

Expression of Anion Exchanger and CFTR in the Hepatocyte and Cholangiocytes in Bile Duct-Ligated Rat

Jae Dong Lee¹, Joon Ho Wang¹, Seung Seog Ki¹, Won Hyeok Choe¹, Jae Seung Park², Won Kyoo Cho², Jung-Jun Park³ and Hong Su Kim^{4*}

¹Department of Gastroenterology/Hepatology, College of Medicine, Konkuk University, Chungju and Seoul, Korea

²Department of Medicine, Division of Gastroenterology/Hepatology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

³Division of Sport Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

⁴Department of Gastroenterology/Hepatology, College of Medicine, Soonchunhyang University, Chunan 336-745, Korea

Received November 14, 2011 / Revised December 10, 2011 / Accepted December 14, 2011

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and sodium-independent Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger (AE) genes are expressed in a wide variety of mammalian tissues including cholangiocytes. They play an important role in the regulation of intracellular pH (pHi) as well as in transepithelial acid/base transport necessary for biliary bicarbonate secretion. The aim of this study was to examine the expression level of CFTR gene and AE genes (AE1, AE2 and AE3) in the cholangiocytes and the hepatocytes, and also measure AE2 gene expression level after bile duct ligation (BDL). As we previously described, isolated hepatocytes and cholangiocytes from the liver of normal and BDL rats were prepared and gene expression levels were measured by using RT-PCR. We found that AE1, AE2, and AE3 genes were expressed in both hepatocytes and cholangiocytes, but CFTR was only in cholangiocytes. AE2 gene expression level was higher in the BDL hepatocytes than normal hepatocytes, which was significantly different between two groups. AE2 gene expression level was lower in the BDL cholangiocytes than normal cholangiocytes. However, AE2 gene expression level in both hepatocytes and cholangiocytes were not changed with a longer duration of BDL. These results suggest that CFTR and AE2 may play an important role in the pathogenetic mechanism of biliary cholestatic liver disease.

Key words : Hepatocyte, cholangiocyte, CFTR, anion exchanger, cholestasis

서 론

담관계는 간에서 형성된 담즙을 십이지장으로 분비하는 통로일 뿐만 아니라 간의 생리적인 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 담즙은 처음에 간세포에서 담 세관으로 분비되고 헤링관을 통해 소 담관으로 운반되며, 더 큰 크기의 담관을 지나는 동안 재흡수와 분비의 과정을 거쳐 최종 담즙이 형성된다. 사람에서 담관계에서의 담즙분비는 총 담즙 양의 약 40%까지 영향을 미칠 수 있다[5,11-13,18,19,20,25].

인간의 7번 염색체에 있는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 유전자는 1480개의 아미노산으로 구성된 CFTR 단백질을 생산한다[13]. CFTR 유전자는 폐, 교환, 기관, 신장, 소장, 대장, 췌장 및 담낭 등에서 발현된다[20]. CFTR 단백질은 분비성 상피세포의 첨막(apical membrane)에 위치하며, 세포내의 cAMP 증가에 의하여 활성화되어 염소 이온을 분비한다[5,9,18,25]. 상염색체 열성으로 유전

되는 낭성 섬유증(Cystic fibrosis)은 CFTR의 기능 부전으로 수분이 거의 없는 점성이 높은 물질을 분비하여 기관지 확장증, 췌부전증, 담관 폐쇄, 불임, 장 폐쇄, 비용종형성, 만성 부비동염 등의 다양한 임상 증상을 일으키는 질병이다[9,20,22].

나트륨 비의존적 염소/중탄산염 음이온 교환기(Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchangers, AEs)는 세포 첨막 측에서 염소이온을 세포내로, 중탄산염이온을 내강으로 배출하는, 염소와 중탄산염 이온의 전기 중화적 교환(electroneutral exchanges)을 매개하는 막 단백질이다[1,28].

담관 세포는 기저 상태에서는 핵 분화가 없는 휴지기지만, 담관 결찰이나, 간 부분 절제 등으로 담관 세포의 활성화가 일어나면, 세포내 cAMP 합성이 증가하고, 세크레틴 수용체 유전자 표현이 증가하며, 담관 세포의 기능도 변화한다. 담관 결찰 흰쥐에서 활성화된 담관 세포는 분비기능이 활성화되며, 중탄산염이 풍부한 담즙 정체를 일으키는 것으로 알려져 있다 [2,5,15].

