

흰쥐 이자에서 Secretin-CCK 상승작용 기전에 관한 연구

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 약리학교실*, 연세대학교 의과대학 내과학교실**, 약리학교실 †

이동기 · 김준명 · 권상욱 · 박경선* · 정재복 · 강진경** · 김경환†

= Abstract =

Mechanism of the Potentiating Effect of Secretin-CCK on Rat Pancreas

Dong Ki Lee, M.D., Jun Myeong Kim, M.D., Sang Ok Kwon, M.D., Kyung Sun Park, M.D.,*
Jae Bock Chung, M.D.,** Jin Kyung Kang, M.D.** and Kyung Hwan Kim, M.D.†

Department of Internal Medicine, Pharmacology*, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Department of Internal medicine**, Pharmacology†, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: The mechanism of secretin and CCK potentiation effect was evaluated in the dispersed pancreatic acini of rat. **Methods:** To observe the presence of potentiating effect of secretin and insulin on CCK, the amount of amylase release according to secretagogues were measured. The mechanism of the potentiating effect of secretagogues were studied by measuring the change of the intracellular amount of cAMP and IP₃, and concentration of intracellular Ca⁺⁺. **Results:** In the dispersed pancreatic acini, secretin potentiates the amylase release stimulated by 10⁻¹¹ and 10⁻¹⁰M CCK-8. Insulin slightly increased the secretory response to secretin plus CCK-8, but with no statistical significance. Secretin or forskolin did not increase the intracellular IP₃ accumulation stimulated by CCK-8. Also insulin had no influence on the intracellular IP₃ accumulation stimulated by CCK-8 plus secretin. CCK-8 and A23187 significantly decreased the intracellular cAMP accumulation stimulated by secretin. But the insulin did not influence the intracellular cAMP accumulation stimulated by secretin plus CCK-8. Secretin alone did not increase the intracellular concentration of Ca⁺⁺. Secretin and dibutyryl cAMP significantly increased the intracellular concentration of Ca⁺⁺ stimulated by CCK-8. **Conclusions:** These results verify the presence of the potentiating effect of secretin but not insulin on CCK. Also the potentiating effect of amylase secretion by the simultaneous activation of the secretin and CCK was shown to be associated with increased intracellular Ca⁺⁺ concentration, without a further elevation of intracellular IP₃ or cAMP accumulation. (Korean J Gastroenterol 1997;29:380 - 393)

Key Words : Dispersed pancreatic acini, Secretin-CCK potentiating effect, IP₃, cAMP, Ca⁺⁺

접수: 1996년 1월 20일, 승인: 1996년 11월 1일

연락처: 이동기, 강원 원주시 일산동 162, 연세대학 원주의대 내과

본 논문의 요지는 1995년도 제 34차 대한소화기학회 추계학술대회에서 발표 되었음

서 론

이자 외분비에 관여하는 인자는 미주신경 반사 신경성 인자와 호르몬성 인자 2가지로 대별할 수 있다. 호르몬성 인자인 secretin과 cholecystokinin (CCK)은 사람은 물론 개, 흰쥐 등 각종 동물에서 이자 외분비를 항진시킨다. 이외에도 bombesin, substance P, neurotensin, insulin, epidermal growth factor(EGF), somatostatin 등이 이자 외분비 기능 조절에 관여하는 것으로 밝혀져 있으나 아직 이들의 정확한 역할은 규명되지 않고 있다.¹⁻⁹

이자 외분비의 세포내 기전은 일찌기 Douglas¹⁰에 의하여 규명된 자극-분비연결(stimulus-secretion coupling)을 통하여 이루어지며, 이는 secretin과 CCK와 같은 분비자극 호르몬에 의해 생성된 세포내 이차 전령 물질을 통해서 이루어진다. 즉, 이자 선세포의 무스카린성 수용체나 CCK 수용체가 흥분되면 세포막 인지질이 가수분해되어 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)와 diacylglycerol(DAG)과 같은 세포내 전령 물질이 생성된다. IP₃는 세포내 Ca⁺⁺을 동원하고, DAG는 protein kinase C를 활성화시켜 이자 효소 분비가 이루어진다. 한편 secretin이나 vasoactive intestinal polypeptide(VIP)는 intact acini에서 secretin 수용체와 결합하고 adenylate cyclase를 자극하여 이자 선세포내의 cAMP를 8-30배 까지 증가시킨다.^{11,12} 이와 같이 이자 분비 자극 호르몬인 secretin과 CCK는 이자 선세포의 각각 다른 수용체에 결합하여 서로 다른 이차 전령 물질 체계에 의한 각각의 외분비 기능을 수행하고 있다.

Secretin은 이자 외분비중 수분과 전해질 분비를 촉진하며 CCK는 효소단백 분비를 촉진한다.¹³ Secretin과 CCK의 작용중 특이한 것은 두 자극 호르몬을 동시 투여하였을 때의 이자 외분비능이 이들 두 호르몬 각각에 의한 이자 외분비능의 합보다 많은 상승작용(potentialiation)이 있다는 것이다. 이러한 생체에서의 secretin-CCK의 상승작용은 오래 전부터 알려져 왔다.^{14,15} 음식섭취 후 상승되는 혈중 농도에 해당하는 secretin을 외부에서 단독 투여했을 때는 이자 외분비 항진이 그다지 뚜렷하지 않다.

이러한 현상은 인체나 개 등 동물에서 생리적 양의 secretin에 의한 이자분비는 CCK가 같이 존재하므로 상승되기 때문에 설명된다.^{15,16} 또한 외부에서 약리학적 용량의 secretin 투여에 의한 이자 외분비 기능은 십이지장에 내인성 CCK의 분비를 항진시키는 L-phenylalanine의 투여로 증대된다.¹⁴ 최근 Jo 등¹⁷은 내인성 CCK와 내인성 secretin이 상승작용으로 이자의 HCO⁻³ 분비를 항진시키는데 중요하다는 사실을 입증하였다.

Insulin은 이자 외분비를 직접 자극하는 분비자극 호르몬은 아니지만 이자의 외분비능을 촉진 조절하는 insulo-acinar axis의 중요한 물질로 알려져 있다.¹⁸ Kanno와 Saito¹⁹는 insulin이 흰쥐에서 CCK 자극에 의한 amylase 분비를 항진시키는 것을 보고 하였으며 insulin 특이항체를 투여하면 음식 섭취후 이자 분비 변동이 차단된다고 하였다. 또한 생체내 실험이나 생체외 실험에서 자연발생 당뇨병²⁰나 약물에 의해 당뇨가 초래된 쥐²¹의 이자 외분비 기능이 저하되며 이는 insulin 투여로 회복된다고 한다.^{19,22,23} 최근에는 외인성뿐만 아니라 내인성 insulin²⁴이 쥐에서 식후 이자 분비를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것이 밝혀져, insulin도 CCK의 이자 외분비능에 대해 상승작용이 있음이 재확인된 바 있다.

이자 외분비에 대한 secretin-CCK의 상승작용은 적출관류 이자표본이나 생체내 실험에 의한 결과의 분석이며, insulin의 상승작용도 대부분 같은 방법에 의해 규명되어 왔다. 그러나 아직까지 이자 분비에서 이러한 호르몬간의 상호 작용이 어떠한 기전으로 이루어지는지에 대한 세포수준에서의 규명은 미흡한 실정이다. Secretin과 CCK에 의한 상승작용은 이들 호르몬에 대한 이자 선세포내 전령 물질간의 상호작용에 의한 것으로 생각된다. 이러한 효과는 이자 선세포의 수용체를 직접 자극하지 않고 제2 전령 물질을 증가시키는 Ca⁺⁺ ionophore인 A23187과 cAMP derivatives, forskolin, cholera toxin 등을 이용한 실험에서도 확인된 바 있다.²⁵⁻²⁷ 하지만 아직 이들 secretin, CCK 등 분비자극 호르몬과 insulin과 같은 분비조절 물질이 이자 선세포의 이자 외분비에 있어 상승효과를 발휘하는데 있어서, 이차 전령 물질

에 어떠한 변동이 초래되며, 어떠한 주효기(effector)를 이용하는지에 대해서는 명확히 규명되어져 있지 않다.

