

## Oleic Acid 유발 흰쥐 이자 기능부전에 대한 Camostat 및 Cholecystokinin의 효과

연세대학교 의과대학 약리학교실

김경환 · 김동구 · 이민구 · 김 철 · 이정은

= Abstract =

### Effects of Camostat and Cholecystokinin on Oleic Acid-Induced Pancreatic Insufficiency in Rats

Kyung Hwan Kim, M.D., Dong Goo Kim, M.D., Min Goo Lee, M.D.,  
Chul Kim, M.D. and Jung Eun Lee, M.D.

*Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background/Aims:** Supplement of exogenous pancreatic enzyme is the only available method for the treatment of pancreatic insufficiency. Theoretically, it is rather a basic way to ameliorate symptoms of pancreatic insufficiency, if hypertrophy and/or hyperplasia could be induced in exocrine pancreas. Therefore, exogenous or endogenous cholecystokinin(CCK) which induces hypertrophy and hyperplasia of the exocrine pancreas may increase pancreatic enzyme output in patients with pancreatic insufficiency. This study aimed to determine the effects of CCK or camostat, a protease inhibitor with endogenous CCK releasing effect, on pancreatic insufficiency in rat pancreatic insufficiency model. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups; control, insufficiency, insufficiency tteck and insufficiency tcamostat. Pancreatic insufficiency was produced by instilling oleic acid(25  $\mu$ l/100g body weight) into the pancreaticobiliary duct of rats. CCK(CCK-8, 10  $\mu$ g/kg/day, s.c.) or camostat(200 mg/kg/day, i.g.) was given after oleic acid instillation. **Results:** Severe pancreatic insufficiency was developed within 3 days and maintained up to 2 weeks observed. The acini of the pancreas were progressively destroyed and showed fibrotic changes after oleic acid instillation, however, islet cells were intact. The amylase as well as trypsin output was decreased more than 90% of control at 1 week after induction of pancreatic insufficiency. The pancreatic enzyme secretion was minimally maintained in the insufficiency rats treated with CCK or camostat. Further, the acinar destruction was attenuated by CCK or camostat. **Conclusions:** These results strongly suggest that CCK or camostat improves the function of exocrine pancreas in pancreatic insufficiency. (Korean J Gastroenterol 1995;27:96-109)

**Key Words:** Pancreatic insufficiency, Cholecystokinin, Camostat.

접수: 1994년 8월 24일, 승인: 1994년 12월 15일

연락처: 김경환, 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 약리학교실

## 서 론

이자 외분비선은 탄수화물, 단백질, 지방 및 핵산 등 각종 영양소의 소화에 관여하는 효소를 합성하고 분비한다. 따라서 이자 외분비의 기능부전(exocrine pancreatic insufficiency)은 장내 가수분해 효소의 결핍으로 인해 지방을 비롯한 여러가지 영양소의 흡수 장애를 초래하는 심각한 질환이다.

실험적 이자 기능부전의 모델로는 몇 가지 방법이 알려져 있다. 그 중 첫번째는 이자관을 결찰하는 방법이다.<sup>1,2</sup> 그러나 이 방법은 흰쥐의 경우 총담관과 주 이자관(main pancreatic duct)이 하나의 해부학적 구조이므로 담도계도 함께 막혀서 간-담도계 및 이자 내분비계의 장애도 같이 유발되는 단점이 있고, 장기간 실험에서 이를 피하려면 담도 우회로술(bile- diversion)을 시행하여야 하는 번거로움이 있다. 다음으로 D-penicillamine을 첨가한 구리 결핍 식사를 장기간(6개월간) 주는 방법이 있는데,<sup>3</sup> 이 방법은 기간이 오래 걸리고 식이조성에 세심한 주의를 필요로 한다. 세번째로 흰쥐의 담취관에 oleic acid를 역행성으로 주입하는 방법이 있으며, 이 방법은 당뇨병의 발생 같은 이자 내분비 기능장애나 담도계 폐쇄없이 외분비 기능부전만을 단기간내에(2주 이내) 유발시킬 수 있다고 알려져 있다.<sup>4</sup>

이자 외분비 기능부전에 대한 치료로서는 결핍된 효소의 보충, 이자추출물 및 medium-chain triglyceride 투여가 이용되고 있으며,<sup>2,5,6</sup> 근본적인 이자의 분비선 기능의 회복은 아직까지 해결되고 있지 않다. 최근 이자의 세포분열과 세포성장을 촉진시키는 물질을 이자 기능부전의 치료에 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 그중 이자 외분비선 세포의 성장과 단백질합성을 촉진시키는 홀몬인 cholecystokinin (CCK)이 가장 활발히 연구되고 있는데, 임상적으로 만성이자염 환자에게 CCK-8,<sup>7</sup> CCK 유사 펩타이드인 cerulein,<sup>8</sup> 또는 단백 분해효소 억제물질을 함유하고 있는 생콩<sup>9</sup>을 투여하여 이자효소의 분비 증가를 관찰하였다는 보고가 있다. 한편 Steinberg 등<sup>10</sup>은 실험적으로 이자 외분비 기능부전을 유발한 흰쥐에서 CCK 유사 펩타이드인 cerulein을 장기간 투여하여 이자조직의 효소함량 증가를 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

정상 흰쥐에 CCK를 장기 투여할 경우 조직내 단백질 함량과 DNA 함량이 증가하지만, 이자 내분비계에는 별로 영향을 미치지 않는다고 알려져 있다.<sup>11</sup> 한편 정상 흰쥐에 장기간 trypsin 억제물질을 투여하면 이자의 비대와 증식이 나타남은 잘 알려져 있으며,<sup>12~16</sup> 이러한 효과도 혈중 내인성 cholecystokinin치의 증가에 의한 것으로 주장되고 있다.<sup>17~20</sup> 즉 십이지장내 단백질분해효소의 활성이 감소될 경우 되먹이 기전에 의해 CCK 분비를 항진시켜 혈중 CCK 농도 상승을 초래하게 되며, 이같은 사실은 이자액의 우회,<sup>19</sup> 이자기능 부전유발,<sup>4,21</sup> trypsin 억제물질 투여<sup>22</sup> 등의 실험으로 입증되었다.