따라서 본 연구에서는 흰쥐의 담관 세포와 간세포에서 CFTR과 AEs (AE1, AE2, AE3)의 역할을 알아보기 위하여 이들 유전자의 발현을 조사하였다. 또한, 흰쥐의 담관 결찰로 유발된 담즙 정체 상태에서 담관 세포와 간세포에서 AE2 유전

*Corresponding author

Tel : +82-41-570-3680 , Fax : +82-41-570-3681

E-mail : khskhs@sch.ac.kr

자 발현을 관찰하여 그 역할을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 대상

실험동물은 200-250 g의 수컷 Sprague Dawley 를 이용하였다. 흰쥐를 마취하여 개복한 후, 총담관이 십이지장으로 유입되는 부위를 찾아, 좌우 분지부 하방에서 결찰을 한 후 담관이 재교통되는 것을 방지하기 위해서 담도를 절제 결찰하였다. 담관 결찰군은 24마리로 실험을 하였고, 대조군은 담관 결찰을 시행하지 않은 6마리로 하였다.

간세포와 담관세포의 분리

담관 결찰 후 4주 동안 1주일에 6마리씩 희생시켜 간 세포와 담관 세포를 분리하였다. 간세포(hepatocytes)와 담관세포(cholangiocytes)의 분리는 다음과 같은 방법을 이용하였다 [6,29]. 요약하면, 간문맥(portal vein)을 통하여 Hanks' buffer 와 collagenase D (Roche, USA)를 관류시킨 후 간(liver)을 떼어낸다. 떼어낸 간을 L-15 배지에서 조심스럽게 간을 둘러싸고 있는 막(membrane)을 제거한 후 핀셋을 이용하여 간을 분쇄하여 간에 붙어있는 간세포를 분리하여 45 µm의 Nitex Swiss nylon monofilament 스크린(Tetko, Lancaster, USA)으로 여과한 후 여과액을 4°C, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 버리고 세포를 32% Percoll 에 재부유한 후 90% Percoll이 들어있는 15 ml 튜브(tube)에 중층시킨다. 담관세포의 분리는 간세포를 분리하고 남은 비 실질세포(non-parenchymal tissue)를 가위로 잘게 썰은 후 collagenase, DNase, 그리고 Pronase 또는 hyaluronidase가 들어있는 MEM 배지에 부유하여 37 °C 진동 배양기(shaking incubator)에서 20분간 반응시켜 작은담관세포 조직(isolated bile duct units, IBUDs)과 단일 담관세포(isolated bile duct cells, IBDCs)로 분리한 후, 분리된 단일 담관세포를 모아 4°C, 1,200 rpm에서 5분간 원심침전한 후, Percoll를 이용하여 살아있는 세포만을 분리하였다. 이때 얻어진 세포를 trypan blue로 염색하여 세포생존율과 세포수를 계산하여 실험에 이용하였다. 세

포의 생존율은 98% 이상이었다.

Immunohistochemistry

담관 세포에서만 발현되는 단일항체를 이용하여 분리된 담관세포를 확인하였다[5]. 요약하면, 분리된 담관세포 조직을 고정액을 이용하여 고정한 후, 단일항체 항 cytokeratin-19 (CK-19)을 이용하여 반응시킨 후, 형광 물질이 결합된 이차항체를 이용하여 CK-19의 발현정도를 형광현미경(Olympus America, Inc., NY, USA)에서 관찰하였다.

