

정맥주입한 알콜이 혼쥐의 췌장 외분비에 미치는 영향

심상수[#] · 김창종

중앙대학교 약학대학

(Received April 4, 2002; Revised May 8, 2002)

Effects of Intravenous Infusion of Ethanol on Exocrine Pancreatic Secretion of Rats

Sang Soo Sim[#] and Chang Jong Kim

Division of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University

Abstract — To investigate the effect of intravenous ethanol administration on pancreatic exocrine secretion, we measured volume and protein amount in pancreatic juice and assayed amylase activity and phospholipase A₂ activity in pancreatic fragments and serum. Acute pancreatitis induced by obstruction of common bile-pancreatic duct (CBPD) and caerulein infusion (5 µg/kg/hr) showed typical characteristics, such as hyperamylasemia and pancreatic edema and increase of phospholipase A₂ activity in pancreatic fragments and serum. Intravenous ethanol infusion (50 mg/kg/hr) significantly stimulated pancreatic exocrine secretion, but such a stimulatory effect of ethanol disappeared at dose of 100 mg/kg/hr without typical symptoms of acute pancreatitis. In microscopic examination, there were no typical changes of edematous pancreatitis in ethanol administered rats. These results suggest that acute ethanol administration has dual effect on exocrine pancreatic secretion: low dose of ethanol (50 mg/kg/hr) stimulates pancreatic exocrine secretion, whereas high dose of ethanol (100 mg/kg/hr) does not without typical changes of edematous pancreatitis.

Keywords □ Amylase, phospholipase A₂, pancreatic exocrine secretion, ethanol, pancreatitis

췌장염과 만성적인 알콜 섭취는 임상적으로 연관성이 있다는 결과는 잘 알려진 사실이다.¹⁻³⁾ 이러한 알콜의 병인적 중요성에도 불구하고 발병기전은 잘 모르는 상태이다. 분리한 췌장조직에 직접 알콜을 투여시 췌장 외분비를 증가시키지만, cholecystokinin-8, secretin이나 vasoactive intestinal polypeptide으로 자극한 췌장 외분비는 억제한다는 보고가 있다.^{4,5)} 이러한 알콜의 직접적인 작용에는 췌장 외분비에 있어 세포내 Ca²⁺ 이동과 밀접한 관계가 있다고 한다.⁵⁾

비록 췌장염이 발병하는 요인은 매우 다양하지만 담석증과 만성적인 알콜 섭취가 주된 요인으로 지목되고 있다. 사람과 쥐에서 장기간 알콜 투여는 췌장과 간에서 형태학적 변화를 일으킨다는 보고가 있다.⁶⁻⁹⁾ 급성췌장염의 전형적인 특징은 췌장의 부종과 혈청내 amylase 활성의 증가, 조직의 vacuolization이 잘 알려져 있다.^{10,11)}

이러한 급성췌장염의 질병 치료를 위해 실험적으로 급성췌장

염을 유도하는 실험 모델이 여러 연구자들에 의해 이미 보고되었다. 췌장관을 폐쇄하는 방법으로써 총담췌관의 결찰(common bile-pancreatic duct(CBPD) ligation)과 췌장의 외분비를 촉진하는 호르몬의 과량 투여 및 choline-deficient 식이요법을 통해 급성췌장염을 유발시킬수 있다.^{10,12,13)} 이러한 실험 모델에서 급성 췌장염의 전형적인 특징인 췌장의 부종과 혈청내 amylase 활성의 증자가 나타나고 있다. 그러나 급성 췌장염도 일종의 염증으로서 췌장 조직과 혈청내에서 염증시 증가하는 phospholipase A₂의 활성에 대한 보고는 없는 상태이다. 이 논문에서는 정맥 주입한 알콜이 췌장 외분비에 미치는 영향을 관찰하고 실험적으로 유발한 췌장염의 특징과 비교하였다.

