

## Camostat 투여 흰쥐 이자 외분비선의 분비자극물질에 대한 반응성

연세대학교 의과대학 약리학교실

김 철·김 동 구·김 경 환

= Abstract =

### Exocrine Secretary Responsiveness of Dispersed Pancreatic Acini to Secretagogues in Camostat-treated Rats

Chul Kim, Dong Goo Kim and Kyung Hwan Kim

*Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine*

It is well known that chronic stimulation with CCK gives rise to growth of exocrine pancreas and to increased content of enzyme proteins in pancreas. However, little is known about changes of the secretory function of exocrine pancreas which has been chronically stimulated with CCK, especially about the responsiveness to secretagogues such as CCK, caerulein and carbachol.

The present study was performed to investigate the effect of camostat on secretory profiles and the responsiveness to secretagogues of exocrine pancreas by observing in vitro amylase release stimulated by cholecystokinin-octapeptide(CCK-8) and carbachol in dispersed isolated pancreatic acini from camostat-treated rats for 4 or 10 days.

The results summarized as follows:

1) The maximal effective concentration of CCK-8 in amylase release in the camostat treated group was greater than control group, but that of carbachol was not different between groups.

2) Analysis of the stimulated amylase release as the percentage of the maximal response revealed that camostat treatment caused right-shift of the dose-response curve of CCK-8. Camostat did not cause significant changes in the dose-response curve of carbachol.

3) There were considerable increases in the amylase release in the camostat-treated group, compared to the control when acini were stimulated with CCK-8  $10^{-9}$  M and carbaochol  $10^{-6}$  M, and higher concentrations.

4) There was a reverse correlation between the tissue content and the maximal release(percentage of the total content) of amylase.

These results suggest that chronic exposure of exocrine pancreas to increased endogenous CCK can enhance the responsiveness of exocrine enzyme secretion to secretagogues, especially at higher concentrations of CCK and carbachol.

---

**Key Words:** Exocrine pancreas, Camostat, Cholecystokinin, Carbachol

---

\* 본 연구는 1993년도 연세대학교 의과대학 조교연구비와 과별 Project를 위한 연구비의 보조로써 이루어짐.

## 서 론

이자 외분비선의 기능과 성장은 음식물(Johnson 등, 1975), 부교감 신경성 인자(Evander 등, 1979; Nakano 등, 1990), 그리고 secretin 및 cholecystokinin(CCK)을 비롯한 위장계 홀몬들에 의하여 조절된다(Mainz 등, 1973; Fölsch 등, 1978). 이 중 CCK는 장기간 투여로 이자의 성장과 효소단백 및 핵산의 합량 증가를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Solomon 등, 1983; Yamaguchi 등, 1985), 단백질 분해 효소 억제제에 의한 이자 외분비선의 비대(hypertrophy) 및 증식(hyperplasia)도 내인성 CCK를 증가시켜 나타나는 것으로 생각되고 있다(Green 및 Lyman, 1972; Fölsch 등, 1974; 김경환 등, 1992). 즉 십이지장내 단백질 분해 효소의 활성이 감소될 경우 되먹이 기전에 의해 CCK 분비를 항진시켜 혈중 CCK 농도의 상승을 초래하게 된다고 알려져 있다. 현재 장관내 소화 효소와 관련된 음성 되먹이 기전에는 펩타이드성 물질로서 CCK 분비인자인 monitor peptide가 관여하는 것으로 생각하고 있다. Monitor peptide는 이자에서 장관내로 분비되며 이 peptide는 trypsin과 결합을 하여 trypsin-monitor peptide 복합체를 형성한다. 외부에서 투여한 단백질이 많아질 경우 단백질이 trypsin과 경쟁적으로 결합하므로 trypsin과 결합하지 않은 CCK 분비인자(free monitor peptide)가 증가하고 이 물질이 CCK를 혈중으로 분비시킨다는 것이 알려져 있다(Miyasaka 등, 1989; Fukuoka 및 Scheele, 1990).

이와 같은 특성 때문에 합성 trypsin 억제제인 camostat을 경우 투여하였을 때도 혈중 CCK 농도가 증가한다고 한다(Göke 등, 1986). Trypsin 억제물질에는 합성제제인 guanidino acid ester가 널리 알려져 있는데 이 중 aromatic ester 제제인 camostat은 trypsin뿐 아니라 kallikrein, plasmin, thrombin, C<sub>1r</sub> 및 C<sub>1</sub> esterase 같은 혈장효소의 활성도 억제한다(Tamura 등, 1977). Camostat은 분자량이 작은(분자량 494.53) 물질로서 수용성이

며 용액내에서 안정성이 있다. 따라서 음식물 성분을 바꾸지 않고 경구적으로 투여할 수 있을 뿐만 아니라, trypsin억제물질 이외의 물질이 함유된 생공에 비하여 독성이 없는 용량에서도 4~15일간 경구 투여하면 이자에 지대한 영향을 주게 되는 장점이 있어 이자 외분비 기능 변동 연구에 중요한 도구로 쓰이고 있다(Otsuki 등, 1987). 더우기 camostat투여에 의한 CCK 농도 상승은 camostat을 계속 투여하고 있던 흰쥐의 경우가 대조군에 비해 크게 나타나 지속적으로 camostat을 투여할 경우 높은 농도의 CCK에 계속 노출되게 된다(Göke 등, 1988).

