

Effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on the Release of Pancreatic Enzymes and Expression of Regenerating Genes in Ethanol-injured Murine Pancreatic Primary Acinar Cells

Sung Ok Kim¹ and Yung Hyun Choi^{2*}

¹Team for Scientification of Korean Medical Intervention (BK21 Plus) & Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-828, Korea

²Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, and Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received October 25, 2013 / Revised November 12, 2013 / Accepted November 13, 2013

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, has been shown to have strong anti-bacterial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, and chemopreventive effects. However it is unknown whether EGCG can recover alcohol-associated pancreatitis. The aim of this study was to investigate the effects of EGCG on pancreatic enzyme activities and the expressions of pancreatic regenerating related markers, such as adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP), and Regenerating gene 1 (Reg1), in mice pancreatic primary acinar cells. Our results revealed that activities of α -amylase and chymotrypsin were significantly increased in the cells treated with ethanol compared to the untreated control cells; however, the increased activities of both enzymes were markedly reduced by pretreatment with EGCG. Phosphorylation of AMPK and total expression of RKIP were decreased in the ethanol-treated primary acinar cells; however, these were both significantly increased in the EGCG-pretreated cells. In addition, when EGCG was treated, expression of Reg1 was markedly increased compared with that of the control or the ethanol-treated primary acinar cells, demonstrating that EGCG can modulate pancreatic regenerating related genes. Therefore, our findings suggest that EGCG may have therapeutic utility in the prevention or treatment of alcohol-associated pancreatitis.

Key words : EGCG, acinar cell, pancreatitis, pancreatic enzymes, regenerating genes

서 론

췌장염 유발은 알코올 섭취(≥ 2.5 drinks/day), 흡연 및 노화 등과 같은 다양한 요인에의 지속적인 노출뿐만 아니라, 스트레스, 비만(BMI ≥ 30 kg/m²) 등과 연관되어 췌장 조직이 섬유화되면서 만성췌장염으로 발전하여 제2형 당뇨병 및 췌장암 발병의 중요한 원인이 될 수 있다[9, 16]. 알코올과 그 대사체가 췌장을 구성하는 모든 세포에 다양한 영향을 미쳐 췌장선포세포(acinar cell)의 민감화를 유도하며, 그에 따른 세포내 칼슘 항상성의 부조, 세포 내 미숙 zymogen의 활성화 및 분비 촉진 등은 급성 췌장염 초기 발병 원인으로 알려져 왔다[2, 6, 17]. 그리고 몇몇 선행연구에서 알코올의 선포세포 내 독성 작용에는 Raf-1 kinase inhibitory protein (RKIP) 발현 변화가

관련이 있음이 보고된 바 있고[4], 다수의 연구자들이 췌장선포세포의 분화, 보호 및 재생에 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 활성화와 Regenerating gene 1 (Reg1) 유전자 발현이 중요하다는 보고를 하였다[11, 12, 14]. 녹차의 폴리페놀성 항산화 물질인 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 항암, 항혈전, 항산화 및 항염증 작용 등의 다양한 약리적 성분을 가진 것으로 보고되고 있다[5, 7, 13]. 본 연구자들의 선행연구에서는 EGCG는 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 신호전달계를 통하여 췌장선포세포의 분화지표인 Neg3와 내분비 기능 지표인 α -amylase 및 insulin의 발현을 조절하였음을 보고한 바 있다[3]. 따라서 본 연구에서는 이에 대한 추가적인 연구의 일환으로 *in vitro* 모델이 아닌 마우스 췌장의 선포세포(primary acinar cell)에서 에탄올에 의해 유도되는 염증성 손상 모델에서 천연생리활성 물질인 EGCG의 췌장 분비 효소의 조절 및 선포세포 기능 회복 관련 마크로 알려진 유전자들, 즉 AMPK, RKIP 및 Reg1의 발현 조절에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