실험방법

재료

Bovine serum albumin과 Tris 및 HEPES는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 absolute ethanol은 Merck(Germany)에서, 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine(β-py-C10-HPC)는 Molecular Probes

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-821-7680
(E-mail) simss@cau.ac.kr

(Oregon, USA)에서 amylase assay kit는 신양제약(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

총담관 결찰 및 caerulein과 알콜 정맥주사

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(몸무게 250~300 g)를 무작위로 6마리씩 나누어 실험을 수행하였다. 총담췌관 결찰은 실험 3일 전에 가벼운 ether 마취하에 복부를 절개한 후 십이지장으로 들어가는 췌장관을 이중 결찰하였다.¹⁴⁾ 다시 복부를 봉합한 후 kanamycin을 주사하고 3일 후에 실험에 사용하였다. caerulein을 정맥주사한 실험군은 20% urethane(0.2 g/kg) 마취하에 고정 맥(jugular vein)에 polyethylene tube를 삽입하고 infusion pump를 이용하여 시간당 0.5 µg/kg를 0.51 ml/hr 속도로 주입하였다. 알콜도 마찬가지로 0.51 ml/hr 속도로 주입하였다. 췌장 외분비 측정은 복강을 개복하고 담관과 췌장 도관에 polyethylene tube(PE-10, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA)를 삽입한 후 30분이 지난 후부터 매시간마다 4시간 동안 췌장액을 수집하였다. 모든 실험이 끝난 후 췌장 조직과 혈청을 분리하여 amylase 정량과 phospholipase A₂ 정량을 위하여 -80°C에 보관하였다.

정 량

Phospholipase A₂ 활성은 형광분석을 이용하여 측정하였다.¹⁵⁾ 시료 10 µl를 취한 후 200 µl의 기질 용액(0.1 M Tris/HCl buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 mM CaCl₂, 2 µM β-py-C10-HPC and 0.1% bovine serum albumin)을 가하고 10분간 실온에 쟁반한 후 FL 600 형광측정기를 이용하여 형광(excitation: 345 nm; emission: 345 nm)을 측정하였다. Alpha-amylase 활성은 Caraway 방법¹⁶⁾에 따라 수용성 starch를 기질로 측정하였다. 단백 정량은 bicinchoninic acid(BCA) 방법¹⁷⁾을 이용하여 정량하였으며, 췌장 부종 측정은 조직에 함유된 물의 양으로 계산하였다. 조직에 학유된 물은 물을 함유한 조직의 무게(wet weight)와 150°C에서 36시간 동안 건조한 무게(dry weight)의 차를 이용하여 %로 표기하였다. 조직검사를 위하여 95% ethanol-saturated picric acid/formalin/acetic acid(85 : 15 : 5) 용액에 48시간 동안 고정시킨 후 통상조직표본을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 맹검 검사를 통하여 조직의 변화를 0에서부터 4+ 까지 등급화 하였다.

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

췌장외분비에 미치는 영향 – 정상 대조군에서 췌장액 분비는

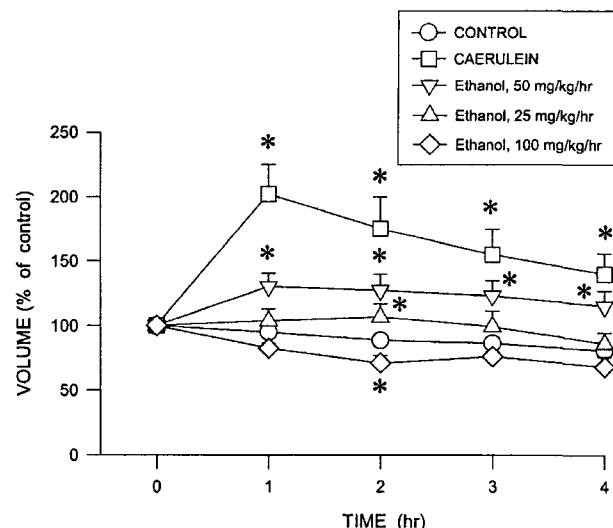


Fig. 1 – The effect of intravenous ethanol infusion on pancreatic juice secretion. Rats were infused into jugular vein with saline (CONTROL), caerulein (5 µg/kg/hr) or ethanol (25, 50, 100 mg/kg/hr). Pancreatic juice was collected every 1 hr for 4 hrs. Results indicate mean ± SD from five experiments. *P<0.05 significantly different from control.