혈중 CCK 농도가 증가된 상태에 이자가 계속 노출될 경우, 이자 외분비선의 성장이 촉진되며 효소단백 합량의 증가가 나타남은 잘 알려져 있다(Solomon 등, 1983; Yamaguchi 등, 1985). 그러나 CCK에 지속적으로 노출되었던 이자 외분비선을 CCK나 caerulein, carbachol 등의 분비자극물질(secretagogue)로 자극했을 때의 외분비 반응성에 관하여는 논란이 많다. 분비자극물질에 대한 반응성이 감소하여 효소의 자극분비가 둔화된다는 견해와 이자 외분비선의 성장 및 효소합량 증가에 따라 효소단백의 자극분비가 증가한다는 견해가 있다. 실제로 CCK-octapeptide(CCK-8)나 camostat을 지속적으로 투여한 흰쥐의 이자는 대조군에 비해 CCK-8, caerulein, carbachol 등으로 자극했을 때 효소 분비의 증가가 적다는 보고가 있는 반면(Otsuki 및 Williams, 1983; Otsuki 등, 1987; Herzig 등, 1990), camostat을 계속 투여한 흰쥐에서 camostat이나 CCK를 투여하면 단백질 분비량이 대조군보다 크다는 보고가 있다(Keim 등, 1988; 김경환 등, 1992). 그러나 이러한 보고들은 CCK나 camostat을 투여한 기간이나 용량, 외분비 기능의 지표로서 측정된 항목, 생체의 또는 생체내 실험에 의한 차이 등으로 인해 비교하기 힘들다. 더구나 이러한 보고들은 생체의 실험의 경우 공히  $10^{-9}$  M 이상의 비생리적 고농도의 CCK로 자극해야만 반응성의 감소가 나타났으며, 생체내로 CCK-8이나 camostat을 투여한 경우 최종투여로

부터 14시간에서 24시간이 지난 후 적출했으므로 이미 CCK의 영향이 사라진 상태에서 실험에 사용되었을 것으로 생각된다. 200 mg/kg의 camostat을 경구적으로 투여하면 혈중 CCK를 증가시켜 2시간내에 최고치에 이르게 되며 정상보다 증가된 상태로 약 8시간 지속된다(Göke등, 1986). 따라서 본 실험에서는 체중 kg당 200 mg 용량의 camostat을 12시간 간격으로 투여하여 생체내에서 가능한한 지속적으로 높은 농도의 CCK에 의해 영향을 받는 상태에서 적출, 분리된 이자 선세포를 사용하여 실험하였다. 이자 조직을 적출하여 관찰하는 것은 생체내에서의 이자 외분비기능이 위장계 홀몬 이외의 여러 요인들에 의해서도 영향을 받으므로 분비자극물질에 대한 반응만으로 보기가 어렵고, 이자 조직 전체를 사용하였을 때 선세포(acinar cell) 외에 관세포(ductal cell)나 결체조직이 섞여 있고 그 구성 비율이 대조군과 camostat 투여군에서 같다고 보기 어려워 효소 분비를 서로 비교하는데 문제점이 있기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 혈중 CCK를 증가시켜 이자의 비대, 증식을 일으킨다고 알려진 camostat을 흰쥐에 지속적으로 투여한 후 이자 조직을 적출, 선세포만을 분리하여 생체외에서 amylase 유리를 기초유리와 CCK 및 carbachol에 의한 자극유리로 나누어 측정함으로써 지속적인 camostat의 투여가 이자 외분비선의 분비양상 및 분비자극물질에 대한 반응성에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하고 그 특성을 알아보려고 하였다. 아울러 camostat을 4일간 투여한 군과 10일간 투여한 군으로 나누어 실험하여 camostat 투여 기간에 따른 차이가 있는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 실험동물 및 실험군

실험동물로는 몸무게 200 g 안팎의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며 실험전 일주일 이상 단백질 21.5%, 지방 3.5%, 칼슘 0.6% 이상이 함유된 표준 배합사료로 동물실에서 사육

한 후 사용하였다.

실험군은 대조군, 4일간 camostat 투여군, 10일간 camostat 투여군으로 나누어 실험하였으며 camostat 투여군은 camostat을 수도물에 녹여 체중 kg당 200 mg의 용량을 12시간 간격으로 하루 2회 위내투여(intragastric administration)하였으며 실험 당일 아침에도 동량을 투여한 후 2시간 뒤에 희생시켜 이자를 적출하였다. 대조군은 camostat 투여군과 같은 방법으로 동량의 수도물을 4일간 및 10일간 투여한 후 사용하였다.

### 2) 분산 이자 선세포의 분리

이자 선세포의 분리는 Ansah등(1986)의 방법을 변형하여 시행하였다. 기본 완충용액으로는 25 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid(HEPES), 104 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 mM glucose와 50배 농축된 필수 아미노산 용액 2% (vol/vol)가 포함된 HEPES 완충용액(pH 7.4)에 0.1% 우혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA), 0.12 mg/ml soybean trypsin inhibitor를 첨가한 후 100%  $\text{O}_2$ 로 포화시키고 37°C 상태로 사용하였다.