RT-PCR

RNA는 TRIzol (Life Technologies, USA)을 이용한 acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 방법으로 추출하고 RNA의 양은 분광광도계(spectrophotometry)에 의하여 측정하였다. 2 µg의 RNA를 2.5 U MLV (Malonic murine leukemic virus) reverse transcriptase, 1 U RNase Inhibitor, 10 mM dNTP, PCR buffer (10 mM Tris Hcl pH 8. 3, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂), 25 M Oligo dT 및 DEPC-water와 함께 각각 실내 온도에서 10분간, 42°C에서 60분간, 그리고 70°C에서 5분간 incubation하여 cDNA를 전사하였다. cDNA 합성은 thermocycler (M. J. Reserch, M-Medical, Firenze, Italy)를 사용하였다. cDNA의 증폭은 PCR buffer로 Perkin Elmer Gene AMP PCR system 2400을 사용하여 시행하였다. CFTR, AE1, AE2, AE3 증폭을 위해 사용한 primer는 다음과 같고(Table 1), GAPDH를 house keeping gene으로 사용하였다. 각각 유전자들의 PCR 조건은 다음과 같다(Table 2). PCR 산물은 1.5% agarose gel을 이용해 분리하였고, ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 자외선 조사기로 관찰하였다. CFTR과 AE2 유전자의 발현 정도는 CFTR/GAPDH와 AE2/GAPDH 발현량의 비를 정량분석기(the quantity one in the FluorS-multi imager)를 이용하여 상대적 밀도로 분석하였다.

자료처리

표적 유전자에 대한 증합효소 연쇄반응 비에 대한 각 군간의 차이를 비교하기 위해 Wilcoxon's two tailed t-test 및

Table 1. Primers used for CFTR and AE mRNA expression

Genes	Primers cDNA sequence	cDNA Sequence location
CFTR	5'-GCCAGGGCTAGCAGTCTTCAITTTACTGAG-3'	(3,045-3,075)
	5'-AGCCTCGAGCACTAGAGCCGGGTCTCTTGC-3'	(4,419-4,448) [16]
AE1	5'-CTC TGC TAC TAA ACG CAG CCA-3'	(272-293)
	5'-TGT AGT CGA TGT GCG GAG CCT CA-3'	(637-615) [14]
AE2	5'-AGT GAT GAG AAA GAA TTC TC-3'	(1,282-1,301)
	5'-AGC TGC ACC TGC CAC CTC TA-3'	(1,982-2,001) [21]
AE3	5' -AGACCAAAGTGGAGATGACC	(1,919-1,938)
	5 - GCAGGGCACTACTATTCAGT	(2,617-2,598) [8]
GAPDH	5'- GGG TGG TGC CAA AAG GGTC	
	3'- GGA GTT GCT GTT GAA GTC ACA	

Table 2. Amplification conditions of RT-PCR

Genes	Denature	Annealing	Extention	No. of Cycles
CFTR	94°C, 1 min	60°C, 45 sec	72°C, 1 min	45
AE1	94°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min	35
AE2	94°C, 30 sec	55°C, 1 min	72°C, 1 min	30
AE3	94°C, 45 sec	60°C, 1 min	72°C, 2 min	35

Kruskal-Wallis test를 시행하였다. 자료 분석은 PC-SAS (ver 8.10)을 이용하였으며, 유의 수준 5%에서 검정이 이루어 졌다.

결 과

분리된 간세포는 균일한 크기의 약 30 μm 크기의 둥근 세포로 관찰되었고(Fig. 1A), 담관 세포는 약 15 μm 크기의 둥근 세포로 관찰되었다(Fig. 1B). 또한 형광 면역 염색을 통하여 분리된 세포가 담관 세포임을 확인하였다(Fig. 2). 담관 세포에서 CFTR, AE1, AE2 및 AE3 RNA가 모두 발현되었다(Fig. 3). 간세포에서 CFTR RNA는 발현되지 않았으며, AE1, AE2 및 AE3 RNA는 모두 발현되었다(Fig. 4). 담관 결찰 1-4주 후, 분리된 담관세포군에서 AE2 유전자의 상

대적 발현 정도가 평균 1.97로 대조군인 정상 담관세포군의 6.91에 비해서 감소되었다. 또한 담관 결찰 담관세포군에서 AE2 유전자의 발현량은 결찰 기간에 따른 차이는 없었다(Fig. 5). 담관 결찰 간세포군에서 AE2 유전자의 상대적 발현도는 평균 1.43으로 대조군인 정상 간세포군의 0.77에 비해서 경계적 유의성을 보이며 증가하는 경향을 나타내었다 ($p=0.065$). 또한 결찰 간세포군에서 AE2 유전자의 발현량은 결찰 기간에 따른 차이는 없었다(Fig. 6).