마우스 췌장에서 선포세포의 분리 및 배양

마우스 췌장의 선포세포 분리는 일부 수정된 효소분해 방법 [4]을 사용하였는데, 먼저 마우스 췌장 2~3개를 적출하여 생리 식염수로 세척하고 세포분리용 용액[phosphate-buffered saline with Ca^{2+} and Mg^{2+} (pH 7.4), 0.1% bovine serum albumin (BSA, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), 0.01% soybean trypsin inhibitor (GIBCO-BRL)]에서 가위로 잘게 자른 후, 0.3 mg/ml collagenase type IV (Sigma-Adrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 포함하는 분리완충용액을 넣고 15분간 파이펫으로 효소분해 한 조직을 현탁 시킨 후, 차가운 분리완충용액을 가하여 원심분리하여 세포 세척하였다. 이를 멸균된 스텐레스 스틸 체에서 여과하고 원심분리하여 상층액을 제거하여 깨끗한 마우스 췌장 선포세포를 분리하였다. 분리된 선포세포에 Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM, 10% bovine serum (FBS, GIBCO-BRL), 1% antibiotic/antimycotic, 1% soybean trypsin inhibitor (FBS, GIBCO-BRL)]를 넣고 현탁하여 laminin으로 코팅된 세포배양 plate에 세포 실험에 따른 적절한 세포 수를 각각 seeding하여 95% 습도, 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였으며 분리 후 24시간 내에 실험에 사용하였다. 분리된 세포는 trypan blue염색을 통해 세포생존율이 95% 이상인 세포를 본 실험에 사용하였다.

세포독성측정

세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma-Adrich) colorimetric assay를 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 마우스 췌장에서 분리된 선포세포를 96 well plate에 1×10^5 /well가 되도록 분주하여 세포를 안정화시킨 후 에탄올 및 EGCG (Sigma-Adrich)를 적정 농도별로 희석하여 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후, 5 mg/ml MTT를 20 μl 씩 가한 후 4시간 동안 배양하였다. MTT가 들어있는 배지를 제거한 후 150 μl DMSO를 가하고 30분간 반응시켜 세포 내 formazan crystal을 용해시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Chymotrypsin 활성 측정

마우스 췌장 선포세포에서의 chymotrypsin 활성 측정은 선행연구 방법[8]과 동일한 방법으로 측정하였다. 즉, 분리된 췌장 선포세포에 1 μM 의 EGCG를 1시간 전처리하고 100 mM의 에탄올을 10분간 처리한 후 세포를 균질화하고, 원심분리로 얻은 상층액 20 μl 에 70 μl 효소측정용 용액(50 mm Tris, pH 8.1, 150 mm NaCl, 1 mm CaCl_2 및 0.01% BSA)과 10 μl 형광기질(EMD Chemicals Inc., NJ, USA)을 가하여 440 nm에서 15분간격으로 60분까지 반응시켜 효소기질 분해를 Gemini XPS

Fluorescence Microplate Reader (Molecular Devices)를 사용하여 측정하였다. 각 시료 값은 총 단백질량으로 환산하여 계산하였다.

α -amylase 활성 측정

마우스 췌장 선포세포에서 α -amylase 활성은 준비된 세포를 모아 균질화하고 원심분리하여 그 상층액에서 α -amylase 활성 측정용 kit (Phadebas kit, Magle Life Sciences, Sweden)를 사용하여 흡광도 540 nm에서 효소활성을 측정하였다

단백질 발현 분석

준비된 세포에 lysis RIPA buffer를 첨가하여 균질화시켜 4°C에서 30분간 반응시킨 후 원심 분리하여 그 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량하여 단백질 시료를 만든 후 전기영동을 하였다. 분리된 단백질을 함유한 gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 상온에서 5% (w/v) nonfat dry milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS)에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 TBS-T로 15분 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체(pAMPK, AMPK 및 RKIP, Santa Cruz, CA, USA; Reg1, R & D Systems, MN, USA; β -actin, Sigma-Aldrich)를 각각 처리하여 상온에서 1시간 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life ScienceCorp. Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

통계처리

통계처리(Student's t-test)는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 실시하여 대조군에 대한 유의성을 검정하였다. 본 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 에탄올이 처리된 마우스 췌장 선포세포에서 α -amylase와 chymotrypsin의 활성 및 세포 재생관련 유전자 발현 조절에 미치는 EGCG의 영향을 조사하였다. 이를 위한 실험 조건의 설정을 위하여 다양한 농도의 에탄올과 EGCG 처리에 따른 세포독성 여부를 조사한 후, 세포독성을 보이지 않았던 범위의 에탄올(100 mM)과 EGCG (1 μM) 농도를 선정하였다(Fig. 1)