분리과정을 간략히 설명하면 단두하여 희생시킨 흰쥐의 이자를 적출하여 지방조직과 임파절을 제거한 후 선세포 분리에 이용하였으며 조직 일부는 조직내 총단백량 및 효소 활성 측정을 위해 -70°C에 보관하였다. 적출한 이자에 기본 완충용액에 40~50 U/ml의 collagenase(Warthington Biochemicals, Freehold, NJ, USA)와 1% BSA, 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 이 포함된 효소용액 5 ml을 주입한 후 가위로 잘게 잘라서 144회/분으로 흔들면서 37°C 항온수조에서 10분간 incubation하였다. 신선한 효소용액으로 바꾸어 주면서 10분간 4회, 총 40분간 효소용액에 소화(enzymatic digestion)시켰다. 기본 완충액으로 세척한 후 pipette을 이용해 plastic pipette tip의 입구 크기가 작아지는 순으로 조직을 기계적으로 붕괴(mechanical disruption)시켰다. 붕괴된 이자 선세포 중 큰 것과 관세포

(ductal cells)를 제거하기 위해 붕괴된 조직을 mesh nylon cloth을 이용해 여과한 후 4%와 1% BSA가 포함된 완충액으로 차례로 원심분리시켜 분리도를 높였다(filtration and purification). 이렇게 분리된 선세포는 trypan blue dye exclusion test로 95% 이상의 생존율을 확인한 후 0.1% BSA가 포함된 기본 완충액에 희석하여 amylase 분비 실험에 이용하였다.

### 3) 분산 이자 선세포에서의 amylase 유리 반응

분리된 이자 선세포를 silicon 처리된 vial에 담고 37°C에서 60회/분으로 흔들리는 항온수조에 incubation하여 유리되는 amylase 양을 측정하였다. Amylase 유리는 30분간의 기초유리 후 여러 농도의 CCK-8 및 carbachol에 의한 자극유리로 나누어 측정하였으며 자극유리 시작 전과 자극유리 30분 후 일정량을 얻어 원심분리(2700×g, 15분)하여 상층액과 세포층으로 분리하였다. 세포층은 세척후 기본 완충액으로 희석하고 초음파 분쇄기로 세포를 파괴하여 amylase양 측정에 이용하였다. 상층액과 세포층에서 측정된 amylase 양의 합을 총 amylase양으로 하여 30분간 자극유리 후 medium내로 유리된 amylase양을 총 amylase양에 대한 백분율로 표시하고 기초유리시 medium내로 유리된 amylase양을 빼주어 순수 자극에 의한 amylase 유리를 계산하였다. (Amylase release(% of total amylase content) = (자극유리 후 상층액내의 amylase양 - 기초유리 후 상층액내의 amylase양) ÷ (자극유리 후 상층액내의 amylase양 + 자극유리 후 세포내의 amylase양))

### 4) 조직내 총단백량 효소 활성 측정

이자조직은 1 mg당 10 μl의 생리식염수를 넣어 균질화한 후, 원심분리(2700 × g, 15분)하여 얻은 상층액을 총단백 및 효소 활성 측정에 이용하였다.

총단백 함량은 Lowry법(1951)을 이용하여 측

정하였고, amylase 활성치는 전분기질에서 유리되는 maltose를 Bernfeld법(1955)으로 측정하여 international unit(IU)으로 표시하였다. Trypsin 활성치는 시료를 enterokinase로 37°C에서 2시간 동안 incubation하여 try-sinogen을 활성화시킨 다음 N-p-toluenesulfo-nyl-L-arginine methylester (TAME) 기질의 분해속도를 UV spectrophotometer (Shimadzu UV-240, Kyoto, Japan)로 247 nm에서 측정하였다(Hummel, 1959).

### 5) 자료분석 및 통계처리

측정한 자료는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 통계학적 분석은 analysis of variance(ANOVA)를 이용하였고 유의성이 있을 경우 각 군간의 차이는 Scheffe's test로 검정하였으며 p값이 0.05미만인 경우를 통계학적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1) 이자무게 및 조직내 단백 함량 변동

4일 및 10일간의 몸무게 증가는 camostat 투여군과 대조군 간에서 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 이자 무게는 대조군이 체중 100 g당 0.34 ± 0.04 g인데 비해 4일간의 camostat 투여로 0.54 ± 0.09, 10일간의 camostat 투여로 0.63 ± 0.11로 의의있게 증가하였다. Camostat 투여군의 이자 조직 단위무게당 총단백 함량 및 효소 활성은 대조군에 비하여 낮았으며, 이러한 현상은 총단백 함량보다 효소 활성에서 더욱 뚜렷이 관찰되었고 camostat 4일간 투여군보다 10일간 투여군에서 더욱 낮았다(Table 1). 특히 조직내 amylase의 활성은 이자 g 당 대조군이 41707 IU인데 비해 camostat 4일간 투여군은 3447 IU으로, camostat 10일간 투여군은 1281 IU으로 현저한 감소를 보였다.

