

생쥐 췌장의 아밀라아제 분비기작에 관한 연구

조 응 행 · 최 임 순
(연세대학교 이과대 생물학과)

Studies on Amylase Secretion Mechanism by Mouse Pancreatic Fragments.

Eng Haeng Cho and Rim Soon Choe
(Dept. of Biology, Yonsei University)
(1986. 11. 15. 접수)

ABSTRACT

Patterns of amylase secretion in mouse pancreatic fragments were studied over a period of time after the tissue was stimulated by acetylcholine and MNNG. MNNG is known to activate guanylate cyclase and thus increase the cGMP concentration in the pancreatic acinar cell. These amylase secretion patterns were studied to investigate the role of cGMP in reaction cascade during secretion response of the tissues stimulated by acetylcholine.

Cellular response of amylase secretion in the pancreas by acetylcholine was divided into two phases. During the first phase, zymogen granules which had existed in the cells were secreted by the action of Ca^{2+} and calmodulin immediately after secretagogue administration, this being known as the initial response. When the tissue was stimulated by acetylcholine in a Ca^{2+} -deficient medium or one containing trifluoperazine as a calmodulin antagonist, this initial response was reduced.

In the second phase, newly formed zymogen granules were secreted as sustained response after protein synthesis was triggered by secretagogue. This response was provoked by an activation of protein kinase C. When either cycloheximide as a protein synthesis inhibitor or dibucaine as a protein kinase C inhibitor were added to the incubation medium, this sustained response was remarkably depressed in the pancreatic fragments stimulated with acetylcholine. In the pancreatic acinar cell, phosphatidylinositol turnover plays an important role in the secretion response and hexachlorocyclohexane inhibits this phosphatidylinositol turnover. The pancreatic tissue treated with the hexachlorocyclohexane exhibited inhibition on both initial and sustained responses of amylase secretion by acetylcholine.

MNNG also accelerated amylase secretion from the tissue gradually along incubation time. The 22 minutes fraction of the pancreatic secretion after administration of both acetylcholine and MNNG showed higher amylase activity than the neighboring fractions. Guanylate cyclase potentiated the sustained response. Even if it is experimented with an indirect method, guanylate cyclase was found responsible for activation of the sustained response of a step prior to the action of protein kinase C.

As conclusion, it was considered that amylase secretion in mouse pancreatic fragments stimulated by acetylcholine is a three phasic response.

서 론

췌장 acini의 분비작용에 있어서 자극—분비 과정을 알아보기 위하여 췌장을 분리하여 이용하는 여러가지 방법들이 알려져 있으며 (Amsterdam and Jamieson, 1972; Bruzzone *et al.*, 1985; Case *et al.*, 1968; Rothman, 1964) 이러한 방법을 이용하여 분비촉진물질을 췌장 acinar cell에 작용시켰을 때 먼저 세포막에 있던 Ca^{2+} 이 세포 내부로 이동하고 뒤이어 분비가 이루어진다는 것이 오래 전부터 알려져 있었다 (Douglas, 1968; Schulz and Stolze, 1980).

췌장의 acinar cell에서는 제이차 메신저로써 cAMP와 cGMP가 제각기 작용하는데 (Gardner, 1979; Schulz and Stolze, 1980), acinar cell에 작용하는 분비촉진물질에 따라 자극—분비의 반응경로가 cGMP를 통하는 경로를 가지는 것과 (Albano *et al.*, 1976; Christophe *et al.*, 1976; Haymovits and Scheele, 1976) cAMP를 수반하는 경로를 가지는 것이 (Gardner *et al.*, 1976; Robberecht *et al.*, 1976; Pearson *et al.*, 1984) 구분되는 것으로 알려져 있다.

또한 어떤 분비촉진제는 분비세포막에서 phosphatidylinositol turnover (PI turnover)를 일으키는 바 (Fisher *et al.*, 1984; Hokin and Hokin, 1956) 췌장 세포에서는 PI-turnover가 cAMP와는 관계가 없으나 cGMP와는 긴밀한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Michell, 1975). 세포막에서 PI turnover를 수반하는 분비세포들의 반응을 간단히 종합하면, 분비촉진물질이 분비 세포막의 수용체에 작용하였을 때 근접한 세포막의 내재성막단백질인 phospholipase C (PLC)가 세포막의 구성 성분인 phosphatidylinositol을 inositol phosphate와 diacylglycerol (DG)로 분해하면서 Ca^{2+} gate가 열리게 되어 세포 밖의 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되고 (Michell, 1975) 뒤이어 세포내에서의 여러가지 반응들이 일어나게 된다. 우선 Ca^{2+} 은 calmodulin (CAM)에 작용하여 세포내에 이미 존재하던 분비물질을 배출시키는 자극 초기의 개시적 반응 (initial response; first phase)을 일으키고 한편 세포막 내측에서는 증가된 Ca^{2+} 으로 인해서 Ca^{2+} -의존성 phosphodiesterase에 의해 PI turnover가 계속 진행되어 그 생성물인 IP_3 가 세포내 칼슘저장소에서 Ca^{2+} 방출을 일으켜 (Hokin, 1985; Streb *et al.*, 1983) 이들 Ca^{2+} 은 세포질 내의 protein kinase C (PKC)를 세포 내막에 부착시키면서 PI turnover로 생긴 DG에 의해 PKC가 활성화된다 (Ashendel, 1985). 이 PKC는 세포내 어떤 단백질을 인산화시킴으로 유전자 발현이 유도되어 새로운 분비물의 합성이 일어나 자극 후 늦게 분비가 증가되는 현상이 나타나는 지속적반응 (sustained response; secondary phase)으로 이어

진다. 그래서 PI turnover가 관여하는 분비반응은 이러한 2상반응(biphasic response)으로서 이들이 연속적으로 진행되어 한가지 분비라고 하는 종합적반응(integrated response)을 일으킨다고 하였다(Rasmussen and Barrett, 1984).

여러 분비조직에서 Ca^{2+} -CAM 의존성 protein kinase (PK)가 확인되었으며(Brooks and Landt, 1985; Gorelick *et al.*, 1983) 췌장의 acinar cell에서도 CAM의 역할은 인정되고 있다(Gorelick *et al.*, 1983). 또한 cGMP도 cAMP와 마찬가지로 고유의 PK인 cGMP-PK를 활성화시키는 것으로 알려져 있을뿐(Aswad, 1984; Flockerzi *et al.*, 1978; Jensen and Gardner, 1978; Nishizuka, 1983) 췌장 acinar cell에서 일어나는 PI turnover와 cGMP가 함께 관여하는 반응관계는 아직 명료하지 않다.

췌장의 acinar cell에서 PI turnover를 일으키며 또한 cGMP를 통한 분비반응을 일으키는 것으로 acetylcholine이나 cholecystokinin octapeptide(CCK-OP)와 같은 것이 알려져 있는데 본 실험에서는 acetylcholine을 분비촉진물질로 사용하여 생쥐 췌장 절편으로부터 아밀라아제가 분비되는 상태를 경시적으로 관찰하고 췌장의 acinar cell에서 guanylate cyclase를 활성화시키는 것으로 알려진 MNNG를 투여하여 이에 따른 아밀라아제 분비를 조사한 후 이들 두가지 약물에 의한 분비상태를 대조하므로써 간접적이지만 acetylcholine에 의한 아밀라아제 분비과정 중 guanylate cyclase의 역할을 알아보고 또 그외에 몇가지 분비억제물질들을 사용하여 acetylcholine에 의한 아밀라아제 분비과정의 구성단계를 분석하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 췌장미소절편의 제작

생후 2개월 정도된 체중 25g~30g의 생쥐를 암수 구분없이 사용하였는데 이들 생쥐를 미리 12시간 이상 굶긴 후 경추과열로 도살하여 복부를 절개한 다음 췌장을 빼내서 95% O_2 -5% CO_2 혼합개스로 충분히 포화시킨 modified Krebs Henseleit solution (Pearson *et al.*, 1984)에 담그고 불필요한 부분을 제거한 다음 안과용 가위로 잘게 썰어서 직경 1~2 mm의 미소절편을 만들었다.