25.4±2.3 µl/hr였다. 정맥을 통한 알콜 주입에서 25 mg/kg/hr를 주입한 후 2시간에서 유의한 증가를 보였으며, 50 mg/kg/hr를 주입한 군은 대조군에 비하여 모든 시간대에서 유의하게 췌장액 분비를 증가시켰다. 그러나 100 mg/kg/hr를 주입한 실험군은 오히려 대조군보다 췌장액 분비를 감소시키는 양상을 보였으며 주입한 2시간 대에는 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 1). cholecystokinin 유도체인 caerulein(5 µg/kg/hr)은 췌장 외분비를 강력하게 증가시켰다. 그러나 시간이 지남에 따라 췌장 외분비는 점차 감소되는 경향을 나타내었다.

췌장액내의 단백질은 주로 소화 효소로 구성된 물질이다. 췌장액 분비와 마찬가지로 췌장액 내에 단백질 방출량의 변화도 같은 양상을 보이고 있다(Fig. 2). caerulein(5 µg/kg/hr)은 주입 후 1시간 동안 최대 단백질 방출을 나타내고 이후 점차 감소하는 양상을 보였다. 알콜은 25와 50 mg/kg/hr에서 단백질의 방출을 증가시켰지만 100 mg/kg/hr에서는 대조군과 유사한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 췌장액 분비나 단백질 방출에 있어 알콜이 이중 효과를 나타내고 있음을 보여준다. 이러한 기전은 명확히 설명할 수 있지만 위 운동에 있어서 이러한 결과가 보고되고 있는데¹⁸⁻²¹⁾ 위운동과 마찬가지로 췌장 외분비도 자율신경계의 신경지배를 받고 있는 것으로서 고농도의 알콜은 자율신경계의 작용을 억제하는 것으로 생각할 수 있다.

췌장 조직에 미치는 영향 – 4시간 동안 알콜 주입이 끝난 후 췌장 조직을 채취하고 조직의 부종 정도를 알기 위하여 조직내 물의 학유량을 측정하였다. 정상 췌장 조직내에 학유된 물의 양은 73.6% 정도로 나타났으나 총담췌관 결찰(common bile-

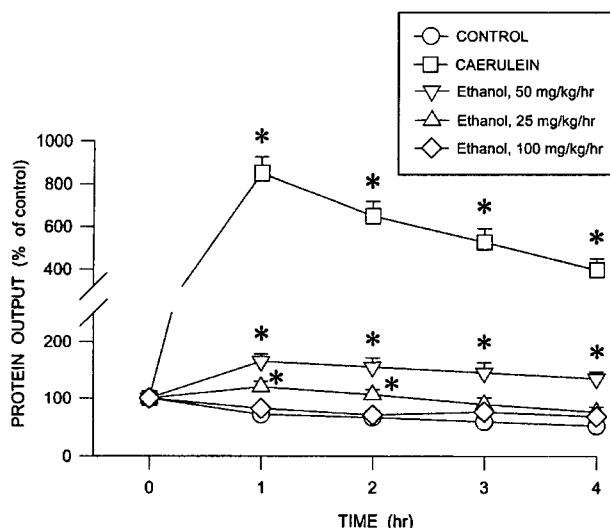


Fig. 2 – The effect of intravenous ethanol infusion on secretion of protein output in pancreatic juice. Rats were infused into jugular vein with saline (CONTROL), caerulein (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$) or ethanol (25, 50, 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$). Pancreatic juice was collected every 1 hr for 4 hrs. Results indicate mean \pm SD from five experiments.

* $P<0.05$ significantly different from control.

pancreatic duct ligation, CBPD)에 의한 급성 췌장염시 물의 함유량이 83.5%로 증가하였다. 또한 췌장 외분비를 촉진하는 호르몬인 caerulein을 4시간 정맥 주입한 실험군에서도 췌장 조직내 물의 함유량이 81.8%로 유의하게 증가하였다(Fig. 3A). 이러한 결과는 opossums에서 총담관 결찰이나 caerulein 주입이 심한 급성 췌장염을 야기 시킨 결과와 잘 일치하고 있다.¹²⁾ 또한 caerulein을 주입한 흰쥐에서도 조직내 물의 함유량이 유의하게 증가하였다는 보고와 일치하고 있다. 이 실험에서 총담관 결찰이나 caerulein의 자극이 흰쥐에서도 급성 췌장염의 전형적 증상인 췌장의 부종을 일으키는 것으로 미루어 볼 때 급성 췌장염을 유발시켰다고 제시할수 있다.