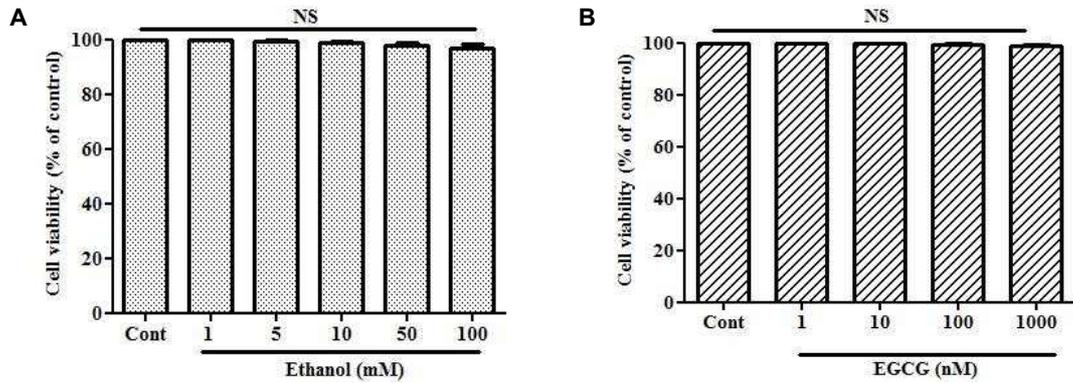


Fig. 1. Effects of ethanol and EGCG on cell viability of primary acinar cells isolated from mice pancreas. Cells were seeded onto 96-well plates and treated with the indicated concentrations of ethanol (A) and EGCG (B). After 24 h, the cell viability was assessed using MTT reduction assay. The values are expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments (NS, not significant).

에탄올 처리 췌장 선포세포에서 α -amylase와 chymotrypsin 활성에 미치는 EGCG의 영향

녹차의 생리활성 성분인 EGCG의 췌장효소 분비조절에 대한 영향을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 즉, 대조군 세포에 비해 에탄올이 단독 처리된 세포에서 α -amylase와 chymotrypsin 활성의 유의적 증가를 보여 에탄올의 선포세포 자극 유도를 확인하였으며, EGCG 처리 시 그 활성들이 유의적 감소하였다. 따라서 이러한 결과는 항산화물질인 EGCG가 에탄올 처리로 유발된 염증성 손상 마우스 췌장 선포세포에서 췌장자극과 미성숙 소화효소의 과분비를 억제할 수 있음을 보여주는 것이다. 과도한 알코올 섭취가 췌장 선포세포의 약화와 섬유화 초래로 진행성 괴사염증질환인 급만성 췌장염을 유발하여 췌장 선포세포를 자극하여 췌장효소인 α -amylase와 chymotrypsin 분비자극으로 세포의 파괴와 췌장 조직의 자가소화를 일으킨다는 점[9, 15]에서 EGCG는 알코올성 췌장염 치료와 예방에 효과적으로 이용 할 수 있을 것으로 사료된다.

에탄올 처리 췌장 선포세포에서 세포 재생관련 유전자 조절에 미치는 EGCG의 영향

EGCG가 에탄올 처리로 유발된 염증성 손상 췌장 선포세포에서 췌장자극과 미성숙 소화효소의 과분비 억제 결과와 연관된 유전자들의 발현 변화를 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 세포의 생존과 보호를 위한 에너지 이용의 스위치 역할을 하는 AMPK [12]는 에탄올 단독 처리 시 그 발현이 유의적으로 감소하였으며, EGCG 처리 세포에서는 그 발현수준이 유의적으로 증가하여, EGCG가 알코올 손상에 대한 췌장 선포세포의 보호 역할을 할 수 있을 가능성을 보여주었다. 그리고 세포 사멸과 세포독성과 연관이 있는 RKIP [4] 또한 그 발현 경향이 유사하였다. 부가적으로 췌장 선포세포의 분화와 관련하여 베타세포 재생에 관여하는 Reg1의 발현은 정상세포에서는 발현이 되지 않지만 염증성 손상 회복 과정에서 그 발현이 증가한다는 보고[1]와 동일하게 에탄올이 처리된 췌장자극 선포세포에 EGCG를 동시에 처리할 경우 그 발현 양이 유의적으로 증가하여 EGCG가 췌장의 염증성 손상이나 당뇨병 회복에