2. 분비물 채취 및 약제처리

췌장의 미소절편들을 37°C로 조절된 항온수조에 정치한 배양용기(내경 1 cm×높이 5 cm)에 직경 3 mm의 유리알들과 함께 넣은 다음 처리 혹은 무처리된 배양액을 혼합개스로 충분히 포화시킨 후 유동펌프를 사용하여 배양용기로 밀어 넣었다. 췌장세포에서 분비된 분비물이 섞여서 배양용기로부터 나오는 유출액의 흐름이 1 ml/min이 되도록 조절하여 분별수집기로 작은 시험관에 2분 간격으로 채취하였다. 분비촉진물질의 처리는 30분간 배양액을 미리 관류시켜서 췌장세포들을 크레브스 용액으로 안정시킨 다음 분비촉진물질인 acetylcholine(10^{-5} M)이나 A_{23187} (9.6×10^{-6} M) 또는 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG; 1 mM)이 포함된 배양액으로 바꾸어 주어서 20분간 분비를 촉진시켰다(Asada and Kanno, 1985). 그후에 연속하여 이들 분비촉진물질이 없는 크레브스 용액을 20분간 더 관류시키면서 후기반응을 조사하였다.

분비억제물질의 처리에 있어서는 분비억제물질들을 각각 배양액에 첨가하여 췌장조직을

배양하는 전기간에 걸쳐 관류시키었는데 전배양이 끝난 후 각개 분비억제물질이 포함된 배양액에 해당 분비촉진물질을 섞어서 췌장세포들을 자극시켰다. cycloheximide는 2×10^{-4} M, trifluoperazine(TFP)은 0.1 mM, dibucaine은 0.1 mM 농도로 30분간 전처리 하였으나 hexachlorocyclohexane(HCCH)은 0.1 mM 농도로 70분간 전처리 하였다.

A₂₃₁₈₇과 HCCH는 dimethyl sulfoxide에, MNNG는 acetone에 그리고 dibucaine은 ethyl alcohol에 녹여서 모액을 먼저 만들어 사용하였다.

3. 아밀라아제 활성 측정

이와 정(1985)의 요오드에 의한 아밀라아제 측정 방법을 이용하였는데 분비물을 넣지 않고 녹말 기질과 요오드용액이 모두 반응하여 나타낸 흡광도 값을 대조치로 하여 다음과 같은 공식으로 녹말분해율을 계산하고 이 값을 시료 중에 포함된 아밀라아제 활성도로 정하였다.

$$\frac{(\text{대조물의 흡광도치}) - (\text{시료의 흡광도치})}{\text{대조물의 흡광도치}} \times 100 = \text{시료의 아밀라아제 활성도 (starch reducing rate; \%)}$$

결 과

아밀라아제 분비에 대한 acetylcholine의 효과

분비물 중의 아밀라아제 활성은 Fig. 1에서 보듯이 분비촉진제 투여 후 즉시 급상승해서 분비촉진제가 배양액에 존재하는 기간뿐 아니라 acetylcholine을 배양액에서 제거한 뒤에도 높은 수준으로 올라 있었다. acetylcholine으로 췌장세포들을 자극하기 전인 30분간의 전배양 기간 중에도 배양용기로부터 채취한 분출물에서 아밀라아제 활성이 나타나는 것은 정도의 차이는 있으나 매번의 실험에서 같은 현상을 보였다. 이들 분출물 중 총단백질 함량의 변화도 아밀라아제 활성도의 변화와 일치하는 경향을 보였으며 특히 acetylcholine으로 췌장세포들을 자극하기 시작한 후 22분째 분획에서 아밀라아제 활성이 보다 높았고 분비된 총단백질의 함량도 월등히 많았다.

배양액 중의 칼슘농도가 아밀라아제 분비에 미치는 영향

“자극—분비의 연계” 기작은 먼저 세포밖에 있던 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되는데서 비롯된다. 따라서 세포 외액 중에는 세포 내부에 비하여 상당히 고농도의 칼슘이 존재하여야 하는데 실제로 세포내 칼슘 농도는 1 μM 미만이지만 세포 외액에는 1 mM 이상이다. 그래서 이러한 Ca^{2+} 의 효과를 알아보기 위하여 먼저 배양액 중에 칼슘을 넣지않은 용액(증류수 중에 포함된 칼슘은 제거하지 않았음)으로 30분간 전배양 하였더니 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 이 기간 동안의 아밀라아제 누출량이 적었다. 마찬가지로 칼슘을 조성에서 뺀 크레브스용액에 acetylcholine이 10^{-5} M 되도록 첨가한 배양액으로 연이어 20분간 췌장세포들을 자극한 다음 acetylcholine을 빼고 본래 조성대로 칼슘이 2.56 mM 포함된 배양액으로 관류시켰더니 세포외액 중에 칼슘이 결핍된 상태에서도 acetylcholine의 자극에 의해서 아밀라아제 분비가 급격히 증가하기는 하였으나 역시 또한 빠르게 감소하였으며 acetylcholine은 없으나 칼슘이 2.56 mM 되도록 세포 외액의 환경을 바꾸어 주었더니 순전히 Ca^{2+} 효과에 의해서 앞의 봉우리보다는 낮지만 아밀라아제 분비가 증가했다가 다시 빠르게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 연속해서 2.56 mM의 칼슘 농도에다 acetylcholine이 10^{-5} M 섞인 배양액을

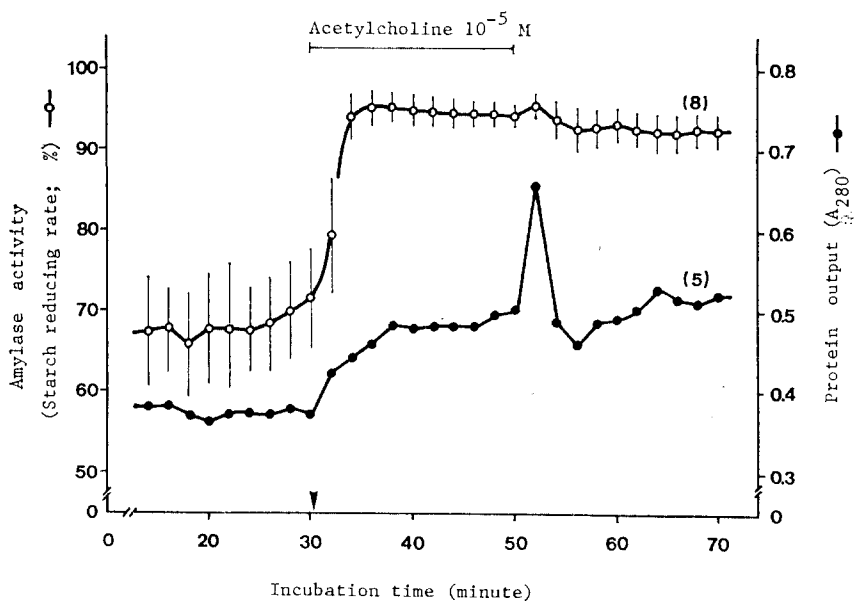


Fig. 1. Effect of acetylcholine on the secretion of amylase from pancreatic fragments. Mouse pancreas was minced to fragments about 1~2mm diameter and incubated within incubation chamber (1 cm inner diameter×5 cm height) at 37°C with perfusing modified Krebs Henseleit solution by peristaltic pump. After 30 minutes preincubation with the medium, acetylcholine (10^{-5} M) containing Krebs solution was given for 20 minutes from the time indicated by the arrow to stimulate the pancreatic secretion of amylase. After that the medium was changed to one without acetylcholine to observe the sustained response of the pancreatic acinar cells. Flow rate of incubation medium was 1 ml/min. and 2 ml fractions were collected. The amylase activity from each fraction was analysed as described in the text. The results are shown as the mean±SD of eight experiments. The total protein of the fractions was also determined by measuring optical density at 280 nm. The results are the mean value of five experiments.