총담췌관 결찰이나 caerulein의 정맥 주입이 췌장염을 야기시키는지를 확인하기 위하여 췌장 조직내의 phospholipase A₂ (PLA₂)의 활성을 측정하였다. 정상 조직내에서 PLA₂ 활성은 $6.6 \pm 1.0 \text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 이었으나, 총담췌관 결찰군에서는 $15.9 \pm 1.9 \text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 로 유의하게 증가하였으며, caerulein을 정맥 주입한 군에서도 $11.0 \pm 1.0 \text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 로 유의하게 증가하였다(Fig. 3B). 이러한 결과로 미루어 볼 때 급성 췌장염시 조직내 PLA₂ 활성도 증가됨을 알 수 있으며 췌장염 지표로서 PLA₂ 활성의 변화도 이용될 수 있음을 시사하여 준다. 그러나 알콜을 25-100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 용량으로 정맥 주입하였을 때 췌장 조직은 부종이나 조직내 PLA₂의 변화에 있어서 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이 결과로 미루어 볼 때 일시적인 알콜의 섭취는 혈청내 췌장염 진단 인자의 변화를 일으키지 않는 것으로 사료된다.

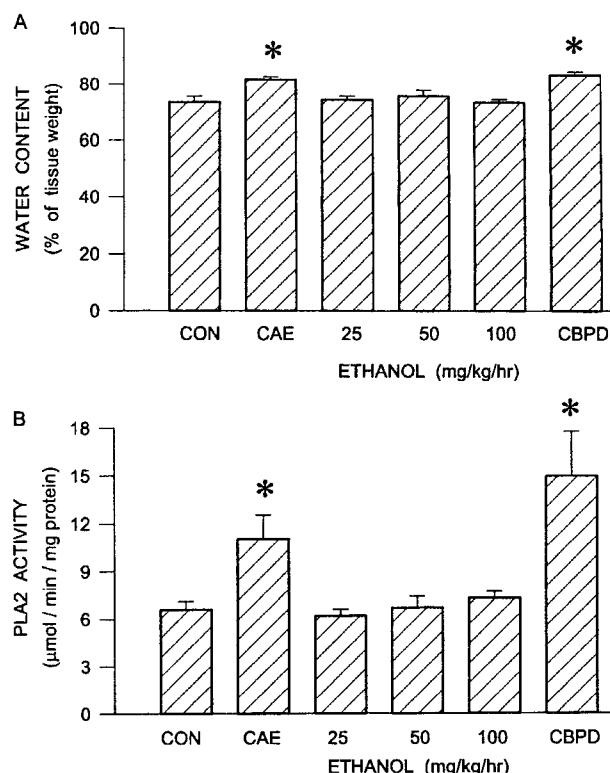


Fig. 3 – The changes of water content (A) and phospholipase A₂ (PLA₂) activity (B) in pancreatic fragments of intravenous ethanol administered rats and common bile-pancreatic duct (CBPD)-ligated rats. Rats were infused into jugular vein with saline (CON), caerulein (CAE, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$) or ethanol (25, 50, 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$). Results indicate mean \pm SD from five experiments.

* $P<0.05$ significantly different from saline.

는 것으로 생각된다.

혈청 amylase와 PLA₂ 활성에 미치는 영향 – 총담췌관 결찰군과 caerulein 정맥 주입한 군에서 혈청내 amylase의 활성 및 PLA₂의 활성은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 caerulein을 정맥 주입한 쥐에서 혈청내 amylase 활성이 4배 증가하였으며 췌장 조직의 부종도 유의하게 증가하였다는 보고와 잘 일치하고 있다.²²⁾ 그러나 총담췌관 결찰군에서의 amylase 및 PLA₂의 활성 증가는 caerulein을 정맥 주입한 군보다 더 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 총담췌관의 폐쇄가 췌장의 외분비를 자극하는 호르몬에 의한 급성췌장염보다 더 심한 급성 췌장염을 유발시킨다는 것을 제시할 수 있다. 그러나 알콜을 25-100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 용량으로 정맥 주입하였을 때 혈청 내 amylase의 활성 및 PLA₂의 활성변화에 있어서 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 일시적인 알콜의 섭취는 혈청내 췌장염 진단 인자의 변화를 일으키지 않는 것으로 사료된다.