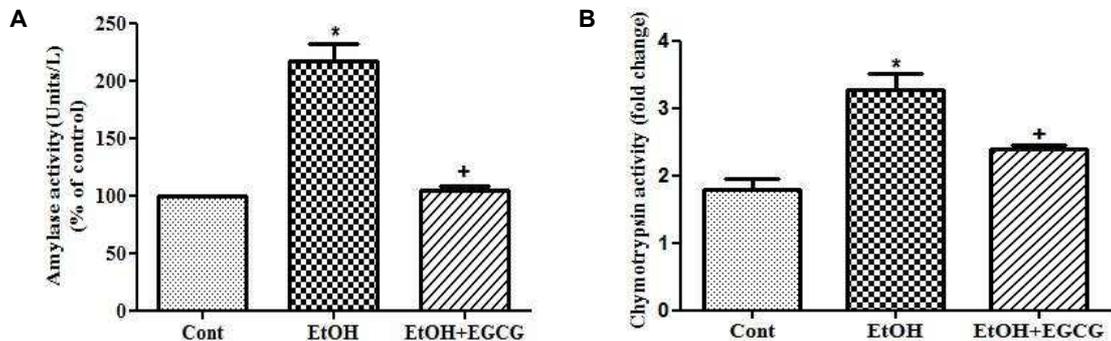


Fig. 2. Effects of EGCG on activities of pancreatic enzymes in EtOH-injured mice pancreas acinar cells. The cells were pretreated with 1 μ M EGCG for 1 h, followed by the addition of 100 mM ethanol (EtOH) and incubated for 10 min, and then the activities of α -amylase (A) and chymotrypsin (B) were measured. Data represent the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (* p <0.05, control vs EtOH; + p <0.05, EtOH vs EtOH + EGCG).

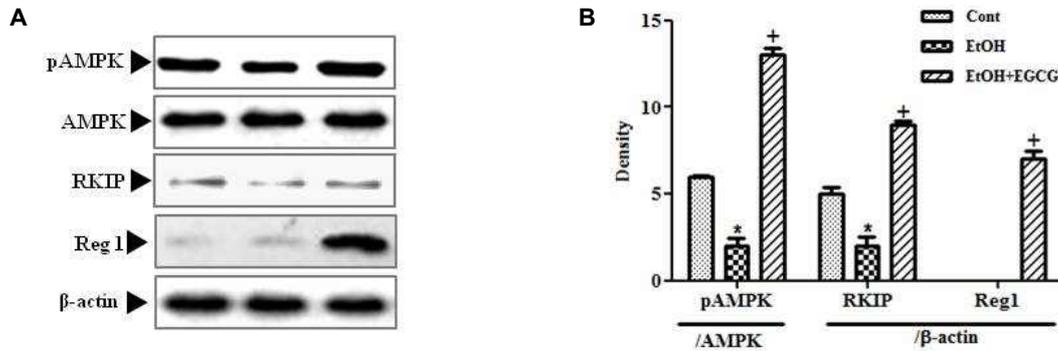


Fig. 3. Effects of EGCG on expressions of regenerating related proteins, AMPK, RKIP and Reg1, in EtOH-injured mice pancreas acinar cells. The cells were pretreated with 1 μ M EGCG for 1 h, followed by the addition of 100 mM ethanol (EtOH) and incubated for 24 h. (A) Total proteins were isolated and subjected to SDS-polyacrylamide gels, followed by Western blotting using the indicated antibodies and an ECL detection system. β -actin was used as an internal control. (B) Densitometry was performed using L Process and Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm), and represent the average densitometric analyses as compared with AMPK or β -actin. Data represent the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (* p <0.05, control vs EtOH; + p <0.05, EtOH vs EtOH + EGCG).

효과적일 것이라 사료된다.

이상에서 관찰된 결과는 EGCG가 알코올에 의하여 유도되는 췌장의 선포세포 염증성 손상의 예방 및 치료에 유의적인 효과가 있을 것임을 보여주는 결과로서, 췌장염 예방과 치료를 위한 EGCG 및 그 유도체의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 및 한국산업기술평가관리원의 향노화 산업 제품화 기술개발사업의 일환으로 수행하였음(10040391, 노화성 근기능 저하 방지를 위한 기능성식품소재 및 기기 개발).