공급하였을 때 평편한 아밀라아제 활성도 고원을 보여주었다.

Fig. 3은 30분간 전배양하는 기간에는 칼슘을 2.56 mM로 포함시켰으나 acetylcholine으로 자극할 때는 크레브스용액의 조성에서 칼슘을 빼고 분비촉진제만 10^{-5} M을 첨가한 배양액을 관류시켰다. 20분간 칼슘이 결핍된 상태에서 췌장조직을 자극한 다음 다시 칼슘이 2.56 mM 포함된 용액을 흘려보내었고 뒤이어 acetylcholine(10^{-5} M)으로 분비를 촉진시켰다. 이와같이 세포외액의 칼슘 결핍 기간을 짧게 하였을때도 아밀라아제 분비 양상은 Fig. 2와 같았지만 전반적으로 아밀라아제 활성도는 Fig. 3에서 Fig. 2보다 높았고 또 아밀라아제 활성도 붕우리의 감소 기울기가 현저히 완만하였다.

Calcium ionophore와 MNNG의 효과

Fig. 4에서 보듯이 Ca^{2+} ionophore인 A_{23187} 을 acetylcholine 대신 투여하였더니 유출액 중의 아밀라아제 활성이 acetylcholine의 경우처럼 급격히 증가하지 않고 점차적으로 서서히 상승하여서 기대한 것과 같은 개시적반응의 독립된 양상을 나타내지 않았다. acetylcholine 자극시 그 지속적반응을 억제시킬 때와 마찬가지로(Fig. 8) PKC 억제물질인 dibucaine을

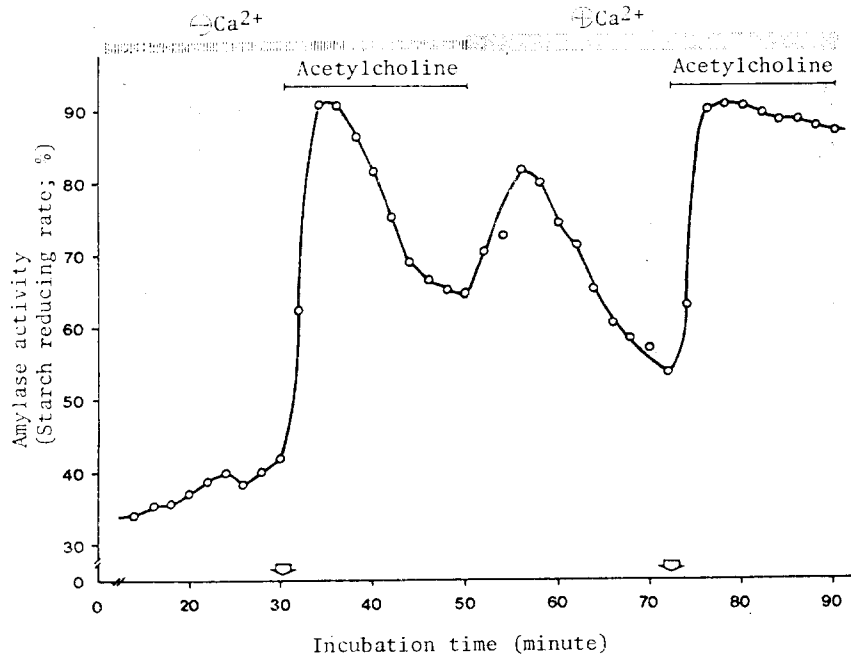


Fig. 2. Ca^{2+} -dependence of acetylcholine effect on amylase secretion after Ca^{2+} -deficient preincubation. Pancreatic tissue fragments were perfused with Ca^{2+} -deficient medium for 50 minutes. During this period, acetylcholine (10^{-6}M) was administered at the time indicated by the first arrow for 20 minutes. After the incubation in the calcium-deficient environment, calcium (2.56 mM) was supplied in the medium. The arrows indicate the time when acetylcholine was introduced. Each value is the mean of five different experiments.

0.1 mM 첨가한 크레브스용액으로 실험하는 전기간 관류시키는 가운데 같은 방법으로 A_{23187} 을 투여하였더니 표 1에 나타난 것과 같이 dibucaine이 A_{23187} 의 분비촉진효과에 대하여는 영향을 주지 않았다.

췌장의 acinar cell에서는 콜린효능성 약물에 의해서 자극될 때 세포내 cGMP의 농도가 증가되는 것으로 알려져 있기 때문에 세포내 cGMP 농도를 증가시키는 guanylate cyclase의 활성을 촉진하는 것으로 알려진 MMNG를 DeRubertis와 Craven(1976)의 실험을 참고하여 1 mM 농도로 Fig. 1에서와 같은 방법으로 acetylcholine 대신 투여하였더니 Fig. 5에 나타난 바와 같이 분비물 중의 아밀라아제 활성이 점차 증가하였다. A_{23187} 이나 MNNG가 마찬가지로 자극 이후 분비촉진제가 없는 배양액을 관류시킨 후기반응에서도 분비물 중의 아밀라아제 활성이 증가하는 경향으로 나타난 것은 외관적으로는 같은 현상으로 보이나 세포내에서의 반응 또한 같은 경로를 가진다고는 볼 수 없기 때문에 이러한 점을 확인하기 위하여 Protein kinase C 억제물질인 dibucaine 0.1 mM을 전기간 처리하고서 A_{23187} 대신 MNNG로 바꾸어 분비를 촉진시켰더니 Fig. 5에 나타난 것처럼 후기반응이 매우 억제되어 있어서 acetylcholine에 의한 지속적반응이 dibucaine의 영향을 받은 것(Fig. 8)과 같았으나 A_{23187} 의 경우와는 달랐다(Table 1). 특이한 점은 MNNG를 투여한 후 22분과 24분제의 분획에서 아

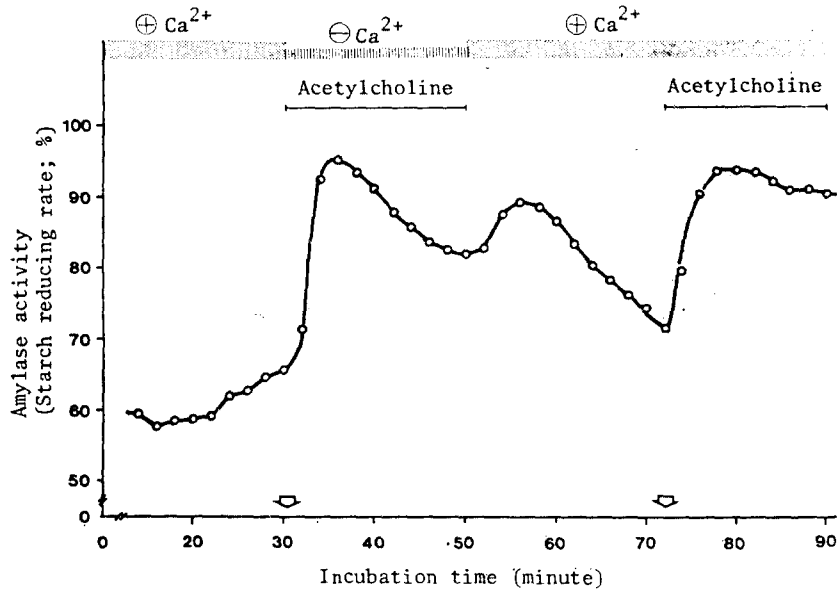


Fig. 3. Acetylcholine effect on amylase secretion in Ca²⁺-deficient medium. The calcium deficient period was only 20 minutes, during which time acetylcholine (10⁻⁵ M) was administered to the tissue fragments, and the response was checked for amylase secretion. The later period of acetylcholine stimulation in the presence of calcium (2.56 mM) was followed for comparison with the effect without calcium. Each value represents the mean of four different experiments.