조직 검사 – 총담췌관 결찰군과 caerulein 정맥 주입한 군은 염

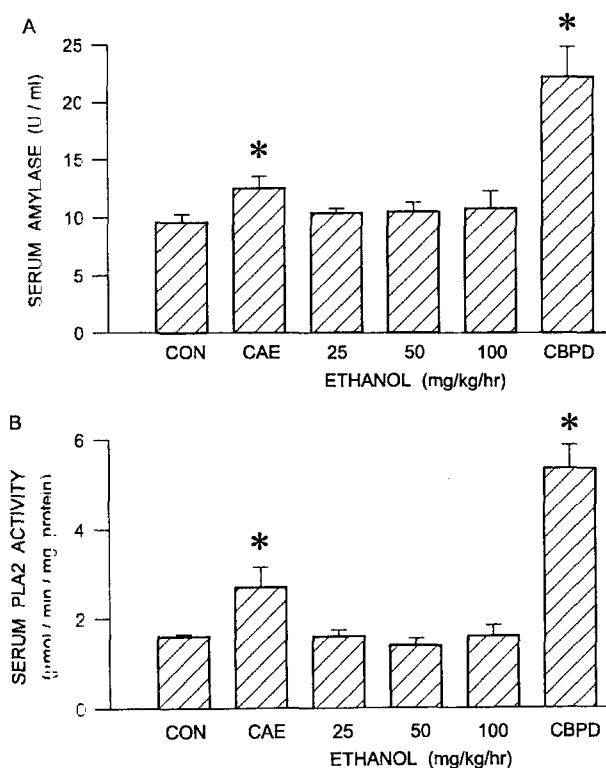


Fig. 4 - The changes of amylase activity (A) and phospholipase A₂ (PLA₂) activity (B) in serum of intravenous ethanol administered rats and common bile-pancreatic duct (CBPD)-ligated rats. Rats were infused into jugular vein with saline (CON), caerulein (CAE, 5 µg/kg/hr) or ethanol (25, 50, 100 mg/kg/hr). Results indicate mean ± SD from five experiments. *P<0.05 significantly different from saline.

Table I - Microscopic changes

Groups	Edema	Inflammatory Cell Infiltrate	Vacuolization
Control	0	0	0
Ethanol	0	0	0
Caerulein	3+	2+	2+
CBPD	4+	3+	4+

Specimen was pancreatic fragment of common bile-pancreatic duct (CBPD)-ligated rats and pancreatic tissue infused into jugular vein with saline (control), ethanol (50 mg/kg/hr) or caerulein (5 µg/kg hr). Morphologic changes were graded on a 0-4+ scale by a blinded observer.

증세로 침윤이나 선포세포의 vacuolization이 명확하게 나타났으나 알콜을 정맥 주입한 군에서는 이렇다 할 췌장염 증상이 나타나지 않았다(Table I).