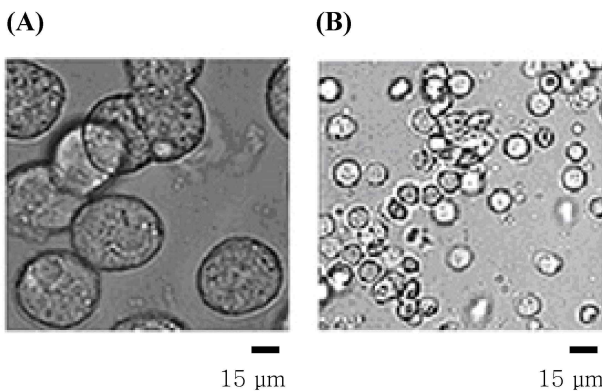


Fig. 1. Clusters of freshly isolated hepatocyte (A) and bile duct epithelial cells (B), (x100).

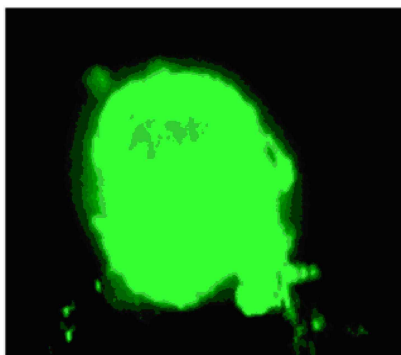


Fig. 2. Immunofluorescent micrograph of IBDUs. IBDUs were immunofluorescently stained for CK-19.

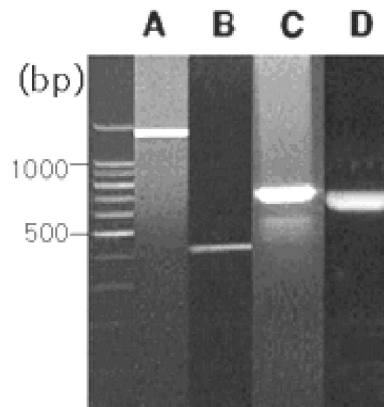


Fig. 3. RT-PCR assisted amplification of CFTR RNA and AE1, AE2, and AE3 RNA in isolated cholangiocytes of rats. Lane A, CFTR (1,403 bp); lane B, AE1 (401 bp); lane C, AE2 (719 bp); lane D, AE3 (679 bp).

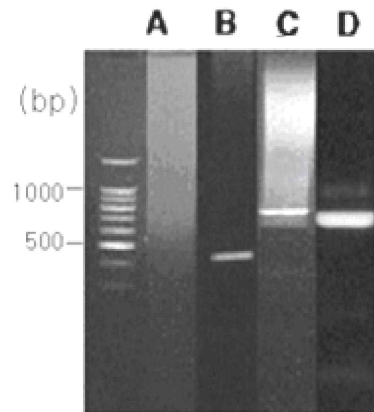


Fig. 4. RT-PCR assisted amplification of CFTR RNA and AE1, AE2, and AE3 RNA in isolated hepatocytes of rats. Lane A, (-) CFTR (1,403 bp); lane B, AE1 (401 bp); lane C, AE2 (719 bp); lane D, AE3 (679 bp).