**Table 1.** Effect of camostat feeding on the weight and the protein content of pancreas

	Control (n=6)	Camostat treatment	
		4 days (n=9)	10 days (n=6)
Weight gain (g)	8.3±6.0 (4 days) 23.3±4.4 (10 days)	8.3±1.9	16.7±4.6
Weight of pancreas (g/100g body weight)	0.34±0.02	0.54±0.003*	0.63±0.05*
Protein content (mg/g pancreas)	119.6±5.1	91.0±3.5*	83.3±5.6*
Amylase activity (IU/g pancreas)	41,707±7,760	3,447±653*	1,281±301*
Trypsin activity (TAME U/g pancreas)	144.3±12.0	42.5±7.0*	21.3±2.4*

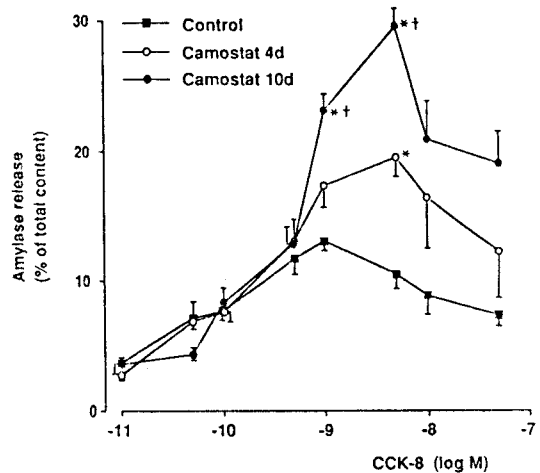
Values are means ± S.E. Numbers in parentheses are the numbers of animals. Camostat(200mg/kg body weight) was given twice daily through orogastric tube for 4 or 10 days. Control rats were given tap water for 4 or 10 days.

\* p<0.01vs. control.

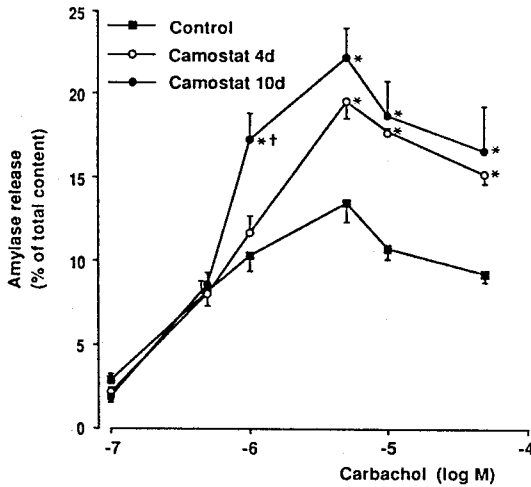
## 2) 분리된 분산 이자 선세포의 CCK-8 및 carbachol에 대한 amylase 유리 반응

분리된 이자 선세포를 30분간 CCK-8로 자극하며 incubation하였을 때 amylase 유리는 CCK-8 농도에 따라 전형적인 이상(二相) 농도-반응 곡선을 나타내었다. 최대 유리반응을 나타내는 CCK-8의 농도는 대조군이  $10^{-9}$ M이었으며 camostat 4일간 및 10일간 투여군은  $5 \times 10^{-9}$  M로 높았다.  $10^{-9}$  M 이상의 CCK-8로 자극시의 amylase 유리반응은 camostat 투여군이 대조군에 비하여 예민하였으며 이러한 현상은 camostat 10일간 투여군에서 현저하였다. 대조군 및 camostat 투여군에서 모두 최대 유효 농도 이상의 CCK-8로 자극시 amylase 분비는 점차 감소하였다(Fig. 1).

Carbachol 자극 유리에서는 대조군 및 camostat 투여군 모두  $5 \times 10^{-6}$  M에서 최대 유리반응을 나타냈으며 CCK-8 자극 유리시와 마찬가지로 고농도로 자극시의 amylase 유리반응은 camostat 투여군이 대조군에 비하여 예민하였다(Fig. 2).



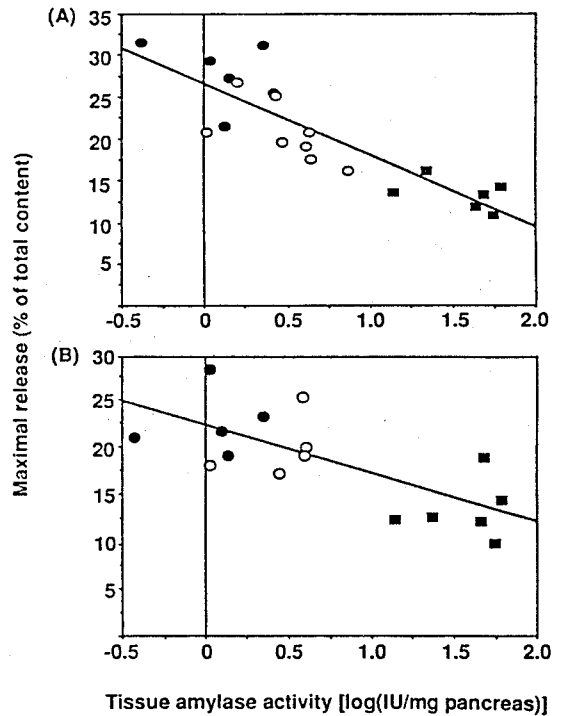
**Fig. 1.** Effect of camostat on the CCK-8-stimulated amylase release in dispersed pancreatic acini. Values are means ± S.E. of the amount of released amylase as a percent of the total amylase content of dispersed pancreatic acini. Camostat (200 mg/kg body weight) was given twice daily through orogastric tube for 4 or 10 days. Control rats were given tap water for 4 or 10 days. \* p<0.05 vs. control, † p<0.05 vs. the group treated with camostat for 4 days.