Trypsin 억제물질에는 합성제제인 guanidino acid ester가 널리 알려져 있는데 이 중 aromatic ester 제제인 camostat은 trypsin 뿐아니라 kallikrein, plasmin, thrombin, C1r 및 C1 esterase 같은 혈장효소의 활성을 억제한다.<sup>23</sup> Camostat은 분자량이 작음(분자량 494.53) 물질로 수용성이며 용액내에서 안정성이 있다. 따라서 음식물 성분을 바꾸지 않고 경구적으로 투여할 수 있을 뿐만 아니라, trypsin 억제물질 이외의 물질이 함유된 생콩에 비하여 독성이 없는 용량에서도 4~15일간 경구 투여하면 이자에 지대한 영향을 주게되는 장점이 있어 이자 외분비 기능 변동 연구에 중요한 도구로 쓰이고 있다.<sup>24,25</sup>

이에 본 연구는 흰쥐에게 인위적으로 이자 기능부전을 유도한 후 CCK 및 camostat을 투여하여 이자 외분비 기능부전이 회복되는 지를 살펴보고, 아울러 이자 외분비 기능이 저하된 상태에서도 단백질분해효소 억제제가 이자성장에 효과를 보이는지를 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley

계 흰쥐를 사용하였으며, 실험전 일주일 이상 단백질 21.5%, 지방 3.5%, 칼슘 0.6% 이상이 함유된 시판 흰쥐용 표준 배합사료(삼양사료사)로 동물실에서 사육한 후 사용하였고 담취액 채취전 24시간동안 물을 제외하고는 금식시켰다.

실험군은 대조군, 이자 외분비 기능부전 유발군, 이자 외분비 기능부전 유발후 CCK-8 투여군, 이자 외분비 기능부전 유발후 camostat 투여군으로 나누었다. 각군은 다시 이자외분비 기능부전 유발 3일, 7일 및 14일 경과군으로 세분하였으며 담취액 및 이자조직을 채취하여 외분비 기능과 조직병변을 검색하였다.

## 2. 이자 외분비 기능부전 유발

흰쥐를 secobarbital(30 mg/kg, i.p.) 마취하에 정중 개복한 후 담취관 개구부로부터 1 cm 원위부의 십이지장을 천공한 후 polyethylene tube를 담취관에 삽입하였다. Oleic acid(25  $\mu$ l/100 g body weight)는 25  $\mu$ l/min의 속도로 infusion pump(Scientific & Research Instruments, Edenbridge, U.K.)를 사용하여 주입하였으며, 주입하는 동안 간으로의 유입을 막기 위하여 총담관의 근위부를 atraumatic clip으로 일시 폐쇄하였다. 주입이 끝난후 oleic acid가 고루 분포되도록 2 분간 기다린 후 polyethylene tube와 clip을 제거하였으며, 십이지장의 천공부위와 복벽을 봉합하였다.

## 3. CCK-8 또는 Camostat 투여

CCK(CCK-8; Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.)는 10  $\mu$ g/kg의 용량으로 하루 2회씩 oleic acid주입 후 3일간, 7일간, 14일간 피하주사하였다. Camostat은 수도물에 녹여 200 mg/kg/day의 용량으로 oleic acid 주입 후 3일간, 7일간, 14일간 위내투여(intra-gastric administration)하였다.

## 4. 담취액 채취 및 효소단백 측정

흰쥐를 urethane(1.2 g/kg, s.c.)으로 마취한 후 내경정맥에 polyethylene tube를 삽입하여 약물주입에

사용하였다. 복부 중앙선을 절개한 후 담취관에 polyethylene tube를 삽입하여 담취액을 채취하였다. 담취액은 삼관후 30분 경과후 기초분비, secretin (Sigma Co. St.Louis, MO, U.S.A.; 0.5 CU/kg/hr) 자극분비, secretin(0.5 CU/kg/hr)과 CCK-8(Sigma Co. St. Louis, MO, U.S.A.; 1,200 ng/kg/hr) 동시자극 분비를 30 분씩 차례로 채취하였다. 담취액의 분비량은 미리 무게를 잰 sample tube에 채취하여 무게로 측정하였으며, 채취한 담취액은 분석때까지 -70℃에 냉동보관 하였다. 담취액 채취후 이자조직을 적출하여 무게를 측정하였고 이 중 uncinat엽 일부를 조직내 단백질 및 효소함량 측정에 이용하였다.

담취액 및 이자조직의 총 단백질함량 측정은 Lowry법<sup>26</sup>을 이용하였고, amylase 활성치는 전분기질에서 유리되는 maltose를 Bernfeld법<sup>27</sup>으로 측정하여 international unit(IU)으로 표시하였다. Trypsin 활성치는 시료를 enterokinase로 37℃에서 2 시간동안 incubation하여 trypsinogen을 활성화 시킨 다음 N-p-toluenesulfonyl-L-arginine methylester(TAME) 기질의 분해속도를 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-240, Kyoto, Japan)로 247 nm에서 측정하였다.<sup>28</sup>

이자조직은 1mg당 10 $\mu$ l의 생리식염수를 넣어 균질화한 후, 원심분리(2,700 g, 30 분)하여 얻은 상층액을 단백질 및 효소 측정에 이용하였다.

## 5. 이자의 조직학적 관찰

적출한 이자 나머지 부위를 10% 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매하여 6  $\mu$ m의 박절표본을 제작한 후 헤마톡실린-에오진 염색을 하였다. 광학현미경으로 저배율( $\times$ 100)에서 조직 표본을 관찰하였다.

## 6. 자료 분석

통계학적 분석은 분산분석(analysis of variance)을 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 경우 의미가 있는 것으로 판정하였다.

**결 과**

**1. 주입한 Oleic Acid 용량에 따른 이자기능 및 형태의 변동**

본 실험에 앞서서 담취관으로 oleic acid를 주입하면 이자 외분비 기능부전이 유발되는 것을 확인하고 또한 주입하는 oleic acid의 적정 용량을 결정하기 위하여 체중 100 g당 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ l의 oleic acid를 용량별로 각 2 마리씩의 흰쥐에 주입하고 1주일 후 실험동물을 희생시켰다.

