 실험을 계획하고 진행하는 동안 참으로 많은 분들로부터 영원히 잊지 못할 도움을 받았습니다. 박사학위 지도교수를 흔쾌히 받아들여 주시고 어려운 여건을 극복하는 지혜와 용기를 잃지 않도록 격려하여 주신 정재복 교수님, 그리고 실험을 계획하고 진행하는데 있어 하나씩 자상히 지도하고 해결 방법을 알려주신 김혜영 교수님, 관심과 열의를 아끼지 않으신 송시영 교수님, 늘 자상하고 온화한 조언을 해주신 김경환 교수님, 이우정 교수님, 이민구 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

다소 어려운 여건에서 실험을 진행하는데 있어 열과 성을 다 해준 이장원 연구원, 변치않은 우정을 가꾸었던 사랑하는 친구들인 이천균, 김태일, 김현수 선생님, 그리고 어렵고 힘든 환경에서도 많은 시간을 할애해 준 일산병원 내과 박인서, 조용석 선생님께도 감사드립니다.

무엇보다도 지금의 제가 있기까지 한없는 사랑과 희생을 베풀어 주시고, 또한 항상 저희 가족을 염려해 주시는 부모님과 처가 부모님에게도 다시 한번 깊이 감사드립니다.

끝으로 그동안 어려운 과정을 항상 곁에서 말없이 믿음과 희망으로 내조를 아끼지 않고, 가정에 온전한 관심을 기울이지 못했던만 아무런 문제없이 슬기롭게 가정을 지켜준 사랑하는 아내 김희선에게 이 논문을 바칩니다. 또한 지치고 힘들 때 그냥 바라보는 것만으로도 커다란 활력소가 된 아들 승환에게도 무한한 사랑을 전합니다.

저 자 씬

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 세포주 및 세포 배양	7
2. 실험 초안	7
3. Cytokine 발현	8
가. Cytokine mRNA	8
나. Cytokine 단백질	8
4. NF- κ B 및 AP-1 활성화	9
가. 세포핵 추출물	9
나. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	9
5. MAP kinase 활성화	10
6. 신호전달 억제방법	10
III. 결과	12
1. Cerulein에 의한 cytokine mRNA와 단백질 발현	12
2. Ras, NF- κ B, AP-1의 억제가 cerulein에 의한 cytokine mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향	12
3. Cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화	13
4. Ras, NF- κ B, AP-1의 억제가 cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화에 미치는 영향	13
5. Cerulein에 의한 MAP kinase 활성화	14
6. MAP kinase의 약리학적 억제제가 cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화, cytokine 발현에 미치는 영향	14
IV. 고 찰	26
V. 결 론	32
참고문헌	34
영문요약	41

그림 차례

Fig. 1. Time response of AR42J cells to cerulein for IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA and protein expression	16
Fig. 2. Effects of I κ B mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA expression in the AR42J cells treated with cerulein	17
Fig. 3. Effects of I κ B mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on IL-6, IL-1 β , TNF- α protein production in the AR42J cells treated with cerulein	18
Fig. 4. The time course of NF- κ B activation in the AR42J cells treated with cerulein	19
Fig. 5. Subunit composition of NF- κ B complexes in AR42J cells at 30 minutes after cerulein stimulation	20
Fig. 6. The time course of AP-1 activation in the AR42J cells treated with cerulein	21
Fig. 7. Subunit composition of AP-1 complexes in AR42J cells at 30 minutes after cerulein stimulation	22
Fig. 8. Effects of I κ B mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on NF- κ B and AP-1 activation in the AR42J cells caused by 30 minutes stimulation of cerulein	23
Fig. 9. Time response of AR42J cells to cerulein for MAP kinase activities	24
Fig. 10. Effects of pharmacological inhibitors of MAP kinases on NF- κ B and AP-1 activation or cytokine expression	25

국문요약

췌장 선세포에서 Cerulein에 의한 Cytokine 발현의 신호전달 체계

친염증성 cytokine이 췌장염의 발생 및 임상경과에 관련되어 있지만 초기 단계의 조절기전에 대해서는 체계적인 연구가 아직까지 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 AR42J 세포주에 cerulein을 처리한 췌장염 세포모델에서 친염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현이 ras, MAP kinase, NF- κ B, AP-1 등에 의해 영향을 받고, 또한 ras와 MAP kinase가 NF- κ B와 AP-1의 상위조절자임을 규명하고자 하였다. Ras, NF- κ B, AP-1을 억제하기 위해 AR42J 세포에 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection하였고, 대조군으로 야생종 세포와 pcDNA를 transfection한 세포를 이용하여 비교 분석하였다. 그리고 MAP kinase의 역할은 cerulein에 의한 ERK, JNK, p38 MAPK 활성화와 ERK와 p38 MAPK에 대한 약리학적 억제제를 전처리한 후 NF- κ B와 AP-1 활성화 그리고 cytokine 발현을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. AR42J 세포에 cerulein (10^{-8} M)을 처리하였을 경우 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) mRNA는 cerulein 노출 1~2시간 후에 발현되어 4시간까지 지속되었고, cytokine 단백질은 노출시간에 비례하여 발현이 증가하였다.

2. Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection하여 ras, NF- κ B, AP-1을 억제하였을 때 cerulein에 의한 cytokine mRNA와 단백질 발현은 야생종 세포나 pcDNA를 transfection한 세포와 비교하여 현저하게 억제되었다.

3. Cerulein에 의한 NF- κ B의 활성화는 노출 30분내에 활성화되었고, 이후 감소하다가 4~6시간 후에 다시 활성화되는 시간에 따른 2단계 활성을 보였고, Ras N-17, TAM67을 각각 transfection한 세포에서는 대조군 세포와 비교하여 cerulein에 의한 NF- κ B 활성이 모두 억제되어 NF- κ B 활성이 ras와 AP-1의 활성화에 영향을 받았다.

4. Cerulein에 의한 AP-1의 활성화는 노출 30분에 활성화되어 6시간동안 지속되었는데, Ras N-17를 transfection한 세포에서는 대조군 세포에 비해 cerulein에 의한 AP-1의 활성이 현저히 억제되었으나, I κ B mutant를 transfection한 세포에서는 억제되지 않아 AP-1의 활성이 ras의 활성화에는 영향을 받았으나 NF- κ

B 활성과는 무관하였다.

5. Cerulein 처치 후 3가지 형태의 MAP kinases (ERK, JNK, p38 MAPK)가 모두 조기에 활성화되었다.

6. U0126 또는 PD98059를 전처치하여 ERK를 억제하였을 때 cerulein에 의한 NF- κ B와 AP-1활성 및 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현은 전처치하지 않은 세포와 비교시 감소하였으나, SB203580를 전처치하여 p38 MAPK를 억제시에는 전사인자 활성 및 cytokine 발현이 감소하지 않았다.

이상의 결과로 AR42J 세포에서 cerulein에 의한 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현은 ras, MAPK, NF- κ B, AP-1 등에 의해 조절됨을 알 수 있었다. 그리고 ras가 NF- κ B와 AP-1경로의 상위 조절자이고, 또한 전사인자인 NF- κ B와 AP-1는 MAP kinase 특히 ERK의 하위매개체일 것으로 추정된다. 또한 NF- κ B의 활성화에서 AP-1의 활성이 필요한 요소임을 규명하였다. 따라서 췌장 선세포에서 염증반응에 관여하는 cytokine 유전자 발현의 신호전달체계를 차단하는 치료가 개발된다면 췌장염의 경과를 완화시키는데 도움이 될 것으로 생각된다.

핵심되는 말 ; AR42J 세포, Cytokine, MAPK, NF- κ B, AP-1

췌장 선세포에서 Cerulein에 의한 Cytokine 발현의 신호전달체계

<지도 정 재 복 교수>

연세대학교 대학원 의과학과

서 정 훈

I. 서 론

췌장염의 발생기전은 병리생태학적 이해의 진전에도 불구하고 아직까지 명확하게 규명되지 않고 있다. 현재까지 췌장염의 기전에 관한 연구는 해부학적 특성상 인체에서 조직을 얻기가 쉽지 않아서 대부분 동물실험에 의존하고 있다. 동물에서 실험적 췌장염을 유발시키는 방법으로는 stress, cerulein주입, choline 결핍성 methionine 강화식이, taurocholate 주입 등 다양한 방법이 있다.^{1,2} 이중 광범위하게 이용되는 실험적 모델은 급성 부종성 췌장염을 빠르고 반복적으로 유도할 수 있는 cholecystokinin (CCK) analog인 cerulein을 고용량으로 투여하는 것이다.³ 이러한 실험적 췌장염으로 유도되는 반응은 췌장의 부종, 세포질의 공포형성, 선세포의 괴사, 부종형성, 췌장내로의 염증세포침윤 등 인체의 췌장염과 유사한 반응을 보이므로 췌장염의 병인 규명을 위한 연구로 널리 이용되고 있다. 췌장 선세포에서 cerulein의 작용기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 고용량의 cerulein 투여시 lipid peroxide (LPO)와 H₂O₂와 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 증가되어 췌장염을 유발하는 것으로 추정된다.⁴

활성산소는 췌장염의 발병에 중요한 역할을 하고,^{2,5} 이러한 활성산소는 췌장염의 초기 단계에서 발생한다고 알려져 있다.⁶ 실험적 췌장염에서 활성산소에 대한 항산화제를 투여한 경우 cerulein 유도성 췌장염에서 췌장조직의 부종 감소와 혈청 amylase 증가가 완화되었다.⁷ 한편 인체의 급성 췌장염에서도 담즙 및 췌장조직에서 지질과산화물의 증가와 혈중 항산화비타민의 감소를 보였다.^{8,9} 따라서 활성산소는 다양한 염증반응을 유도하는 시발점이 되고, 췌장염을 지속시키고 췌장외 합병증을 유발하는데 중추적 역할을 하는 것으로 생각된다.¹⁰

췌장염의 발생 및 진행에서 interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 친염증성 cytokine, chemokines, 부착분자, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등의 발현이 중요한 역할을 하고,^{11,12} cytokine의 활성 정도는 질병의 중증도나 이환율과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.¹³ 이러한 분자의 발현은 인체 및 실험적 췌장염에서 증가되어 있고,¹⁴⁻¹⁸ 약리학적 억제제나 항길항제¹⁹, 중화항체^{18,20} 및 유전자적 접근¹⁷을 통해 췌장염에서의 역할이 증명되었다. 이와같이 cytokine이 췌장염의 발생 및 임상경과에 중요한 역할을 하지만, 초기단계에서의 조절기전에 대해서는 아직 분명치 않다.

