KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2006;49:263-8

사람 중이점막상피세포에서 Uridine-5' Triphosphate에 의한 칼슘 이동과 점액분비에 미치는 카페인의 효과

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
최재영 · 김성헌 · 정상호 · 손은진 · 박헌이 · 신중욱 · 윤주헌

Effect of Caffeine on UTP-induced Ca^{2+} Mobilization and Mucin Secretion in Human Middle Ear Epithelial Cells

Jae-Young Choi, MD, Sung Huhn Kim, MD, Sang Ho Jung, MD, Eun Jin Son, MD, Hun Yi Park, MD, Joong Wook Shin, MD and Joo-Heon Yoon, MD
Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Puringeric receptors and their agonists like uridine-5-triphosphate (UTP) and adenosine triphosphate (ATP), regulate mucin secretion in middle ear epithelial cells. In the present study, we examined the effects of purinergic agonists on Ca^{2+} influx *($[Ca^{2+}]i$)* in normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. We also examined the effect of caffeine, an inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) inhibitor, on UTP induced *$[Ca^{2+}]i$* and mucin secretion in NHMEE cells. **Materials and Method** : NHMEE cells were stimulated with various purinergic agonists, such as UTP, and *$[Ca^{2+}]i$* was measured using a miniature double perfusion chamber. UTP-induced mucin secretion was quantitated by immunoblotting assay. **Results** : The determined order of purinergic agonist potency with respect to *$[Ca^{2+}]i$* was ATP=UTP >2-MeSATP >ADP >> adenosine. UTP-induced mucin secretion was inhibited when the intracellular Ca^{2+} was removed with 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester. Caffeine suppressed UTP-induced *$[Ca^{2+}]i$*, and but inhibited UTP-induced and constitutional mucin secretion. **Conclusion** : Our results suggest that caffeine may have a therapeutic effect in mucoid otitis media by suppressing mucin secretion. **(Korean J Otolaryngol 2006;49:263-8)**

KEY WORDS : Mucin · Caffeine · Calcium.

서 론

삼출성 중이염은 소아 난청의 가장 흔한 원인이다. 더욱이 삼출액이 점액성으로 바뀌면 대증적인 치료는 효과적이지 않아 수술적 치료의 적응증이 된다. 점액성 중이염의 특징은 중이점막에서의 점액 과분비이다.[1] 그러나 중이점막에서 점액 과분비의 근본적인 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지는 않다.

Uridine - 5 '- triphosphate(UTP)와 adenosine triphosphate(ATP) 같은 뉴클레오티드는 기도상피세포의 퓨린 수용체를 활성화시킴으로써 점액 분비를 조절한다.[2][3] 최근에 저자들은 배양된 정상 사람 중이점막상피세포에서의 퓨린 수용체의 발현과 그 자극제인 UTP가 점액 분비를 촉진하는 것을 보고하였다.[4] 그러나 어떠한 퓨린 수용체 아형이 정상 사람 중이점막상피세포에서 기능적으로 활성화되는 지는 명확하지 않다.

칼슘은 많은 세포에서 세포외 유출(exocytosis) 작용을 활성화한다. 그러나, 뉴클레오티드에 의한 점액 분비에서의 칼슘의 역할에 관해서는 논란이 있다. 뉴클레오티드는 기도상피세포에서는 점액 유전자 발현을 증가시키며, 칼슘 비의존성 경로를 통하여 점액의 분비를 자극한다.[5][6] 그러나 결막 상피와 담도 상피에서는 뉴클레오티드에 의한 점액 분비는 칼슘 의존적이며,[7][8] 점액 유전자 발현 증강은 일어나지 않는다. 이러한 점들은 칼슘 의존성 점액 분비가 세포의 형태에 따라 다르다는 것을 시사한다.