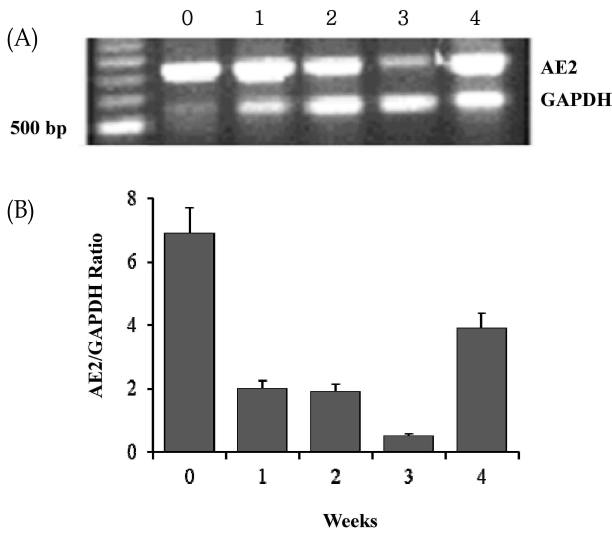


Fig. 5. AE2 and GAPDH mRNA expression levels in cholangiocytes of BDL rats. (A) AE2 and GAPDH mRNA expression levels measured by gel electrophoresis. Lane 0, control; lane 1, 1 week after BDL; lane 2, 2 week after BDL, lane 3, 3 week after BDL, and lane 4, 4 week after BDL. (B) Relative mRNA expression levels of AE2 compared to GAPDH measured by densitometry (Mean±SD).

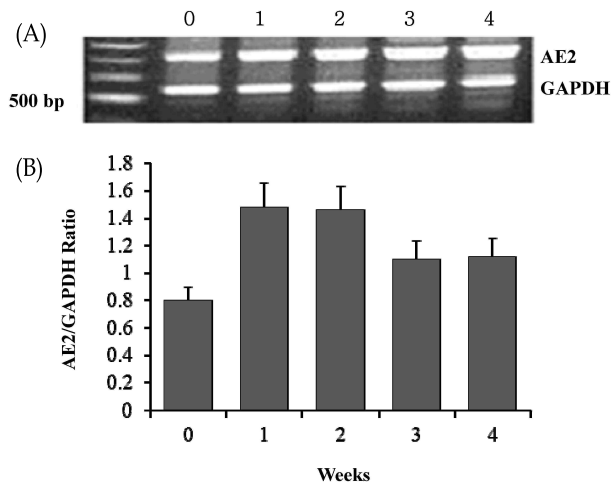


Fig. 6. AE2 and GAPDH mRNA expression levels in hepatocytes of BDL rats. (A) AE2 and GAPDH mRNA expression levels measured by gel electrophoresis. Lane 0, control; lane 1, 1 week after BDL; lane 2, 2 weeks after BDL, lane 3, 3 weeks after BDL, and lane 4, 4 weeks after BDL. (B) Relative mRNA expression levels of AE2 compared to GAPDH measured by densitometry (Mean±SD).

고찰

흰쥐의 간세포에서는 AE1, AE2 및 AE3 유전자만 발현되었

고, 담관 세포에서는 담즙의 이온 조절에 중요한 역할을 하는 CFTR, AE1, AE2 및 AE3 유전자 모두 발현되는 소견을 보였다. 또한 1주에서 4주까지 담관 결찰을 한 흰쥐의 담관 세포와 간세포에서 AE2 유전자의 발현이 증가할 것으로 예상하였으나, 결찰을 하지 않은 군에 비해서 발현이 증가되지 않은 결과를 보였다.

담관계의 담즙 분비 및 전해질 교환은 CFTR, AEs, Na⁺/H⁺ exchanger (NHE), 및 Na⁺-HCO₃⁻ transport 등의 종합적인 작용으로 담즙의 양, pH 등이 조절된다. CFTR는 담관세포의 침막에 위치하며, 세크레틴 수용체에 의해 증가된 cAMP에 의하여 활성화되어 염소 이온을 분비한다[20]. 염소 이온 통로는 CFTR 이외에도 칼슘 이온 활성화 염소이온 통로(Ca²⁺-activated chloride channel), 고전도 음이온 통로(high conductance anion channel) 등이 있다. 담도 상피 세포의 침단층에서 발견되는 AEs는 CFTR과 연관되어 작동하며 염소이온 통로를 통해 내강으로 분비된 염소이온은 세포 내로 이동시키고, 세포 내에서 내강으로 중탄산염을 분비한다[7,10,24]. 이와 같이 담관 세포에서 이온의 분비 및 흡수에 관여하는 통로, 운반체 등은 서로 밀접하게 연관되어 담즙 형성과 중탄산염 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[28].