활성산소는 전사인자를 활성화시키고, 직접 또는 간접적으로 다른 신호체계에 영향을 주어 여러 반응을 조절한다. 활성산소에 의한 cytokine과 같은 염증분자의 발현에서 주된 세포조절기전으로는 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)²¹와 activator protein-1 (AP-1)²²이 알려져 있다. Cytokine 유전자의 promotor에는 NF- κ B와 AP-1에 대한 결합장소가 포함되어 있어 조절을 받는다.²³ 한편 이러한 전사인자는 염증유발 유전자의 활성 뿐 아니라 세포사멸과 증식에도 관여하며,^{24,25} 세포의 종류에 따라 산화환원 상태가 활성에 밀접하게 관련된다.²⁶

NF- κ B는 세포의 성장과 분화, 염증반응, 면역반응에 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자이고,²⁷ Rel homology domain을 공유하는 단백질군으로 DNA에 homodimer 또는 heterodimer로 결합한다.²¹ NF- κ B의 Rel family member에는 p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), Rel A (p65), c-Rel, Rel B, 그리고 *Drosophila morphogen dorsal gene product*가 있다.²⁸ NF- κ B에 의해서 유도되는 유전자는 대부분의 경우 세포 스트레스에 반응하는 조기반응유전자로 cytokine, 성장인자, 부착분자, acute phase 단백 등의 유전자를 활성화시킨다.²⁹ 대부분의 전사인자와는 다르게 NF- κ B는 비자극상태에서 세포질내에서 inhibitory subunit인 I κ B family (I κ B α , I κ B β , Bcl-3 등)와 결합체를 이루고 있다.²⁷ 세포가 바이러스, 세균, mitogen, 활성산소, 친염증성 cytokine 등의 유도체에 의해 자극을 받았을 경우 I κ B가 인산화과정을 통해 분리되고, NF- κ B dimer가 핵내로 이동하여 목표유전자의 조절부위에서 κ B motif를 포함하는 DNA 인지장소에 결합함으로써 유전자를 활성화시킨다.³⁰ 이러한 DNA 결합의 선택성은 부분적으로는 p65, p50, c-Rel과 같은 NF- κ B의 여러 subunit에 의해 조절되고,²⁸ 활성화되는 NF- κ B/Rel dimer의 형태나 활성정도가 염증반응의 정도나 특성을 결정하게 된다.³¹ 췌장에서 NF- κ B의 활성이 염증, 세포손상, 세포괴사에 관련된 유전자표현을 조절하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

AP-1은 Jun와 Fos family의 complex로 구성되어 있다.³² Jun family 단백질에는 c-Jun, Jun-B, Jun-D 등이 있고, Fos family에는 c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2 등의 구성원이 있어 Jun/Jun homodimer, 또는 Jun/Fos heterodimer를 형성한다. AP-1은 정상적으로 핵내에 존재하다가 성장인자나 cytokine 등과 같은 세포외 자극에 의해 활성화되면 DNA내의 phorbol ester 또는 cAMP responsive site에 결합하여 유전자 발현을 유도한다.³³ AP-1은 세포의 손상, 증식, 재생, 분화에 중요한 유전자 발현을 조절하고, cytokine 발현에도 관여한다.²² 세포형태에 따라 산화조건이나 항산화 조건 모두에서 유도될 수 있는 산화환원 민감 전사인자로 알려져 있고,³⁴ 또한 다양한 자극에 의한 MAP kinase의 활성이 c-Fos와 c-Jun을 인산화시켜 AP-1의 활성을 증가시킬 수 있다.³² 최근 인체의 위상피세포인 MKN45나 Kato III세포에서 IL-8 유전자의 발현에 AP-1이 관련되어 있고,^{35,36} AGS 세포에서도 *Helicobacter pylori*에 의해 유도된 염증반응에서 AP-1이 IL-8의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있지만,³⁷ 췌장염에서의 연구는 미미한 실정이다.

Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)는 serine/threonine-specific, proline-directed protein kinase로서 주요 기능은 외부자극을 특정 전사인자에 전달하여 유전자 발현을 조절하는데 관여한다. 이러한 MAP kinase에는 extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK 등의 3가지 아형이 있다. ERK는 주로 mitogen에 의해 자극이 되는 반면, JNK와 p38 MAPK는 열, 자외선, 방사선, 염증성 cytokine 등 세포 스트레스에 의해 활성화된다.³⁸ 한편 활성산소가 MAP kinase를 활성화시키고, 항산화제가 MAP kinase 활성을 억제한다는 사실은 활성산소가 MAP kinase를 통한 신호전달 체계를 유도할 수 있음을 시사한다.^{38,39} AP-1 활성은 다양한 자극에 반응하여 MAP kinase에 의해 조절되고,⁴⁰ NF- κ B 활성은 JNK와 p38 MAPK의 상위 kinase인 MEKK1에 의해 조절된다.^{41,42}

췌장염에서 cytokine이 질병의 발생 및 임상 경과와 관련되어 있지만, 초기 단계에서 조절기전에 대해서는 단편적인 보고가 있을 뿐 체계적인 연구는 아직까지 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 AR42J 세포주에 cerulein을 처리한 췌장염 세포모델에 의한 친염증성 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현이 ras, MAP kinase, NF- κ B, AP-1 등에 의해 영향을 받고, 또한 ras와 MAP kinase가 NF- κ B와 AP-1의 상위조절자임을 규명하여 췌장염 발생에서의 신호전달체계를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 흰쥐 췌장 선세포의 유도체인

AR42J 세포주에서 cerulein (10^{-8} M)에 의한 췌장염 세포모델을 확립하여 ① 친염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현 및 MAP kinase, NF- κ B, AP-1의 활성을 관찰하고, ② AR42J 세포에 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection하여 ras, NF- κ B, AP-1의 경로를 억제하였을 때 cerulein에 의한 NF- κ B, AP-1활성 및 cytokine 발현 변화를 측정하였으며, ③ cerulein 처치 후 MAP kinase (ERK, JNK, p38 MAPK)의 활성과 MAP kinase의 약리학적 억제제를 전처치한 후 전사인자인 NF- κ B와 AP-1 활성 및 cytokine 발현의 변화를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 및 세포 배양

실험 세포주는 azaserine에 의하여 유도된 백쥐 선세포 종인 AR42J 세포주를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 배양액으로는 10% FBS가 함유된 DMEM을 이용하였고, cell viability는 trypan blue exclusion test로 확인하였다.

2. 실험 초안

AR42J 세포는 12-well culture plate에 DMEM 배양액에서 10^6 /ml의 밀도로 배양하였다. 배양시간에 따른 cytokine의 발현은 cerulein (10^{-8} M)을 처리한 후 시간별로 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA와 단백질 발현을 측정하여 확인하였다. Cytokine mRNA는 배양시와 cerulein 처리 후 각각 1, 2, 3, 4시간동안 배양한 후 핵에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행하였다. Cytokine 단백질은 배양시와 cerulein 처리 후 6, 12, 18, 24시간동안 배양하여 배양액에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 한편 배양시간에 따른 NF- κ B와 AP-1 활성 변화는 배양시와 cerulein (10^{-8} M) 처리 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 후에 electrophoretic mobility assay (EMSA)로 측정하였다. NF- κ B와 AP-1 활성의 특이도를 확인하기 위해 cold competition 실험을 하였고, 구성 성분을 분석하기 위해 supershift 실험을 하였다. Ras, NF- κ B, AP-1이 cerulein에 의한 전사인자 활성과 cytokine 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 AR42J 세포주에 Ras N-17 (a specific H-Ras dominant negative gene), I κ B mutant, TAM67 (a specific c-Jun dominant negative gene)를 transfection하였고, control vector로는 pcDNA를 transfection하였다. 각각의 세포는 transfection후 15시간동안 배양하였고, 배양액을 교환하여 6시간을 추가 배양하였다. Cytokine mRNA와 단백질은 cerulein을 처리한 후 각각 2시간과 18시간, NF- κ B와 AP-1 활성은 cerulein 처리 30분 후에 측정하였다. Cerulein (10^{-8} M)에 의한 MAP kinase의 시간에 따른 활성은 배양시와 cerulein (10^{-8} M)을 처리한 후 5분, 10분, 15분, 20분, 30분에 western blot으로 확인하였다. 그리고 MAP kinase의 화학적 억제제를 cerulein 노출 1시간 전에 전처리한 후 cerulein에 의한 NF- κ B 와 AP-1 활성을 EMSA로 확인하였고, cytokine mRNA는 RT-PCR로 측정하였다.

3. Cytokine 발현

가. Cytokine mRNA

AR42J 세포에서 cytokine mRNA 발현은 RT-PCR을 이용하여 측정하였는데, internal control로서 housekeeping gene GAPDH을 이용하여 표준화하였다. 총 RNA는 guanidine thiocyanate extraction method에 의하여 췌장 선세포로부터 추출하였다.⁴³ Random hexamer primer 50 pg, each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 500 μ M, RNase inhibitor 25 U, Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase 200 U를 25 μ l로 맞추어 priming하여 (37°C, 1시간) 총 RNA 2 μ g에서 cDNA를 합성하였다. RNA 160 ng과 동량의 cDNA를 각 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)에 맞는 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 0.6 U Tag polymerase를 최종부피 20 μ l로 하여 시행하였다. 총 RNA는 DNA로 역전사되고 cytokine과 GAPDH에 대한 rat-specific primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. IL-1 β primer에 대한 sequence는 5'-TCC TAG GAA ACA GCA ATG GTC G-3'(forward primer)와 5'-TTC ATC CCA TAC ACA CGG ACA AC-3'(reverse primer)였다. IL-6 primer의 sequence는 5'-CTG GTC TTC TGG AGT TCC GTT TC-3'(forward primer)와 5'-CAT AGC ACA CTA GGT TTG CCG AG-3'(reverse primer)였다. TNF- α 의 sequence는 5'-CTC AAA GAC AAC CAA CTG GTG GTA C-3'(forward primer)와 5'-ACA GAG CAA TGA CTC CAA AGT AGA CC-3'(reverse primer)였다. GAPDH sequence는 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'(forward primer)와 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'(reverse primer)였다. PCR은 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension하여 32 cycle반복하였다. PCR products는 0.5 μ g/ml ethidium bromide를 함유하는 1.5% agarose gel에서 분리되어 UV transillumination에서 확인되었다.

나. Cytokine 단백질

배양액내 측정된 IL-6, IL-1 β , TNF- α 단백질은 정해진 시간에서 ELISA kit (R&D System, Minneapolis, Minnesota)를 이용하였다. 각각의 well에 시료를

주입하고 2시간동안 배양하였다. Kit의 세척액으로 4회 실행하고 biotin-conjugate 로 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 세척액으로 4회 실행하고 streptavidin-HRP 시약으로 30분간 반응시킨 후 chromogen 시약으로 빛 차단 하에 실온에서 30 분간 발색시켰다. Kit의 정지용액을 가한 후 405nm에서 ELISA reader를 사용하여 정량하였다.