그러므로 본 연구에서는 분산 이자 선세포를 이용하여 secretin-CCK의 이자 외분비 상승작용 뿐 아니라 이들 호르몬에 대한 insulin의 영향을 알아보기 위해 각각 호르몬에 의한 이자 선세포의 amylase 유리 및 세포내 IP₃, cAMP 및 Ca⁺⁺ 농도 변동을 살펴봄으로써 세포 수준에서 이들 호르몬에 의한 이자 외분비 상승작용 기전을 규명해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 재료

가. 실험 동물

실험 동물로는 1주일 이상 동물실 환경에 적응시킨 200g 안팎의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하였다. 실험 동물은 단백질 21.5%, 지방 3.5%, 칼슘 0.6% 이상이 함유된 시판 흰쥐용 표준 배합사료로 사육하였다. 동물실은 오전 6시에 불이 들어오고 오후 6시에 불이 꺼지게 함으로 인공 밤낮을 유지하였다.

나. 이자 선세포의 분리

흰쥐를 단두하여 희생시킨 후 이자를 적출하였다. 이자 선세포의 분리는 Ansah 등²⁸의 방법을 변형하여 시행하였다. 완충액의 조성은 25mM HEPES, 104mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 2.0mM CaCl₂, 2mM Glutamine, 15mM glucose와 50X 필수 아미노산 용액 2%(v/v)이었으며, 이 완충액에 0.1% 우혈청 알부민, 0.012% soybean trypsin inhibitor를 첨가한 후 pH를 7.4로 조정하고 100% O₂로 포화시키며 37°C로 유지하여 사용하였다. 조직소화(digestion)용 완충액과 세포내 Ca⁺⁺ 농도 측정에 사용된 완충액은 2.0mM CaCl₂ 대신 0.5mM CaCl₂로 하였으며 소화용 완충액에는 collagenase를 50U/ml 되게 첨가하였다.

분리과정을 간략히 설명하면 적출 이자 조직 1g 당 소화용 완충액 5ml를 주사기(21G)를 사용하여 조직속으로 구석구석 주입한 후 소화 완충액에 담

가 110회/분으로 흔들면서 37°C 항온수조에서 15분간 소화시켰다. 매 15분마다 신선한 효소 용액으로 바꾸어 주면서 총 45분간 소화시키고, 기본 완충액으로 세척한 후 pipette tip을 이용해 기계적 분쇄를 시켰다. 분쇄된 조직을 nylon mesh를 이용해 여과한 후, 기본완충액을 가하고 2,000g로 15초간 원심분리한 후 상층액을 제거하는 식으로 2번 세척하였다. 이렇게 분리된 선세포는 trypan blue dye exclusion test로 90% 이상의 생존율을 확인한 후 기본 완충액에 희석하여 실험에 이용하였다.

다. 사용 약물

우혈청 알부민(fraction V), soybean trypsin inhibitor(type 1-S), minimal essential medium amino acid (50X concentrated), L-glutamine, HEPES, CCK-8, secretin, forskolin, A23187, dibutyryl cAMP 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였으며, 정제된 collagenase(type IV, CLSPA)는 Worthington Biochemicals Co.(Freehold, NJ, U.S.A)에서 구입하였다. D-Myo-inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)[³H]assay system과 cAMP[¹²⁵I]assay system(dual range)는 Amersham International plc(Buckinghamshire, U.K)에서 구입하였다. Fura-2/AM은 Molecular probe(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 인슐린 Actrapid[®] Pork는 녹십자(서울)에서 구입하였으며, 그외의 시약은 analytical grade를 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 단백질 및 amylase 활성 측정

단백은 Bradford²⁹의 방법으로 측정하였으며 amylase 활성은 전분기질에서 유리되는 maltose의 양을 Bernfeld³⁰의 방법을 이용하여 측정하였다.

나. 분비 자극물질에 의한 amylase 유리

분리된 이자 선세포를 다시 기본 완충액에서 37°C로 70회/분으로 흔들리는 항온수조에서 preincubation시킨 후 2,000g로 15초간 원심분리하여 상층액을 버리고 남아있는 이자 선세포를 1mg당 완충액 30ml에 부유시킨 후 사용하였다.

완충액에 부유시킨 분산 선세포를 plastic vial에

최종용량 500ul가 되도록 분주 후 37°C에서 70회/분으로 흔들리는 항온 수조에서 30분동안 배양하여 세포막으로 유리되는 amylase양을 측정하였다. Amylase유리는 CCK, secretin에 의한 자극 유리 및 CCK에 secretin의 추가 유무, CCK+secretin에 insulin의 추가유무에 따른 자극유리를 관찰하였다. 자극유리에 사용되는 같은 양의 분산 선세포를 완충용액에 희석시켜 polytron(setting 7번, 10초)을 이용해 기계적으로 분쇄시켜 amylase 총량을 측정하였다. 30분간 배양 후 Eppendorf microcentrifuge로 원심분리 (11,000g, 30초)하여 상층액과 세포층으로 분리하였고, 상층액의 amylase 양을 측정하였다. 자극 후 유리된 amylase의 양은 기초 유리에 의한 amylase 양을 제거한 자극에 의한 순수 amylase 유리량으로 표시하였다. 순수 유리량은 자극에 의한 순수 amylase 유리량을 자극 전 전체 선세포내의 amylase양에 대한 %로 표시하였다.

다. 세포내 IP₃ 측정

앞에서 분리한 분산 선세포를 30분간 preincubation 후 원심분리(2,000g, 15초)하여 상층액을 걸어내고, 이자조직 1mg을 10ml의 완충액에 부유시킨 후 여러 농도의 CCK-8(10^{-12} ~ 10^{-8} M), CCK-8+ secretin, CCK-8+forskolin 및 CCK-8+secretin+ insulin이 함유된 plastic vial에 최종 용량 500ul가 되도록 분주하였다. 분주직후 가볍게 흔들어 혼합해주고, 5초 후에 100ul의 ice-cold 20% perchloric acid를 넣고 얼음속에서 20분 방치하였다. 방치 후 4°C에서 2,000g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 취해 60mM HEPES 완충액을 포함하는 1.5M KOH로 중화시킨 후 Universal indicator를 사용하여 pH7.5로 적정하였다. 적정이 끝난 후, 세포내 IP₃의 양을 D-Myo-inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃) [³H]assay system을 이용하여 측정하였다.³¹

라. 세포내 cAMP의 측정

앞에서 분리한 분산 선세포를 30분간 preincubation 후 원심분리(2,000g, 15초)하여 상층액을 걸어내고 이자조직 1mg을 30ml의 완충액에 부유시킨 후 여러 농도의 secretin(10^{-12} ~ 10^{-8} M), secretin+

CCK-8, secretin+A23187 및 secretin+CCK-8+insulin이 담겨있는 plastic vial에 최종용량 500ul가 되도록 분주하였다. 분주 후 37°C에서 70회/분으로 흔들리는 항온 수조에서 30분간 배양한 다음 1ml의 ice cold ethanol(99.9%)을 가한 후 얼음에 10분간 방치하였다. 이후 11,000g로 5분간 원심분리 후 상층액을 취해 55°C에 증탕하면서 N₂ gas로 ethanol을 증발시켰다. 남은 pellet을 0.05M acetate buffer 250ul에 녹인 다음 적당히 희석시킨 후, 세포내 cAMP의 양을 cAMP [¹²⁵I]assay system을 이용하여 측정하였다.³²

마. 세포내 유리 Ca⁺⁺ 농도 측정

앞의 방법으로 흰쥐 1마리에서 얻은 이자 분산 선세포로 15ml의 세포 부유액을 만든 후 fura-2/AM을 5μM 되게 가하고, 37°C의 온도하에서 30분간 배양하였다. 그후 원심분리로 상층액을 제거함으로 세포외액에 존재하는 여분의 fura-2/AM을 제거하였으며, 2회 세척후 15ml의 기본 완충용액에 다시 부유시켰다. 선세포내 유리 Ca⁺⁺ 농도 Fluorescence Spectrophotometer (F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 fluorescence intensity를 지속적으로 측정하여 산출하였다. 일정한 속도로 회전하는 교반기의 cuvette내에 500ul의 세포 부유액을 넣고 37°C의 온도하에서 평형이 이루어지도록 약 5분정도 기다린 후, 여러가지 약물을 가하고 유리 Ca⁺⁺ 농도의 변화를 측정하였다. 실험 끝에 0.1% Triton X-100 및 10mM EGTA를 가하여 F_{max}(fluorescence maximum)와 F_{min}(fluorescence minimum)을 각각 구하였다.