**Fig. 2.** Effect of camostat on the carbachol-stimulated amylase release in dispersed pancreatic acini. Values are means  $\pm$  S.E. of the amount of released amylase as a percent of the total amylase content of dispersed pancreatic acini. Camostat (200 mg/kg body weight) was given twice daily through orogastric tube for 4 or 10 days. Control rats were given tap water for 4 or 10 days. \*  $p < 0.05$  vs. control, †  $p < 0.05$  vs. the group treated with camostat for 4 days.

### 3) 조직내 amylase 활성치와 분산 이자 선 세포의 최대 amylase 유리 반응의 관계

각 실험동물의 조직내 amylase 활성치와 분리된 이자 선세포의 CCK-8 자극시 최대 amylase 유리반응과의 관계를 살펴보면 적출 당시의 이자 조직내 amylase 활성치가 낮을수록 CCK-8 자극시의 최대 amylase 유리반응이 증가함을 알 수 있다. 조직내 amylase 활성치의 log값과 각 실험에서의 최대반응간의 상관관계를 알아보면 기울기가 (-)값이고 상관계수가 0.75로( $p < 0.001$ ) 유의한 역상관 관계를 타내었다. Carbachol 자극 유리의 경우도 상관계수 0.52로( $p < 0.05$ ) 역상관 관계를 나타내 조직내 amylase 활성치와 최대 amylase 유리반응이 반비례함을 보였다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Relationship between the maximal amylase release and the tissue amylase activity. Correlation coefficients between amylase activity in pancreas and maximal amylase release are 0.75 ( $p < 0.001$ ) in (A) and 0.52 ( $p < 0.05$ ) in (B). ■, Controls; O, Rats treated with camostat for 4 days; ●, Rats treated with camostat for 10 days.

## 고 찰

흰쥐에 단백 분해 효소 억제제인 camostat을 투여하면 이자의 비대와 조직내 총단백 및 효소단백의 증가가 나타난다. 특히 trypsinogen, chymotrypsin, proelastase와 같은 serine protease의 함량이 크게 증가하고(Keim등, 1988; 김 경환 등, 1992), 이것은 음성 되먹이 기전에 의한 내인성 CCK의 증가에 의한 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 4일간 및 10일간 camostat을 투여한 결과 이자 무게의 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 이

자 조직내 총단백량 및 효소 활성은 camostat 투여군에서 오히려 감소한 것으로 나타났는데, 이는 실험동물을 희생시키기 2시간 전에 투여한 camostat에 의해 CCK 분비가 증가하고 이에 따라 효소단백들이 조직으로부터 분비되어 나타난 결과로 생각된다. 특히 총단백에 비해 효소단백의 함량이 더욱 감소하고 camostat 10일간 투여군에서 4일간 투여군보다 더 많은 감소를 나타낸 것은 반복적으로 camostat을 투여할 경우 일정량의 camostat 투여에 의한 내인성 CCK분비 증가폭이 점차 증가한다는 Göke등(1988)의 보고를 고려할 때 이와 같이 설명된다.

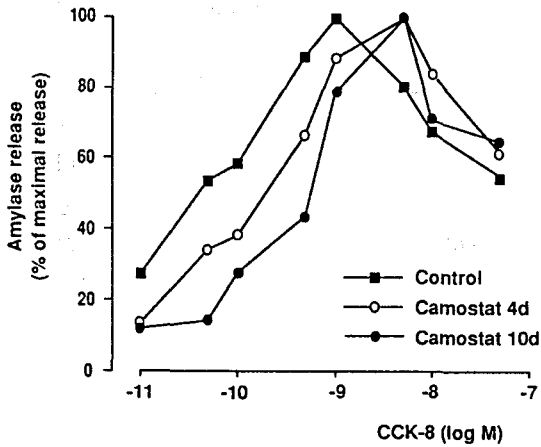
Camostat 투여군에서 분리한 선세포의 자극분비물질에 대한 반응성 변화를 알아보기 위해 여러 농도의 CCK에 의한 amylase 유리량을 측정하고 결과 최대 효과를 나타내는 CCK 농도가 증가해 최대 유효농도의 측면에서 볼 때 CCK에 대한 반응성이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다. 이러한 최대 유효농도의 증가는 배양액내에서 혹은 생체내에 높은 CCK 농도를 유지해줄 경우, 계속된 분비자극물질에 대한 효소 분비반응에서 최대 유효농도가 증가했다는 다른 실험 결과와 일치한다(Abdelmoumene 및 Gardner, 1980; Otsuki 및 Williams, 1983; Herzig등, 1990). CCK에 대한 유리반응과는 달리 carbachol에 대한 반응은 camostat 전처치에 의해 최대 유효농도가 변하지 않아 이와 같은 최대 유효농도의 증가는 동종의 호르몬에 대한 특이적인 반응임을 알 수 있다.