4. NF- κ B 및 AP-1 활성화

가. 세포핵 추출액

배양이 끝난 세포(1×10^6 cell/ml)는 ice-cold PBS로 2회 세척하고 100 μ l의 고염액(high salt buffer)에 재분산시켰다. 고염액은 20 mM HEPES, pH 7.6, 200 mM NaCl, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 0.5 mM dithiothreitol (DDT), 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 및 0.001% aprotinin으로 구성하였다. 얼음 위에서 15분간 방치한 후 cell lysate는 원심분리하고 상층액은 -70°C 에 보관하여 단백질 정량 및 NF- κ B, AP-1 활성화 측정에 사용하였다.

나. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)는 Dignam 등⁴⁴에 의해 보고된 방법을 이용하였다. NF- κ B gel shift oligonucleotide(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGGC-3')과 AP-1 gel shift oligonucleotide(5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3') (Promega Corp, Madison, Wisconsin, USA)를 T4 polynucleotide kinase (Gibco-BRL)를 이용한 [³²P]dATP (Amersham)에 반응시켰다. End-labelled probe은 Bio-Rad purification column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)를 이용하여 unincorporated [³²P]dATP로부터 정제되었고 Tis EDTA buffer (TE)에서 회복되었다. 세포핵 추출물(10 μ g)은 12% glycerol, pH 7.912 mM HEPES, pH 7.94 mM Tris HCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.04 μ g/ml poly[d(I-C)] (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana, USA), 0.4 mM PMSF, TE 등이 함유된 buffer에서 preincubation되었다. Labelled probe가 첨가되고 추출물 (sample)은 10분 동안 얼음에서 incubation되었다. 추출물은 nondenaturing 5%

acrylamide gel에서 $0.5 \times$ Tris borate EDTA buffer를 이용하여 electrophoretic separation을 하였다. Gel은 80°C 에서 1시간동안 건조한 후 Kodak X-ray film에 하룻밤(overnight) 노출시켰다. NF- κ B와 AP-1 활성(binding activity)의 특이도를 확인하기 위해 cold(unlabelled) AP-1 oligonucleotide, cold mutant type NF- κ B oligonucleotide, cold wild type NF- κ B oligonucleotide를 100배 첨가하여 cold competition 실험을 시행하였다. Supershift 실험은 ^{32}P -labeled oligonucleotide probe와 배양하기 전에 NF- κ B subunit(p65 항체와 p50 항체)과 AP-1 subunit(Jun과 Fos 항체)에 대한 rabbit polyclonal antibodies와 4°C 에서 1시간동안 먼저 배양하였다.

5. MAP kinase 활성

세포는 0.5% Triton X-100과 protease inhibitor mixture (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana, USA)를 함유하는 Tris HCL (pH 7.4) buffer에서 균질화시켰다. 각각의 sample에서 14,000 g soluble supernatant의 단백질 농도는 Bradford 방법⁴⁵으로 측정되었다. 100 μg 의 세포단백질은 lane에 loading되어 환원 조건에서 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 의해 분리하여(10 mA, 3.5시간) nitrocellulose로 transfer하였다(10 V, 2시간). MAP kinase 활성을 알아보기 위하여 세포추출액으로부터 phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38 MAPK에 대한 각각의 항체를 이용하여 western blotting을 수행하였다. 이차항체로 goat radish peroxidase가 붙은 immunoglobulin G를 사용하고, 발광반응 측정은 enhanced chemilluminescence kit을 사용하였으며, X-ray 필름에 노출시켜 단백을 확인하였다.

6. 신호전달 억제방법

Mutant transfection을 이용하여 ras, NF- κ B, AP-1을 억제한 세포와 MAP kinase의 약리학적 억제제를 전처리하여 MAP kinase를 억제한 세포에서 cerulein (10^{-8}M)을 투여한 후 NF- κ B와 AP-1 활성 및 cytokine 발현을 측정하여 비교하였다. ERK의 활성을 억제하기 위해서 MEK1/2의 특이적인 억제제인 U0126 10 μM 또는 MEK1의 특이적인 억제제인 PD98059 30 μM 을 전처리하였고, p38 MAPK를 억제하기 위하여 pyridinyl imidazoles인 SB203580 10 μM 을 전처리하였다 (Calbiochem[®] Biochemicals). 또한 ras, NF- κ B, AP-1을 억제하기

위하여 AR42J 세포주에 Ras N-17, IκB mutant, TAM67을 18시간동안 transfection하였다. Transfection에 사용된 매개물질로는 DOTAP liposomal transfection reagent; N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium methylsulfate를 사용하였다.

III. 결 과

1. Cerulein에 의한 cytokine mRNA와 단백질 발현

Cerulein (10^{-8} M)을 처치한 AR42J 세포에서 RNA을 분리하여 cerulein 노출시간에 따른 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현을 확인하였다. IL-6 mRNA는 1시간 후 그리고 IL-1 β 와 TNF- α mRNA는 2시간 후에 발현되기 시작하였고, 모두 4시간까지 지속적으로 발현되었다(Fig. 1A). 한편 cerulein (10^{-8} M)을 처치한 AR42J 세포의 배양액에서 측정된 cytokine 단백질(pg/ml)은 cerulein 노출 전과 노출 후 6시간 간격으로 24시간동안 측정하였다. Cerulein 노출 0, 6, 12, 18, 24시간 후의 cytokine 단백질 발현 정도는 각각 IL-6 0, 21.3, 28.9, 38.2, 39.6, IL-1 β 0, 30.1, 44.6, 65, 69.2, TNF- α 0, 24.1, 44.2, 57.5, 60.7 pg/ml로 노출시간에 비례하여 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 1B).

2. Ras, NF- κ B, AP-1의 억제에 의한 cerulein에 의한 cytokine mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

Ras, NF- κ B, AP-1이 cytokine의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 AR42J 세포에 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67를 각각 transfection하였다. 그리고 control vector로 pcDNA를 transfection한 세포를 이용하였다. 각각의 세포는 transfection 15시간 후에 새로운 배지로 교환하였고, 6시간이 경과한 후 cerulein (10^{-8} M)을 처치하였다. 배양액에 cerulein을 처치한 후 mRNA과 단백질 분석을 위해 각각 2시간과 18시간동안 배양하였다. Cerulein 처치 2시간 후 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA의 발현은 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67를 각각 transfection한 세포에서 모두 부분적으로 감소하였다(Fig. 2). Cytokine 단백질 (pg/ml)은 cerulein을 18시간동안 처치한 후 배양액에서 ELISA를 이용하여 측정하였다. IL-6 단백질은 야생종 세포와 pcDNA transfection 세포에서 cerulein을 처치 전 각각 0.78, 2.15에서 처치 후 23.2, 24.73 pg/ml로 현저히 증가하였으나, Ras N-17, I κ B mutant, TAM67를 transfection한 세포에서는 cerulein 처치 전 각각 2.38, 2.25, 2.29에서 처치 후 7.04, 5.11, 7.62 pg/ml로 cerulein에 의한 단백질 발현증가가 대조군에 비해 현저히 억제되었다. IL-1 β 단백질은 야생종 세포와 pcDNA transfection 세포에서 cerulein 처치 전 각각 23.4, 34.2에서 처치 후 88.6, 78.7 pg/ml로 현저히 증가하였으나, Ras N-17, I κ B mutant, TAM67

을 transfection한 세포에서는 처치 전 각각 31.5, 26.4, 33.5에서 47.2, 48.7, 39.3 pg/ml로 cerulein에 의한 단백질 발현 증가가 억제되었다. 한편 TNF- α 단백질은 야생종 세포와 pcDNA transfection 세포에서 cerulein 처치 전 각각 28, 30.4에서 처치 후 43.5, 49.8 pg/ml로 증가하였고, Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection한 세포에서는 처치 전 각각 27.8, 26.2, 25.3에서 처치 후 39.6, 34.8, 36.5 pg/ml로 cerulein에 의한 단백질 발현증가가 IL-6나 IL-1 β 에 비해 부분적으로 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 AR42J 세포에서 cerulein에 의한 친염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현증가가 ras와 전사인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성화와 밀접한 관계가 있음을 암시한다.

3. Cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화

AR42J 세포에서 cerulein에 의한 NF- κ B와 AP-1 활성화의 시간에 따른 변화를 관찰하기 위해 cerulein (10^{-8} M)을 6시간동안 처치하였다. Cerulein에 의한 NF- κ B 활성화는 30분내에 강하게 활성화되었고, 이후 감소하다가 4-6시간후에 다시 활성화되는 시간에 따른 2단계 활성화(biphasic or two-phase time course)를 보였다(Fig. 4). NF- κ B 활성화의 특이도를 확인하기 위해 cold(unlabelled) AP-1 oligonucleotide, cold mutant type NF- κ B oligonucleotide, cold wild-type NF- κ B oligonucleotide를 첨가하여 cold competition 실험을 시행하였는데, cold wild-type NF- κ B oligonucleotide만이 NF- κ B DNA binding probe와 경쟁을 하였다(Fig. 5A). 한편 NF- κ B complex의 구성을 분석하기 위해 p65(Rel A)와 p50에 대한 항체를 이용하여 supershift 실험을 시행하였는데, p65 항체와 p50 항체 모두에서 clear supershift를 보였기 때문에 NF- κ B complexes에는 p65와 p50이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 5B). AP-1은 cerulein 처치 30분 후 활성화되어 6시간 후까지 지속되었다(Fig. 6). AP-1 활성화의 특이도는 cold AP-1 oligonucleotide가 AP-1 DNA binding probe와 경쟁함으로써 확인하였고(Fig. 7A), AP-1에 대한 supershift 실험에서는 Jun과 Fos 단백질에 대한 항체 모두에서 AP-1의 specific band의 강도가 감소하였다(Fig. 7B).

4. Ras, NF- κ B, AP-1의 억제가 cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화에 미치는 영향

Ras와 AP-1의 활성화가 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향과 ras와 NF- κ B가 AP-1

의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 AR42J 세포에 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 각각 transfection하였고, control vector로 pcDNA를 transfection한 세포를 이용하였다. 각각의 세포는 transfection 15시간 후 새로운 배지로 교환하였고, 6시간이 경과한 후 cerulein (10^{-8} M)을 처리하였다. NF- κ B 및 AP-1 활성을 분석하기 위해 배양액에 cerulein을 처리한 후 30분동안 배양한 후 세포의 핵추출물을 이용하여 측정하였다. NF- κ B의 활성화는 야생종 세포와 pcDNA를 transfection한 세포에서 cerulein 처리 후 현저히 증가하였으나, Ras N-17와 TAM67을 각각 transfection한 세포에서는 cerulein에 의한 NF- κ B 활성이 모두 억제되었다(Fig. 8A). 한편 cerulein에 의한 AP-1의 활성화는 Ras N-17를 transfection한 세포에서 야생종 세포와 pcDNA를 transfection한 세포에 비해 현저히 억제되었으나, I κ B mutant를 transfection한 세포에서는 억제되지 않았다(Fig. 8B). 이러한 결과는 cerulein에 의한 cytokine 발현에서 NF- κ B 및 AP-1이 ras의 하위매개체임을 암시하며, 또한 AP-1의 활성화증가가 NF- κ B의 활성화에 필요한 조건임을 시사한다.