카페인은 커피 등에 2~3 mM 정도가 존재하며,[9] 세포

논문접수일 : 2005년 5월 17일 / 심사완료일 : 2005년 12월 1일
교신저자 : 윤주헌, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2228 - 3610 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

내 칼슘 농도에 영향을 주는것으로 알려져 있다. 즉, 카페인은 inositol - 1, 4, 5 - triphosphate(IP_3)의 생산을 억제하고, IP_3 수용체를 지닌 분비세포에서 IP_3의 기능을 억제한다.[10] 이러한 억제 효과 때문에 카페인은 위(stomach)의 상피세포에서 칼슘 의존성 점액 분비를 억제한다.[11] 그러므로 만약 정상 사람 중이점막상피세포에서의 UTP에 의해 유도된 점액 분비가 칼슘 의존성이라면, 카페인은 이러한 과정을 억제할 것으로 여겨진다.

본 연구에서 저자들은 어떤 퓨린 수용체들이 칼슘의 세포내 이동(influx) 칼슘($[Ca^{2+}]i$)에 관하여 기능적으로 활성화되는 지를 알아보았다. 또한 UTP에 의한 점액 분비가 정상 사람 중이점막상피세포에서 칼슘 의존성인지를 조사하였다. 마지막으로 본 저자들은 정상 사람 중이점막상피세포에서 UTP에 의한 $[Ca^{2+}]i$와 점액 분비에 카페인이 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

세포배양과 카페인 처치

정상 사람의 중이점막상피세포의 분리, 팽창, 냉동보존과 순차적 계대 배양은 이전에 기술한대로 시행하였다.[12][13] 요약하면 계대 배양한 2세대(passage - 2) 중이점막상피세포를 Transwell - clear culture inserts(Costar, Cambridge, MA, USA)에서, bronchial epithelial cell basal medium과 Dulbecco's modified Eagle's media containing all supplements의 1 : 1 혼합물에서 배양되었다.[13] 세포들은 confluent까지 7일간 5% CO_2의 배양기에서 유지되었다. 이후에 세포표면의 apical medium을 제거하고 세포에게 기저외측면으로 영양공급을 함으로써 air - liquid interface가 형성되었다. 카페인의 효과를 평가하기 위해서 세포들은 1, 10, 20 혹은 40 mM의 카페인으로 처치하였고, 그 후에 $[Ca^{2+}]i$과 점액 분비를 아래에 기술한 방법으로 측정하였다.

시약 및 용액의 조성

Fura - 2 - AM은 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, UTP, ATP, UDP, 2 - methylthioadenosine, 2 - bis(2 - aminophenoxy) ethane - N, N, N', N' - tetraacetic acid - acetoxymethyl ester(BAPTA - AM)을 포함한 다른 화학물과 카페인은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 표준관류용액은 140 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 D - Glucose 및 10 HEPES (pH7.4 with NaOH)를 포함하였다.

$[Ca^{2+}]i$ 의 측정

정상 사람의 단층 중이점막상피세포에서 $[Ca^{2+}]i$의 측정은 이전에 보고된 방법으로 시행하였다.[14] 간단히 언급하면, 세포들을 3 μM fura - 2AM을 포함한 배지에서 30분간 배양함으로써 Fura - 2를 가한다. Fura - 2가 가해진 정상 사람의 중이상피세포를 포함한 막은 도립현미경의 검경대에 부착된 소형 Ussing chamber(AKI Institute, U of Copenhagen, Denmark)에 위치시킨다. 투명한 커버 글라스를 관류실의 바닥에 덮는데, 이는 긴 작동거리(2 mm 이상)을 가진 대물렌즈를 이용함으로써 염색된 단층막의 형광측정을 가능하게 한다. 관강내와 기저외측 관류액은 37℃로 가열하고 중력흐름(rate=3~5 ml/min)에 의해 관류실로 전달된다. Fura - 2 형광물질은 350 nm와 380 nm의 흥분성 파장에서 기록되고(PTI, Delta Ram, Photon Technology International, NJ, USA), 350/380 형광비는 세포의 관강내측을 다양한 퓨린 자극제와 억제제를 함유한 용액에 노출함으로써 측정된다. $[Ca^{2+}]i$에 대한 카페인의 효과를 검사할 때는 세포들은 1분간 카페인으로 사전처리를 하였고, 후에 UTP로 자극하였다.