결 론

흰쥐의 고정맥에 알콜을 주입군에서 50 mg/kg/hr 용량에서 췌장 외분비를 유의하게 증가시켰으나 100 mg/kg/hr로 용량을 증

가하였을 때는 췌장 외분비의 증가 효과는 감소되었다. 한편 총 담췌관 결찰과 caerulein의 정맥 주입은 대조군에 비하여 췌장조직의 부종과 PLA₂ 활성 증가를 일으켰으며, 혈청내 amylase 활성과 PLA₂ 활성의 증가를 유의하게 유발하였다. 이러한 증가는 급성 췌장염의 전형적인 증상으로서 실험적인 급성췌장염 모델로 이용할 수 있는 것을 확인하였다. 그러나 알콜을 주입한 실험군에서 췌장염을 나타내는 여러 가지 parameter들의 변화는 조직과 혈청내에서 나타나지 않았다. 이들의 결과로 미루어 볼 때 50 mg/kg/hr 까지의 저용량 알콜의 주입은 췌장 외분비를 증가시키지만 고용량(100 mg/kg/hr)의 알콜은 췌장 외분비의 항진효과가 사라지며 오히려 췌장 외분비 기능을 억제 할 수 있는 가능성을 보이고 있다. 그러므로 적당량의 알콜 섭취는 췌장 기능의 항진을 일으키지만 과량의 알콜 섭취는 오히려 췌장 외분비 기능을 약화시킬 것으로 사료되며, 단기간의 알콜 섭취는 췌장염을 일으키는 인자의 변화가 없는 것으로 보아 급성췌장염을 야기 시키지는 않는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2001학년도 중앙대학교 학술연구비 지원과 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로그램에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Albo, R., Silen, W. and Goldman, L. : A critical clinical analysis of acute pancreatitis. *Arch. Surg.* **86**, 1032 (1983).
- 2) Durbec, J. P. and Sarles, H. : Multicenter survey of the etiology of pancreatic disease. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. *Digestion* **18**, 337 (1978).
- 3) Kager, L., Lindberg, S. and Agren, G. : Alcohol consumption and acute pancreatitis in men. *Scand. J. Gastroenterol.* **7**, 1 (1972).
- 4) Nakamura, T., Okabayashi, Y., Fujii, M., Tani, S., Fusisawa, T. and Otsuki, M. : Effect of ethanol on pancreatic exocrine secretion in rats. *Pancreas* **6**, 571 (1991).
- 5) Tachibana, I., Okabayashi, Y., Toshiharu, A., Koide, M., Matsushita, K. and Otsuki, M. : Ethanol inhibits CCK-induced enzyme secretion by affecting calcium-pump activity in isolated rat pancreatic acini. *Pancreas* **13**, 316 (1996).
- 6) Darle, N., Ekholm, R. and Edlund, Y. : Ultrastructure of the rat exocrine pancreas after long term intake of ethanol. *Gastroenterology* **58**, 62 (1970).
- 7) Huttunen, R., Huttunen, P. and Jalovaara, P. : The effect of chronic intragastric alcohol ingestion on the pancreatic

- secretion of the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* **11**, 103 (1976).
- 8) Matsono, S., Kano, K., Miyagawa, K., Yamauchi, H. and Sato, T. : Effects of long term intravenous administration of ethanol on rat pancreas. *Tohoku J. Exp. Med.* **141**, 77 (1983).
- 9) Noronha, M., Salgadinho, A., Ferreira De Almeida, M.J., Dreiling, D. A. and Bordalo, O. : Alcohol and the pancreas. I. Clinical associations and histopathology of minimal pancreatic inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* **76**, 114 (1981).
- 10) Lampel, M. and Kern, H. F. : Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histol.* **373**, 97 (1977).
- 11) Watanabe, O., Baccino, F. M., Steer, M. L. 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 (1984).
- 12) Kaiser, A. M., Saluja, A. K., Sengupta, A., Saluja, M. and Steer, M. L. : Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am. J. Physiol.* **269**, C1295 (1995).
- 13) Lombardi, B., Estes, L. W. and Longnecker, D. S. : Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am. J. Pathol.* **79**, 465 (1975).
- 14) Ohshio, G., Saluja, A. and Steer, M. L. : Effects of short-term pancreatic duct obstruction in rats. *Gastroenterology* **100**, 196 (1991).
- 15) Radvanyi, F., Jordan, L., Russo-Marie, F. and Bon, C. : A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* **177**, 103 (1989).
- 16) Flick, A. L., Bark, C. J. and Harrell, J. H. : Serum amylase values by the Caraway method in hospitalized patients and normal controls. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**, 458 (1970).
- 17) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K. and Gartner, F. H. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
- 18) Sanders, K. M. and Bauer, A. J. : Ethyl alcohol interferes with excitation-contraction mechanisms of canine antral muscle. *Am. J. Physiol.* **242**, G222 (1982).
- 19) Sanders, K. M. and Berry, R. G. : Effects of ethyl alcohol on phasic and tonic contractions of the proximal stomach. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **235**, 858 (1985).
- 20) Werber, A. H., Morgan, R. A., Zhou, P. and Yang, C. : Intracellular mechanism of constriction of rat aorta by ethanol. *Alcohol* **14**, 351 (1997).
- 21) Zheng, X. L., Mokashi, S. and Hollenberg, M. D. : Contractile action of ethanol in guinea pig gastric smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 485 (1997).
- 22) Saluja, A. K., Saluja, M., Printz, H., Zaverntnik, A., Sengupta, A. and Steer, M. L. : Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8968 (1989).