5. Cerulein에 의한 MAP Kinase 활성화

AR42J 세포에서 cerulein에 의한 MAP kinase의 시간에 따른 활성을 알아보기 위하여 cerulein을 30분동안 처리한 후 phosphospecific MAP kinase 항체 (p-ERK, p-JNK, p-p38 MAPK)를 이용하여 western blotting으로 측정하였다. Cerulein(10^{-8} M)을 처리 후 인산화된 형태의 ERK(분자량: 46-50 KD), JNK(분자량: 46-55 KD), p38 MAPK(분자량: 42 KD)는 모두 5~10분 후에 최대로 활성화되다가 이후에 감소되었다(Fig. 9). 따라서 cerulein에 의한 cytokine 발현에서 3종류의 MAP kinase가 모두 조기에 활성화됨을 알 수 있었다.

6. MAP Kinase의 약리학적 억제제가 cerulein에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화, cytokine 발현에 미치는 영향

MAP kinase가 NF- κ B 및 AP-1 활성화, 그리고 cytokine 발현의 상위조절자임을 확인하기 위해 MEK 또는 p38 MAPK의 약리학적 억제제를 이용하였다. ERK를 억제하기 위해 U0126 10μ M 또는 PD98059 30μ M, p38 MAPK의 억제는 SB203580 10μ M을 1시간 전에 전처리한 후 cerulein (10^{-8} M)을 투여하였다. NF- κ B와 AP-1 활성화는 cerulein 처리 30분 후에 핵추출물을 이용하여 EMSA로

측정하였고, cytokine mRNA 발현은 cerulein 처치 2시간 후에 핵에서 RNA를 분리하여 RT-PCR로 확인하였다. NF- κ B는 U0126 또는 PD98059를 전처치하였을 때는 전처치하지 않은 세포에 비해 cerulein에 의한 활성이 억제되었으나, SB203580를 전처치한 경우는 활성이 저하되지 않았다(Fig. 10A). 또한 cerulein에 의한 AP-1 활성증가도 NF- κ B와 유사하게 U0126 또는 PD98059를 전처치하였을 경우에만 억제되었다(Fig. 10B). 그리고 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현은 U0126 또는 PD98059를 전처치시 cerulein에 의한 활성이 억제되었으나 SB203580를 전처치한 경우에는 억제제를 투여하지 않은 경우와 차이가 없었다(Fig. 10C). 이상의 결과는 cerulein에 의한 cytokine 발현에서 MAP kinase 특히 ERK가 NF- κ B 및 AP-1활성, cytokine 발현에 중요한 조절자임을 시사한다.

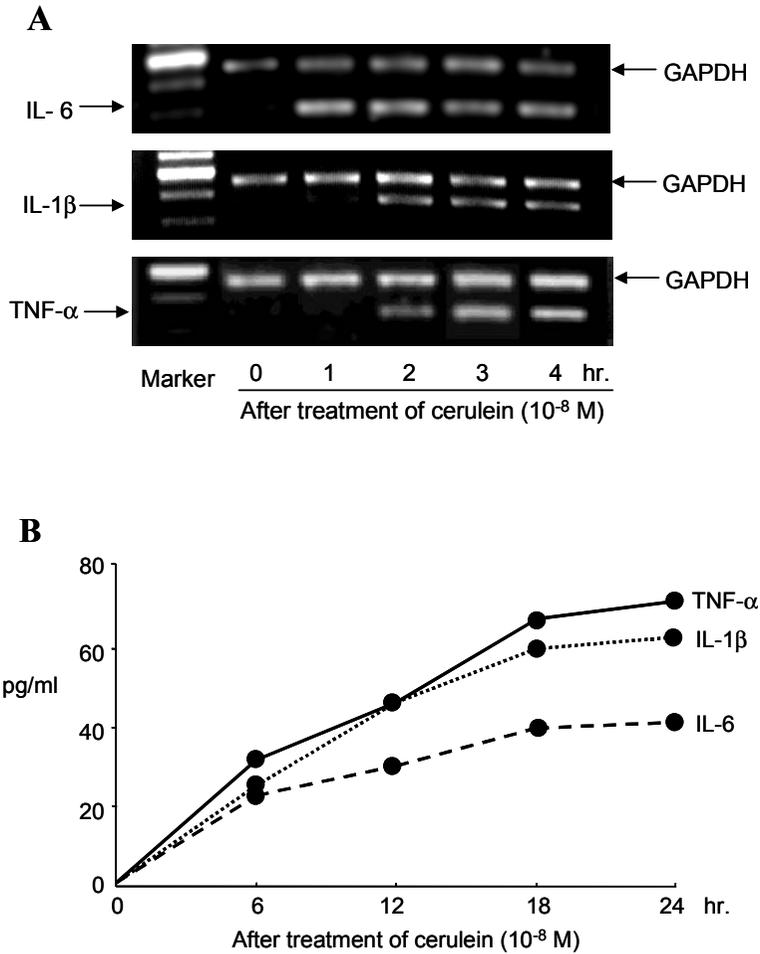


Fig. 1. Time response of AR42J cells to cerulein for IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA and protein expression. **(A)** Cytokine mRNA expression in AR42J cells treated with cerulein (10^{-8} M) was assessed at an indicted time point, as determined by RT-PCR. The internal standard(GAPDH) was coamplified with each cytokines. mRNA expression of cytokines were evident at 1 to 2 hours. **(B)** Cytokine protein level(pg/ml) in the culture medium from AR42J cells treated with cerulein (10^{-8} M) was determined at the indicated time point using ELISA. Cerulein caused a time-dependent increase of cytokine protein expression.

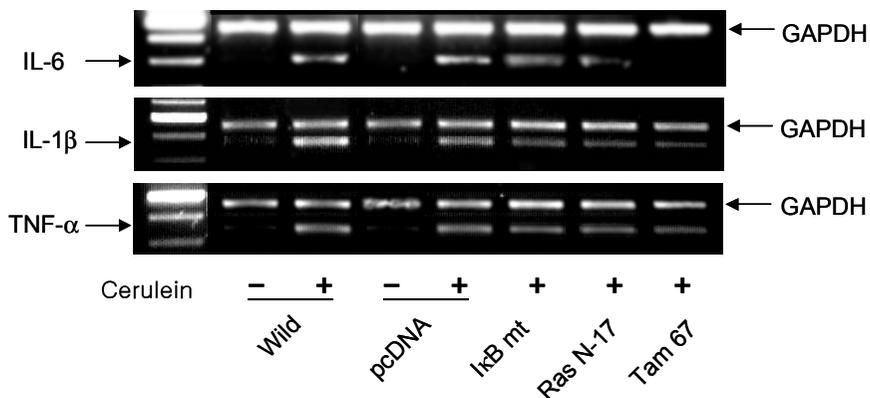


Fig. 2. Effects of $\text{I}\kappa\text{B}$ mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA expression in the AR42J cells treated with cerulein. The AR42J cells were treated with cerulein (10^{-8}M) in the presence of $\text{I}\kappa\text{B}$ mutant, Ras N-17, TAM67 transfection for 2 hours. Cytokine mRNA expression was determined by RT-PCR. The internal standard(GAPDH) was coamplified with each cytokine. Wild = non-transfected cells; pcDNA = control vector. The cerulein-induced cytokine mRNA expression was inhibited in transfected cells with $\text{I}\kappa\text{B}$ mutant, Ras N-17, TAM67 compared with wild-type cells or pcDNA cells.

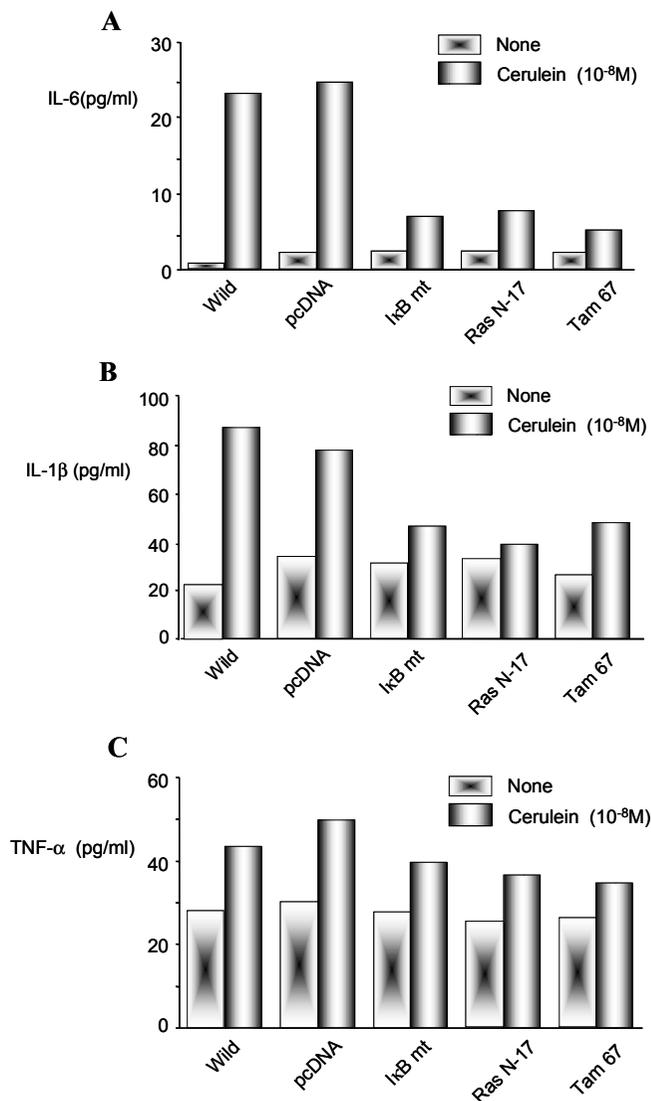


Fig. 3. Effects of IkB mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on IL-6(A), IL-1 β (B), TNF- α (C) protein production in the AR42J cells treated with cerulein. The AR42J cells were treated with cerulein (10⁻⁸M) in the presence of IkB mutant, Ras N-17, TAM67 transfection for 18 hours. The cytokine protein expression was determined by an ELISA. Wild = non-transfected cells; pcDNA = control vector. The cerulein-induced cytokine protein expression in the culture medium was inhibited in transfected cells with IkB mutant, Ras N-17, TAM67 compared with wild-type cells or pcDNA cells.