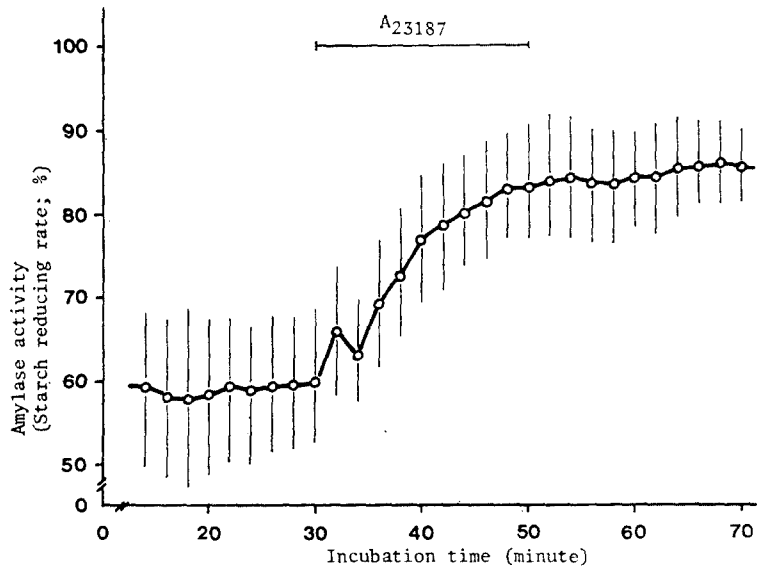


Fig. 4. Effect of calcium ionophore (A₂₃₁₈₇) on amylase secretion from mouse pancreatic fragments. After 30 minutes preincubation, the medium containing A₂₃₁₈₇ (9.6 × 10⁻⁶ M) was perfused for 20 minutes and replaced by the medium without the calcium ionophore. Each value is the mean ± SD of five different experiments.

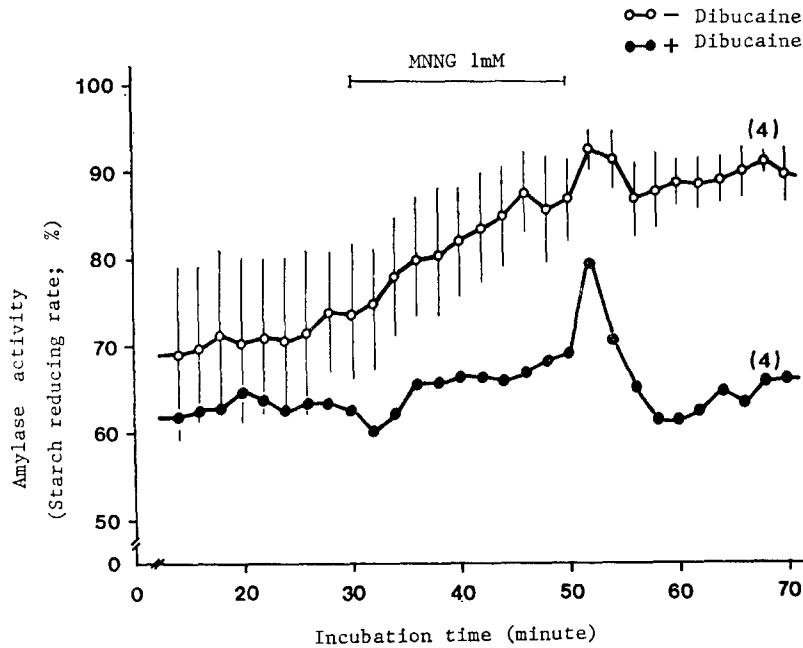


Fig. 5. Effect of guanylate cyclase activator to stimulate amylase secretion by pancreatic fragments in the presence or absence of dibucaine. Pancreatic fragments were preincubated for 30 minutes with perfusion of the Krebs solution. The solution containing MNNG(1 mM) was given during 20 minutes to activate guanylate cyclase in pancreatic acinar cells for amylase secretion in presence or absence of dibucaine. The preincubation solution was given after the administration of the activator containing medium to observe sustained response by the tissue fragments in amylase secretion. Upper figure represents the effect of MNNG in the absence of dibucaine in the incubation medium for amylase secretion and data are expressed as the mean \pm SD of four experiments. Lower figure represents the effect of MNNG in the presence of dibucaine(0.1 mM) in the incubation medium during the entire period of perfusion and data are expressed as mean of four experiments.

밀라아제 활성이 이웃 분획보다 높게 나타났는데 Fig. 5에서 보듯이 dibucaine (0.1 mM)으로 억제시킨 후 MNNG를 투여하였을 때는 이 부분이 더욱 현저한 상승을 보였다.

여러가지 분비억제물질들이 acetylcholine 효과에 미치는 영향

세포질에서 단백질합성을 억제하는 것으로 알려진 cycloheximide를 2×10^{-4} M 농도로 크레브스 용액에 첨가하여 췌장조직을 배양하는 전기간을 관류시키면서 acetylcholine으로 췌장세포들을 자극시켰더니 Fig. 6에서 보듯이 자극 직후의 개시적반응은 영향을 받지 않고 Fig. 1에서와 같은 수준으로 아밀라아제 활성이 급속히 증가하였으나 배양시간이 지남에 따라 점차 분비물 분획의 아밀라아제 활성은 감소하여 지속적반응은 36분째 분획에서 약 20%나 저하하였다. 이러한 사실은 지속적반응에서 중요한 역할을 하는 PKC의 억제물질인 dibucaine을 처리한 Fig. 8에서도 같은 양상을 나타내므로써 Fig. 1에 나타난 것과 같이 acetylcholine의 자극에 의해서 아밀라아제 분비가 고원을 형성하는 표면적 현상이 acinar cell 내부에서는 여러 반응이 몇 단계로 나뉘어 진행되는 것으로 나타났다.

calmodulin의 길항물질로 알려진 trifluoperazine(TFP)을 0.1 mM 농도로 배양 전기간을

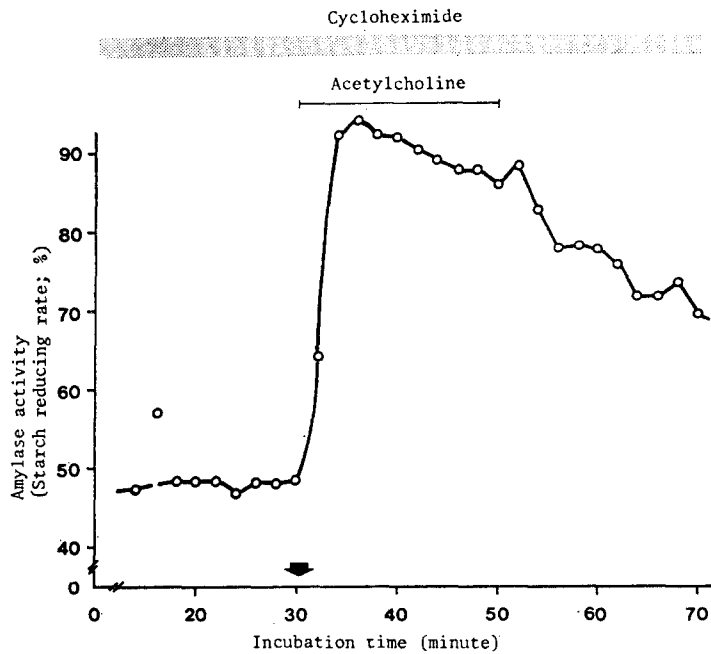


Fig. 6. Effect of acetylcholine on cycloheximide-inhibited amylase secretion. Protein synthesis inhibitor, cycloheximide (2×10^{-4} M), was given the entire perfusion period and acetylcholine (10^{-5} M) was added for 20 minutes from the arrow indicated. Each value represents the mean of six different experiments.