형광 면역조직화학

배양된 정상 사람의 중이상피세포에서의 형광 면역조직화학은 항 $P2Y_2$ 수용체 항체를 사용함으로써 시행되었다. 요약하면, 세포들은 24시간 동안 4% paraformaldehyde로 고정되었고, sucrose로 동결방지 되었으며, 필요 시까지 냉동실에 보관하였다. 그 후 동결표본은 10 μM 간격으로 절단하였으며, $P2Y_2$에 대한 primary rabbit antibody(1 : 500, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) 20 μM를 떨어뜨려서 염색하였다. 1시간 동안 배양한 후에, 정상 사람 중이점막상피세포는 PBS로 10분간 3번 세척되었다. 그 후 절편은 Fluorescein isothiocyanate(FITC) - conjugated goat anti - rabbit immunoglobulin G secondary antibody (1 : 200, Jackson Immunoresearch, PA, USA)와 암실에서 30분간 배양되었고, PBS로 세척하였으며, 10 μM의 glycerol로 표본제작하였다. 이렇게 처리된 절편을 형광현미경(high - performance cooled charge - coupled device (CCD) imaging systems ; Apogee Instruments Inc)으로 관찰하였다. 음성 대조군은 antisense peptide를 이용하여 10배로 전처치한 후 primary antibody를 처리하여 시행하였다.

점액의 정량화

실험군 표본과 그에 해당하는 시간대별 대조군을 모으기

전에 세포표면의 축적된 분비물을 PBS로 완벽히 세척하여 제거하였다. 시간대별 대조군 표본을 모으기 위해 정상 사람 중이점막상피세포를 30분간 배지에서 단독으로 배양하였으며, 세포 첨부의 세포 분비물을 수집하고 보관하였다. 이 세포들을 100 μM UTP를 포함한 배지에 노출시켰으며, 배지에 있는 세포 분비물은 실험군 표본으로 수집되었다. 이 처치한 표본의 배양 시간은 시간별 대조군 표본과 동일하였다. BAPTA-AM(50 μM)이나 카페인의 효과를 조사하기 위해 계획된 실험에서, BAPTA-AM(50 μM)이나 카페인은 UTP처치 10분전에 첨가되므로 총 처치시간은 40분간이 된다. 세포 잔유물을 제거하기 위해 수집된 표본은 3분간 2,500 r.p.m.으로 원심분리 시키며, 상층액은 dot-blotting method를 이용하여 점액 측정에 이용하였다.[13]

통계 처리

모든 실험은 최소한 2개 이상의 검체를 이용하여 2회 이상의 독립 실험을 시행하였고 실험 숫자(N)는 최소한 3이상이었다. 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 실험측정치는 Student's *t*-test로 통계학적 분석을 시행 하고 $p<0.05$를 유의성의 기준으로 삼았으며 평균±표준오차로 표시하였다.

결 과

퓨린 자극제에 의한 $[Ca^{2+}]i$의 조절

배양된 정상 사람 중이점막상피세포는 다양한 퓨린 자극제에 의해 자극되었다. ATP(100 μM)와 UTP(100 μM)는 상대적으로 큰 $[Ca^{2+}]i$ 반응을 유도하였다. 2MeATP(100 μM)도 역시 $[Ca^{2+}]i$를 유도했으나 adenosine(100 μM)은 별다른 반응이 없었다(Fig. 1). 관류액에서 칼슘을 없애더라도 자극제에 의해 유도된 $[Ca^{2+}]i$ 정도는 변화되지 않았다(결과 생략). $[Ca^{2+}]i$ 의 상승 효과는 ATP가 가장 크고, 다음으로 UTP, 2MeATP 순으로 생각되며, adenosine에 의한 효과는 미미하였다. 이는 $P2Y_2$ 수용체 활성화에서의 결과와 유사하였다.[15] 이와는 반대로 $P2Y_6$ 자극제인 UDP(100 μM)는 $[Ca^{2+}]i$을 거의 유도하지 않았다(Fig. 1).