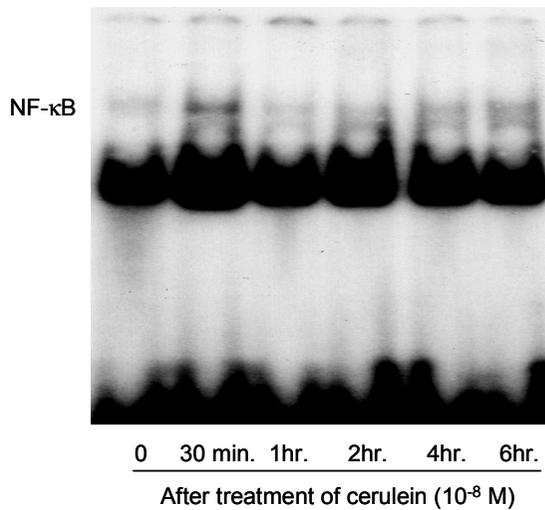


Fig. 4. The time course of NF- κ B activation in the AR42 cells treated with cerulein. The AR42J cells were treated with cerulein (10^{-8} M) and cultured for 6 hours. Nuclear extracts were prepared from AR42J cells and subjected to electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for NF- κ B DNA binding activity. NF- κ B activation induced by cerulein displayed a biphasic time course. The NF- κ B DNA binding activity increased within 30 min of cerulein treatment, and then decreased substantially by 1 h. A second wave of NF- κ B activation was prominent at 4~6 h after cerulein treatment.

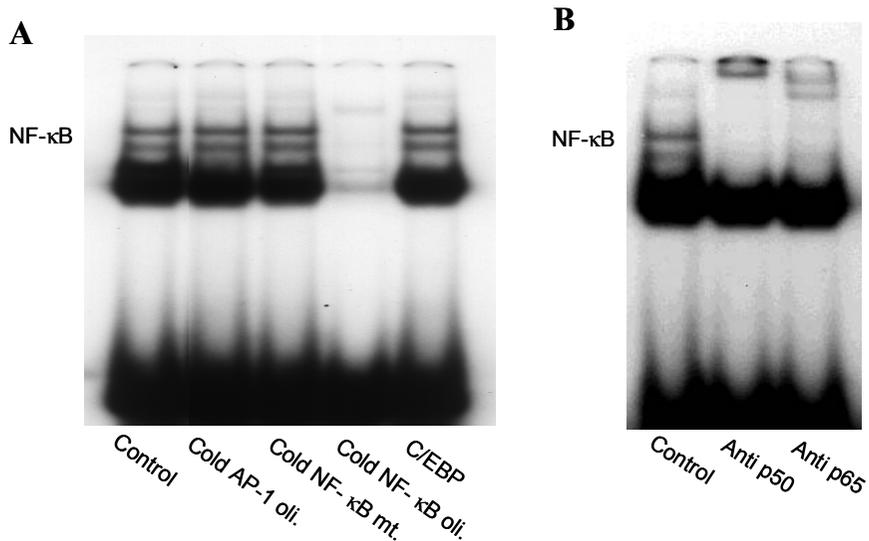


Fig. 5. Subunit composition of NF-κB complexes in AR42J cells at 30 minutes after cerulein (10^{-8} M) stimulation. **(A)** Cold competition experiments confirming the specificity of NF-κB binding by adding $100\times$ molar excess of unlabelled(cold) AP-1 oligonucleotide or cold NF-κB mutated oligonucleotide, or cold wild-type NF-κB mutated oligonucleotide. Only wild-type, and not mutated, NF-κB oligonucleotide competed with the probe for the NF-κB DNA binding. **(B)** Supershift analysis using antibodies to p65 and p50 NF-κB proteins. Antibody against p65 or p50 produced a clear supershift indicating p65 and p50 proteins are present in the NF-κB complex.

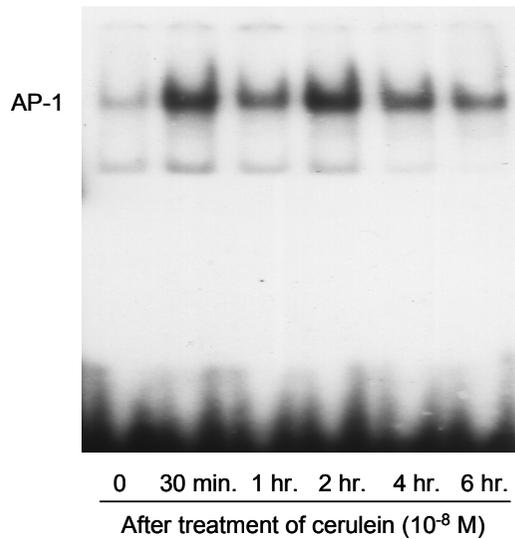


Fig. 6. The time course of AP-1 activation in the AR42J cells treated with cerulein. The AR42J cells were treated with cerulein (10^{-8} M) and cultured for 6 hours. The AP-1 DNA binding activity in nuclear extract was determined by EMSA. Cerulein induced AP-1 activation after 30 minutes, and it remained elevated at 6 h.

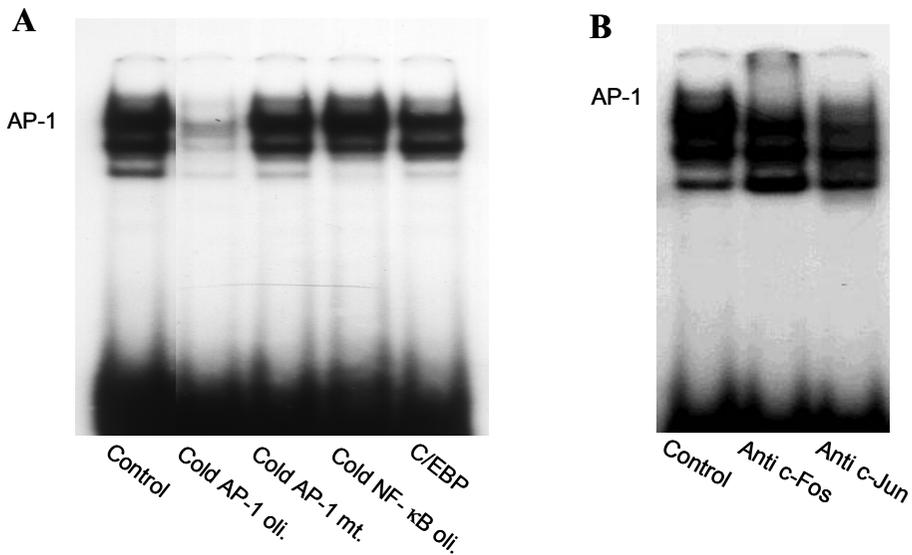


Fig. 7. Subunit composition of AP-1 complexes in AR42J cells at 30 minutes after cerulein (10^{-8} M) stimulation. **(A)** Cold competition experiments confirming the specificity of AP-1 binding by adding $100\times$ molar excess of unlabelled(cold) AP-1 oligonucleotide or cold AP-1 mutated oligonucleotide, or cold wild-type NF- κ B mutated oligonucleotide. Only wild-type, and not mutated, AP-1 oligonucleotide competed with the probe for the AP-1 binding. **(B)** Supershift analysis using antibodies to c-Fos, c-Jun proteins. The addition of c-Fos or c-Jun antibody caused a significant decrease of the specific AP-1 band indicating the presence of c-Fos and c-Jun in AP-1 complex.

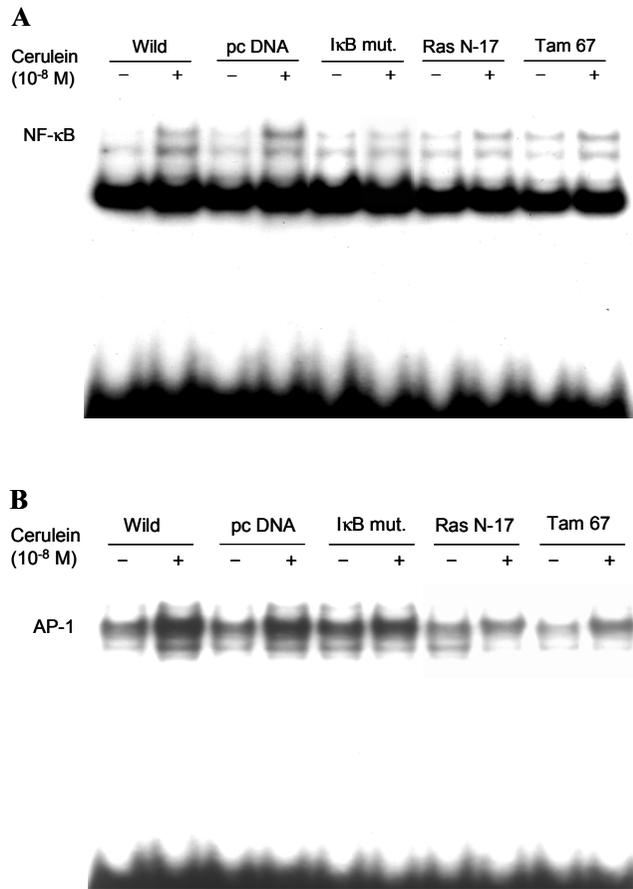


Fig. 8. Effects of I κ B mutant, Ras N-17, TAM67 transfection on NF- κ B and AP-1 activation in the AR42J cells caused by 30 minutes stimulation of cerulein (10^{-8} M). NF- κ B and AP-1 activations were determined by an EMSA. pcDNA cell was used for control vector. **(A)** Transfection of Ras N-17 or TAM67 reduced cerulein-induced NF- κ B compared with wild-type cells or pcDNA cells. These data suggest that AP-1 activation may be required for activation of NF- κ B. **(B)** Cerulein-induced AP-1 activation was reduced by transfection with Ras N-17 whereas the transfection of I κ B mutant showed no change of AP-1 activation compared with wild-type cell or pcDNA cells.

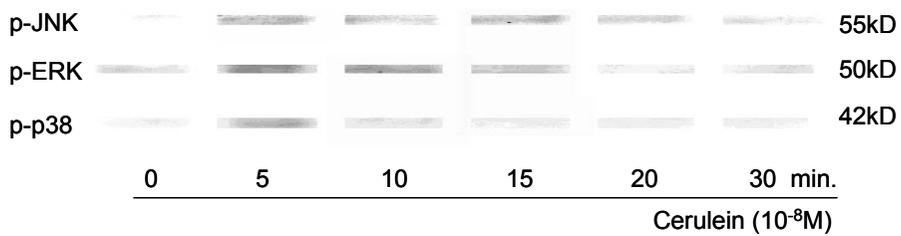


Fig. 9. Time response of AR42J cells to cerulein for MAP kinase activities. The cells were lysed at indicated time points after stimulation of cerulein ($10^{-8}M$). The cells were lysed and $100\mu g$ total cell extract were immunoprecipitated with phospho-specific antibodies for ERK, JNK or p38 MAPK. In vitro kinase assays were performed and phosphorylated substrates were detected by western blot analysis using phospho-specific antibodies. The three subtypes of MAP kinases activities were elevated rapidly in AR42J cell treated with cerulein.