생리식염수 또는 oleic acid 6.25  $\mu$ l/100 g BW의 담취관내 주입으로는 이자무게 및 amylase 분비가 별로 변동되지 않았으나 oleic acid 12.5  $\mu$ l/100 g BW 또는 그 이상 주입으로 조직무게는 50% 이상 감소하였고, 조직내 단백, amylase 및 trypsin 함량 역시 oleic acid의 담취관내 주입으로 현저히 감소되었다. 특히 amylase 함량은 12.5  $\mu$ l/100 g BW 이상 주입한 예에서는 그 활성을 거의 측정할 수 없었다 (Fig. 1, 2). 담취관으로의 amylase 분비는 기초 및 자극분비 모두에서 대조군에 비하여 1% 이하로 감소

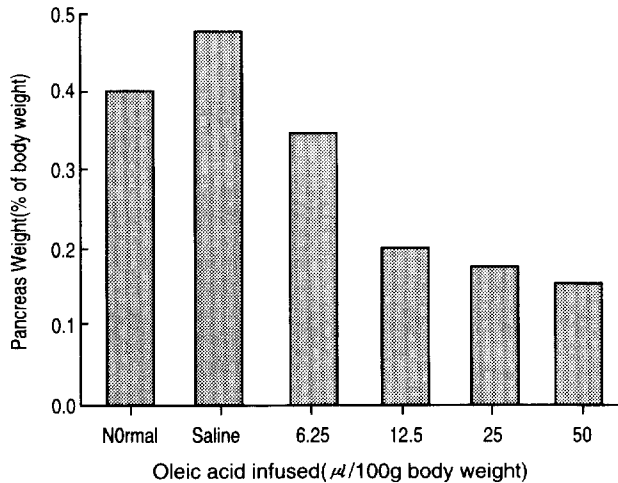
하는 심한 외분비 부전을 보였다(Fig. 3).

이상의 예비 실험을 토대로 본 실험은 25  $\mu$ l/100 g BW의 oleic acid를 담취관내 주입하여 이자외분비 기능 부전을 유발하였다.

**2. 이자외분비 기능부전에서의 이자무게 및 조직내 효소단백 함량 변동**

Oleic acid로 이자부전이 유발된 흰쥐는 대조군에 비해 이자무게 및 효소단백 총 함량이 현저히 감소하였으며 이자부전 유발후 기간이 길어질 수록 더욱 감소하였다(Table 1, Fig. 4). 즉 대조군의 조직 단백질 함량은  $39.6 \pm 5.2 - 56.0 \pm 4.0$  mg/100g BW이었으나 이자 기능부전 유발 3일에  $22.7 \pm 1.9$ , 7일에  $9.8 \pm 0.6$ , 14일에  $6.1 \pm 1.0$ 으로 감소하였다. Amylase나 trypsin 함량은 단백질 함량 감소보다 현저하여 대조군에 비해 3일에 1% 이하였으며 7일, 14일에는 거의 측정되지 않았다.

이자 기능부전 유발로 인한 조직내 단백질 함량 변동은 CCK 또는 camostat 투여로 회복되는 경향을 나타내었다. 특히 조직 단백질함량이 3일에는 처치하지 않은 군과 별 차이가 없었으나 camostat 투여 7일



**Fig. 1.** Effects of instillation of oleic acid into the pancreaticobiliary duct on pancreatic weight in rats. Pancreatic tissues were obtained 1 week after the instillation. "Normal" represents the uninstilled group and "Saline" represents the group whose rats were instilled with 25  $\mu$ l/100g body weight of normal saline into the duct.

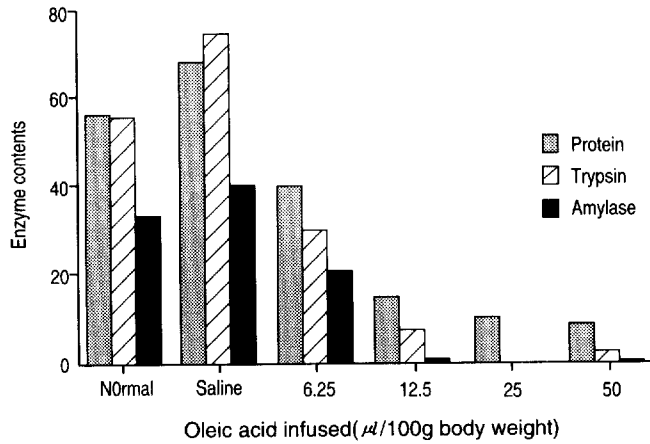


Fig. 2. Effects of instillation of oleic acid into the pancreaticobiliary duct on the tissue contents of protein, trypsin, or amylase in rats. Values are expressed as mg(protein), TAME U(trypsin), and 10<sup>3</sup>IU(amylase) per 100 g body weight. Other legends are the same as Fig. 1.

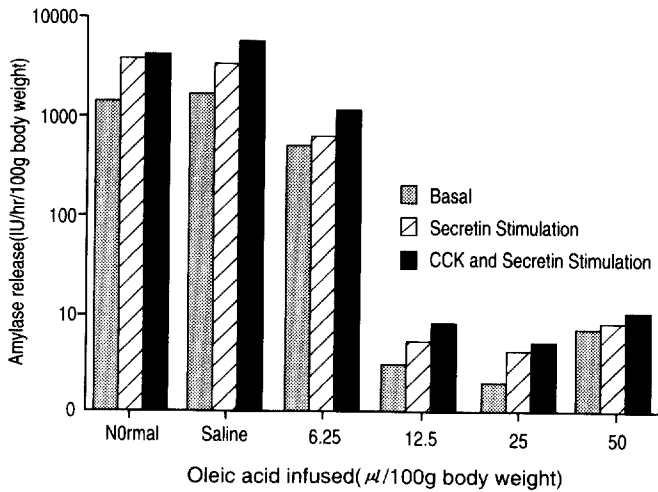


Fig. 3. Effects of instillation of oleic acid into the pancreaticobiliary duct on amylase output in rats. Basal, secretin(0.5 CU/kg/hr) -stimulated, and secretin(0.5 CU/kg/hr) × cholecystokinin(1,200 ng/kg/hr) -stimulated amylase release were measured 1 week after the instillation. Other legends are the same as Fig. 1.

에 기능부전 유발군 9.8±0.6 mg/100 g BW에서 16.9 ± 4.3으로, 14일에 기능부전 유발군 6.1±1.0에서 11.9±1.9로 유의있는 증가를 보였다.