Fura-2를 측정시킨 선세포에 분비자극 물질 투여에 따른 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 파장 340nm 및 380nm로 0.5초 간격으로 번갈아 자극 시키면서, 그에 의해 유발되는 형광신호를 510nm emission filter를 통해 측정하였다. 이때 Ca⁺⁺과 결합한 fura-2 분자(Ca⁺⁺-fura-2 complex)는 340nm에 의해, 그리고 free form의 fura-2 분자는 380nm에 형광정도가 최대로 나타나기 때문에, 이들의 형광비를 아래의 식에 대입하여 세포내 유리 Ca⁺⁺ 농도로 환산하였다.³³

$$[Ca^{++}]_i = K \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{F_{min} (\lambda_2)}{F_{max} (\lambda_2)}$$

[Ca⁺⁺]_i : intracellular Ca⁺⁺ concentration

K : Dissociation constant of Fura-2/AM (224mM for fura-2)

R : 340/380 ratio at any time point

R_{min} : 340/380 ratio at zero [Ca⁺⁺]_i

R_{max} : 340/380 ratio at saturating [Ca⁺⁺]_i

F_{min}(380) : F(380) at zero [Ca⁺⁺]_i

F_{max}(380) : F(380) at saturating [Ca⁺⁺]_i

실험결과를 CCK-8 단독 투여에 의한 Ca⁺⁺ 농도의 최고치를 대조군으로 하여 일정 농도의 secretin 및 dibutyryl cAMP 전투여 후 CCK-8에 의한 Ca⁺⁺ 농도의 변화를 백분율로 환산표시하였다.

3. 자료분석 및 통계처리

실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계 분석은 unpaired groups에 대한 Student's *t*-test로 검정하여 *P*값이 0.05이하인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 분비 자극 물질에 의한 amylase 유리 변동

가. Secretin 및 forskolin 투여에 따른 CCK-8에 의한 amylase 유리 반응의 변동

분산 선세포의 기초 amylase 유리량은 1.69 ± 0.37%였으며 CCK-8 10⁻¹²~10⁻¹⁰M 투여로 용량에 따라 amylase 유리는 전형적인 이상 농도-반응곡선 (biphasic dose response curve)을 나타내어 3.78 ± 0.39, 12.62 ± 0.48, 17.11 ± 0.82%로 증가하였으나 10⁻⁹ 및 10⁻⁸M에 의해서는 amylase 유리가 10⁻¹⁰M 반응보다 감소되어 2.74 ± 1.60, 8.26 ± 0.44%를 나타내었다. CCK-8에 secretin 10⁻⁹M 첨가로 CCK 반응을 의의있게 증강되어 나타나서 CCK 10⁻¹²~10⁻⁸M 투여시 amylase 유리는 5.36 ± 0.48, 6.37 ± 1.56, 20.97 ± 1.10, 24.15 ± 2.32, 16.44 ± 1.19, 11.92 ± 0.56%이었다. CCK-8 투여시 secretin 첨가와 관계없이 최대

유리 반응을 나타내는 농도는 모두 10⁻¹⁰M이었다 (Fig. 1A).

Secretin 대신 forskolin 10⁻⁶M을 CCK-8에 첨가함으로써 amylase 유리는 CCK-8 단독 투여군에서 보다 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 1B).

나. Insulin 투여에 따른 CCK-8 및 CCK-8+ secretin의 amylase 유리 반응의 변동

분산 선세포의 CCK-8 농도 반응은 insulin 10⁻⁶M 첨가에 의해 별 변동이 없었다(Fig. 2A). 또한 secretin 10⁻⁹M 첨가에 의한 CCK-8의 농도 반응

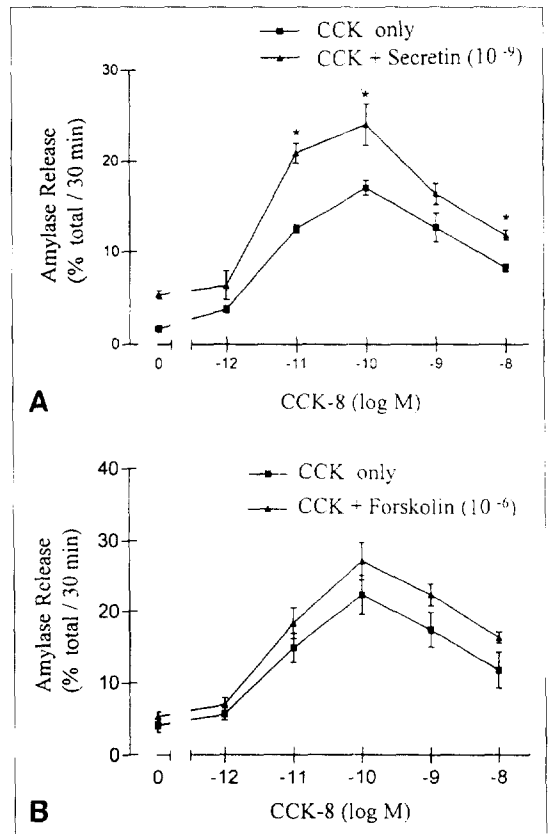


Fig. 1. Response of amylase release stimulated by CCK-8 according to (A) secretion(10⁻⁹M) or (B) forskolin (10⁻⁶M) in dispersed pancreatic acini. Values shown are the percent of released amylase to the total amount of intracellular amylase of acini. Plus-minus values are means ± SE. Number of experiments in four. **p* < 0.05 vs. control.

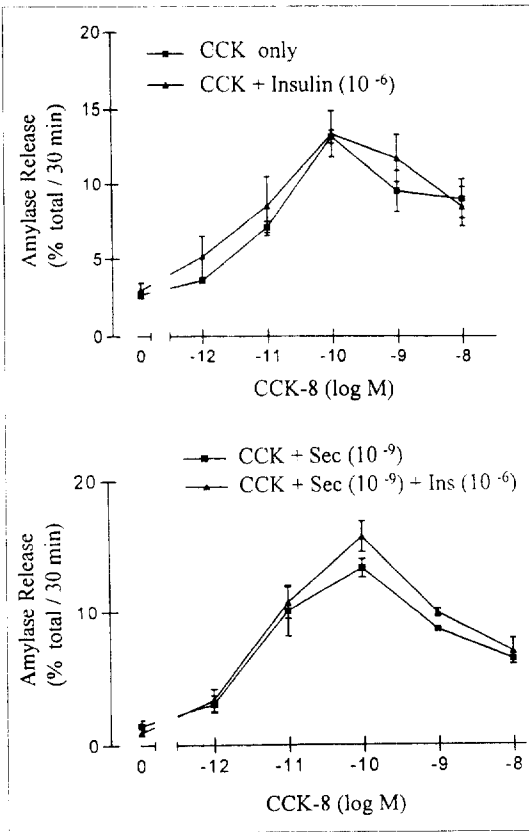


Fig. 2. Response of amylase release stimulated by (A) CCK-8 + secretin(10⁻⁹M) according to insulin (10⁻⁶M) in dispersed pancreatic acini. Values shown are the percent of released amylase to the total amount of intracellular amylase of acini. Number of experiments in four.

역시 insulin 10⁻⁶M 처치로 별 영향을 받지 않았다 (Fig. 2B).

2. 분비자극물질에 의한 세포내 IP₃의 변동

가. CCK-8에 의한 IP₃의 반응곡선

분산 선세포의 기초 IP₃ 양은 13.8±0.6pmol/mg protein이었으며 CCK-8 10⁻¹², 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸M을 투여한 후 IP₃의 양은 15.5±1.9, 16.6±0.7, 19.0±0.7, 66.9±9.9, 131.8±10.4pmol/mg protein으로 용량 의존적으로 증가하였다(Fig 3A).