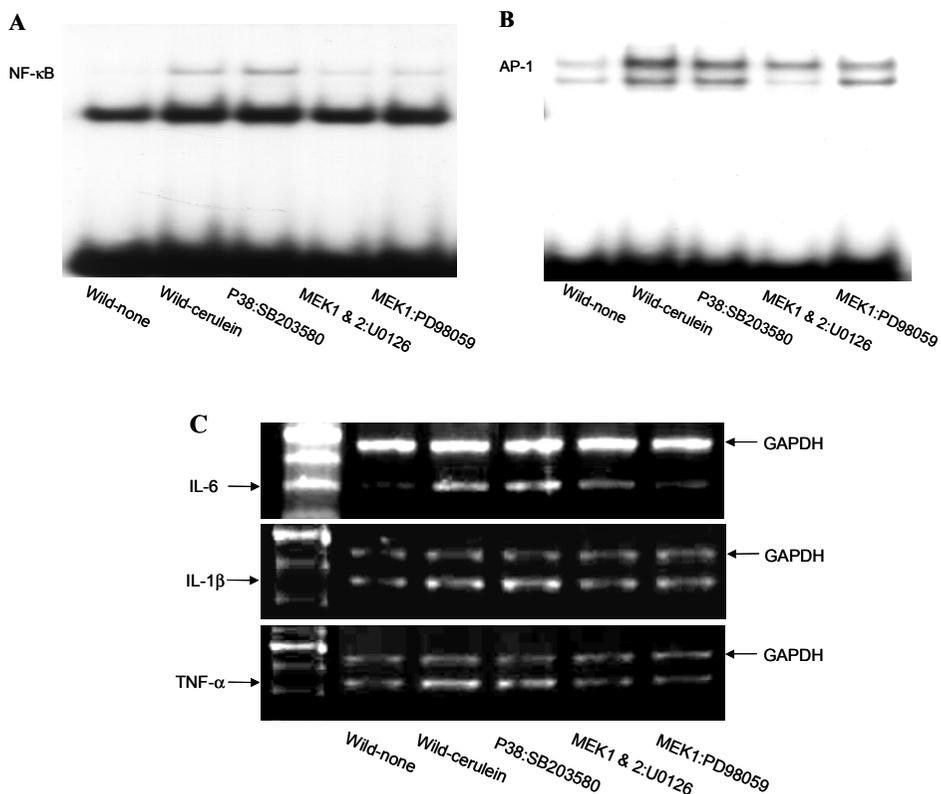


Fig. 10. Effects of pharmacological inhibitors of MAP kinases on NF- κ B and AP-1 activation and cytokine expression. The AR42J cells were treated with either the inhibitors or DMSO for 1 hour prior to stimulation with cerulein. The NF- κ B(A) and AP-1(B) activations or cytokine expression(C) were measured in the presence of SB203580 (p38 MAPK inhibitor) 10 μ g, U0126 (MEK1/2 inhibitor) 10 μ g, or PD98059 (MEK1>MEK2 inhibitor) 30 μ g. Inhibition of MEK, but not p38 MAPK, activity resulted in a significant reduction of cerulein-induced NF- κ B and AP-1 activations, or cytokine expressions. These data suggest that NF- κ B and/or AP-1 transcription factors are potential downstream mediator of MAP kinases, especially ERK in the cerulein-induced cytokine expression in AR42J cells.

IV. 고 찰

췌장 선세포에서 cerulein에 의해 유도된 활성산소는 초기단계에서 췌장염의 발생 및 진행에 중요한 매개체이고 cytokine 생성에 관여한다. 이와같이 췌장 선세포에서 생성된 cytokine은 췌장으로의 염증세포침윤을 유도하여 염증반응을 일으킨다. 최근 이러한 cytokine의 발현을 조절하는 중요한 조절자로 NF- κ B가 확인되고 있다.^{3,46} 그리고 NF- κ B와 더불어 AP-1은 초기염증반응을 조절하는 중요한 전사인자이다.²² 따라서 본 연구에서는 AR42J 세포를 이용한 췌장염 모델에서 NF- κ B와 AP-1의 활성뿐 아니라, 이러한 전사인자의 중요한 상위조절자인 MAP kinase의 활성을 분석하여 cerulein에 의한 cytokine 발현의 신호전달체계를 알아보았다.

본 연구에서는 흰쥐에 azaserine을 투여하여 췌장내 과증식성 결절을 유도하여 분리한 AR42J 세포주를 사용하였다. 실험적 췌장염의 모델로 췌장조직에서 분리된 선세포를 일차적인 배양을 통해 얻을 수 있으나, 생존기간이 짧고 분리과정에서의 자극으로 인하여 cytokine 발현 및 p38 MAPK가 활성화되는 단점이 있다.⁴⁷ 이러한 AR42J 세포는 소화효소의 합성 및 분비와 같은 정상 췌장 선세포의 특성을 지속적으로 유지하는 유일한 세포주로서 췌장선세포와 유사한 수용체 발현과 신호전달을 나타낸다.⁴⁸ 따라서 현재 췌장외분비계의 세포분비, 성장, 증식, 신호전달을 연구하는데 광범위하게 이용되고 있다.

AR42J 세포에서 cerulein (10^{-8} M)을 처치하였을 때 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA는 2시간 내에 모두 발현되었고, 한편 배양액에서 ELISA로 측정된 cytokine 단백질은 시간에 따라 증가되는 소견을 보였다. 췌장염에서 cytokine 생성은 후기단계에서 췌장을 침윤하는 염증세포에서 유도되는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 IL-6, TNF- α , monocyte chemotactic protein-1과 같은 cytokine이나 chemokine이 염증세포가 아닌 췌장 선세포 자체에서도 생성됨이 밝혀졌고,^{20,47} cerulein에 의해 자극된 선세포에서도 IL-6, IL-1 β mRNA 및 단백질 발현이 증가하였다.⁴ 췌장 선세포에서 생성된 cytokine이나 chemokine은 췌장염의 발생초기에 췌장으로의 염증세포침윤에 필요한 첫 신호를 보내기 때문에 중요한 역할을 한다.¹² 본 연구에서도 분리된 AR42J 세포에서 cerulein에 의해 cytokine이 발현됨을 확인하여 염증세포가 아닌 췌장 선세포 자체에서 생성된 cytokine이 췌장염의 발생에서 중추적인 역할을 하는 것을 다시 한번 증명

하였다. 한편 *in vivo* 실험적 췌장염에는 IL-6, IL-1 β , TNF- α 발현에서 시간적인 차이를 보였으나 이는 cytokine이 염증세포와 췌장 선세포 모두에서 생성되기 때문이고, 본 실험에서는 췌장 선세포 자체에서만 cytokine이 생성되었기 때문에 시간적 차이를 보이지는 않았다.

AR42J 세포에서 cerulein을 처치하였을 때 NF- κ B 활성화는 30분내에 강하게 활성화되었고 1시간 후에는 감소추세를 보이다가, 4~6시간 후에 다시 활성화되는 시간에 따른 2단계 활성을 보였다. 반면 AP-1은 30분내에 활성화되었고 NF- κ B와는 다르게 지속적으로 강하게 활성화 되었다. 현재까지 실험적 모델을 이용한 췌장염에서 NF- κ B 활성화에 대한 보고는 많이 있다. 췌장관 결찰에 의해 유도된 담즙성 췌장염 모델에서 NF- κ B가 활성화되고, amobarbital로 NF- κ B를 억제하였을 경우 췌장염의 지표의 하나인 amylase 수치가 호전되어 NF- κ B와 췌장염의 발생간의 상관관계를 추론할 수 있었다.⁴⁹ 본 실험 결과도 cerulein에 의한 췌장염모델에서 NF- κ B의 조기 활성화를 보고한 다른 연구 결과와 일치된 소견을 보였다.^{3,46} 이러한 사실을 종합해 볼 때 췌장 선세포에서 NF- κ B의 활성화는 췌장염의 초기 단계에서의 일차적인 현상이고, 췌장염 발생에서 중요한 공통적인 기전이 될 수 있음을 암시한다. 본 연구에서 NF- κ B 활성화가 2단계로 활성화를 보이는 이유는 비록 I κ B 단백질에 대한 실험 결과가 없지만 I κ B α 와 I κ B β 가 각각 1단계와 2단계에서 다른 특성을 보이기 때문으로 추정된다. Cerulein에 의한 췌장염 모델을 이용하여 NF- κ B 활성을 연구한 실험에서 I κ B α 는 급격하게 일시적으로 분리되다가 cerulein 처치 3~6시간 후에는 정상화되는데 비해, I κ B β 는 좀더 천천히 분리되어 6시간 후까지 분리가 유지되는 양상을 보였다.⁴⁶ 따라서 NF- κ B의 1단계 활성화는 I κ B α 의 분리에 의해 일어나고, 2단계 활성화는 I κ B β 에 의해 유도됨을 알 수 있다. I κ B α 와 I κ B β 의 서로 다른 특성은 NF- κ B에 의한 유전자 전사조절의 차이 때문이다. 즉 I κ B α 의 유전자는 기능적으로 NF- κ B 결합장소를 함유하기 때문에 NF- κ B에 의해 활성화되고 따라서 NF- κ B의 활성화는 I κ B α 를 빠르게 재합성하여 정상화시킬 수 있다.^{29,50,51} 이렇게 재합성된 I κ B α 는 핵내로 이동하여 NF- κ B dimer와 DNA 결합장소를 분리시킨다.⁵⁰ 반면 I κ B β 유전자는 κ B motif가 없기 때문에 발현에 NF- κ B가 관여하지 않는다.^{29,50} 그리고 2단계에서의 NF- κ B 활성화에는 췌장 선세포에서 분비되는 cytokine에 의한 NF- κ B 활성화도 일부 관여할 것으로 생각된다. 한편 췌장염에서 AP-1의 활성화에 대한 연구는 드물게 보고되고 있는데, taurocholate로 유도된 췌장염과 cerulein을 처치한 췌장 선세포 등에서 활성화가 보고되었고,⁵² 본 연구 결과에서

도 이와 일치된 결과를 보였다. 이와같이 cerulein에 의한 NF- κ B와 AP-1의 활성화는 cerulein에 의해 생성된 활성산소가 NF- κ B의 핵내이동에 필요한 I κ B 인산화나 AP-1의 구성 성분인 c-Fos/ c-Jun을 유도하여 산화조건에 민감한 전사인자인 NF- κ B와 AP-1을 활성화시키기 때문인 것으로 생각된다.²⁸ 활성화된 NF- κ B의 전형적인 형태는 p65와 p50의 subunit으로 구성된 heterodimer인데, 본 연구에서도 supershift 실험 결과 p65와 p50 subunit가 AR42J 세포에서 활성화됨을 알 수 있었다. 이제까지의 보고에서 cerulein이나 taurocholate를 이용한 췌장염 모델에서 p65가 췌장 선세포 핵내로 이동됨이 증명되었고,^{3,52} 자극된 중성구(stimulated neutrophil)에 노출된 췌장 선세포에서 p50/p65 NF- κ B heterodimer와 p50 NF- κ B homodimer의 핵내이동이 유도됨이 확인된 바 있다.⁵³ 한편 AP-1와 대한 supershift 실험에서도 c-Jun과 c-Fos가 모두 확인되었다.