### 3. 담췌액내 효소단백 분비량

담췌액 분비량은 3일군에서 secretin과 CCK 동시

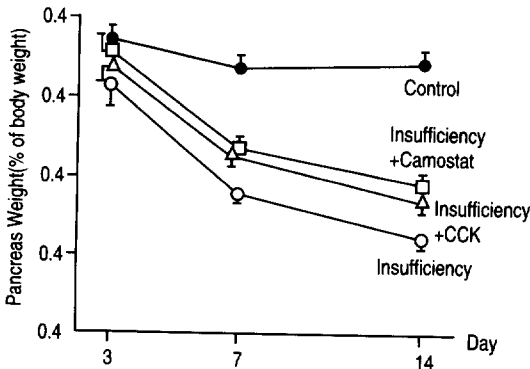
자극시 대조군 397.8 ± 20.4 μ/hr/100 g BW 에서 기능부전 유발군 337.1 ± 21.4로, 총단백 분비량은 대조군 11.67 ± 2.78 mg/hr/100 g BW에서 기능부전 유발군 3.26 ± 0.85로 감소하였으며, 7일군과 14일군에서도 같은 양상을 나타내었다. 그러나 이자 기능부전 유발군과 기능부전 유발 후 CCK나 camostat을 투여

**Table 1.** Effects of Camostat and CCK on the Pancreatic Contents of Protein and Enzymes in Experimental Pancreatic Insufficiency of Rats

	Protein (mg/100 g BW)	Amylase (IU/100 g BW)	Trypsin (TAME U/100 g BW)
3day Control	56.0 ± 4.0	38.8 ± 1.7	64.9 ± 9.7
Insufficiency <sup>1</sup>	22.7 ± 1.9	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.5
Insuff + Camostat <sup>2</sup>	24.3 ± 1.0	0.7 ± 0.1	2.2 ± 1.1
Insuff + CCK <sup>3</sup>	25.7 ± 3.8	1.2 ± 0.3	3.6 ± 2.3
1week Control	39.6 ± 5.2	24.6 ± 5.3	29.6 ± 8.2
Insufficiency	9.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Insuff + Camostat	16.9 ± 4.3*	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.5
Insuff + CCK	13.5 ± 1.0	0.1 ± 0.1	1.4 ± 1.4
2week Control	45.7 ± 3.2	29.0 ± 2.5	39.7 ± 2.8
Insufficiency	6.1 ± 1.0	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Insuff + Camostat	11.9 ± 1.9*	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3
Insuff + CCK	10.3 ± 2.6	1.1 ± 0.6	2.3 ± 1.6

Values are means ± SE. Enzyme protein contents were measured 3 days, 1 week, and 2 weeks after induction of pancreatic insufficiency. <sup>1</sup>Pancreatic insufficiency was induced by instillation of oleic acid(25 μl/100 g body weight) into pancreaticobiliary duct. <sup>2</sup>Camostat(200 mg/kg/day, i.g.) was administered until the sampling day. <sup>3</sup>CCK-8 (10 μg/kg/day, s.c., b.i.d.) was administered until the sampling day.

\* p<0.05, difference from Insufficiency.



**Fig. 4.** Effects of camostat and CCK on the pancreatic weights in experimental pancreatic insufficiency of rats induced by oleic acid instillation(25 μl/100 g BW) into the pancreaticobiliary duct. Two weeks of camostat or CCK treatment caused significant increase of pancreas weight.

\* p< 0.05, difference from Insufficiency.

한 군 간에는 별 차이점이 없었다.

Amylase 분비량은 부전 유발 후 CCK 또는 camo-

stat을 투여함으로써 기초분비 및 자극분비가 모두 증가되었으며, 특히 투여 14일에서 뚜렷하였다. Trypsin 분비 역시 비슷한 경향을 나타내었다(Table 2, 3).

#### 4. 조직학적 검색

담취관에 oleic acid를 주입한 후 3일이 지나면 정상 흰쥐에 비하여 세포간질 섬유화, 이자소엽의 구조 파괴가 보였고, 선세포의 위축 및 효소과립의 소실을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6). CCK를 주었을 경우 주지 않았을 경우에 비하여 비교적 세포 소엽의 구조가 잘 유지되었고, 섬유화도 적었으며, 이자 외분비선 조직 및 선세포내의 효소과립이 많이 존재하였다(Fig. 7). Camostat을 투여한 경우도 CCK 투여와 비슷하였으며, 효소과립이 더욱 풍부한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

Oleic acid 투여후 7일이 지나면 섬유화가 고도로 진행되어 있고 선세포의 위축이 심하여 선포세포

**Table 2.** Effects of Camostat and CCK on Amylase Output in Experimental Pancreatic Insufficiency of Rats

	Basal	Stimulation	
		Secretin	Secretin + CCK
3day Control	2173 ± 419	3872 ± 438	6154 ± 754
Insufficiency	6 ± 1	6 ± 1	18 ± 3
Insuff + Camostat	8 ± 2	9 ± 1	28 ± 7
Insuff + CCK	10 ± 2	11 ± 3	29 ± 5
1week Control	2069 ± 773	2985 ± 874	6180 ± 943
Insufficiency	6 ± 1	9 ± 2	15 ± 4
Insuff + Camostat	13 ± 7	20 ± 9	26 ± 7
Insuff + CCK	20 ± 10	27 ± 12	29 ± 9
2week Control	1954 ± 520	3971 ± 758	6143 ± 734
Insufficiency	2 ± 0	2 ± 0	3 ± 0
Insuff + Camostat	8 ± 2	14 ± 5*	20 ± 6*
Insuff + CCK	14 ± 4*	13 ± 4*	26 ± 6*

Values are means ± S.E. in IU/hr/100g BW. Amylase contents in pancreaticobiliary secretion were measured 3 days, 1 week, and 2 weeks after induction of pancreatic insufficiency. Pancreatic secretion was stimulated by intravenous infusion of secretin (0.5 CU/kg/hr) or secretin (0.5 CU/kg/hr) with CCK-8 (1200 ng/kg/hr). Other legends are same as Table 1.

\* p<0.05, difference from Insufficiency.

(acini) 구조가 세관(tubule) 같은 모습으로 변한 것을 관찰할 수 있었다. 7일군에서도 CCK 혹은 camostat 을 투여하면 이자 선세포가 조금 더 존재하는 것을 관찰할 수 있으나 그 정도가 경미하여 뚜렷한 차이를 발견할 수는 없었다.