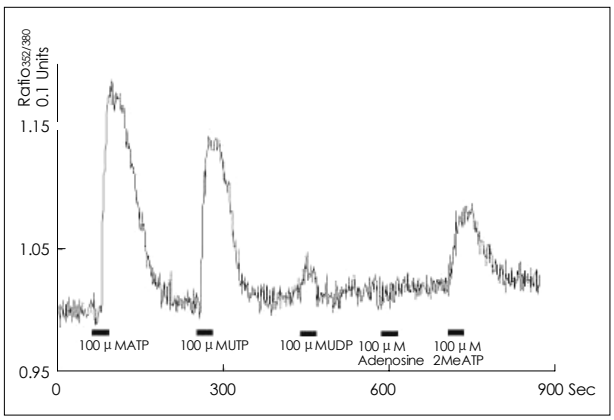

Fig. 1. Mobilization of intracellular Ca^{2+} by purinergic agonists in cultured normal human middle ear epithelial cells.

$P2Y_2$ 수용체의 localization

$P2Y_2$ 수용체는 배양된 정상 사람 중이점막상피세포의 첨부와 기저부 세포층에서 관찰되었으나 중간 세포층에서는 관찰되지 않았다. Anti-sense peptide로 처리된 표본에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

세포내 칼슘 결핍이 점액 분비에 미치는 영향

저자들은 정상 사람 중이점막상피세포에서 점액 분비에 대한 세포내 칼슘의 역할에 대하여 조사하였다. UTP(100 μM, 30 min)는 대조군에 비해 점액 분비를 438±6%까지 자극하는데 이러한 자극 효과는 BAPTA-AM으로 세포내 칼슘을 결핍시킴으로써 대조군의 176±9%까지 부분적으로 억제된다. 더욱이 BAPTA-AM은 전체적인 점액 분비를 대조군의 73±1%까지 억제한다(Fig. 3). 그러므로, 정상 사람 중이점막상피세포에서의 UTP에 의한 점액 분비와 전체적인 점액 분비는 부분적으로는 칼슘 의존성이라고 볼 수 있다.

UTP 유도 칼슘 이동에 카페인이 미치는 영향

UTP는 정상 사람 중이점막상피세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 유도

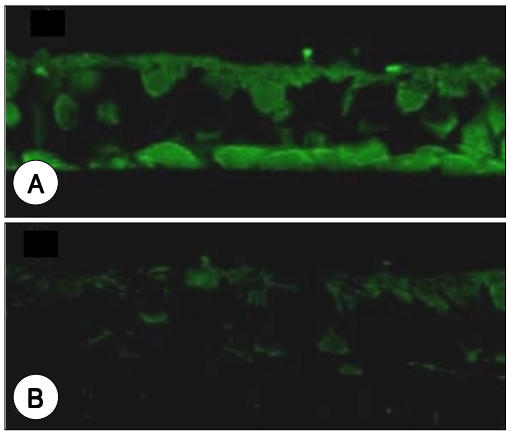

Fig. 2. Immunohistochemical analysis of normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells using antibody against the $P2Y_2$ receptor. NHMEE cells showed positive immunofluorescent reactions in the apical and basal cell layers (A), whereas, negative controls, which were treated with anti-sense peptides, showed no immunoreactivity (B).

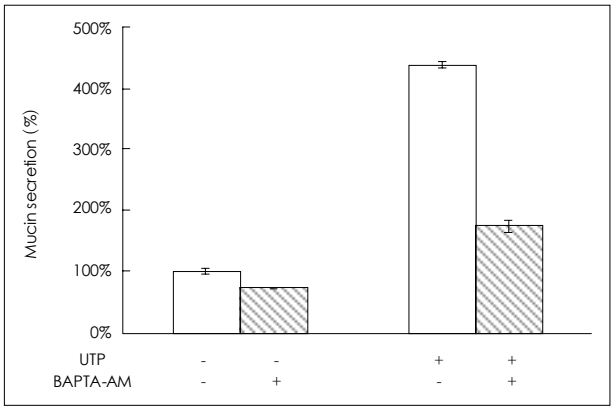

Fig. 3. Effect of intracellular calcium depletion on mucin secretion in NHMEE cells. Intracellular Ca^{2+} was depleted by adding 50 μM 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester. This treatment suppressed both UTP-induced mucin secretion and constitutional mucin secretion.