관류시키면서 acetylcholine 10^{-5} M로 소화효소들의 분비를 촉진시켰더니 Fig. 7에서 보여주는 바와 같이 acetylcholine 투여 직후 분출물분획의 아밀라아제 활성은 상당히 증가하기는 하나 시간에 따른 반응속도(dR/dt)가 매우 감소되어 있었고 또한 활성도분우리가 Figs. 1이나 6보다도 낮았다. 후기의 반응은 cycloheximide를 처리하였을 때 보다도 더욱 억제되어 있었는데 Fig. 8의 dibucaine에 의한 억제보다도 한층 더 억제되는 것으로 나타났다. dibucaine이나 TFP의 농도를 0.1 mM로 정한 것은 이들 억제물질들을 몇가지 농도(20 μ M, 50 μ M 그리고 100 μ M)로 생쥐 췌장조직에 처리하여 보았더니 100 μ M 농도에서 이들의 영향이 보다 뚜렷하였기 때문에 이 농도로 실험치를 구하였다.

cycloheximide, TFP 그리고 dibucaine의 경우 모두 acetylcholine 자극 후 22분째 분출물분획에서 아밀라아제 활성이 이웃 분획보다 약간씩 높았으며 이러한 현상은 HCCH로 억제시켰을 때도(Fig. 9) 마찬가지 이었다.

dibucaine이 acetylcholine, A_{23187} 그리고 MNNG의 아밀라아제 분비촉진작용에 미치는 영향을 표 1에 비교하였다. 표 1에서는 췌장세포를 자극한 후 개시적반응으로 인하여 아밀라아제분비가 봉우리를 이루는 시점인 분비촉진제 투여 후 4분째 분획의 값, 지속적반응의 초기 단계라고 볼 수 있는 20분째 분획의 값, guanylate cyclase에 의해서 일어나는 반응들이 분비에 최대로 작용할 때라고 생각되는 22분째 분획의 값 그리고 지속적반응이 나타나는 후기 단계라고 생각되는 36분째 분획의 값을 취하여 dibucaine에 의해 여러가지 분비촉

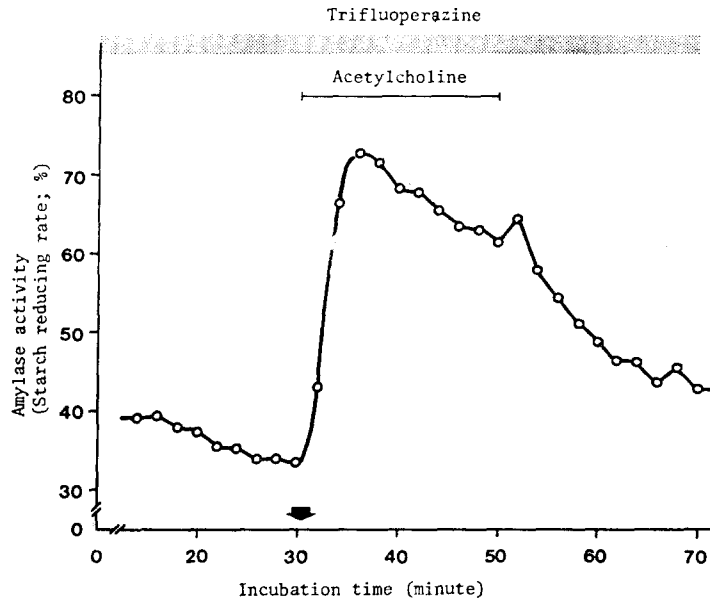


Fig. 7. Effect of acetylcholine on amylase secretion by trifluoperazine-treated pancreatic fragments. Pancreatic fragments were perfused with trifluoperazine (0.1 mM) containing medium through the entire incubation period and the same medium with acetylcholine (10^{-5} M) was perfused from the time indicated by the arrow. Each value is the mean of four different experiments.

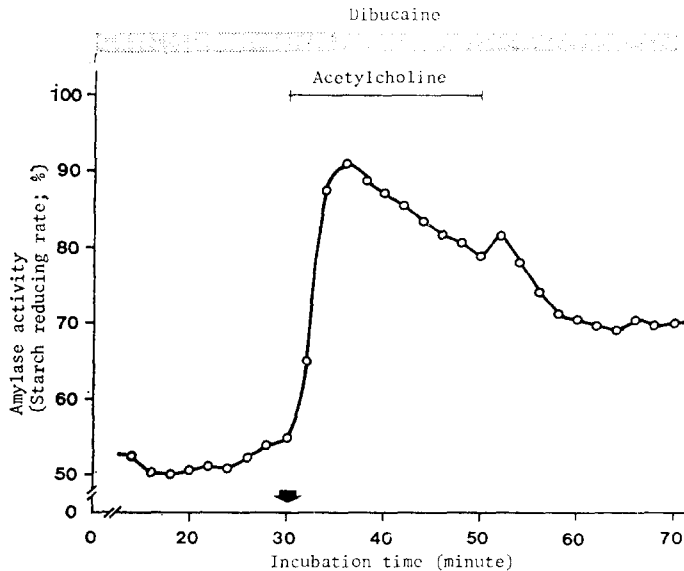


Fig. 8. Effect of acetylcholine on amylase secretion by dibucaine-treated pancreatic fragments. Protein kinase C inhibitor, dibucaine (0.1 mM), was given for the entire period of perfusion. Acetylcholine (10^{-5} M) was administered for 20 minutes from the arrow indicated. Each value is the mean of six different experiments.

Table 1. Comparison of dibucaine-inhibited responses of amylase secretion by acetylcholine, A₂₃₁₈₇ and MNNG.

Time after stimulation (minutes)	Kind of stimulators	Amylase activity (starch reducing rate; %)		% of inhibition	p-value
		Not inhibited	Inhibited		
4	Acetylcholine (10 ⁻⁵ M)	94.0±2.58(8)	87.0±5.14(6)	7.4	p<0.025
	A ₂₃₁₈₇ (9.6×10 ⁻⁶ M)	63.3±6.42(5)	63.6±7.92(3)	-0.5	—
	MNNG (1mM)	78.2±7.07(4)	62.3±6.98(4)	20.3	p<0.025
20	Acetylcholine	94.4±1.17(8)	78.5±6.08(6)	16.8	p<0.001
	A ₂₃₁₈₇	83.2±7.08(5)	81.4±5.24(3)	2.2	p>0.5
	MNNG	86.8±5.30(4)	69.2±5.50(4)	20.3	p<0.005
22	Acetylcholine	95.4±1.41(8)	81.4±6.67(6)	14.7	p<0.005
	A ₂₃₁₈₇	83.8±8.11(5)	84.3±4.73(3)	-0.6	—
	MNNG	92.1±2.17(4)	79.6±4.38(4)	13.6	p<0.025
36	Acetylcholine	92.3±2.17(8)	70.4±8.47(6)	23.7	p<0.005
	A ₂₃₁₈₇	85.7±5.77(5)	81.8±5.95(3)	4.6	p>0.2
	MNNG	90.0±2.31(4)	63.4±8.04(4)	29.6	p<0.005

In each experiment, pancreatic fragments were incubated in the medium containing dibucaine (0.1 mM) through the full testing period. After 30 minutes preincubation, the same medium with each stimulator added at the concentration given in parentheses was perfused for 20 minutes and exchanged for a stimulator free medium. The observation times were chosen from the time course experiments of each stimulator as representative points as initial response peak (4 min), early sustained response phase (20 min), guanylate cyclase response peak (22 min) and late sustained response phase (36 min). Results are shown as mean±SD with number of experiments in parentheses. The p-values are evaluated under the null hypothesis for amylase secretion between those inhibited and not-inhibited.