나. Secretin 또는 forskolin 투여에 따른 CCK-8의 IP₃ 반응의 변동

Secretin 10⁻⁹M 처치로 분산 선세포의 IP₃ 농도는 22.4±0.69pmol/mg protein으로 대조군과 별 차이가 없었으며, CCK-8 10⁻¹⁰M 및 10⁻⁹M에 secretin 10⁻⁹M을 처치하여도 CCK-8 단독에 의한 세포내 IP₃ 증가와 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3B). 또한 secretin 대신 forskolin 10⁻⁶M을 투여한 경우에도 CCK-8 단독 투여군과 세포내 IP₃양의 차이는 없었다(Fig. 3C).

다. Insulin 투여에 따른 CCK-8+secretin의 cAMP 반응의 변동

분산 선세포에 insulin 10⁻⁶M을 첨가하므로 세포내 IP₃양은 29.0±2.7pmol/mg protein으로 대조군과 별 차이가 없었으며 CCK-8+secretin 반응 역시 insulin 투여에 따른 세포내 IP₃양의 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 3D).

3. 분비자극 물질에 의한 세포내 cAMP의 변동

가. Secretin에 의한 cAMP의 반응곡선

분산 선세포의 기초 cAMP 양은 18.5±6.3pmol/mg protein이었으며 secretin 10⁻¹², 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸M을 투여한 후 cAMP의 양은 17.9±5.2, 22.2±6.6, 27.7±8.7, 54.3±9.9, 68.4±12.5pmol/mg protein으로 용량 의존적으로 증가하였다(Fig. 4A).

나. CCK-8 또는 A23187 투여에 따른 secretin의 cAMP 반응의 변동

CCK-8 10⁻¹⁰M 처치로 분산 선세포의 cAMP 농도는 29.9±4.9fmol/tube로 별 차이가 없었으며, secretin 10⁻⁹M 및 10⁻⁸M에 CCK-8 10⁻¹⁰M을 처치하였을 때 cAMP 농도는 44.7±6.2, 25.1±1.5fmol/tube로 CCK-8을 처치하지 않았을 때의 55.3±1.7, 38.9±1.7fmol/tube보다 유의있게 낮았다(Fig 4B). 또한 secretin 10⁻⁸M 농도에서 CCK-8 대신 A23187 10⁻⁶M을 투여한 경우 세포내 cAMP 농도는 27.9±3.7fmol/tube로 secretin 단독 투여군의 44.3±0.99fmol/tube보다 유의있게 낮았다(Fig. 4C).

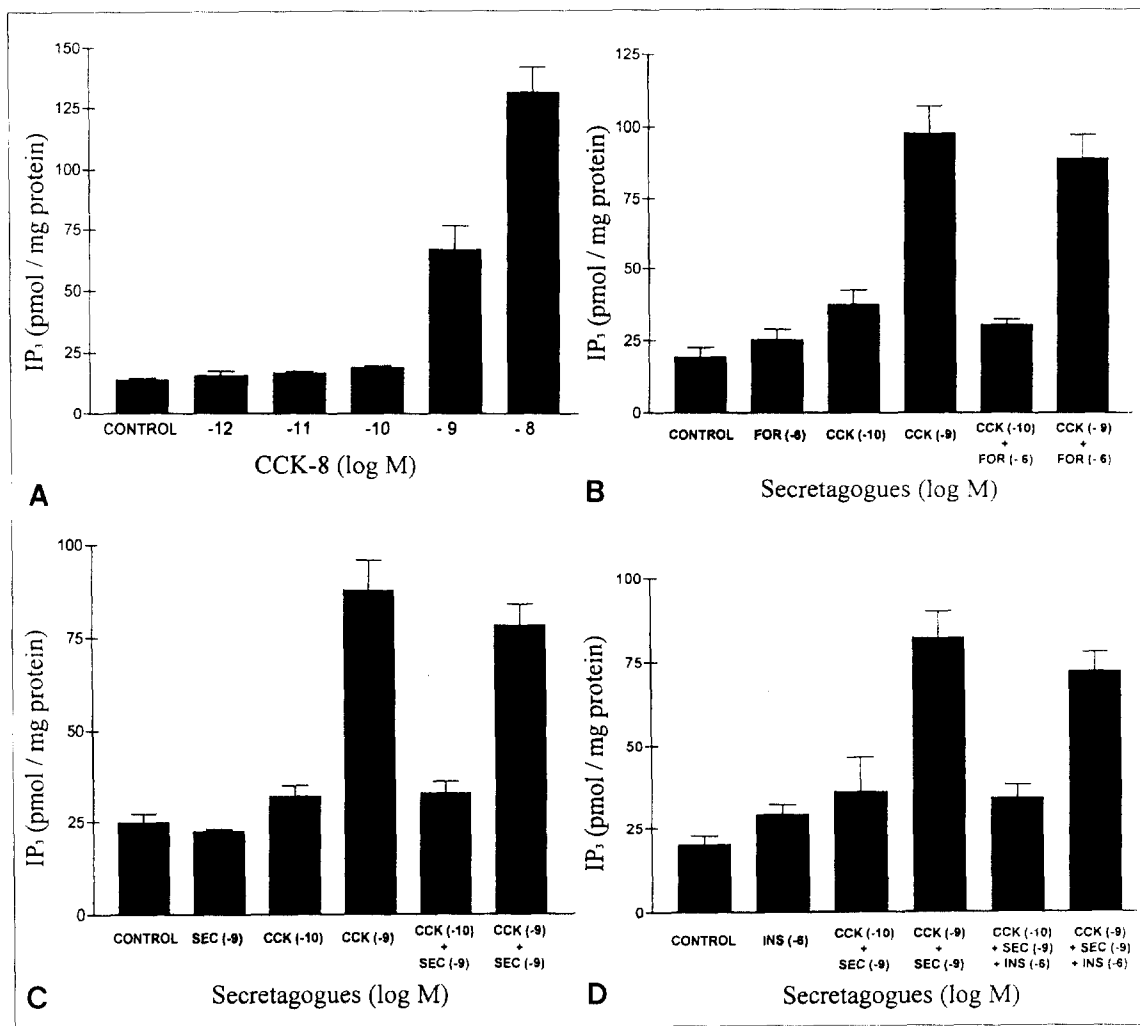


Fig. 3. Intracellular IP₃ accumulation in dispersed pancreatic acini according to secretagogues. A. Intracellular IP₃ accumulation according to CCK-8. B,C. Intracellular IP₃ accumulation stimulated by CCK-8 10⁻¹⁰, 10⁻⁹M according to secretin 10⁻⁹M (B) or forskolin 10⁻⁶M(C). D. Intracellular IP₃ accumulation stimulated by CCK-8 10⁻¹⁰M + secretin 10⁻⁹M, CCK-8 10⁻⁸ + secretin 10⁻⁹M according to insulin 10⁻⁶M. Number of experiments in three.

다. Insulin 투여에 따른 secretin + CCK-8의 cAMP 반응의 변동

분산 선세포에 insulin 10⁻⁶M을 첨가하므로 세포내 cAMP 양은 9.1 ± 1.7fmol/tube로 대조군과 별 차이가 없었으며 secretin+CCK-8 반응 역시 insulin 투여에 따른 세포내 cAMP양의 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 4D).