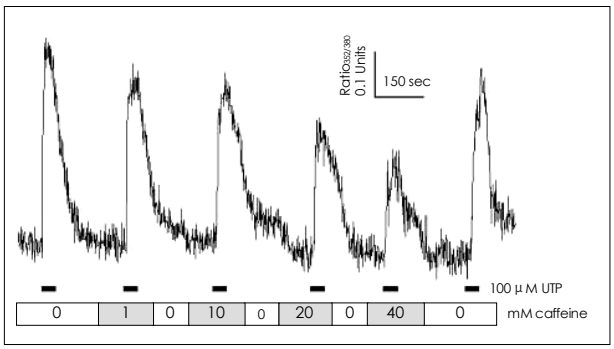

Fig. 4. Effect of caffeine on UTP-induced Ca^{2+} mobilization in NHMEE cells. Caffeine suppressed UTP-induced mucin Ca^{2+} influx in a dose-dependant manner.

하고, 이러한 $[Ca^{2+}]i$은 5 mM 카페인에 의해 UTP로 처리된 수치의 83±3%까지 부분적으로 억제된다. 더욱이, 카페인의 억제효과는 10 mM, 20 mM, 40 mM에서 각각 UTP로 처리된 수치의 70±4%, 57±2%, 43±2%로 용량에 비례하여 점차적으로 증가한다(Fig. 4).

점액 분비에 카페인이 미치는 영향

UTP에 의해 유도된 점액 분비가 칼슘 의존적이고, 카페인이 정상 사람 중이점막상피세포에서의 $[Ca^{2+}]i$을 억제하기 때문에, 저자들은 UTP에 의한 점액 분비에 대한 카페인의 억제 효과에 대하여 조사하였다. 100 μM의 UTP는 정상 사람 중이점막상피세포에서 점액 분비를 촉진시키고(대조군의 437±12%) 카페인은 이러한 UTP 유도 점액 분비를 용량에 비례하여 억제한다(1 mM에서 대조군의 389±9%, 10 mM에서 대조군의 299±13%, 20 mM에서 대조군의 212±2%, 40 mM에서 대조군의 210±1%)(Fig. 5A). 10 mM 이상의 카페인은 또한 용량에 비례하여 전체

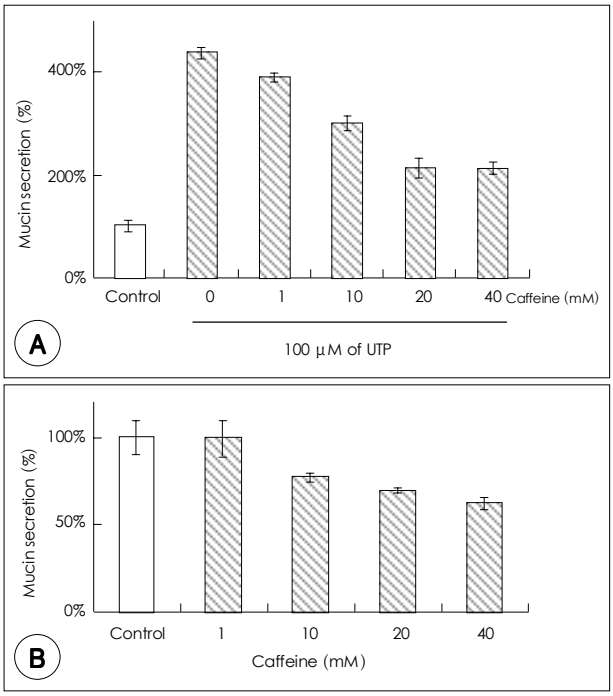

Fig. 5. Effect of caffeine on mucin secretion in NHMEE cells. Caffeine suppressed UTP-induced mucin secretion in NHMEE cells in a dose- dependent manner (A). More than 10 mM of caffeine also suppressed constitutional mucin secretion (B).

적인 점액 분비를 억제한다(1 mM에서 대조군의 99±10%, 10 mM에서 대조군의 77±2%, 20 mM에서 대조군의 70±1%, 40 mM에서 대조군의 62±3%)(Fig. 5B).