진제의 작용이 이들 반응단계에서 억제된 정도를 비교하였더니 칼슘 ionophore의 경우를 제외하고는 acetylcholine이나 MNNG의 경우 둘다 dibucaine에 의하여 분비반응 후기로 가면서 억제현상이 크게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

췌장의 acinar cell에서 PI turnover에 따른 소화효소들의 분비촉진효과는 이미 잘 알려진 일어서 PI turnover시에 생성되는 산물인 ionositiol과 유사한 구조를 가진 hexachlorocyclohexane(HCCH)이 췌장 acinar cell에서 콜린효능성 약물인 carbachol의 자극에 의한 아밀라아제 분비를 억제시킨다는 것이 알려져 있었지만 그 억제작용을 경시적으로 좀 더 세분하여 측정하여 보았다. HCCH가 0.1 mM 농도로 첨가된 크레브스용액으로 70분간 배양한 생쥐 췌장조직 절편을 acetylcholine(10⁻⁵ M)으로 자극시켜서 배양용기 유출액 중의 아밀라아제 활성을 조사하였더니 Fig. 9에 나타난 바와 같이 개시적반응이나 지속적반응이 모두 억제되어 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 이 Fig. 9에는 다른 억제물질들의 억제효과도 또한 표 1에서와 같은 의도로 반응단계를 구분하여 acetylcholine 투여 후 4분, 20분, 22분 그리고 36분째 배양용기 분출물 분획의 아밀라아제 활성도를 Figs. 6, 7, 및 8에서 취하여

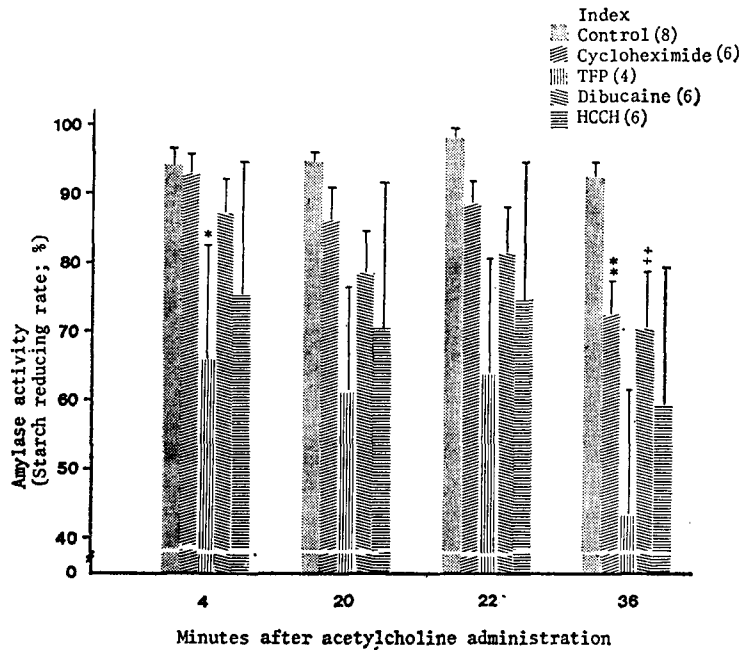


Fig. 9. Effect of acetylcholine on amylase secretion from inhibitors-treated pancreatic fragments. Pancreatic fragments were treated with various inhibitors, cycloheximide(2×10^{-4} M), trifluoperazine(0.1 mM), dibucaine(0.1 mM) or hexachlorocyclohexane(0.1 mM), during the entire experimental period. Acetylcholine(10^{-5} M) was introduced to the tissue fragments for 20 minutes as in control experiment shown in Fig. 1. Values were taken from amylase activity curve after acetylcholine administration at four representative times as initial response peak(4 min.), early sustained response phase(20 min.), guanylate cyclase-dependent response peak(22 min.) and late sustained response phase(36 min.). The influence of inhibitors were compared to the control value which was stimulated by acetylcholine alone. The results are shown as the mean \pm SD with the number of experiments in parentheses. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and $\mp p < 0.005$ are p-values for the null hypothesis on amylase secretion between those inhibitor-treated and acetylcholine(10^{-5} M) alone in same representative time.

control로써 Fig. 1에서 얻은 값과 함께 비교하였다.

고 찰

췌장에서의 외분비작용은 생체의 여러가지 조직 중에서 가장 활발한 신진대사작용의 하나인데 췌장은 거의 20여 가지의 소화효소원 및 소화효소를 분비하며 그 분비촉진요인도 신경액, 내분비물질 및 환경적요인등 다양하다.

acetylcholine으로 생쥐 췌장의 acinar cell을 자극시켰을 때 아밀라아제 활성으로 측정된 분비반응은 acetylcholine 투여 후 급격히 증가해서 40여분동안 거의 일정한 수준을 유지하였는데 이러한 현상은 acetylcholine과 같은 콜린효능성 약물인 bethanechol이 생쥐의 췌장 절편에서(Williams and Chandler, 1975), 그리고 caerulein이 쥐의 분리된 췌장에서(Bruzzone

et al., 1984) 아밀라아제를 분비시킨 것과는 유사한 결과를 보였다. 그러나 Asada와 Kanno (1985), Shibuya와 Kanno (1985)는 CCK-OP로 분리된 쥐의 췌장을 자극하였더니 200 pM 농도에서 단백질 분비가 두개의 봉우리를 이루었는데 CCK-OP 투여 후 즉시 췌장의 단백질 분비가 급격히 증가하여 예리한 봉우리를 이루었고 감소하던 분비량을 다시 서서히 증가하다가 분비가 중단되는 것으로 나타나서 그 분비양상이 본 실험의 경우와는 외형적으로 상이하였는데 acetylcholine, CCK-OP 및 caerulein은 췌장세포 내에서 같은 반응경로를 가지는 것으로 알려져 있으므로 이러한 상이한 결과는 좀 더 규명되어야 할 것으로 본다.

본 실험의 결과는 Kojima등(1983)이 보여준 돼지 부신에서 angiotensin에 의한 aldosterone 분비양상과 경시적 분비형태가 비슷하였지만 Asada와 Kanno (1985)의 결과는 쥐 췌장의 Langerhans's islet에서의 insulin 분비형태(Zawalish *et al.*, 1983)와 비슷하다고 볼 수 있다.

Kojima등(1983)과 Zawalich등(1983)은 calcium ionophore (A_{23187})로 분비반응의 initial phase를, 12-0-tetradecanolyphorbol-13-acetate (TPA)로 sustained phase를 분리시켜서 분비를 촉진시킬 수 있었기 때문에 Rasmussen과 Barrett (1984)는 이들의 결과를 개시적반응(initial response)과 지속적반응(sustained response)으로 구분하여 설명하였지만 본 실험에서는 A_{23187} 이 initial phase만을 독립적으로 나타내어 주지 못하였으나 단백질합성을 억제하는 cycloheximide나 PKC를 억제하는 것으로 알려진 dibucaine (Shulman, 1984)을 처리하였을 때 경시적으로 sustained phase에 해당하는 부분의 분비가 유의성 있게 억제되므로써 (Fig. 9) acetylcholine에 의한 생쥐췌장에서의 아밀라아제 분비과정도 다른 분비조직의 분비반응과 마찬가지로 여러 단계로 구성된 종합적반응이라고 생각할 수 있다. dibucaine이 MNNG에 의한 후기반응마저 억제한 것은 cGMP에 의존하는 일련의 반응과정도 이 물질에 의하여 억제되는 것인지 또는 dibucaine이 일종의 국소마취제이기 때문에 세포막에서 Ca^{2+} 이동을 억제하므로써 나타나는 이차적인 결과의 하나인지는 아직 불명하다.