그러나 최대 유효농도에서의 amylase 유리 자체는 camostat 투여에 의해 높아져 최대효과 측면에서는 반응성이 오히려 예민해진 것으로 나타났다. 특히 10일군에서는 대조군에서 최대효과를 나타낸  $10^{-9}$  M 이상의 측정된 모든 CCK 농도에서 대조군보다 높은 반응을 나타내었다. 또한 carbachol에 대한 분비반응에서도  $10^{-6}$  M 이상의 농도에서 camostat 투여군의 반응이 크게 나타났다. 이와 같은 고농도의 분비자극물질에 대한 반응성 증가는 몇가지로 해석해 볼 수 있다.

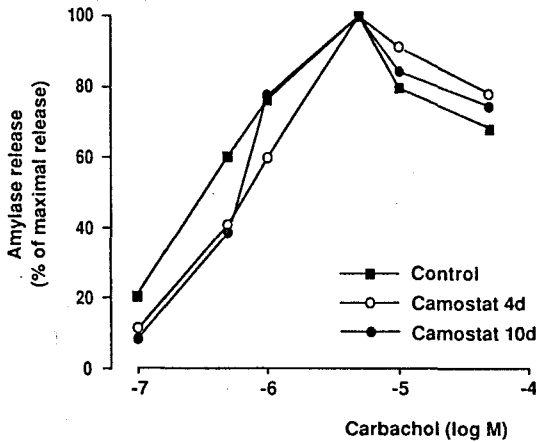
우선 camostat 투여군의 조직내 amylase 양이

대조군에 비해 낮았기 때문으로 볼 수 있다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 CCK에 의한 최대 amylase 유리반응은 조직내 amylase 활성치와 반비례하고 있다. 또한 CCK에 대한 반응뿐 아니라 carbachol에 대한 반응도 고농도에서는 camostat 투여군이 높은 것으로 보아 이러한 현상은 비특이적 반응으로 단순히 amylase 활성치가 낮아 최대 유리반응이 높게 나타났을 가능성이 있다. 이럴 경우 최대 유리반응은 이자 선세포의 분비자극물질에 대한 반응성의 척도가 되지 못할 것임을 예측할 수 있다. 따라서 각 농도에서의 유리반응을 최대 유리반응에 대한 백분율로 표시한 Fig. 4 및 Fig. 5에서 볼 수 있는 것 처럼 camostat 4일간 및 10일간 투여군 이자 선세포의 CCK에 의한 amylase 유리반응 농도-반응곡선은 대조군에서 비해 오른쪽으로 이동해 반응성이 감소한 것으로 나타난 반면, 같은 세포내 신호변환기전으로 효소분비를 촉진하는 것으로 알려진 carbachol에 대한 반응성은 변하지 않아 CCK의 분비자극에 대한 동질성 불응(homologous refractoriness) 현상이 나타났다고 볼 수 있다.

그러나 조직내 amylase 양의 감소가 최대 유리반응 증가의 직접적 원인이 아닐 경우 camostat 투여군에서의 지속적인 내인성 CCK 증가상태가 고농도의 분비자극물질에 대한 이자 선세포의 반응성을 증가시켰다고 생각할 수 있다. 이는 CCK-8을 7일간 및 14일간 주사하거나 4일간 camostat을 투여한 흰쥐의 이자를 적출, 선세포를 분리해 CCK-8 및 carbachol에 대한 반응성을 본 경우 CCK나 carbachol로 amylase 유리자극시 최대 유효농도가 증가하고 최대반응의 크기는 감소한 것이나(Otsuki등, 1983; Herzig등, 1990), 배양액내에서 고농도의 CCK로 자극하며 배양했을 때 이후의 세포내  $Ca^{2+}$ 을 증가시키는 여러 분비자극물질에 대한 분비반응이 감소했다는 보고(Abdelmoumene 및 Gardner, 1980; Menozzi등, 1989)와는 다른 결과이다. 그러나 이러한 보고들이 생체의 실험의 경우 공히  $10^{-9}$  M 이상의 비생리적 고농도의 CCK로 자극해야만 반응성의 감소가 나



**Fig. 4.** Different response to CCK-8 in dispersed pancreatic acini from camostat-treated rats. Legends are same as Fig. 1.



**Fig. 5.** Different response to carbachol in dispersed pancreatic acini from camostat-treated rats. Legends are the same as Fig. 2.

타났으며, 생체내로 CCK-8이나 camostat을 투여한 경우 최종투여로부터 14시간에서 24시간이 지난 후 적출했으므로 이미 CCK의 영향이 사라진 상태에서 실험에 사용되었을 것으로 생각되어 생체내에서 높은 농도의 CCK에 의해 영향을 받는 상태에서 적출, 분리된 이자 선세포를 사용한 이

번 실험과는 다른 조건이었기 때문에 직접 비교할 수는 없다.