Cytokine 발현에 영향을 주는 상위조절자임을 알아보기 위해 AR42J 세포에 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 각각 transfection하여 ras, NF- κ B, AP-1을 차단하였을 때 cerulein 자극에 의한 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA와 단백질 발현은 야생종 세포와 pcDNA 세포를 transfection한 control vector에 비해 감소하여 cytokine의 상위 조절자로서 ras 그리고 NF- κ B와 AP-1이 관여함을 알 수 있었다. 일반적으로 NF- κ B나 AP-1과 같은 전사인자는 cytokine 유전자의 promotor에 결합하여 유전자 발현을 조절할 수 있다. 췌장염 모델에서 염증세포에서 분비된 IL-1과 TNF- α 가 NF- κ B를 활성화 시킬 수 있고,^{12,20} 분리된 췌장 선세포 자체에서도 TNF- α 가 분비되어 NF- κ B를 활성화 시킬 수 있으나 이것은 초기단계보다는 후기단계에서 cytokine이 NF- κ B를 활성화시키는 기전으로 알려져 있다.^{20,46} 한편 췌장염의 초기 단계에 관한 연구에서는 흰쥐의 cerulein 유도성 췌장염에서 NF- κ B가 조기에 활성화되고 NF- κ B의 억제시에 cytokine KC와 IL-6발현이 감소되며,⁴⁶ N-acetylcysteine이나 pyrrolidine dithiocarbamate와 같은 항산화제를 투여하여 NF- κ B 활성화나 NF- κ B와 상위조절자 결합부위간의 상호작용을 억제하였을 때 cytokine 발현이 억제된다는 보고가 있다.^{53,54} 이러한 결과는 활성산소가 I κ B를 인산화시키거나, 상위조절자를 경유하여 NF- κ B를 활성화시켜 cytokine을 발현시키고,⁵⁵ 항산화제가 활성산소에 의해 매개된 전사인자 활성을 억제함으로써 cytokine 생성을 감소시킬 수 있음을 암시한다. 본 연구에서는 AR42J 세포 자체에서 cerulein 처치 30분내에 NF- κ B와 AP-1이 활성화되어 cytokine 발현보다 먼저 발생하였고, NF- κ B나

AP-1을 차단시 cytokine 발현이 억제된 점은 췌장염의 초기단계에서 활성산소나 상위조절자에 의해 NF- κ B와 AP-1가 활성화되고, 이것이 cytokine 발현에 영향을 미치는 것을 시사한다. 이와같이 췌장염의 초기단계에서 NF- κ B가 cytokine 발현을 조절함은 기존의 보고와 일치된 결과를 보였고, AP-1도 NF- κ B와 유사하게 cytokine 발현에 관여함을 본 연구에서 새롭게 보고하는 바이다. 따라서 NF- κ B와 AP-1의 활성화와 친염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 발현의 상관관계는 췌장염에서 초기 단계에서 이러한 전사인자가 중요한 역할을 함을 암시한다.

Ras, NF- κ B, AP-1이 NF- κ B 및 AP-1 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection 한 세포를 이용하였다. NF- κ B의 활성화는 Ras N-17 또는 TAM67을 transfection한 세포에서 cerulein을 처치시 야생종 세포나 pcDNA를 transfection한 세포에 비해 활성이 억제되었다. 이러한 사실은 ras가 NF- κ B의 상위조절자이고, AP-1의 활성증가가 NF- κ B의 활성화에 필요한 조건임을 암시한다. 일반적으로 NF- κ B와 AP-1은 서로 독립적인 전사인자로 작용하여 유전자 발현을 조절하지만, 본 연구에서는 AP-1 활성화가 NF- κ B 활성화에 영향을 주었다. 이러한 결과는 AP-1의 구성 성분인 c-Fos와 c-Jun이 NF- κ B의 p65와 물리적으로 상호작용할 수 있고, Fos와 Jun에 대한 항체가 NF- κ B와 κ B 결합 장소의 결합능을 감소시킨다는 보고와 keratinocyte에서 dominant negative Jun으로 AP-1을 억제시 NF- κ B의 활성화가 억제된 실험과 일치하지만, 정확한 기전에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.^{56,57} 한편 AP-1은 Ras N-17을 transfection한 세포에서 cerulein에 의한 활성증가가 감소되었으나, I κ B mutant를 transfection한 세포에서는 변화가 없었다. 이러한 결과로 cerulein에 의한 AP-1의 활성화에서 ras가 상위조절자로 작용하였으나 NF- κ B의 활성화에는 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

MAP kinase는 세포막에서 핵내로 신호전달을 하는 중요한 매개체이기 때문에 AR42J 세포에서 cerulein에 의한 MAP kinase의 역할을 규명하였다. Cerulein 처치 후 ERK, JNK, p38 MAPK 등 3종류의 MAP kinase가 모두 5~10분 후에 최대 활성화되다가 이후에 감소하였는데, 이는 cerulein에 의해 유도된 활성산소가 MAP kinase 신호를 증가시켜 cytokine 발현에 관여함을 시사한다. 이러한 결과는 췌장 선세포를 이용한 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 cerulein이 3종류의 MAP kinase를 모두 활성화시키고, CCK작용에 의해 p38 MAPK가 활성화된다는 보고와 일치된 결과를 보였다.^{58,59} Cerulein에 의한 MAP kinase의 활성화에 대한 연구

에서는 JNK가 가장 먼저 활성화되고 췌장염과 관련된 세포 표지자와 가장 상관관계가 있다는 보고와 p38 MAPK 활성화가 JNK보다 조기에 활성화되고 ERK보다 강하게 활성을 보인다는 상반된 보고가 있다.^{58,60} 본 연구에서는 ERK, JNK, p38 MAPK가 모두 유사한 형태로 조기에 활성화되었다. Cerulein에 의한 cytokine 발현에 ERK와 p38 MAPK의 역할을 규명하기 위해 각각의 억제제를 투여하였다. JNK의 약리학적 억제제는 이용이 가능하지 않아 시행하지 않았다. ERK의 활성억제는 ERK activating kinase인 MEK1을 좀더 선택적으로 억제하는 PD98059와 MEK1/2를 모두 억제하는 U0126을 전처치하였고, p38 MAPK를 억제하기 위하여 pyridinyl imidazole인 SB203580을 전처치하였다. 이 화합물은 다른 protein kinase는 억제하지 않고 선택적으로 p38 MAPK의 α 와 β 의 isoform만을 선택적으로 억제하기 때문에,⁶¹ p38 MAPK의 역할규명을 위해 널리 이용된다. SB203580을 전 처치한 후 cerulein에 노출시 AP-1과 NF- κ B 활성 및 cytokine 발현은 전처치를 하지 않았을 경우와 비교시 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 p38 MAPK가 cerulein을 투여시 활성화되었지만, 억제제를 전처치하였을 때 cytokine 발현에 영향을 주지 않아 cerulein에 의한 cytokine 발현에서 직접적인 조절자로서의 관련성이 적음을 암시한다. 최근 p38 MAPK의 활성이 몇몇 세포에서 IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α 생성에 관련됨이 보고되었고,^{62,63} 췌장에서도 cytokine 발현에 p38 MAPK가 관여하는 것으로 알려져 있지만,⁴⁷ 본 연구 결과에서는 상반된 결과를 보여 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다. 한편 PD98059 또는 U0126를 전처치하였을 경우에는 SB203580와 다르게 AP-1 및 NF- κ B 활성, cytokine 발현을 모두 감소시켜 ERK가 상위조절자로 작용함을 알 수 있었다. 이와같이 NF- κ B가 MAP kinase 특히 ERK에 의해 조절됨이 확인되었는데, 가능한 기전으로는 NF- κ B의 활성화에 필요한 I κ B의 인산화가 I κ B kinase (IKK)에 의하고, IKK는 mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEKK)와 protein kinase C등에 의해서 조절되기 때문에 MAP kinase가 NF- κ B을 활성화에 영향을 줄 수 있다.⁶⁴ 한편 AP-1활성에도 MAP kinase가 관여하였는데 이는 활성산소가 ERK에 의한 Elk-1의 인산화를 유도하여 serum response factor (SRF)와의 상호작용을 촉진하고, 이것이 c-Fos의 promotor region에 있는 serum response element (SRE)와 결합하여 c-Fos의 발현을 증가시키기 때문이다.⁴⁰ 보고에 따라서는 ERK는 c-Fos의 활성을 유도하는 반면 JNK와 p38 MAPK는 c-Fos와 c-Jun의 활성을 모두 유도하여 AP-1활성에 ERK, JNK, p38 MAPK 등 서로

다른 MAP kinase가 관여한다는 결과가 있지만,^{65,66} 본 연구에서는 p38 MAPK 보다는 ERK와 밀접한 관련이 있었고 JNK에 대한 연구는 시행하지 않았다. 이상의 결과 cerulein에 의한 췌장염 모델에서 NF- κ B와 AP-1의 활성화는 적어도 부분적으로는 MAP kinase 특히 ERK에 의해 조절됨이 확인되었다. 이것은 활성산소가 직접적으로 전사인자를 활성화시키거나, 전사인자의 상위 조절자인 MAP kinase에 영향을 주어 cytokine 발현에 관여하는 것으로 생각된다.

췌장 선세포 자체에서의 cytokine 발현 및 생성은 급성 췌장염의 발생에서 중요한 역할을 하며, 생성된 cytokine은 손상부위로 염증세포의 침윤을 유도하여 선세포의 세포사멸 또는 괴사를 유도한다. 이러한 cytokine생성에 NF- κ B와 p38 MAPK가 초기 단계에서 관여한다는 보고가 있지만, 본 연구에서와 같이 cerulein을 이용한 췌장염모델에서 cytokine 발현에 관련된 신호전달체계를 체계적으로 보고한 바는 없었다.

결론적으로 AR42J 세포에 cerulein을 처치하였을 때 cytokine mRNA와 단백질 발현이 증가하였고, NF- κ B, AP-1, 3종류의 MAP kinase 등이 활성화되었다. 한편 ras, NF- κ B, AP-1의 억제시 cytokine 발현이 억제되었고, MAP kinase 억제제를 전처치하였을 때 특히 ERK가 NF- κ B와 AP-1 활성화 및 cytokine 발현에 관여하였다. 또한 AP-1 활성을 억제하였을 경우에는 NF- κ B의 활성이 감소하였다. 이상을 종합해 볼 때 ras와 MAP kinase, 특히 ERK는 NF- κ B나 AP-1의 상위조절자로 작용하여 cerulein에 의한 cytokine의 발현을 조절하였고, 또한 AP-1도 정확한 기전을 알 수 없지만 NF- κ B 활성화에 관여하였다. 따라서 췌장 선세포에서 염증반응에 관여하는 cytokine 유전자 발현의 신호전달체계를 차단하는 치료가 개발된다면 췌장염의 경과를 완화시키는데 도움이 될 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 AR42J 세포주에 cerulein을 처리한 췌장염 세포모델에서 친염 증성 cytokine 발현의 조절자로서 ras, MAP kinase, NF- κ B, AP-1의 역할을 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. AR42J 세포에 cerulein (10^{-8} M)을 처리하였을 경우 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) mRNA는 cerulein 노출 1~2시간 후에 발현되어 4시간까지 지속되었고, cytokine 단백질은 노출시간에 비례하여 발현이 증가하였다.