TFP는 본 실험에서 개시적반응이나 지속적반응을 모두 억제하였는데 이것은 이 약물이 쥐 췌장의 Langerhans's islet에서 인슐린분비를 억제한 것(Janjic *et al.*, 1981)과 같은 양상을 보여주고 있다. 개시적반응이 유의성 있게 (Fig. 9) 억제되는 것으로 보아 이미 알려진 calmodulin(Gorelick *et al.*, 1983)이 췌장의 acinar cell에서도 분비 초기에 작용한다고 볼 수 있으나 후기반응마저 억제된 것은 좀 더 규명되어야 할 것으로 본다.

HCCH는 inositol과 구조가 유사하여 생쥐 췌장에서 carbachol, CCK-OP 및 A_{23187} 에 의한 아밀라아제 분비를 억제하였다고 했는데(Crouch and Roberts, 1985) 본 실험에서는 개시적 및 지속적반응이 모두 억제되어서 acetylcholine으로 분비를 촉진시킬때 생쥐 췌장 acinar cell에서 PI turnover가 분비에 관여하는 것을 간접적이거나 알 수 있었다.

세포외액중의 Ca^{2+} 이 세포 내부에서 일어나는 반응에 관여하는 것은 분명한 일이지만 Ca^{2+} 이 결핍된 용액으로 30분간 전배양을 하고 동일한 용액에 acetylcholine을 첨가하여 자극시킨 acinar cell에서도 세포외액에 칼슘이 2.56 mM 존재할 때에 못지 않게 외분비작용에 있어서 개시적반응이 신속하게 진행되어 아밀라아제 분비가 봉우리를 이루는 것을 볼 수 있었는데 그 이유는 ① 우선은 생쥐 췌장 acinar cell의 표면에 Ca^{2+} 이 결합할 수 있는 구조물이 있어서 비록 세포외액 중에 Ca^{2+} 이 결핍되어도 이러한 구조물에 붙어있던 Ca^{2+} 은 그 상태를 유지하고 있다가 Ca^{2+} gate가 열리면 세포내로 유입된다고 볼 수 있다. 동물체의 조직중 심근에는 transverse tubule 표면에 glycocalyx라는 Ca^{2+} 이 결합할 수 있는 음성을 띤

구조물이 있어서 excitation-contraction coupling이 일어날 때 Ca^{2+} 이동에 기여한다고 알려져 있다(Langer, 1978; Langer *et al.* 1976) 또는 ② 세포외액의 칼슘유무에 관계없이 PI turnover로 생긴 IP_3 가 세포내 Ca^{2+} 저장소에서 불충분하나 Ca^{2+} 을 방출시켰기 때문이 아닌가 생각해 볼 수 있다(Hokin, 1985; Pandol *et al.*, 1985; Rosoff and Cantley, 1985). 이러한 결과들은 췌장세포에서 세포 밖으로부터 유입된 Ca^{2+} 은 세포내부의 반응에 있어서 필요조건일 따름이지 필요충분조건은 아닐 것이라는 생각을 가지게 하는데 Williams와 Chandler(1975)도 세포 밖에서 유입된 Ca^{2+} 은 췌장세포에서 효소분비를 일으킬 때에 가장 중요한 요인은 아니고 다만 분비과정을 조절할 따름이라고 하였다. Shibuya와 Kanno(1985)는 Ca^{2+} 이 결핍된 용액을 쥐 췌장에 관류시키면서 CCK-OP로 자극할 때 8 pM에서는 단백질 분비가 없었고 200 pM에서는 단상분비(monophasic secretion)를 보였다고 하였다. Asada와 Kanno(1985)도 CCK-OP 200 pM을 Ca^{2+} 이 결핍된 관류액에 섞어 쥐 췌장에 투여하였을 때 단백질 분비가 약간 있었지만 Ca^{2+} 이 정상적으로 포함된 용액을 분비촉진제 없이 뒤이어 관류시켰더니 Ca^{2+} 결핍시 분비촉진제에 의한 것보다 더 많은 단백질분비를 보여서 본 실험과 정도의 차이는 바뀌었으나 같은 양상을 보였다.

MNNG에 의해서 아밀라아제 분비가 촉진된 것 만으로는 acinar cell내에서 cGMP의 작용을 확인하는 직접적인 증거는 못되지만 MNNG가 세포내의 cGMP 농도를 증가시킨다는 것은 여러가지 조직에서 알려진 사실로서 Gunther와 Jamieson(1979) 및 Gunther(1981)는 기니아피그의 췌장세포에서 MNNG(10^{-4} M)에 의한 세포내 cGMP의 증가는 MNNG 투여후 2~3분내에 최고 농도를 보였으나 단백질분비에는 영향을 주지 않았고 caerulein(10^{-9} M)은 cGMP도 같은 양상으로 증가시켰고 단백질분비도 촉진시킨다고 하였으나 acetylcholine, CCK-OP 및 caerulein 같은 물질들이 췌장세포에서 cGMP의 증가와 더불어 소화효소들의 분비를 촉진시킨다는 것은 주지의 사실이므로 앞으로 cGMP에 따른 후속반응이 더 자세히 규명되어야 하겠지만 cGMP도 cAMP와 마찬가지로 어떤 단백질을 인산화 시키는데 작용하므로써 췌장세포 내에서의 반응에 관여한다고 생각된다.

본 실험에서는 MNNG(1 mM)에 의해서 아밀라아제 분비가 촉진되었을 뿐 아니라 MNNG 투여후 22분과 24분제 분획에서 주위 분획보다 더 높은 분비증가를 보여서 acetylcholine 투여후 22분제 분획에서 아밀라아제 활성도나 총단백질 함량이 특히 높은 것과 경시적으로 일치하여 acetylcholine(10^{-5} M)으로 생쥐 췌장의 acinar cell을 자극할 경우 PI turnover에 따른 분비촉진과정도 진행되지만 다른 한편으로는 guanylate cyclase도 활성화되어서 cGMP 및 cGMP-PK를 거쳐 PKC와는 다른 독자적인 반응경로를 통하여 외분비효소의 합성을 유발시키므로써 지속적반응에 가세하는 것으로 보여진다.

요 약

생쥐 췌장조직에서 acetylcholine의 자극에 따른 아밀라아제 분비촉진과정을 보기 위하여 몇가지 분비촉진물질과 억제물질들을 이용하여 실험을 하여본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. acetylcholine에 의한 생쥐 췌장 acinar cell에서의 아밀라아제 분비촉진반응은 종합적 반응으로 개시적반응과 지속적반응으로 구분할 수 있었다.

2. 분비과정에 있어서 개시적반응은 Ca^{2+} 과 calmodulin에 의하여 매개된다고 보여지며 acetylcholine 투여 직후 반응이 급속히 진행되었는데 이것은 acinar cell 내에 이미 존재하던 효소원입자들이 방출되는 과정이라고 본다.

3. 분비과정의 지속적반응은 세포내에서 단백질을 새로 합성하여 분비하는 과정으로 한 가지 이상의 반응 경로를 거쳐 일어나는 반응들이 가세하여 진행되는 것으로 나타났다.

4. acetylcholine 투여후 22분째 분비물 분석에서 아밀라아제 활성 및 총단백질 함량이 이윗 분석의 값보다 높았는데 MNNG로 guanylate cyclase를 활성화 시켰을 때도 이부분의 아밀라아제 활성이 가장 높게 나타났다.

5. protein kinase C의 억제물질인 dibucaine은 acetylcholine의 자극에 의한 아밀라아제 분비촉진반응 중에서 지속적반응을 저하시켰는데 calcium ionophore의 아밀라아제 분비촉진 효과에는 영향을 주지 않았지만 MNNG에 의한 효과는 현저하게 감소시켰다.