본 연구에서 흰쥐의 담관 세포에서 CFTR의 발현을 관찰할 수 있었지만, 간세포에서는 CFTR이 발현되지 않은 결과를 보여 기존의 연구 결과를 재확인할 수 있었다. 또한, 흰쥐의 담관 세포와 간세포 모두에서 AE1, AE2 및 AE3가 발현되었다. 간세포 및 담관 세포에서 AE2 유전자의 발현 결과는 이제까지의 연구 결과와 일치하였다. 그러나 AE1 유전자는 간세포 및 담관 세포에서 발현되지 않았다는 다른 연구들과 다른 결과를 보였다[17,23]. 또한 AE3 유전자의 경우 간세포와 담관 세포에서 mRNA 발현을 보고한 연구 결과는 현재까지 확인되지 않은 상태이다. 비록 본 연구에서는 유전자의 발현만을 조사하였고, 면역화학 염색 등의 방법으로 AE1 및 AE3 막단백질의 발현 여부와 조직에서의 위치 및 역할에 대한 검증이 이루어지지 못한 한계가 있었지만, 간세포 및 담관 세포에서 AE1 및 AE3 유전자 발현을 처음으로 확인하였다는 것은 중요한 사실이며 향후 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

담관 세포는 안정 시에는 휴지기 상태로 존재하지만 담관 결찰상태, α-naphthylisothiocyanate 투여시, 70% 간 절제 상태에서는 급격히 담관 세포의 증식이 일어난다[3,5,10,24]. 담관을 결찰한 흰쥐의 간에서 담관세포가 증식하며, 선택적으로 세크레틴 수용체 mRNA 발현이 증가한다고 알려져 있다. 세크레틴 수용체는 세포내 cAMP를 증가시켜서 CFTR을 활성화하여 염소이온을 배출시키고, 내강 내에서는 다시 AEs를 활성화시켜서 중탄산염이온이 풍부한 담즙정체를 유도한다[26,27]. 이것은 간에서 HCO₃⁻ 이온의 분비가 더 필요한 상황일 때는 어떤 자극에 의하여 AE2 발현을 증가시킬

수도 있다는 것을 시사한다[3]. 본 연구에서는 담관을 결찰한 흰쥐의 담관 세포에서 AE2 발현량이 기저량에 비해서 차이가 없었으며, 결찰 기간에 따른 차이도 없었다. 그러나 간세포에서는 AE2 발현량이 결찰 기간에 따라 증가되는 경향을 보였으나 통계상의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 담관을 결찰하면 주로 중등도 이상의 큰 담관 세포의 증식이 일어나며, AE2는 주로 중간 크기이상의 담관 세포에서 발현이 관찰된다[4,18]. 그러므로 담관 결찰시 AE2 유전자의 발현이 증가될 것으로 예측되지만, 본 연구 결과는 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 이러한 결과는 실험 동물수가 충분하지 않아서 통계적 차이를 발견할 수 없었을 가능성도 있지만, CFTR과 다르게 AE2 유전자는 담관 결찰 등의 담즙 정체에 의해서 활성화되지 않을 가능성이 있음을 시사한다. 실제로 췌장암으로 인한 담즙 정체가 있었던 환자들에서 정상 상태에 비해 AE2 단백질의 발현이 높지 않았던 결과들을 고려해볼 때 담즙 정체는 AE2 유전자 발현에는 영향을 끼치지 않을 가능성도 있다. 향후 더 많은 실험동물을 대상으로 중등도 이상의 담관세포를 선택적으로 분리하여 연구한다면 그 결과가 보다 뚜렷해질 것으로 생각한다.

결론적으로 일반적인 예측과는 달리 본 연구에서는 담관 결찰로 유발된 담즙 정체 상태에서 담관 세포의 AE2 유전자 발현은 증가되지 않았다. 그러나 CFTR 유전자는 담관 세포에서, AE1, AE2 및 AE3 유전자는 담관 세포와 간세포 모두에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러므로 CFTR, AE1, AE2, 그리고 AE3는 간세포와 담관 세포에서 중탄산염이온과 수액을 매개하는 주된 이온 전달체라는 사실을 고려할 때, 담도 담즙 정체 간질환에서 CFTR과 AE2 발현의 변화는 병리학적 기전에 중요한 역할을 할 수 있으리라고 생각된다.