4. 분비자극 물질에 의한 세포내 Ca⁺⁺농도의 변화

Secretin 10⁻⁹M 혹은 10⁻⁸M 단독 투여에 의해서는 세포내 Ca⁺⁺ 농도의 변화는 관찰할 수 없었다. CCK-8 10⁻¹⁰M 단독 투여에 의해 증가된 세포내 최고 Ca⁺⁺ 농도를 대조군 100%로 하였을 때, secretin 10⁻⁹M, 10⁻⁸M을 CCK-8 투여된 처치한 결과 세포내 Ca⁺⁺ 농도는 각각 103.7 ± 2.75%, 110.1 ± 3.84%로 secretin 10⁻⁸M 전처치시 유의한 증가가 있었다. 또

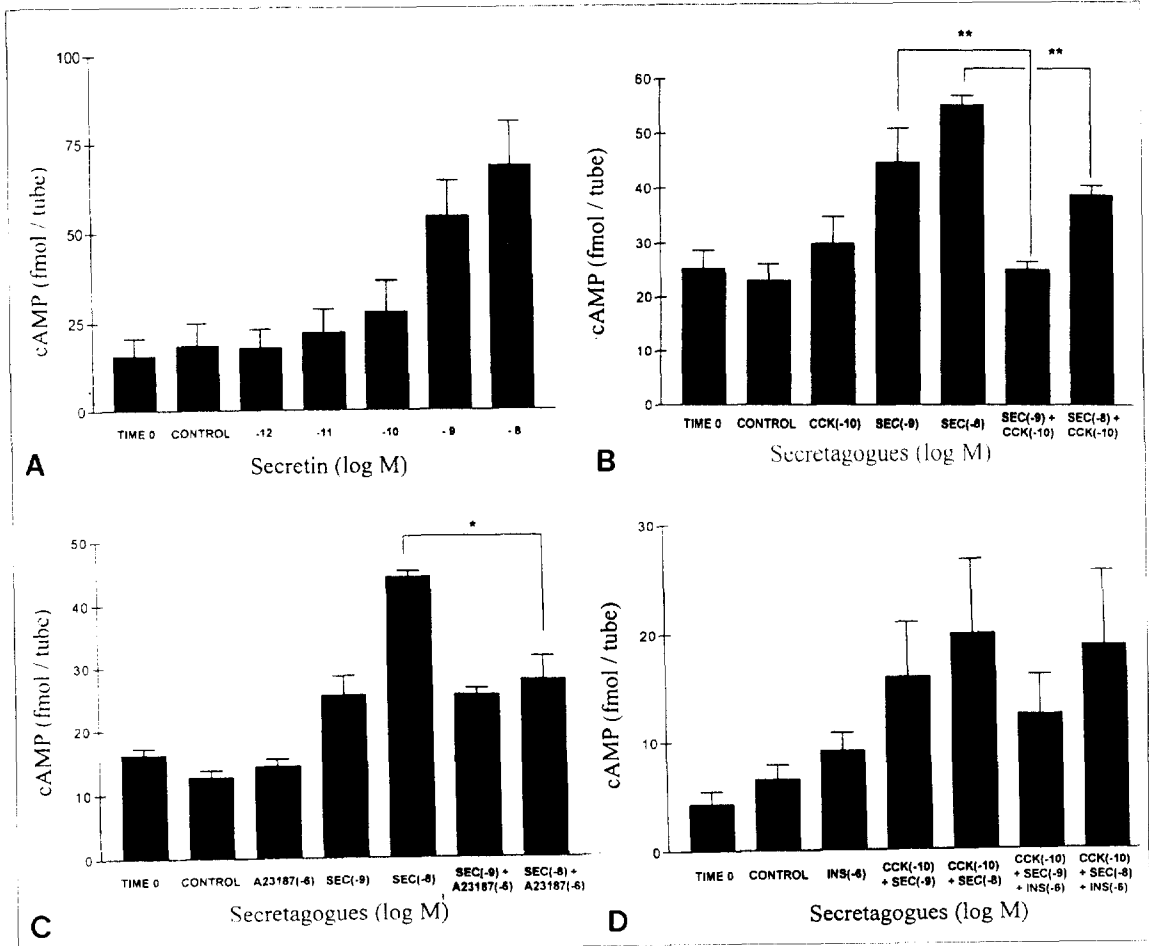


Fig. 4. Intracellular cAMP accumulation in dispersed pancreatic acini according to secretagogues. A. Intracellular cAMP3 accumulation according to secretin. B,C. Intracellular cAMP accumulation stimulated by secretin 10^{-9} , 10^{-8} M according to CCK-8 10^{-10} M (B) or A23187 10^{-6} M (C). D. Intracellular cAMP accumulation stimulated by CCK-8 10^{-10} M + secretin 10^{-9} M, CCK-8 10^{-8} M + secretin 10^{-9} M according to insulin 10^{-6} M. Number of experiments is three. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

한 secretin 대신 dibutyl cAMP 10^{-4} M을 전처리하였을 때에도 세포내 Ca^{++} 농도가 CCK-8 단독 투여에 비하여 $111.9 \pm 4.3\%$ 로 유의있게 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

Hansky 등³⁴이 개에서 pancreozymin과 secretin을 동시 투여하였을 때 이자 분비 효과가 최대에 달함을 보고하였다. 이후 이러한 CCK와 secretin의 이

자 외분비 상승작용은 흰쥐,^{1,3} 고양이,^{4,5} 개^{6,7} 및 사람^{8,9} 등에서 확인되었다. 또한 사람의 이자에서 생리적 양의 secretin에 의해 분비되는 HCO_3^- 는 CCK-8의 동시 투여에 의해 분비가 증가됨이 보고되었고,¹⁵ 개에서도 생리적 양의 secretin과 CCK에 의해 이자액 분비의 상승작용이 있음이 보고되어¹⁶ CCK와 secretin 두 이자외분비 자극 호르몬은 약리적 용량에서 뿐만 아니라 생리적 양으로도 이자 외분비 상승작용이 있음이 보고되었다. 또한 최근에는 생리적 양의 CCK와 secretin에 의한 이자 외분비

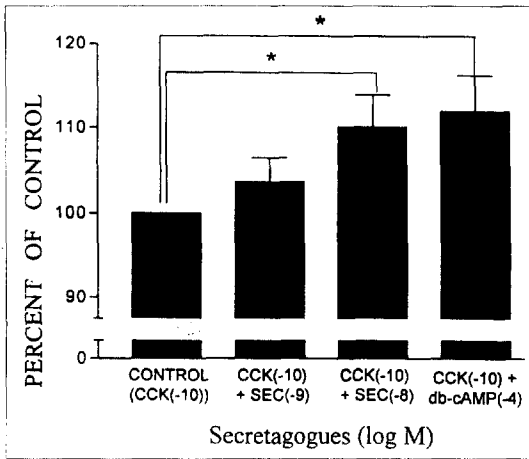


Fig. 5. Intracellular concentration of Ca⁺⁺ in dispersed pancreatic acini according to secretagogues. Values shown are the percents of changes of intracellular Ca⁺⁺ concentration stimulated by CCK-8 10⁻⁸M with pretreatment of secretin 10⁻⁹, 10⁻⁸M or dibutyl cAMP 10⁻⁶M to the change by CCK-8 10⁻¹⁰M alone. Number of experiments is five. *p < 0.05 vs. control.

상승작용은 생체 내에서 콜린성 신경 의존성 현상이라는 보고도 있어,³⁵ 생체내에서는 이 두 호르몬의 상호작용에 의한 상승작용이 이차 선세포에 대한 신경전달 체계와도 연관이 있음을 시사하였다. 또한 이상의 생체내 실험연구와는 달리 혈류나 신경지배 효과를 배제한 이차분산 선세포에 대한 CCK와 secretin의 외분비 상승작용의 존재도 오래 전에 보고된바 있으나,^{36, 37} 이후 이러한 상승작용의 세포수준에서의 기전에 대한 명확한 규명은 미흡하였다.

이자의 외분비 기능은 자극-분비 연결(stimulus-secretion coupling) 과정을 통하여 수행된다. 즉, secretin이나 VIP는 세포막의 adenylate cyclase를 자극하여 세포내 cAMP를 생성하며 CCK나 acetylcholine은 세포막의 phospholipase를 자극하여 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)을 형성한다. 이중 IP₃는 endoplasmic reticulum으로부터 Ca⁺⁺을 세포질내로 유리시킨다. 이렇게 분비자극 물질에 의해 형성된 세포내 전령물질들인 cAMP, Ca⁺⁺ 및 DAG 등은 여러 protein kinase, protein phosphatase와 같은 주효기를 활성화시킴으로써 이차 외분비 기능을 수행한다. 이와 같이 secretin과 CCK는 서

로 다른 세포내 경로를 통해 외분비 기능을 항진시키므로 이 두 분비자극 호르몬의 상승작용을 세포수준에서 규명하기 위해서는 이들 두 호르몬에 의해 생성되는 세포내 전령물질들의 변동을 살펴보는 것이 중요하다고 생각된다.