14일군에서는 7일군보다 더 심한 섬유화의 진행과 이자 외분비선이 소실된 소견을 나타내었다. 그렇지만 이자 내분비선인 islet 세포는 비교적 잘 유지된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9). 7일군과 마찬가지로 CCK 혹은 camostat 투여군은 투여하지 않은 군에 비해 이자 선세포가 조금 더 존재하는 것을 관찰할 수 있었으나, 90% 이상 외분비 조직이 소실된 소견을 나타내었다(Fig. 10).

## 고 찰

이자 소화효소는 단백질, 탄수화물, 지방 및 핵산 등 각종 영양소의 체내 흡수에 꼭 필요한 물질이다.

만성이자염, 이자암, 낭포성 섬유종과 이자 절제술의 시행등 여러 원인에 의하여 소화효소의 분비가 감소되어 발생하는 이자외분비 기능부전은 영양결핍, 발육부전, 지방변(steatorrhea), 각종 체내 대사이상 등 여러 문제를 일으킨다.

외분비 기능부전의 원인중 많은 부분을 차지하고 있는 만성이자염은 조직 병리상 주요 이자관의 확장 및 이자 실질의 심한 괴사 및 섬유화를 보이는데, 아직 병인 기전은 확실히 밝혀져 있지 않다. 만성이자염은 외분비 기능부전 이외에도 통증을 유발시키고 종종 합병증으로 가상낭종과 급성출혈성 이자염(acute hemorrhagic pancreatitis) 및 당뇨병을 발생시키는 등 임상적으로 심각한 문제가 되는 질환이다.<sup>29</sup>

이자 외분비 기능부전에 관한 연구를 진행시킴에 있어 가장 기본적인 것 중의 하나는 실험 모델의 확립이다. 본 실험에서 흰쥐에 oleic acid를 역행성으로 담취관에 주입한 결과 12.5 µl/100 g BW 이상의 용량에서 심한 이자외분비 부전이 발생된 것을 확인할

**Table 3.** Effects of Camostat and CCK on Trypsin Output in Experimental Pancreatic Insufficiency of Rats

	Basal	Stimulation	
		Secretin	Secretin + CCK
3day Control	5.72 ± 1.03	13.07 ± 4.49	46.09 ± 8.46
Insufficiency	0.41 ± 0.16	0.10 ± 0.03	0.44 ± 0.16
Insuff + Camostat	0.13 ± 0.08	0.19 ± 0.12	0.58 ± 0.23
Insuff + CCK	0.39 ± 0.19	0.23 ± 0.09	0.41 ± 0.09
1week Control	9.95 ± 3.68	15.27 ± 3.72	57.07 ± 5.09
Insufficiency	0.54 ± 0.16	0.30 ± 0.12	0.46 ± 0.13
Insuff + Camostat	0.56 ± 0.19	0.41 ± 0.16	0.85 ± 0.38
Insuff + CCK	0.48 ± 0.13	0.66 ± 0.20	0.63 ± 0.13
2week Control	5.27 ± 0.80	16.37 ± 3.72	35.78 ± 6.28
Insufficiency	0.19 ± 0.05	0.35 ± 0.17	0.47 ± 0.26
Insuff + Camostat	0.38 ± 0.12	0.59 ± 0.21	1.24 ± 0.36
Insuff + CCK	0.58 ± 0.12*	0.47 ± 0.10	0.77 ± 0.05

Values are means ± S.E. in TAME U/hr/100g BW. Trypsin contents in pancreaticobiliary secretion were measured 3 days, 1 week, and 2 weeks after induction of pancreatic insufficiency. Pancreatic secretion was stimulated by intravenous infusion of secretin (0.5 CU/kg/hr) or secretin (0.5 CU/kg/hr) with CCK-8(1200 ng/kg/hr). Other legends are same as Table 1.

\*p<0.05, difference from insufficiency.

**Fig. 5.** Photomicrograph of normal rat pancreas. Normal lobular architectures and zymogen granules of acinar cells are observed(H&E stain; × 100).

수 있었다. 또한 조직학적 검색에서 비교적 선택적으로 외분비 세포만 손상을 받고 내분비 세포는 손상을 받지 않은 것을 확인할 수 있어 이 방법이 유용한 실험 모델이 될 수 있음을 알 수 있었다. Oleic acid는 불포화 지방산(C18)으로서 주로 산성효과와

**Fig. 6.** Photomicrograph of rat pancreas 3 days after oleic acid instillation(25 μl/100g body weight). Interstitial fibrosis, moderately destructed lobular architecture, and little zymogen granules are demonstrated(H&E stain; × 100).

계면활성 작용으로 세포막을 파괴하여 세포에 손상을 준다.<sup>4,30</sup> 또한 담취관에 역행성으로 주입할 경우 이자관의 폐쇄(obstruction)를 일으키고 이 작용도 이



**Fig. 7.** Photomicrograph of rat pancreas treated with CCK( $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , s.c., b.i.d.) for 3 days after oleic acid instillation. Less destructed lobular architecture, less interstitial fibrosis, and more zymogen granules are observed than Fig. 6 (H&E stain;  $\times 100$ ).

**Fig. 9.** Photomicrograph of rat pancreas 2 weeks after oleic acid instillation( $25 \mu\text{l}/100\text{g}$  body weight). Exocrine pancreatic lobules are severely destroyed by fibrosis. Relatively well preserved pancreatic islet is seen(H&E stain;  $\times 100$ ).

**Fig. 8.** Photomicrograph of rat pancreas treated with camostat( $200 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ , i.g.) for 3 days after oleic acid instillation. Less destructed lobular architecture and more zymogen granules are observed than Fig 6(H&E stain;  $\times 100$ ).

**Fig. 10.** Photomicrograph of rat pancreas treated with camostat( $200 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ , i.g.) for 2 weeks after oleic acid instillation. More acinar cells are observed than Fig.9, but more than 90% of exocrine tissues are lost(H&E stain;  $\times 100$ ).