References

- Alper, S. L. 1991. The band 3-related AE anion exchanger gene family. *Ann. Rev. Physiol.* **53**, 549-564.
- Alpini, G., C. D. Ulrich, J. O. Phillips, L. D. Pham, L. J. Miller, and N. F. LaRusso. 1994. Upregulation of secretin receptor gene expression in rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am. J. Physiol.* **266**, G922-928.
- Alpini, G., R. Lenzi, L. Sarkozi, and N. Tavoloni. 1988. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J. Clin. Invest.* **81**, 569-578.
- Alpini, G., S. Roberts, S. M. Kuntz, Y. Ueno, S. Gubba, P. V. Podila, G. LeSage, and N. F. LaRusso. 1996. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* **110**, 1636-1643.
- Alpini, G., S. S. Glaser, Y. Ueno, L. Pham, P. V. Podila, A. Caligiuri, G. LeSage, and N. F. LaRusso. 1998. Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am. J. Physiol.* **274**, G767-G775.
- Alvaro, D., W. K. Cho, A. Mennone, and J. L. Boyer. 1993. Effect of secretion on intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**, 1314-1325.
- Aranda, V., I. Martinez, S. Melero, J. Lecanda, J. M. Banales, J. Prieto, and J. F. Medina. 2004. Shared apical sorting of anion exchanger isoforms AE2a, AE2b₁, and AE2b₂ in primary hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1040-1046.
- Brosius, F. C. 3rd, R. L. Pisoni, X. Cao, G. Deshmukh, D. Yannoukakos, A. K. Stuart-Tilley, C. Haller, and S. L. Alper. 1997. AE anion exchanger mRNA and protein expression in vascular smooth muscle cells, aorta, and renal microvessels. *Am. J. Physiol.* **273**, F1039-F1047.
- Collins, F. S. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774-779.
- Elsing, C., A. Hirlinger, E. L. Renner, B. H. Lauterburg, P. J. Meier, and J. Reichen. 1995. Solvent isotope effect on bile formation in the rat. *Biochem. J.* **307**, 175-181.
- Fitz, J. G. 2002. Regulation of cholangiocyte secretion. *Semin. Liver Dis.* **22**, 241-249.
- Fitz, J. G., S. Basavappa, J. McGill, O. Melhus, and J. A. Cohn. 1993. Regulation of membrane chloride currents in rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **91**, 319-328.
- Knowlton, R. G., O. Cohen-Haguenaer, N. Van Cong, J. Frezal, V. A. Brown, D. Barker, J. C. Braman, J. W. Schumm, L. C. Tsui, and M. Buchwald. 1985. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* **318**, 380-382.
- Kudrycki, K. E. and G. E. Shull. 1989. Primary structure of the rat kidney band 3 anion exchange protein deduced from a cDNA. *J. Biol. Chem.* **264**, 8185-8192.
- LeSage, G., S. S. Glaser, S. Gubba, W. E. Robertson, J. L. Phinizy, J. Lasater, R. E. Rodgers, and G. Alpini. 1996. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology* **111**, 1633-1644.
- Leung, G. P., X. D. Gong, K. H. Cheung, S. B. Cheng-Chew, and P. Y. Wong. 2001. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat efferent duct epithelium. *Biol. Reprod.* **64**, 1509-1515.
- Martinez-Anso, E., J. E. Castillo, J. Diez, J. F. Medina, and J. Prieto. 1994. Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver. *Hepatology* **19**, 1400-1406.
- Marzinoni, M., S. S. Glaser, H. Francis, J. L. Phinizy, G. LeSage, and G. Alpini. 2002. Functional Heterogeneity of Cholangiocytes. *Semin. Liver Dis.* **22**, 227-240.
- McGill, J. M., S. Basavappa, T. W. Gettys, and J. G. Fitz. 1994. Secretin activates Cl⁻ channels in bile duct epithelial cells through a cAMP-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* **266**, G731-G736.
- Morales, M. M., M. A. Capella, and A. G. Lopes. 1999. Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 1021-1028.
- Rajendran, V. M., J. Black, T. A. Ardito, P. Sangani, S. L.