본 실험에서는 분비자극 호르몬 단독 투여군에서 보다 두 분비자극 호르몬을 동시 투여한 군간에 cAMP와 IP₃의 생성량의 증가는 관찰할 수 없었다. cAMP의 경우는 secretin 단독 투여의 경우보다 CCK를 첨가한 군에서 오히려 감소하였고, CCK 대신 A23187 첨가시에도 같은 효과를 관찰할 수 있었다. 따라서 두 분비자극 호르몬을 동시 투여하였을 때 서로 상대방의 호르몬에 의해 일차적으로 생성되는 이차 전령 물질의 양을 증가시키지 않는 것을 알수 있었다. cAMP에서와 같이 두 분비 자극 물질 동시 투여에 따른 이차 전령 물질의 감소는 세포내 되먹이 기전에 의한 것으로 생각된다. 반면 이차 전령 물질 중 Ca⁺⁺의 양은 CCK 단독 투여군에서 보다 secretin을 동시 투여한 경우 세포내 농도가 유의하게 증가하였다.

증가된 세포내 Ca⁺⁺이 secretin 동시 투여에 의해 생성된 세포내 cAMP의 영향인가를 확인하기 위해 secretin 대신 직접 dibutyl cAMP를 CCK에 첨가 투여해본 결과, CCK 단독 투여시에서 보다 세포내 Ca⁺⁺ 농도가 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있어 secretin에 의해 생성된 cAMP가 세포내 Ca⁺⁺ 동원(mobilization)을 증가시켜 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 증가시켰다고 생각한다. 본 실험에서와 같이 세포내 cAMP의 생성이 secretin-CCK 상승작용에 관여하는 사실은 다른 실험에서도 규명된바 있다. Secretin 대신 직접 cAMP의 analogue인 8-Bromo cAMP, adenylate cyclase 활성물질인 forskolin 혹은 cAMP 분해를 억제하는 3-isobutyl-1-methyl-xanthine 등에 의해서도 역시 CCK의 외분비 상승작용이 있음을 통하여 증명되었다.^{38,39} 즉 secretin 대신에 forskolin이나 cAMP analogue를 투여할 때에도 CCK 단독 투여에 의하여 생성되는 세포내 IP₃의 양에는 변화를 주지 않고 세포내 calcium의 양을 증가시키는 것으로 생각된다.

외분비 상승기전은 회귀의 이자뿐 아니라 이자와

같이 amylase의 외부비 기능이 있는 이하선 선세포에서도 증명된바 있다.^{40,41} McKinney와 Rubin⁴²은 cAMP와 phorbol 12,13-dibutyrate를 병합 투여하여 amylase 분비가 상승함을 밝혀내 이 상승기전에 protein kinase C가 관여할 것이라고 추측하였다. 한편 흰쥐 이하선 선세포를 이용하여 β -아드레날린성 효현제인 isoproterenol과 콜린성 효현제인 carbamylcholine을 투여하여 각각에 의한 세포내 cAMP와 IP₃를 통한 세포내 calcium 농도를 증가시켜 외부비 상승작용이 확인되었다.⁴³ 이 실험에서는 isoproterenol 대신 8-Bromo cAMP, forskolin 또는 3-isobutyl-1-methylxanthine을 이용하거나 carbamylcholine 대신 calcium ionophore인 A23187이나 ionomycin 등을 사용하였을 때에도 역시 같은 상승작용을 확인할 수 있었다. 또한 1,2-bis-[2-amino-phenoxy]-ethane-N,N',N'-tetraaceticacid로 세포내 free calcium을 chelation 시켰을 때는 상승작용이 없어졌고, calmodulin 길항제에 의해서 isoproterenol 단독에 의한 amylase 분비는 줄지 않았으나, isoproterenol과 carbamylcholine의 두 분비 자극 물질 또는 carbamylcholine 단독에 의한 amylase 유리가 방해되었다. 이러한 결과로 외부비의 상승기전은 이차 전령 물질 생성 후 cAMP계와 세포내 calcium계 간의 상호작용에 의한 것으로 생각되며, 이는 cAMP에 의해 calcium 분비를 자극하는 물질에 의한 calcium 분비의 민감도가 증가된 것으로 생각하였다.

분비자극 물질에 의한 세포내 Ca⁺⁺의 증가는 IP₃에 의한 세포내 저장 calcium이 세포질로 유리됨에 의한 것도 있지만 세포외액으로 부터 유입되었을 가능성도 있다. 따라서 상승기전에 관여하는 세포내 Ca⁺⁺ 증가의 유래를 규명할 필요가 있다. Yoshimura와 Nezu⁴³는 흰쥐의 주위관류 이하선 선세포(perifused salivary acini)를 이용한 실험에서 주위관류액의 calcium을 제거하여도 isoproterenol과 carbamylcholine의 두 외부비 자극 물질에 의한 상승기전 효과를 없앨 수 없음을 관찰하였으며 세포내 calcium chelator인 BAPTA를 투여하였을 때에는 두 외부비 자극 물질 병합 투여에 의한 상승기전을 관찰할 수 없었기 때문에 두 분비자극 물질에 의한 상

승기전에 관여하는 세포내 Ca⁺⁺ 증가는 세포외액에서 유입된 것이 아니라 세포 내에서 유리되었음을 보고하였다. Rubin과 Adolf⁴⁴는 이자의 이하선 선세포를 saponin으로 투과성 세포(permeabilized cell)로 만들어 분비자극 호르몬 대신 직접 IP₃와 cAMP를 투여할 때 IP₃ 단독 투여시보다 세포내 Ca⁺⁺ 농도가 증가함을 보고하였다. 또한 이 실험에서는 cAMP 투여에 따른 세포내 Ca⁺⁺ 동원은, IP₃ 투여에 따른 Ca⁺⁺ 동원과는 달리, endoplasmic reticulum 막에서 IP₃와 경쟁적으로 세포질막 결합을 차단하는 heparin에 의해 차단되지는 않았다. 나아가서 non-mitochondrial microsomal Ca⁺⁺-ATPase inhibitor인 thapsigargin을 투여하였을 때는 IP₃에 의한 Ca⁺⁺의 동원은 완전차단 되었으나 cAMP에 의한 Ca⁺⁺ 동원은 일부만 차단되었다. 따라서 cAMP가 이하선의 외부비 기능에 작용하는 기전은 IP₃의 Ca⁺⁺ 동원 능력의 예민도를 조절할 뿐 아니라 보편 IP₃-insensitive Ca⁺⁺ pool도 동원시킴으로써 이루어 진다고 주장하였다.

cAMP가 어떻게 IP₃의 세포내 Ca⁺⁺ 유리기능에 영향을 미치는가에 대하여는 잘 알려져있지 않다. Burgess 등⁴⁵은 guinea pig의 간세포를 이용하여 cAMP-dependent 호르몬이 Ca⁺⁺-mobilizing 호르몬의 기능을 어떻게 변화시켜 상승기전을 나타내는가를 연구하였다. cAMP-dependent protein kinase는 (1,4,5)IP₃ receptor/channel protein을 phosphorylation 시키고 이것이 간세포에서 2가지 기전에 의해 IP₃에 의한 Ca⁺⁺ 분비에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 첫째는 유리되는 Ca⁺⁺의 전체양은 IP₃ 수용체 길항제에만 국한되는 것이 아니고, 관련된 Ca⁺⁺ pool의 크기를 증가시킨다는 것이다. 둘째로 더욱 중요한 것은 cAMP dependent protein kinase는 IP₃에 의한 Ca⁺⁺ 유리에 대한 EC₅₀을 감소시키는데 이는 IP₃-binding site의 친화력을 증가시키거나 Ca⁺⁺-gating mechanism을 변화시킴으로써 가능하다고 추정하였다. 그러나 cAMP-dependent protein kinase에 의한 IP₃ receptor/channel protein의 인산화는 여러 세포마다 그 의미가 다르기 때문에 이자 선세포에서의 역할과 의의에 대해서는 더욱 연구가 필요하다고 생각된다.