고 찰

세포외 퓨린 자극제들은 다양한 생물학적 반응의 중요한 조절 역할을 한다. 또한, 퓨린 자극제는 $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ 등과 같은 uracil - sensitive receptors를 통해 기도상피의 mucociliary clearance를 조절한다.[2)3)16)] 저자들은 $P2Y_2$, $P2Y_6$ mRNA 전사가 *in vivo* 및 *in vitro* 중이상피세포에서 존재함을 보고하였다.[4)] 그러나 본 연구에서 $P2Y_6$는 강력한 자극제인 UDP가 $[Ca^{2+}]i$를 활성화시키지 못하였기 때문에 $P2Y_6$는 정상 사람 중이점막상피세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 조절하지 못함을 알 수 있다. 이는 $P2Y_6$가 $P2Y_2$와 같은 강도를 보이는 비점막과 기관 · 기관지 상피[16)]와는 상반된 결과이다. 정상 사람 중이점막상피에서의 강도는 ATP가 가장 크고, 다음으로 UTP, 2MeATP, adenosine 순이었는데, 이는 $P2Y_2$가 $[Ca^{2+}]i$에 작용한다는 것을 의미한다.[15)] 퓨린 자극에 의한 중이상피세포에서의 $P2Y_2$ 수용체의 활성화는 기관 · 기관지[2)]와 비강상피[3)]에서의 것과 유사하며, 중이세포주와 일치한다.[17)] 저자들은 또한 $P2Y_2$ 수용체가

배양된 정상 사람 중이상피세포의 중간면이 아닌 기저면과 첨부면에 위치함을 확인하였다. 하지만 $P2Y_2$ 수용체가 왜 이러한 면에만 나타나는 지는 불확실하다.

$P2Y_2$가 능동적으로 $[Ca^{2+}]i$를 증가시키지만, 이러한 $[Ca^{2+}]i$가 정상 사람 중이상피세포에서 UTP 유도 점액 분비에 필수적인지는 확실하지 않다. $P2Y_2$ 수용체의 자극제가 PLC를 활성화시키고, 이로 인해 Phosphatidylinositol 4, 5 - P_2(PIP_2)의 diacyglycerol(DAG)와 IP_3로의 가수분해가 촉진되는데, 이는 두가지 다른 신호경로를 자극하게 된다.[18] IP_3는 세포내 칼슘 농도를 증가시켜 다양한 칼슘 의존성 세포반응을 조절하며, DAG는 protein kinase C와 protein kinase와 같은 칼슘 비의존성 신호경로를 통하여 유전자를 활성화함으로써 생물학적 기능을 발휘한다. 뉴클레오티드는 세포의 종류에 따라 이러한 경로 중 하나를 통하여 점액 분비를 유도한다. 본 연구에서는 BAPTA - AM으로 세포내 칼슘을 부분적으로 제거하였을 때 UTP 유도 점액 분비가 억제되었으며, 전체적인 점액 분비조차 억제되었다. 이는 UTP 유도 점액 분비가 정상 사람 중이점막상피세포에서 부분적으로는 칼슘 의존성이며 이는 정상 사람 중이점막상피세포에서 점액 유전자 발현의 변화가 없이 UTP 유도 점액 분비가 일어난다는 저자들의 이전 연구와 일치한다.[4]

세포내 칼슘 농도에 미치는 카페인의 영향은 세포 종류에 따라 다르다. 카페인은 ryanodine 수용체를 함유한 크롬친화세포의 소포체에서는 칼슘을 유리시키지만,[19] 췌장 포상세포 같은 IP_3 수용체를 함유한 세포에서는 소포체(endoplasmic reticulum)로부터 칼슘을 유리시키는 IP_3의 작용을 억제한다.[10] 본 연구에서는 카페인은 정상 사람 중이점막상피세포에서 UTP에 의한 $[Ca^{2+}]i$를 부분적으로 억제하는 것으로 보아 정상 사람 중이점막상피세포가 카페인에 민감한 IP_3 수용체를 가지고 있음을 알 수 있었다.