자 기능부전 유발에 기여하였을 것으로 생각되며, 폐쇄를 좀 더 효과적으로 유발시키기 위하여 zein을 혼합하여 주입하기도 한다.<sup>31</sup>

현재 이자외분비 기능부전의 치료로는 지방변과 흡수장애를 치료하기 위하여 지질분해 효소가 강화된 이종 동물의 이자효소를 투여하거나 medium-chain triglyceride를 공급하며, 때로 심한 영양결핍이나 체중 감소가 발생할 경우에는 비경구영양법

(parenteral nutrition)을 시행하는 정도가 이용되고 있다. 아직까지 근본적으로 이자 기능의 개선이나 외분비조직의 재생은 해결되고 있지 않다. 근래에 이자의 세포분열과 세포성장을 촉진시키는 물질을 이자 기능부전의 치료에 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 그 중 이자외분비선 세포의 성장과 단백질 합성을 촉진시키는 홀몬인 cholecystokinin(CCK)과 그 관련물질이 가장 활발히 연구되고 있는데, 체제

적으로 잘 정립된 연구는 아니지만 임상적으로 만성 이자염 환자에게 CCK-8,<sup>7</sup> CCK 유사 펩타이드인 cerulein<sup>8</sup> 또는 단백 분해효소 억제물질들을 함유하고 있는 생콩<sup>9</sup>을 투여하여 이자효소의 분비 증가를 관찰하였다는 보고가 있다.

이번 실험에서 oleic acid로 이자기능 부전을 유발한 흰쥐에 합성 CCK를 투여한 결과 투여하지 않았던 흰쥐에 비해 어느정도 이자기능이 유지됨을 관찰할 수 있었다. 이자 기능부전 유발군과 부전 유발후 CCK를 투여한 군간의 이자기능 변동을 살펴보면, 담취액 분비량이나 담취액의 총단백 분비량은 상대적으로 이자액에 비하여 담즙의 분비량이 커서 별 차이가 없었으나 이자외분비 기능과 관련이 깊은 소화효소의 분비는 의미있는 차이를 나타내었다. 14일군의 trypsin 기초분비를 기준으로 볼 때 이자기능 부전 유발군은 정상의 3.6%로 trypsin 분비가 감소했으나, CCK 투여군은 11%로 유지되는 것을 볼 수 있다. 이자외분비의 소화효소 분비가 90% 이상 소실되어야 흡수장애가 발생하는 것을 감안할 때,<sup>12</sup> 이 정도의 이자외분비 기능 유지도 임상적으로 의미가 있을 것으로 생각된다. 한편 이 경우 담취액으로의 효소 분비나 이자조직의 효소함량을 살펴보면 amylase에 비하여 trypsin 양이 훨씬 많음을 관찰할 수 있으며, CCK가 주로 serine protease(trypsin, chymotrypsin, elastase 등)의 합성을 촉진시킨다는 사실<sup>33</sup>로 미루어 이는 CCK 증가에 의한 효과로 생각할 수 있다.

이자외분비 선세포에 존재하는 수용체는 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키는 수용체(cholecystokinin, bombesin, tachykinins, muscarinic), 세포내 adenylyl cyclase를 활성화시키는 수용체(secretin, vasoactive intestinal polypeptide), 세포내 tyrosine kinase를 활성화시키는 수용체(insulin), 및 steroid 수용체(glucocorticoids, estrogens)로 나눌 수 있다.<sup>34</sup> 이 중 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키는 수용체가 오랫동안 흥분되면 선세포의 분열 및 성장이 일어난다는 것으로 알려져 있고, 대표적으로 CCK 수용체 효현제를 정상 흰쥐에 장기간 투여하면 이자의 비대와 증식이 나타나며 조

직내 효소 함량이 증가한다.<sup>11,35</sup> CCK 수용체 흥분에 의한 이자세포 분열 및 성장 촉진은 주로 protein kinase C(PKC)에 의한 세포내 단백 인산화 기전 활성화에 의하여 이루어지는 것으로 알려져 있고,<sup>35</sup> 또한 ornithine decarboxylase 활성화에 따른 세포내 polyamine 함량 증가와도 관련이 있는 것으로 밝혀져 있다.<sup>36</sup>

또한 본 실험에서 oleic acid로 이자기능 부전을 유발한 흰쥐에 합성 단백질 분해 효소 억제제인 camostat을 투여한 결과 역시 투여하지 않았던 흰쥐에 비해 어느정도 이자기능이 유지됨을 관찰할 수 있었다. 14일군의 trypsin 기초분비를 기준으로 볼 때 이자 기능부전 유발군은 정상의 3.6%로 trypsin 분비가 감소했으나, camostat 투여군은 7.2%로 유지되었다.

Camostat의 작용기전은 세 가지로 생각해 볼 수 있다. 첫째로 장관내의 되먹이 기전을 더욱 활성화시켜 내인성 CCK 분비를 촉진시켜 효과를 나타내었다고 볼 수 있다. 정상 흰쥐 이자에서 camostat이 음성되먹이 기전에 의하여 CCK 분비를 촉진시켜 이자성장을 촉진시키는 기전은 잘 알려져 있다.<sup>37,38</sup> 장관내 소화 효소와 관련된 음성 되먹이 기전은 Hong 등<sup>39</sup>이 돼지 실험을 통해 제시한 바 있으며 초기에는 trypsin이 장관의 내분비 세포 수용체에 직접 작용할 것으로 생각하였으나,<sup>40</sup> 현재는 peptide성 물질인 CCK 분비인자(monitor peptide)가 관여하는 것으로 생각하고 있다. 이자에서 장관내로 CCK 분비인자를 분비하며 이 peptide는 trypsin과 결합하여 trypsininhibitor complex를 형성하는데, 외부에서 투여한 단백질이 많아질 경우 단백질이 trypsin과 상경적으로 결합하므로 trypsin과 결합하지 않은 CCK 분비인자(free monitor peptide)가 증가하고 이 물질이 내분비 세포를 흥분시켜서 CCK를 혈중으로 분비시킨다는 것이 알려졌으며, 현재 흰쥐의 경우 monitor peptide의 아미노산 서열까지 밝혀져 있다.<sup>41,42</sup> 이번 실험에서도 담취액으로의 효소 분비나 이자조직의 효소함량을 살펴보면 amylase에 비하여 trypsin 양이 훨씬 많음을 관찰할 수 있으며, CCK가

주로 serine protease(trypsin, chymotrypsin, elastase 등)의 합성을 촉진시킨다는 사실<sup>33</sup>로 미루어 이 역시 CCK 증가에 의한 효과로 생각해 볼 수 있다. 한편 최근 사람에서는 이런 되먹이 기전에 관여하는 위장계 peptide hormone이 CCK가 아니라 neurotensin이라는 주장이 제기되고 있다.<sup>43</sup>

다음으로는 최근 camostat이 직접적으로 세포에 작용하여 cAMP의 작용을 증가시킨다는 견해가 있으며,<sup>44</sup> 여러가지 세포내 신호 변환 기전의 동시 활성화는 세포 분열 및 성장을 더욱 촉진한다는 사실<sup>45</sup>로 미루어 볼 때, 이 또한 일부 효과가 있으리라고 생각할 수 있다.