Secretin이 외분비 기능에 영향을 미치는 기전은 본 실험에서와 같이 세포내 Ca^{++} 농도의 증가가 큰 역할을 한다. 이는 Ca^{++} 농도의 증가가 amylase 등의 세포의 유출(exocytosis)에 가장 많은 관여를 하기 때문으로 생각된다. 하지만 secretin 대신 cAMP-dependent protein kinase (PKA) activator인 (Sp)-5,6-DC1-cBIMPS를 투여하여 cAMP-PK 활성도를 최대로 자극하였을 때에도 secretin 투여시에서 보다 이차 외분비 양이 적었다는 보고가 있다.⁴⁶ 이는 secretin이 cAMP를 통한 외분비 기능 이외에도 calcium pathway에 영향을 미치는, 즉 이중효과를 갖는 간접적 증거라고 할 수 있다. 또 cAMP analogue가 흰쥐 이차 투과성 분산 세포에서 amylase의 세포의 유출에 어떠한 영향을 미치는지 조사한 실험에서는, Ca^{++} free medium에서도 cAMP에 phorbtor ester(TRA), GTP(γ S)와 같이 calcium pathway와 관계있는 세포내 전령 물질의 조합만으로도 amylase의 세포의 유출이 일어남을 관찰하였다.⁴⁷ 따라서 이차에서 amylase를 세포의 유출시키는 외분비 기능을 전적으로 Ca^{++} 에 의존하는 과정만은 아닐 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 분산 선세포에서 secretin 첨가후 세포내 Ca^{++} 농도가 증가하여 이것이 amylase 분비에 주요한 상승기전으로 생각되나, cAMP가 Ca^{++} 과 무관한 경로로 외분비 상승기전에 일부 관여할 수 있을 것으로 추측된다.

Insulin은 직접적인 이차 외분비 자극 호르몬은 아니지만 이차 선세포의 단백질, RNA 및 DNA 합성을 자극하고⁴⁸⁻⁵⁰ amylase gene transcription을 유도시킴^{51,52}으로써 이차 외분비 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 특히 이차 외분비 기능에 있어 insulo-acinar axis가 주장된 이래¹⁸ insulin은 CCK 자극에 의한 이차 외분비에 상승작용이 있음이 증명되었다.^{24,53} 이상과 같은 일련의 생체 실험에서의 insulin의 이차 외분비의 상승기전에 관한 실험과는 달리 세포수준에서의 insulin의 외분비 상승기전에의 영향은 Matsushita 등⁵⁴의 흰쥐 이차 선세포를 이용한 연구에 의하여 처음으로 알려졌다. 이 실험에서 세포수준에서의 insulin의 상승기전은 CCK 혹은 secretin 단독에 대하여는 그 상승기전이 없으나

CCK와 secretin 동시 투여시에만 상승기전을 확인할 수 있었다. 또한 이 상승작용의 기전은 이차 선세포막의 Na^+, K^+ -ATPase 활성도의 증가와 관련이 있었음을 보고하였다. 본 연구에서도 분산이차 선세포에서 insulin은 CCK 단독의 경우보다는 CCK+secretin에 의해서만 외분비 기능의 증가 경향을 보였다. 하지만 Matsushita 등⁵⁴의 결과와는 달리 insulin에 의한 외분비 상승작용은 secretin-CCK 상승작용의 효과에는 훨씬 못 미치는 것이었으며 통계적인 유의성도 없었다. 본 실험에서는 특히 insulin의 이차 외분비의 영향이 한 장기 내에서 일어나기 때문에 permeation effect가 있을 것으로 생각되어 insulin을 혈중 농도보다 훨씬 높은 $1\mu M$ 의 농도까지 투여해 보았으나 역시 뚜렷한 외분비 상승기전은 관찰할 수 없었다. 또한 본 실험을 통하여 insulin이 생체 실험에서는 이차 외분비 기능에 상승작용이 뚜렷하여도 분산 선세포에서는 그 기능이 뚜렷하지 않고, insulin이 세포내 전령 물질 생성량도 변화시키지는 않는 것으로 확인되었다.

본 실험에서 확인된 흰쥐 이차 분산 선세포에서의 secretin-CCK의 상승작용은 생체 실험에서와 같이 신경 지배 효과 없이도 가능하며 이 상승작용의 기전은 두 분비 자극 호르몬에 의해 일차적으로 생성된 cAMP와 IP_3 생성 후에 세포내 Ca^{++} 농도 증가에 의해 이루어지는 것으로 생각된다. 이는 같은 외분비 기능이 있는 흰쥐 분산 투과성 이하선 선세포에 cAMP와 IP_3 의 두 이차 전령 물질을 직접 투여하여 규명한 상승작용의 확인실험⁴⁴의 결과와 유사성을 보인다. 그러나 본 실험에서 확인된 두 이차 전령 물질에 의한 세포내 calcium 증가의 정확한 정량적인 유래 및 calcium 증가에 따른 여러 protein kinase 등을 포함한 주효기들의 변화에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

목적 : 흰쥐 이차의 분산 선세포에서 amylase 유리에 대한 CCK와 secretin 및 insulin의 상승작용 유무와 그 기전을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 시행하였다. **대상 및 방법** : 분비 자극 물질들에 의한

이자 외분비 상승작용 유무를 살펴보기 위하여 secretin, CCK 및 insulin 투여 후 이들 물질에 의한 분산 선세포에서의 amylase 유리를 측정하였다. 또한 이러한 분비자극 물질에 의한 상승작용 기전을 알아보기 위하여 분비자극 물질 투여 후 분산 선세포내 IP₃와 cAMP 생성량의 변동 및 세포내 Ca²⁺ 농도 변동을 관찰하였다. **결과:** 분산 선세포의 amylase 유리는 CCK 단독 투여군에 비하여 CCK-8 + secretin 투여군에서 상승되었으며 특히 CCK-8 농도 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰M에서 amylase 유리가 의의있게 증가하였다. 그러나 CCK + secretin의 상승작용에 대해 insulin은 별 영향이 없었다. CCK-8 투여로 세포내 IP₃는 증가하였으나 secretin이나 forskolin의 첨가에 의해 더 이상의 증가는 없었으며, insulin 투여로 별 변동은 없었다. Secretin 투여로 세포내 cAMP양은 현저히 증가하였으나 secretin에 CCK-8d이나 A23187을 첨가한 군에서 세포내 cAMP의 양은 별 변동이 없고 오히려 의의있게 감소하였다. 하지만 insulin 투여 유무에 따른 cAMP 생성량의 변화는 관찰되지 않았다. 세포내 Ca²⁺의 농도는 CCK-8 단독 투여 때보다 secretin이나 dibutyryl cAMP을 전 투여한 군에서 유의하게 증가하였다. **결론:** 흰쥐 이자 분산 선세포에서 CCK의 외분비 기능에 대한 secretin의 상승작용이 확인되었다. 하지만 insulin의 CCK 및 CCK+secretin에 대한 외분비 상승작용은 뚜렷하지 않았다. Secretin-CCK의 상승작용 기전은 각각의 호르몬에 의해 일차적으로 생성된 cAMP나 IP₃와 같은 세포내 전령 물질 생성량의 증가에 기인한 것이 아니고 이들 세포내 전령 물질 생성후 cAMP에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가에 의한 것으로 생각된다.