이번 실험의 결과를 살펴보면 기초분비(data는 나타내지 않았음) 및  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의 저농도의 CCK에 대해서는 camostat 투여군과 대조군간의 효소분비에 차이가 없었으나 그 이상의 농도에서는 camostat 투여군에서 높은 효소유리반응을 보였으며 최대반응에서는 두배 이상의 큰 차이를 나타냈다. 이러한 현상은 CCK 수용체가 고농도의 효현제로 자극되면 소화효소의 분비가 오히려 억제되며 실험적 이차염을 일으킨다는 사실(Watanabe등, 1984; Saluja등, 1989)을 생각해 볼 때 정확한 기전은 알 수 없지만 지속적인 과도한 CCK 자극에 대한 일종의 생체 방어기전으로 최대 유효농도 이상에서 나타나는 효소분비의 억제현상(supramaximal inhibition of enzyme secretion)이 불활성화되어 나타났을 가능성을 생각해 볼 수 있다. CCK 수용체 중 고농도의 CCK 수용체 효현제로 자극될 때 활성화되는 저친화성의 수용체(low-affinity CCK receptor)는  $10^{-10}$  M 이상의 농도에서 CCK와의 결합이 시작되며 소화효소 분비억제에 관여하는 것으로 미루어(Sato등, 1989; Stark등, 1989),  $10^{-9}$  M 이상의 고농도에서만 CCK에 대한 반응성이 높게 나타난 이번 실험 결과를 저친화성 수용체에 의한 효과가 억제되어 나타난 것으로 추측해 볼 수 있다. 고친화성 수용체(high-affinity CCK receptor)에는 효현제로 작용하고 저친화성 수용체에는 CCK의 경쟁적 길항제로 작용하는 새로운 CCK 유사물질인 CCK-JMV-180이 합성된 후(Galas등, 1988) 고친화성 수용체와 저친화성 수용체가 두 개의 다른 수용체가 아니라 하나의 분자로서 상황에 따라 저친화성이나 고친화성의 특징을 갖는 상태로 변환될 것이라는 가설이 주장되었다(Matozaki등, 1989). 이에 따르면 고농도의 CCK에 지속적으로 노출된 본 실험의 경우 CCK 수용체가 효소 분비에 적합한 고친화성 상태로의 변환이 증가했을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 수용체 후 신호변화기전(post-receptor signal transduction mechanism)에 있어



서 두 상태 모두 GTP 유사물질 첨가에 의해 반응이 증폭되고(Piiper등, 1991) 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시키나 고친화성의 수용체는 inositol triphosphate ( $IP_3$ ) 생성을 증가시키지 않는 반면 저친화성의 수용체는  $IP_3$  생성을 증가시킨다고 한다(Saluja등, 1992; Vinayek등, 1993). 따라서 CCK-JMV-180을 이용하거나 receptor binding assay를 통해 CCK 수용체의 친화성 변화를 검색하거나 수용체 후 신호변환기전의 특성을 관찰하므로써 본 실험 결과의 원인을 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

고농도의 CCK에 지속적으로 노출된 이자 외분비선의 분비 반응을 알아보기 위해 단백분해효소 억제제인 camostat을 투여한 흰쥐의 이자를 적출하여 분산 이자 선세포에서 CCK 및 carbachol에 의한 amylase 유리반응을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 최대효과를 나타내는 CCK의 농도는 대조군에 비해 camostat 투여군이 높았으나 carbachol의 최대유효농도는 대조군과 camostat 투여군 사이에 차이가 없었다.

2) 각 농도의 분비자극물질에 의한 효소유리반응을 최대반응에 대한 백분율로 나타낸 농도-반응 곡선에서 CCK 반응은 camostat 투여로 오른쪽으로 이동하였지만 carbachol 반응은 별 차이가 없었다.

3) 각 농도에서의 효소유리반응을 직접 비교한 결과 CCK  $10^{-9}$  M 이상, carbachol  $10^{-6}$  M 이상 고농도의 분비자극물질에 대한 유리반응이 camostat 투여군에서 높았으며 camostat 10일간 투여군에서 특히 높게 나타났다.

4) 조직내 amylase 활성치와 최대 amylase 유리반응은 역상관 관계를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 이자 외분비선에 대한 지속적인 내인성 CCK 자극은 외분비 효소 분비에 있어 분비자극물질, 특히 고농도의 CCK에 대한 반

응성을 항진시킨다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 김경환, 이민구, 방영옥: 합성 *Trypsin* 억제제 *Camostat*에 의한 이차외분비 기능변동기전에 관한 연구. *대한소화기병학회지* 24: 593-604, 1992
- Abdelmoumene S and Gardner D: *Cholecystokinin-induced desensitization of enzyme secretion in dispersed acini from guinea pig pancreas. Am J Physiol* 239: G272-279, 1980
- Ansah TA, Dho S and Case RM: *Calcium concentration and amylase secretion in guinea pig pancreatic acini: interaction between carbachol, cholecystokinin octapeptide and the phorbol ester, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate. Biochim Biophys Acta* 889: 326-333, 1986
- Bernfeld P: *Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In Methods in enzymology Vol. 1, Academic Press, 1955, pp149-150*
- Evander A, Ihse I and Lundquist I: *Influence of anticholinergic treatment on rat pancreatic protein and amylase concentration. Scand J Gastroenterol* 14: 115-117, 1979
- Fölsch UR, Winckler K and Wormsley KG: *Effect of a soybean diet on enzyme content and ultrastructure of the rat exocrine pancreas. Digestion* 11: 161-171, 1974
- Fölsch UR, Winckler K and Wormsley KG: *Influence of repeated administration of cholecystokinin and secretin on the pancreas of the rat. Scand J Gastroenterol* 13: 663-671, 1978
- Fukuoka SI and 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* 5: 1-7, 1990
- Galas MC, Lignon MF, Rodriguez M, Mendre C, Fulcrand P, Laur J and Martinez J: *Structure-*