마지막으로 camostat은 trypsin inhibitor이므로 oleic acid에 의한 초기 이자선세포 손상시 소화 효소에 의하여 손상이 더욱 진행되는 것을 방지하는데 도움을 주었을 가능성도 있다.<sup>46</sup>

이번 실험에서 이자 기능부전 유발후 외부에서 투여한 CCK 및 camostat이 이자 선조직의 재생 혹은 손상 완화에 효과를 나타내는 지를 조직학적으로도 검색하였다. 기능부전 유발군의 경우 oleic acid를 투여한 후 14일까지 지속적으로 외부비 기능이 감소하고 조직학적 병변이 심해지는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 이전의 보고들<sup>4,31</sup>과 일치하는 결과였다. 기능부전 유발후 CCK 혹은 camostat을 투여할 경우 3일군의 경우는 투여하지 않았을 경우에 비하여 기능적인 외부비 조직이 더 많이 유지되는 뚜렷한 차이를 발견할 수 있었으나, 7일 및 14일 군에서는 경미한 차이만 관찰할 수 있었다. 이는 외부비 기능 검색에 대한 결과와는 다소 일치되지 않는 결과로 그 이유중의 하나는 oleic acid 주입 7일 이후에는 대부분의 외부비선 조직이 파괴되어 조직학적으로 경미한 차이밖에 나타나지 않았지만, 이 정도의 차이도 기능적으로는 의미있는 차이가 될 수 있으리라고 생각해 볼 수 있으며, 이에 대하여는 morphometry 등을 이용한 추가적인 검색이 요구된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 외부에서 투여한 CCK 혹은 camostat이 실험적 흰쥐 이자기능 부전을 어느정도 호전시킬 수 있다고 생각하며, 이 치료의

효능과 안전성에 대하여 더 많은 연구가 사람과 실험동물에서 필요하다고 생각된다.

## 요 약

**목적:** 합성 cholecystokinin 혹은 합성단백분해 효소억제제가 흰쥐 이자기능부전의 치료에 도움이 되는지를 규명하고자 다음과 같은 실험을 시행하였다. **대상 및 방법:** 담취관에 oleic acid를 주입하여 이자외분비 기능부전을 유도한 후, 합성 cholecystokinin(CCK) 혹은 합성 단백질분해효소 억제제인 camostat을 투여하여 그 효과를 기능적 및 조직학적으로 검색하였다. **결과:** Oleic acid를 담취관에 역행성으로 주입한 흰쥐는 대조군 흰쥐에 비하여 이자의 무게 및 효소단백 함량이 감소하였으며, 주입후 14일까지 기간이 길어질수록 더욱 감소하는 양상을 나타내었다. Oleic acid를 주입한 흰쥐는 대조군 흰쥐에 비하여 담취액의 이자외분비 소화효소 분비량이 현저히 감소되었다. 이자외분비 기능부전 유발후 CCK 및 camostat 처치는 조직내 효소단백 함량과 외부비 효소 분비를 증가시켰으며, 특히 14일 군에서 뚜렷하였다. 이자외분비 기능부전이 유발된 흰쥐의 이자를 조직학적으로 검색한 결과 이자외분비 조직의 심한 위축과 섬유화를 관찰할 수 있었으나 내분비 조직은 비교적 손상을 받지 않은 소견을 나타내었다. 이자외분비 기능부전 유발후 CCK 및 camostat 처치는 조직학적 검색에서 정상적인 이자외분비 조직을 더 많이 유지시켰으며, 이는 3일군에서 현저하였다. **결론:** Oleic acid의 흰쥐 담취관내 주입이 이자외분비 기능부전의 유용한 실험 모델이 될 수 있음을 알 수 있었고, 합성 CCK 및 합성 단백질분해 효소 억제제인 camostat은 실험적 흰쥐 이자 기능부전을 어느정도 호전시킬 수 있다고 생각된다.