References

- Bluth, M., Mueller, C. M., Pierre, J., Callender, G., Kandil, E., Viterbo, D., Fu, S. L., Sugawara, A., Okamoto, H. and Zenilman, M. E. 2008. Pancreatic regenerating protein I in chronic pancreatitis and aging: implications for new therapeutic approaches to diabetes. *Pancreas* **37**, 386-395.
- Criddle, D. N., Sutton, R. and Petersen, O. H. 2006. Role of Ca^{2+} in pancreatic cell death induced by alcohol metabolites. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, S14-S17.
- Kim, S. O. and Choe, W. K. 2011. Effect of EGCG on expression of neurogenin 3 via the MAP kinase signaling pathway in AR42J cells, a rat pancreatic tumor cell line. *Korean J Nutr* **44**, 196-202.
- Kim, S. O., Ives, K. L., Wang, X., Davey, R. A., Chao, C. and Hellmich, M. R. 2012. Raf-1 kinase inhibitory protein (RKIP) mediates ethanol-induced sensitization of secretagogue signaling in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **287**, 33377-33388.
- Kürbitz, C., Heise, D., Redmer, T., Goumas, F., Arlt, A., Lemke, J., Rimbach, G., Kalthoff, H. and Trauzold, A. 2011. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Sci* **102**, 728-734.
- González, A., Pariente, J. A. and Salido, G. M. 2008. Ethanol impairs calcium homeostasis following CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol* **42**, 565-573.
- Larsen, C. A., Dashwood, R. H. and Bisson, W. H. 2010. Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: mechanistic insights and human relevance. *Pharmacol Res* **262**, 457-464.
- Lu, Z., Kolodecik, T. R., Karne, S., Nyce, M. and Gorelick, F. 2003. Effect of ligands that increase cAMP on cerulein-induced zymogen activation in pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G822-828.
- Papachristou, G. I., Papachristou, D. J., Morinville, V. D., Slivka, A. and Whitcomb, D. C. 2006. Chronic alcohol consumption is a major risk factor for pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* **101**, 2605-2610.
- Paterniti, I., Mazzon, E., Riccardi, L., Galuppo, M., Impellizzeri, D., Esposito, E., Bramanti, P., Cappellani, A. and Cuzzocrea, S. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. *Surgery* **152**, 90-106.
- Sanchez, D., Mueller, C. M. and Zenilman, M. E. 2009. Pancreatic regenerating gene I and acinar cell differentiation: influence on cellular lineage. *Pancreas* **38**, 572-577.
- Shugrue, C. A., Alexandre, M., de Villalvilla, A. D., Kolodecik, T. R., Young, L. H., Gorelick, F. S. and Thrower, E. C. 2012. Cerulein hyperstimulation decreases AMP-activated protein kinase levels at the site of maximal zymogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**, G723-732.

13. Singh, R., Akhtar, N. and Haqqi, T. M. 2010. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci* **86**, 907-918.
14. Soltoff, S. P. and Hedden, L. 2008. Regulation of ERK1/2 by ouabain and Na-K-ATPase-dependent energy utilization and AMPK activation in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C590-599.
15. Steinberg, W. and Tenner, S. 1994. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* **330**, 1198-1210.
16. Yadav, D. and Whitcomb, D. C. 2010. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 131-145.
17. Zhou, W., Shen, F., Miller, J. E., Han, Q. and Olson, M. S. 1996. Evidence for altered cellular calcium in the pathogenic mechanism of acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* **60**, 147-155.

초록 : 에탄올에 의하여 유도된 마우스 췌장 선포세포의 염증성 손상에서 췌장분비 효소의 활성 및 세포 재생관련 유전자들의 발현에 미치는 EGCG의 영향

김성욱¹ · 최영현^{2*}

(¹대우한대학교 BK21 Plus Team, 한의과대학 본초약리학교실, ²동의대학교 한의과대학 생화학 교실, 항노화연구소 및 블루마이크로소재개발센터)

본 연구에서는 마우스 췌장의 선포세포(primary acinar cell)에서 에탄올에 의해 유도된 염증성 손상에 미치는 녹차의 생리활성 물질인 EGCG의 효과를 췌장분비 효소의 활성과 선포세포에서의 기능 회복 관련 마크로 알려진 유전자들(AMPK, RKIP 및 Reg1)의 발현 조절 측면에서 조사하였다. 대조군에 비해 에탄올이 처리된 세포에서는 α -amylase와 chymotrypsin의 활성이 증가되었지만, EGCG 처리에 의하여 그들 활성이 유의적으로 감소하였다. 세포 생존 및 보호와 관련 있는 AMPK 인산화 수준은 에탄올 단독 처리시 그 발현이 감소하였지만, EGCG 처리에 의하여 유의적으로 회복되었다. 세포 사멸과 세포독성 조절과 연관이 있는 RKIP 또한 그 발현 경향이 AMPK인산화 변화의 정도와 유사하였다. 또한 베타세포 재생에 관여하는 Reg1 발현은 에탄올이 처리된 선포세포에 EGCG를 처리하였을 경우 그 발현량이 유의적으로 증가하였다. 이상의 결과들을 종합하여, 항산화성 폴리페놀인 EGCG는 알코올성 췌장염으로 인한 세포의 손상이나 당뇨병 예방과 회복에 치료적 효과를 가질 수 있다고 제안한다.