색인단어: 이자 분산 선세포, secretin-CCK 상승작용, IP₃, cAMP, Ca²⁺

참 고 문 헌

- Folsch UR, Wormsley KG. Pancreatic enzyme response to secretin and cholecystokinin-pancreozymin in the rat. *J Physiol* 1973;234:79-94.
- Petersen H, Grossman MI. Pancreatic exocrine secretion in anesthetized and conscious rats. *Am J Physiol* 1977;233:E530-E536.
- Haarstad H, Petersen H. Interaction between secretin and a cholecystokinin-like peptide on pancreatic protein secretion and synthesis in the rat. *Pancreas* 1988;3:543-550.
- Brown JC, Harper AA, Scatcherd T. Potentiation of secretin stimulation of the pancreas. *J Physiol* 1967; 190:519-530.
- Konturek SJ, Radecki T, Mikos E, Thor J. The effect of exogenous and endogenous secretin and cholecystokinin on pancreatic secretion in cats. *Scand J Gastroenterol* 1971;6:423-428.
- Henriksen FW. Effect of pancreozymin on the canine pancreatic secretion of fluid and bicarbonate. *Scand J Gastroenterol* 1968;3:637-640.
- Beglinger C, Grossman MI, Solomon TE. Interaction between stimulants of exocrine pancreatic secretion in dogs. *Am J Physiol* 1984;246:G173-G179.
- Wormsley KG. A comparison of the response to secretin, pancreozymin and a combination of these hormones, in man. *Scand J Gastroenterol* 1969;4: 413-41734.
- Vaysse N, Laval J, Duffaut M, Ribet A. Effect of secretin and graded doses of CCK-PZ on pancreatic secretion in man. *Am J Dig Dis* 1974;19: 887-894.
- Douglas WW. Stimulus-secretion coupling; The concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 1968;34:451-474.
- Robberecht P, Conlon TP, Gardner JD. Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig. *J Biol Chem* 1976;251:4635-4639.
- Solomon TE. Control of exocrine pancreatic secretion. In Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract* Volum 2. 3rd ed. New York: Raven, 1994:1521-1524.
- Korman LY, Walker MD, Gardner JD. Action of theophylline on secretagogue-stimulated amylase release from dispersed pancreatic acini. *Am J Physiol* 1980;239:G324-G333.

14. Meyer JH, Spingola LF, Grossman MI. Endogenous cholecystokinin potentiates exogenous secretin on pancreas of dog. *Am J Physiol* 1971;21:742-747.
15. You CH, Rominger JM, Chey WY. Potentiation effect of cholecystokinin-octapeptide on pancreatic bicarbonate secretion stimulated by a physiologic dose of secretin in Humans. *Gastroenterology* 1983; 85:40-45.
16. Chey WY, Lee KY, Chang TM, Chen YP, Millikan L. Potentiating effect of secretin on cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in dogs. *Am J Physiol* 1984;246:G248-G252.
17. Jo YH, Lee KY, Chang TM, Chey WY. Role of cholecystokinin in pancreatic bicarbonate secretion in dogs. *Pancreas* 1991;6:197-201.
18. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes* 1985;34:980-986
19. Kanno T, Saito A. The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J Physiol Lond* 1976;261:505-521.
20. Balk MW, Lang CM, White WJ, Munger BL. Exocrine pancreatic dysfunction in guinea pigs with diabetes mellitus. *Lab Invest* 1975;32:28-32.
21. Alder G, Kern HF. Regulation of exocrine pancreatic secretory process by insulin in vivo. *Horm Metab Res* 1975;7:290-296.
22. Saito A, Williams JA, Kanno T. Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J Clin Invest* 1980;65:777-782.
23. Sofrankova A. Effect of exogenous and endogenous insulin on the secretory response of the pancreas to the octapeptide of cholecystokinin(CCK-8) in normal rats. *Physiol Bohemoslov* 1984;33:391-398.
24. Lee KY, Zhou LU, Ren XS, Chang TM, Chey WY. An important role of endogenous insulin on exocrine pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 1990;258: G268-G274.
25. 김 응. 콜레라 독소자 적출 고양이 이자의 외분비 기능에 미치는 영향. 연세의대학위논문집 1988,134-145.
26. Gardner JD, Jensen RT. Regulation of pancreatic enzyme secretion in vitro. In Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. Volume 1. 1st ed. New York: Raven Press, 1981:831-871.
27. Burnham DB, McChesney DJ, Thurston KC, Williams JA. Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J Physiol(Lond)* 1984;349: 475-482.
28. Ansah TA, Dho S, Case RM. Calcium concentration and amylase secretion in guinea pig pancreatic acini; interactions between carbachol, cholecystokinin octapeptide and the phorbol ester, 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate. *Biochem Biophys Acta* 1986; 889:326-333.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248-254.
30. Bernfeld P. Amylases, α and β . *Methods Enzymol* 1955;1:149-158.
31. Challis RAJ, Batty I, Nahorski SR. Mass measurements of inositol(1,4,5) trisphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of neurotransmitters and depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:684-691.
32. Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 1972;247:1106-1113.
33. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260: 3440-3450.
34. Hansky J, Tiscornia OM, Dreiling DA, Janowitz HD. Maximal secretory capacity of the canine pancreas in response to pancreozymin and secretin. *Am J Physiol* 1964;206:351-356.
35. Moriyoshi Y, Shiratori K, Watanabe S, Takeuchi T. Potentiating effect of CCK and secretin on rat exocrine pancreas and its cholinergic dependence. *Pancreas* 1991;5:603-608.

36. Gardner JD, Jackson MJ. Regulation of amylase release from dispersed pancreatic acinar cells. *J Physiol* 1977;270:439-454.
37. Lee PC. Effect of CCK-octapeptide and secretin on amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion* 1979;19:6-14.
38. Yoshimura K, Nezu E, Yoneyama T. Mechanism of regulation of amylase release by α - and β -adrenergic agonists in rat parotid tissue. *Jpn J Physiol* 1984;34:655-667.
39. Seamon KB, Daly JW. Forskolin: Its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1986;20:1-150.
40. Templeton D. Augmented amylase release from rat parotid gland slices, in vitro. *Pflugers Arch* 1980;384:287-289.
41. Spearman TN, Butcher FR. Rat parotid gland protein kinase activation. Relationship to enzyme secretion. *Mol Pharmacol* 1982;21:121-127.
42. McKinney JS, Rubin RP. Enhancement of cyclic AMP modulated salivary amylase secretion by protein kinase C activators. *Biochem Pharmacol* 1988;37:4433-4438.
43. Yoshimura K, Nezu E. Interaction between the calcium and the cyclic AMP messenger system in perfused rat parotid acinar cells. *Biochem Pharmacol* 1992;5:1031-1041.
44. Rubin RP, Adolf MA. Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:600-606.
45. Burgess GM, Bird GSJ, Obie JF, Putney JW Jr. The mechanism for synergism between phospholipase C- and adenylate cyclase-linked hormones in liver. *J Biol Chem* 1991;266:4772-4781.
46. Schafer C, Steffen H, Printz H, Goke B. Effect of synthetic cyclic AMP analogs on amylase exocytosis from rat pancreatic acini. *Can J Physiol Pharmacol* 1994;72:1138-1147.
47. Kitagawa M, Williams JA, DeLisle RC. Interactions of intracellular mediators of amylase secretion in permeabilized pancreatic acini. *Biochem Biophys Acta* 1991;1073:129-135.
48. Korc M, Sankaran H, Wong KY, Williams JA, Goldfine ID. Insulin receptors in isolated mouse pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:293-299.
49. Mossner J, Logsdon CD, Williams JA, Goldfine ID. Insulin, via its own receptor, regulates growth and amylase synthesis in pancreatic acinar AR42J cells. *Diabetes* 1985;34:891-897.
50. Okabayashi Y, Moessner J, Logsdon CD, Goldfine ID, Williams JA. Insulin and other stimulants have nonparallel translational effects on protein synthesis. *Diabetes* 1987;36:1054-1060.
51. Korc M, Owerbach D, Quinto C, Rutter WJ. Pancreatic islet-acinar cell interaction; amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science* 1981;213:351-353.
52. Osborn L, Rosenberg MP, Keller SA, Meisler MH. Tissue-specific and insulin-dependent expression of a pancreatic amylase gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1987;7:326-334.
53. Garry DJ, Garry MG, Williams JA, Mahoney WC, Sorenson RL. Effects of islet hormones on amylase secretion and localization of somatostatin binding sites. *Am J Physiol* 1989;256:G897-G904.
54. Matsushita K, Okabayashi Y, Koide M, Hasegawa H, Otsuki M, Kasuga M. Potentiating effect of insulin on exocrine secretory function in isolated rat pancreatic acini. *Gastroenterology* 1994;106:200-206.