- activity relationship studies on cholecystokinin: analogues with partial agonist activity. *Am J Physiol* 254: G176-182, 1988
- Göke B, Printz H and Koop I: *Endogenous CCK release and pancreatic growth in rats after feeding a proteinase inhibitor (camostat)*. *Pancreas* 1: 509-515, 1986
- Göke B, Fenchel K, Knobloch S, Arnold R and Alder G: *Increased CCK-response to proteinase inhibitor feeding after induction of pancreatic hypertrophy in rats*. *Pancreas* 3: 576-579, 1988
- Green GM and Lyman RL: *Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats*. *Proc Soc Exp Bio Med* 140: 6-12, 1972
- Herzig KH, May D, Louie DS, Takahashi T, Göke B and Owyang C: *Intracellular mechanism responsible for reduced enzyme secretion from camostat-induced hypertrophied pancreas*. *Digestion* 46(suppl 2): 195-201, 1990
- Hummel BD: *A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin*. *Can J Biochem Physiol* 37: 1393-1399, 1959
- Johnson LR, Copeland EM and Dudrick SJ: *Structural and hormonal alterations in the gastrointestinal tract of parenterally fed rats*. *Gastroenterology* 68: 1177-1183, 1975
- Keim V, Göke B and Adler G: *Changes in pattern of enzyme secretion by rat pancreas during repeated trypsin inhibitor treatment*. *Am J Physiol* 255: G236-241, 1988
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RL: *Protein measurement with Folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- Mainz DL, Black O and Webster D: *Hormonal control of pancreatic growth*. *J Clin Invest* 52: 2300-2304, 1973
- Matozaki T, Martinez J and Williams JA: *A new CCK analogue differentiates two functionally distinct CCK receptors in rat and mouse pancreatic acini*. *Am J Physiol* 257: G594-600, 1989
- Menozi D, Stark HA, Martinez J, Jensen RT and Gardner JD: *Cholecystokinin(CCK)-induced desensitization of pancreatic enzyme secretion is mediated by low-affinity CCK receptors*. *Peptides* 10: 337-341, 1989
- Miyasaka K, Guan D, Liddle RA and Green GM: *Feedback regulation by trypsin: evidence for intraluminal CCK-releasing peptide*. *Am J Physiol* 257: G175-181, 1989
- Nakano I, Towil T, Spamagel AW, Liddle RA and Green GM: *Atropine enhances feed-stimulated CCK secretion in the rat*. *Pancreas* 5: 621-625, 1990
- Otsuki M, Ohki A, Okabayashi Y, Suehiro I and Baba S: *Effect of synthetic protease inhibitor camostat on pancreatic exocrine function in rats*. *Pancreas* 2: 164-169, 1987
- Otsuki M and Williams JA: *Amylase secretion by isolated pancreatic acini after chronic cholecystokinin treatment in vivo*. *Am J Physiol* 244: G683-688, 1983
- Piiper A, Plusczyk T, Eckhardt L and Schulz I: *Effect of cholecystokinin, cholecystokinin JMV-180 and GTP analogs on enzyme secretion from permeabilized acini and chloride conduction in isolated zymogen granules of the rat pancreas*. *Eur J Biochem* 197: 391-398, 1991
- Saluja AK, Dawra RK, Lerch MM and Steer ML: *CCK-JMV-180, an analog of cholecystokinin, releases intracellular calcium from an inositol triphosphate-independent pool in rat pancreatic acini*. *J Biol Chem* 267: 1102-11207, 1992
- Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zavertnik A, Sengupta A and Steer ML: *Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8968-8971, 1989
- Sato S, Stark HA, Martinez J, Beaven MA, Jensen

- RT and Gardner JD: *Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180*. *Am J Physiol* 257: G202-209, 1989
- Solomon TE, Vanier M and Morrisset J: *Cell site and time course of DNA synthesis in pancreas after caerulein and secretin*. *Am J Physiol* 245: G99-105, 1983
- Stark HA, Sharp CM, Sutliff VE, Martinez J, Jensen RT and Gardner JD: *CCK-JMV-180: a peptide that distinguishes high-affinity cholecystokinin receptors from low-affinity cholecystokinin receptors*. *Biochim Biophys Acta* 1010: 145-150, 1989
- Tamura Y, Hirado M, Okamura K, Minato Y and Fujii S: *Synthetic inhibitor of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C<sub>1r</sub> and C<sub>1</sub> esterase*. *Biochim Biophys Acta* 484: 417-422, 1977
- Vinayek R, Patto RJ, Menozzi D, Gregory J, Mrozinski JE, Jensen RT and Gardner JD: *Occupation of low-affinity cholecystokinin(CCK) receptors by CCK activates signal transduction and stimulates amylase secretion in pancreatic acinar cells*. *Biochim Biophys Acta* 1176: 183-191, 1993
- Watanabe O, Baccino FM, Steer ML and Meldolesi J: *Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis*. *Am J Physiol* 246: G457-467, 1984
- Yamaguchi T, Tabata K and Johnson LR: *Effect of proglumide on rat pancreatic growth*. *Am J Physiol* 249: G294-298, 1984
-