- Alper, C. Schweinfest, M. Kashgarian, and H. J. Binder. 2000. Regulation of DRA and AE1 in rat colon by dietary Na depletion. *Am J. Physiol.* **279**, G931-G942.
22. Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grazelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, M. L. Drumm, M. C. Iannuzzi, F. S. Collins, and L. C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
23. Spirli, C., A. Granato, K. Zsembery, F. Anglani, L. Okolicsanyi, N. F. LaRusso, G. Crepaldi, and M. Strazzabosco. 1998. Functional polarity of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in a rat cholangiocyte cell line. *Am J. Physiol.* **275**, G1236-1245.
24. Strazzabosco, M., A. Mennone, and J. L. Boyer. 1991. Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **87**, 1503-1512.
25. Strong, T. V., K. Boehm, and F. S. Collins. 1994. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J. Clin. Invest.* **93**, 347-354.
26. Thulin, L. and C. Johansson. 1978. Gastrointestinal hormones. *Acta. Chir. Scand. Suppl.* **482**, 69-72.
27. Tietz, P. S., G. Alpini, L. D. Pham, and N. F. Larusso. 1995. Somatostatin inhibits secretin-induced ductal hypercholerisis and exocytosis by cholangiocytes. *Am J. Physiol.* **269**, G110-G118.
28. Tsuganezawa, H., K. Kobayashi, M. Iyori, T. Araki, A. Koizumi, S. Watanabe, A. Kaneko, T. Fukao, T. Monkawa, T. Yoshida, D. K. Kim, Y. Kanai, H. Endou, M. Hayashi, and T. Saruta. 2001. A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J. Biol. Chem.* **276**, 8180-8189.
29. You, M., M. Matsumoto, C. M. Pacold, W. K. Cho, and D. W. Crabb. 2004. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* **127**, 1798-1808.

초록 : 담관 결찰 쥐의 간세포와 담관세포의 anion exchanger와 CFTR 발현

이재동¹ · 왕준호¹ · 기승석¹ · 최원혁¹ · 박재승² · 조원규² · 박정준³ · 김홍수⁴*

(¹건국대학교 의과대학 내과학교실, ²미국 인디애나 의과대학 소화기내과, ³부산대학교 스포츠과학부, ⁴순천향대학교 의과대학 내과학교실)

본 연구는 흰쥐의 담관 세포와 간세포에서 CFTR과 AE1·AE2·AE3 유전자들의 발현 유무를 조사하고 흰쥐에서 담관 결찰 후 AE2 유전자의 발현의 변화를 관찰하고자 하였다. 200-250 g의 Sprague Dawley 계 흰쥐 24마리의 총담관을 결찰한 후 4 주 동안 1 주일에 6마리씩 희생하여 간세포와 담관 세포를 분리하였다. 6마리는 대조군으로 사용하여 간세포와 담관 세포에서 CFTR 유전자와 AE1·AE2 와 AE3 유전자 발현을 조사하고 담관 결찰 후 1·2·3·4주 간격으로 AE2 유전자 발현을 조사하였다. AE1·AE2 와 AE3는 간세포와 담관 세포에서 발현되었고 CFTR은 담관 세포에서만 발현되었다. 담관 결찰 담관세포군에서 AE2 유전자의 발현은 대조군인 정상 담관세포군에 비해서 낮았다. 결찰 담관세포군에서 AE2 유전자의 발현은 결찰 기간에 따라 차이가 없었다. 담관 결찰 간세포군에서 AE2 유전자의 발현은 대조군인 정상 간세포군에 비해서 경계적 유의성을 보이며 증가하는 경향이 있었다. 결찰 간세포군에서 AE2 유전자의 발현은 결찰 기간에 따라 차이는 없었다. 따라서 CFTR·AE1·AE2·그리고 AE3 는 간세포와 담관 세포에서 중탄산염이온과 수액을 매개하는 주된 이온 전달체라는 사실을 고려할 때 담도 담즙정체 간질환에서 CFTR과 AE2 발현의 변화는 병리학적 기전에 중요한 역할을 할 수 있으리라고 생각된다.