**색인 단어:** 이자기능부전, 콜레스토키닌, 합성단백분해효소억제제.

## 참 고 문 헌

1. Isaksson G, Ihse I, Lundquist I. Influence of pancreatic duct ligation on endocrine and exocrine rat pancreas. *Acta Physiol Scand* 1983;117:281-286.
2. Abello J, Pascaud X, Simoes-Nunes C, Cuber JC, Junien JL, Roze C. Total pancreatic insufficiency in pigs: a model to study intestinal enzymes and plasma levels of digestive hormones after pancreatic supplementation by a whole pancreas preparation. *Pancreas* 1989;4:556-564.
3. Folsch UR, Creutzfeldt W. Pancreatic duct cells in rats: secretory studies in response to secretin, cholecystokinin-pancreozymin, and gastrin in vitro. *Gastroenterology* 1977;73:1053-1059.
4. Mundlos S, Adler G, Schaar M, Koop I, Arnold R. Exocrine pancreatic function in oleic acid induced pancreatic insufficiency in rats. *Pancreas* 1986; 1:29-36.
5. Andren SA. Theory and practice in the individualization of oral pancreatic enzyme administration for chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1989; 5(Suppl):51-62.
6. Dobrilla G. Management of chronic pancreatitis. Focus on enzyme replacement therapy. *Int J Pancreatol* 1989;5(Suppl):17-29.
7. Pap A, Berger Z, Varro V. Trophic effect of cholecystokinin octapeptide in man - a new way in the treatment of chronic pancreatitis. *Digestion* 1981; 21:163-168.
8. Pap A, Varro V. Effect of ceruletide treatment on exocrine function in chronic pancreatitis. *Digestion* 1984;30:118-124.
9. Pap A, Berger Z, Varro V. Beneficial effect of soy flour diet in chronic pancreatitis. *Mt Sinai J* 1983; 50:208-212.
10. Steinberg WM, Burns MK, Henry JP, Nochomovitz LE, Anderson KK. Cerulein induces hyperplasia of pancreas in a rat model of chronic pancreatic insufficiency. *Pancreas* 1987;2:176-180.
11. Folsch UR, Winckler K, Wormsley KG. Influence of repeated administration of cholecystokinin and secretin on the pancreas of the rat. *Scand J Gastroenterol* 1978;13:663-671.
12. Chernick SS, Lepkovsky S, Chaikoff IL. A dietary factor regulating the enzyme content of the pancreas: changes induced in size and proteolytic activity of the chick pancreas by the ingestion of the raw soy-bean meal. *Am J Physiol* 1948;55:33-41.
13. Beswick IP, Pirola RC, Bouchier IAD. The cause of pancreatic enlargement in rats fed raw soybean. *Br J Exp Pathol* 1971;52:252-255.
14. Folsch UR, Winckler K, Wormsley KG. Effect of a soybean diet on enzyme content and ultrastructure of the rat exocrine pancreas. *Digestion* 1974;11:161-171.
15. 김경환, 김동구, 이선미, 안영수. 생콩투여가 흰쥐 췌장의 외분비기능 및 미세구조에 미치는 영향. 원주의 대논문집 1988;1:65-67.
16. 김학산, 김경환. 생콩을 첨가 사육한 흰쥐의 이자외분비 기능 및 구조에 관한 연구. 연세의대 논문집 1990; 71-75.
17. Lyman RL, Wilcox SS, Monsen ER. Pancreatic enzyme secretion produced in the rat by trypsin inhibitors. *Am J Physiol* 1962;202:1077-1082.
18. Kayambashi H, Lyman RL. Secretion of rat pancreas perfused with plasma from rats fed soybean trypsin inhibitor. *Am J Physiol* 1969;217:646-651.
19. Green GM, Lyman RL. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;140:6-12.
20. Ihse I. Abolishment of oral trypsin inhibitor stimulation of the rat exocrine pancreas after duodenojejunal resection. *Scand J Gastroenterol* 1976;11: 11-12.
21. Folsch UR, Schafmayer A, Ebert R, Becker HD, Creutzfeldt W. Elevated plasma cholecystokinin concentrations in exocrine pancreatic atrophy in the

- rat. *Digestion* 1984;29:60-64.
22. Liddle RA, Goldfine ID, Williams JA. Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. *Gastroenterology* 1984; 87:542-549.
  23. Tamura Y, Hirado M, Okamura K, Minato Y, Fujii S. Synthetic inhibitor of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C1r, and C1 esterase. *Biochim Biophys Acta* 1977;484:417-422.
  24. Rao SV, Leela R, Swaminathan M, Parpia HAB. The nutritive value of the proteins of leguminous seeds. *J Nutr Diet* 1964;1:304 - 321.
  25. Otsuki M, Ohki A, Okabayashi Y, Suehiro I, Baba S. Effect of synthetic protease inhibitor camostat on pancreatic exocrine function in rats. *Pancreas* 1987;2:164 -169.
  26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193 -75.
  27. Bernfeld P. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In *Methods in enzymology* 1, New York. Academic Press, 1955: 149 -150.
  28. Hummel BD. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:1393 -1399.
  29. Levitt MD. Pancreatitis. In: Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Cecil textbook of Medicine*. 18th ed. WB Saunders Co. 1988;774 -778.
  30. Hirsch EF. Relation of the chemical composition of lipids to characteristic tissue lesions. *Arch Pathol* 1941;31:516 -527.
  31. Rhodes JB, Arvanitakis C, Folcroft J, Shapiro P. A rat model for exocrine pancreatic insufficiency. *Clin Res* 1981;29:713-719
  32. DiMagno EP, Go VLW, Summerskill WHJ. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N Eng J Med* 1973;288:813 -818.
  33. Case RM. Cellular mechanisms of control and secretion in the exocrine pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* 1990;6:731-738.
  34. Williams JA, Burnhan DB, Hootman SR. Cellular regulation of pancreatic secretion. In Schultz SG eds. *Handbook of physiology: Section 6. The gastrointestinal system III*. New York, Oxford University Press, 1989;419 - 441.
  35. Bruzzone R. The molecular basis of enzyme secretion. *Gastroenterology* 1990;99:1157-1176.
  36. Loser C, Folsch UR, Cleffman U, Nustede R, Creutzfeldt W. Role of ornithine decarboxylase and polyamines in camostat(FOY-305) - induced pancreatic growth in rats. *Digestion* 1989;43:108 -112.
  37. Schmidt WE, Stockman F, Choudhury AR, et al. Influence of CCK antagonist L364718, pancreastatin (33-49) and a somatostatin analogue on camostat-induced rat pancreatic hypertrophy. *Digestion* 1989; 44:105 -116.
  38. 김경환, 이민구, 방영옥. 합성 trypsin억제제 camostat에 의한 이자외분비 기능 변동기전에 관한 연구. 대한 소화기병학회지 1992;24:593 - 604.
  39. Hong SS, Nakamura M, Magee DF. Relationship between duodenal pH and pancreatic secretion in dogs and pigs. *Ann Surg* 1967;166:778 - 782.
  40. Schneeman BO, Lyman RL. Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 148:897- 903.
  41. Miyasaka K, Guan D, Liddle RA, Green GM. Feedback regulation by trypsin: Evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am J Physiol* 1989;257:G175 - G181.
  42. Fukuoka SI, Scheele GA. Rapid and selective cloning of monitor peptide a novel cholecystokinin-releasing peptide, using minimal amino acid sequence and the polymerase chain reaction. *Pancreas* 1990;5:1-7.
  43. Nustede R, Kohler H, Folsch UR, Schafmayer A. Plasma concentration of neurotensin and CCK in patients with chronic pancreatitis with and without enzyme substitution. *Pancreas* 1991;6:260 -265.

44. Horiuchi A, Iwatsuki K, Yonekura H, Ren L, Chiba S. Gabexate and camostat, synthetic proteinase inhibitors, as direct inducing factors of water and bicarbonate secretion in the isolated and blood-perfused dog pancreas. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252:320 -326.
  45. Hardie DG. Regulation of cell proliferation and cancer. In Hardie DG *Biochemical messengers*. London, Chapman & Hall, 1991;249 -277.
  46. Otsuki M, Tani S, Okabayashi Y, et al. Beneficial effects of the synthetic trypsin inhibitor camostate in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1990;35:242-250.
-