2. Ras N-17, I κ B mutant, TAM67을 transfection하여 ras, NF- κ B, AP-1을 억제하였을 때 cerulein에 의한 cytokine mRNA와 단백질 발현은 야생종 세포나 pcDNA를 transfection한 세포와 비교하여 현저하게 억제되었다.

3. Cerulein에 의한 NF- κ B의 활성화는 노출 30분내에 활성화되었고, 이후 감소하다가 4~6시간 후에 다시 활성화되는 시간에 따른 2단계 활성을 보였고, Ras N-17, TAM67을 각각 transfection한 세포에서는 대조군 세포와 비교하여 cerulein에 의한 NF- κ B 활성이 모두 억제되어 NF- κ B 활성이 ras와 AP-1의 활성화에 영향을 받았다.

4. Cerulein에 의한 AP-1의 활성화는 노출 30분에 활성화되어 6시간동안 지속되었는데, Ras N-17를 transfection한 세포에서는 대조군 세포에 비해 cerulein에 의한 AP-1의 활성이 현저히 억제되었으나, I κ B mutant를 transfection한 세포에서는 억제되지 않아 AP-1의 활성이 ras의 활성화에는 영향을 받았으나 NF- κ B 활성화와는 무관하였다.

5. Cerulein 처리 후 3가지 형태의 MAP kinases (ERK, JNK, p38 MAPK)가 모두 조기에 활성화되었다.

6. U0126 또는 PD98059를 전처리하여 ERK를 억제하였을 때 cerulein에 의한 NF- κ B와 AP-1활성 및 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 발현은 전처리하지 않은 세포와 비교시 감소하였으나, SB203580를 전처리하여 p38 MAPK를 억제시에는 전사인자 활성 및 cytokine 발현이 감소하지 않았다.

이상의 결과로 AR42J 세포에서 cerulein에 의한 cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현은 ras, MAPK, NF- κ B, AP-1 등에 의해 조절됨을 알 수 있었다. 그리고 ras가 NF- κ B와 AP-1경로의 상위 조절자이고, 또한 전사인자인 NF- κ B와 AP-1는 MAP kinase 특히 ERK의 하위매개체일 것으로 추정된다. 또한 NF- κ B

의 활성화에서 AP-1의 활성화가 필요한 요소임을 규명하였다. 따라서 췌장 선세포에서 염증반응에 관여하는 cytokine 유전자 발현의 신호전달체계를 차단하는 치료가 개발된다면 췌장염의 경과를 완화시키는데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Koiwai T, Oguchi H, Kawa S, Yanagisawa Y, Kobayashi T, Homma T. The role of oxygen free radicals in experimental acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1989;5:135-143.
2. Schoenberg MH, Buchler M, Helfen M, Berger HG. Role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992;24(Suppl):74-84.
3. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Alder G, Schmid RM. NF- κ B/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;116:420-430.
4. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim HY, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 2002;82:1359-1368.
5. Schoenberg MH, Buchler M, Gasper M. The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis. *Gut* 1990;31:1138-1143.
6. Gough DB, Boyle B, Joyce WP. Free radical inhibition and serial chemilluminence in evolving experimental pancreatitis. *Br J Surg* 1990;77:1256-1259.
7. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. Evidence of a role of free radicals by synthesized scavenger 2-octadecy ascorbic acid in cerulein-induced mouse acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1992;37:274-279.
8. Guyan PM, Udern S, Braganza JM. Heightened free radical activity in pancreatitis. *Free Radic Bio Med* 1990;8:347-354.
9. Scott P, Bruce C, Schofield D. Vitamin C status in patients in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1993;80:750-754.
10. Guice KS, Oldham KT, Gaty MG. Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg* 1989; 210:740-747.
11. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995;82:6-13.
12. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.

- Am J Surg 1998;175:76-83.
13. Gross V, Leser HG, Heinisch A. Inflammatory mediators and cytokines - new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1993;40:522-530.
 14. Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997;40:1-4.
 15. Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, et al. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:371-377.
 16. Fink GW, Norman JG. Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin-1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine* 1997;9:1023-1027.
 17. Frossard JL, Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, et al. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999;116:694-701.
 18. Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999;229:834-840.
 19. Norman J, Franz MG, Messina J, Riker A, Fabri PJ, Rosemurgy AS, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* 1995;130:966-970.
 20. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky AS, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997;100:1853-1862.
 21. Baeuerle PA, Baichwal VR. NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997;65:111-137.
 22. Wisdom R. AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 1999;253:180-185.

23. Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *J Leukoc Biol* 1999;65:291-298.
24. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-377.
25. Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 1996;18:371-378.
26. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-720.
27. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers L. New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45:7-17.
28. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-455.
29. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: Mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996;74:749-769.
30. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: A lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-532.
31. Lernbecher T, Muller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365:767-770.
32. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Mod Med* 1996;74:589-607.
33. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos, and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-139.
34. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factor NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1672-1676.
35. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakene H, Ohmoto Y,

- et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997;65:3218-3224.
36. Masamune A, Shimosegawa T, Masammune O, Mukaida N, Koizumi M, Toyota T. *Helicobacter pylori*-dependent ceramide production may mediate increased interleukin-8 expression in human gastric cancer cell lines. *Gastroenterology* 1999;116:1330-1341.
 37. Chu SH, Kim H, Seo JY, Lim JW, Mukaida N, Kim KH. Role of NF- κ B and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. *Dig Dis Sci* 2003;48:257-265.
 38. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998;333:291-300.
 39. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996;271:4138-4142.
 40. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-16486.
 41. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the Ikappa B alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997;88:213-222.
 42. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced Ikappa B alpha phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol* 1998;18:78-84.
 43. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
 44. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1475-1489.
 45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
46. Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998;275:G1402-1414.
 47. Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ, et al. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1993-2003.
 48. Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR42J. *Am J Physiol* 1994;266:G963-971.
 49. Dunn JA, Li C, Ha T, Kao RL, Browder W. Therapeutic modification of nuclear factor κ B binding activity and tumor necrosis factor- α gene expression during acute biliary pancreatitis. *Am Surg* 1997;63:1036-1043.
 50. Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelierie F, Thomas D, Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 1995;15:2689-2696.
 51. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I κ B β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* 1995;80:573-582.
 52. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF- κ B activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1197-1208.
 53. Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF- κ B activation and cysteine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:674-683.
 54. Ho E, Chen G, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF- κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J* 1999;13:1845-1854.
 55. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF- κ B in immune and

- inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-860.
56. Stein B, Baldwin AS Jr, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 1993;12:3879-3891.
 57. Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappa B transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene* 1998;16:2711-2721.
 58. Wagner ACC, Metzler W, Hofken T, Weber H, Goke B. p38 MAP kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation. *Digestion* 1999;60:41-47.
 59. Schafer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem* 1998;273:24173-24180.
 60. Grady T, Dabrowski A, Williams JA, Logsdon CD. Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:1-7.
 61. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3(MKK6) comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* 1997;16:3563-3571.
 62. Miyazawa K, Mori A, Miyata H, Akahane M, Ajisawa Y, Okudaira H. Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273:24832-24838.
 63. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasn SC, et al. Selective activation and functional significance of p38 α mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1999;103:851-858.
 64. Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 2

- and 3 activate nuclear factor-kappa B through Ikappa B kinase-alpha and Ikappa B kinase-beta. *J Biol Chem* 1999;274:8355-8358.
65. Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Calvo V, Armesilla AL, Redondo JM. Antioxidants and AP-1 activation: A brief overview. *Immunobiol* 1997;198:273-278.
66. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240-246.

Abstract

Signal transduction of cerulein-induced cytokine expression in pancreatic acinar cells

Jeong Hun Seo

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

(Directed by Professor Jae Bock Chung)

The signaling pathways mediating cytokine production in pancreatic acinar cells have not been fully understood. Recent studies indicated that cytokine expression requires activation of NF- κ B and AP-1 as well as activation of the MAP kinases. However, the precise relationship between transcription factor and MAP kinase remains unclear. We examined the requirements of ras, MAP kinases, NF- κ B, and AP-1 for cerulein-induced cytokine expression in pancreatic acinar AR42J cells. Cerulein was treated to the wild-type cells and the transfected cells with control vector (pcDNA), I κ B mutant gene (I κ B mt), H-ras mutant gene (Ras N-17), or c-jun dominant negative gene (TAM67). In addition, to investigate the role for MAP kinases, three subtypes of MAP kinases were measured in the cerulein-treated AR42J cells, and we used pharmacological inhibitors to attenuate signaling via these kinases. As a result, ① cerulein (10^{-8} M) induced production of the inflammatory IL-6, IL-1 β , and TNF- α mRNA and protein expression in AR42J cell. ② Inhibition of ras, NF- κ B, and AP-1 using transfected cell with Ras N-17, I κ B mutant, and TAM67 decreased the cytokine gene expression induced by cerulein (10^{-8} M) as compared to pcDNA cells and the wild-type cells. ③ Cerulein induced NF- κ B activation with biphasic kinetics. That is, NF- κ B was strongly activated within 30 min after the stimulation and a second phase of NF- κ B activation was prominent at 4~6 h. Transfection of Ras N-17 or TAM67 in AR42J cells reduced cerulein-induced NF- κ B activation. ④

Cerulein induced the activation of AP-1 within 30 min after stimulation and AP-1 activation was sustained continuously until 6 h. Transfection of Ras N-17 but not I κ B mutant reduced cerulein-induced AP-1 activation. ⑤ Three subtypes of MAP kinases (ERK, JNK, and p38 MAPK) activities were elevated rapidly by cerulein in AR42J cells. ⑥ Inhibition of MEK activity resulted in a reduction of NF- κ B and AP-1 activations, and cytokine expressions whereas the inhibition of p38 MAPK did not. In conclusion, cytokine gene expression by cerulein in AR42J cells was mediated via the activation of the ras, MAP kinases, NF- κ B, and AP-1. Ras functioned as common upstream activators of both NF- κ B and AP-1 pathway, and AP-1 might be required for activation of NF- κ B. AP-1 and/or NF- κ B transcription factors were potential downstream mediators of MAP kinases, especially ERK in the cerulein-induced cytokine expression in AR42J cell. It was believed that inhibition of signal transduction pathway such as ras, MAP kinases, NF- κ B, and AP-1 might alleviate the inflammatory response in pancreatic acinar cells by suppressing cytokine gene expression.

Key Words; AR42J cells, Cytokine, MAPK, NF- κ B, AP-1