6. guanylate cyclase의 활성화는 독자적인 경로 또는 다른 반응경로에 연계되어 지속적 반응에 가세하는 것으로 생각되며 간접적인 방법에 의한 추정이기는 하지만 guanylate cyclase의존성 반응계단(reaction cascade)은 protein kinase C에 의한 것보다 앞서서 나타났다.

7. 이상으로 보아 생쥐의 췌장 acinar cell에서 acetylcholine의 자극에 의한 아밀타아제 분비촉진반응은 3상반응(three phase response)으로 세분할 수 있다고 본다.

REFERENCES

- Albano, J., K.D. Bhoola and R.F. Harvey, 1976. Intracellular messenger role of cyclic GMP in exocrine pancreas. *Nature* 262:404-406.
- Amsterdam, A. and J.D. Jamieson, 1972. Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:3028-3032.
- Asada, N. and T. Kanno, 1985. Influence of PH change on redox state and CCK-induced secretion in isolated perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 248:C235-C240.
- Ashendel, C.L., 1985. The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochem. Biophys. Acta* 822:219-242.
- Aswad, D.W., 1984. cGMP-dependent protein phosphorylation in the nervous system. *Trends Pharmacol. Sci.* 5:64-66.
- Brooks, C.L. and M. Landt, 1985. Calmodulin-dependent protein kinase in acini from lactating rat mammary tissue: Subcellular locale, characterization and solubilization. *Arch. Biochem. Biophys.* 240:663-673.
- Bruzzone, R., E.R. Trimble, A. Gjinovci and A.E. Renold, 1984. Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas. *Gastroenterology* 87:1305-1312.
- Bruzzone, R., P.A. Halben, A. Gjinovci and E.R. Trimble, 1985. A new rapid method for preparation of dispersed pancreatic acini. *Biochem. J.* 226:621-624.
- Case, R.M., A.A. Harper and T. Scratcherd, 1968. Water and electrolyte secretion by the perfused pancreas of cat. *J. Physiol. (London)* 196:133-149.
- Cristophe, J.P., E.K. Frandson, T.P. Conlon, G. Krishna and J.D. Gardner, 1976. Action of cholecystokinin, cholinergic agents and A_{23187} on accumulation of guanosine 3',5'-monophosphate in dispersed guinea pig pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 251:4640-4645.

- Crouch, M.F. and M.L. Roberts, 1985. The effects of γ -hexachlorocyclohexane on amylase secretion and inositol phospholipid metabolism in mouse pancreatic acini. *Biochem. Biophys. Acta* **844**:149-157.
- DeRubertis, F.R. and P.A. Craven, 1967. Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylate cyclase by nitrosamines. *Science* **193**:897-899.
- Douglas, W.W., 1968. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* **34**:451-474.
- Fisher, S.K., L.A.A. Van Rooijen and B.W. Agranoff, 1984. Renewed interest in the polyphosphoinositides. *Trends Biochem. Sci.* **9**:53-56.
- Flockerzi, V., N. Speichermann and F. Hofmann, 1978. A guanosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.* **253**:3395-3399.
- Gardner, J.D., 1979. Regulation of pancreatic exocrine function in vitro: initial steps in the actions of secretagogues. *Ann. Rev. Physiol.* **41**:55-66.
- Gardner, J.D., T.P. Conlon, M.L. Fink and M. Bodanszky, 1976. Interaction of peptides related to secretin with hormone receptors on pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **71**:965-970.
- Gorelick, F.S., J.A. Cohn, S.D. Freedman, N.G. Delahunt, J.M. Gershoni and J.D. Jamieson, 1983. Calmodulin-stimulated protein kinase activity from rat pancreas. *J. Cell Biol.* **97**:1294-1298.
- Gunther, G.R., 1981. Effect of 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on Ca^{2+} efflux and protein discharge in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **256**:12040-12045.
- Gunther, G.R. and J.D. Jamieson, 1979. Increased intracellular cyclic GMP does not correlate with protein discharge from pancreatic acinar cells. *Nature* **280**:318-320.
- Haymovits, A. and G.A. Scheele, 1976. Cellular cyclic nucleotides and enzyme secretion in pancreatic acinar cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:156-160.
- Hokin, L.E., 1985. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **54**:205-235.
- Hokin, L.E. and M.R. Hokin, 1956. The actions of pancreozymin in pancreas slices and the role of phospholipids in enzyme secretion. *J. Physiol. (London)* **132**:442-453.
- Janjic, D., C.B. Wollheim, E.G. Siegel, Y. Krausz and G.W.G. Sharp, 1981. Sites of action of trifluoperazine in the inhibition of glucose-stimulated insulin release. *Diabetes* **30**:960-966.
- Jensen, R.T., J.D. Gardner, 1978. Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity in acinar cells from guinea pig pancreas. *Gastroenterology* **75**:806-817.
- Kojima, I., H. Lippes, K. Kojima and H. Rasmussen, 1983. Aldosterone secretion: Effect of phorbol ester and A_{23187} . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**:555-562.
- Langer, G.A., 1978. The structure and function of the myocardial cell surfase. *Am. J. Physiol.* **235**:H461-H468.
- Langer, G.A., J.S. Frank, L.M. Nudd and K. Seraydarian, 1976. Sialic acid: Effect of removal on exchangeability of cultured heart cells. *Science* **193**:1013-1015.
- 이삼열, 정윤섭, 1985. "임상병리검사·" 중 Amylase활성 측정, 연세대학교 출판부, 제 5 판 : pp. 238-240.
- Michell, R.M., 1975. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta* **415**:81-147.
- Nishizuka, Y., 1983. Phospholipid degradation and signal translation for protein phosphorylation.

- Trends Biochem. Sci.* 8:13-16.
- Pandol, S.J., M.W. Thomas, M.S. Schoeffield, G. Saches and S. Muallem, 1985. Role of calcium in cholecystokinin-stimulated phosphoinositide breakdown in exocrine pancreas. *Am. J. Physiol.* 248:G551-G560.
- Pearson, G.T., J. Singh and O.H. Peterson, 1984. Adrenergic nervous control of cAMP-mediated amylase secretion in the rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 246:G563-G573.
- Rasmussen, H. and P.Q. Barrett, 1984. Calcium messenger system: An integrated view. *Physiol. Rev.* 64:938-984.
- Robberecht, P., T.P. Conlon and J.D. Gardner, 1976. Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig: Structural requirements for effects of VIP and secretin on cellular cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 251:4635-4639.
- Rosoff, P.M. and L.C. Cantley, 1985. Lipopolysaccharide and phorbol esters induce differentiation but have opposite effects on phosphatidylinositol turnover and Ca^{2+} mobilization in 70z/3 pre-B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 260:9209-9215.
- Rothman, S.S., 1964. Exocrine secretion from the isolated rabbit pancreas. *Nature* 204:84-85.
- Schulman, H., 1984. Calcium-dependent protein kinases and neuronal function, *Trends Pharmacol. Sci.* 5:188-192.
- Schulz, I. and H.H. Stolze, 1980. The exocrine pancreas: the role of secretagogues, cyclic nucleotides and calcium in enzyme secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 42:127-156.
- Shibuya, I. and T. Kanno, 1985. Calcium-dependent secretory and redox response to CCK-8 in isolated perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 248:C228-C234.
- Streb, H., R.F. Irvine, M.J. Berridge and I. Schulz, 1983. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature* 306:67-68.
- Williams, J.A. and D. Chandler, 1975. Ca^{2+} and pancreatic amylase release. *Am. J. Physiol.* 228:1729-1732.
- Zawalich, W., C. Brown and H. Rasmussen, 1983. Insulin secretion: Combined effects of phorbol ester and A_{23187} . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 117:448-455.