UTP에 의한 점액 분비가 칼슘 의존성이고 카페인이 세포내 칼슘 농도에 억제효과를 나타낸다는 본 연구에서의 결과에 따라 카페인이 정상 사람 중이상피세포에서 UTP 유도 점액 분비를 억제한다는 것을 가정해 볼 수 있다. 본 연구에서 카페인은 UTP 유도 점액 분비와 구조적 점액 분비를 BAPTA - AM과 비슷한 정도로 억제하였다. 이러한 결과는 정상 사람 중이상피세포에서의 점액 분비가 부분적으로 칼슘 의존성이고 카페인에 의해 억제됨을 의미한다.

이상을 요약하면, $P2Y_2$ 수용체는 정상 사람 중이점막상피세포의 기저부와 첨부에서 발현됨을 알 수 있었고, $[Ca^{2+}]i$의 조절에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다. 카페인은 UTP에 의한 $[Ca^{2+}]i$를 억제하고, 정상 사람 중이점막상피세포에서 UTP에 의한 점액 분비와 전체적 점액 분비를 억제함을 알 수 있었다. 이는 카페인이 점액성 중이염에서 점액 분비를 억제할 수 있음을 시사한다.

중심 단어 : 점액 · 카페인 · 칼슘.

본 연구는 2003년 한국학술진흥재단 신진교수연구과제의 지원에 의해 이루어졌음(KRF - 2003 - 003 - E00144).

REFERENCES

1) Alessandra R, Alfio F. *The pathology and clinical features of glue ear: A review. Eur Arch Otorhinolaryngol 2000;257:300-3.*
2) Kim KC, Park HR. Shin CY, Akiyama T, Ko KH. *Nucleotide-induced mucin release from primary hamster tracheal surface epithelial cells involves the P2u purinoreceptor. Eur Respir J 1996;9:542-8.*
3) Choi JY, Namkung W, Shin JH, Yoon JH. *UTP and ATPrS induce mucin secretion via Ca^{2+} dependent pathways in human nasal epithelial cells. Acta Otolaryngol 2003;123:1080-6.*
4) Choi JY, Cho KN, Yoon JH. *Effect of Uridine 5'-Triphosphate on Mucin and Lysozyme Expression in Human Middle Ear Epithelial Cells. Acta Otolaryngol 2003;123:362-6.*
5) Ko KH, Jo M, McCracken K, Kim KC. *ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells involves, in part, activation of protein kinase C. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:194-8.*
6) Chen Y, Zhao YH, Wu R. *Differential regulation of airway mucin gene expression and mucin secretion by extracellular nucleotide triphosphates. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;25:409-17.*
7) Dartt DA, Rios JD, Kanno H, Rawe IM, Zieske JD, Ralda N, *et al. Regulation of conjunctival goblet cell secretion by Ca (2+) and protein kinase C. Exp Eye Res 2000;71:619-28.*
8) Dray-Charier N, Paul A, Combettes L, Bouin M, Mergey M, Balladur P, *et al. Regulation of mucin secretion in human gallbladder epithelial cells: Predominant role of calcium and protein kinase C. Gastroenterology 1997;112:978-90.*
9) Brewer GJ. *The methylxanthine beverages and foods: Chemistry, consumption, and health effects. Prog Clin Biol Res 1984;158:1-413.*
10) Osipchuk YV, Wakui M, Yule DI, Gallacher DV, Petersen OH. *Cytoplasmic Ca^{2+} oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein - activation, internal application of inositol trisphosphate or Ca^{2+}: Simultaneous microfluorimetry and Ca^{2+} dependent Cl^- current recording in single pancreatic acinar cells. EMBO 1990; 9:697-704.*
11) Hamada E, Nakajima T, Hata Y, Hazama H, Iwasawa K, Takahashi M, *et al. Effect of caffeine on mucus secretion and agonist-dependent Ca^{2+} mobilization in human gastric mucus secreting cells. Biochim Biophys Acta 1997;24;1356:198-206.*
12) Choi JY, Kim CH, Lee WS, Kim HN, Song KS, Yoon JH. *Ciliary and secretory differentiation of normal human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol 2002;122:270-5.*
13) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG, Park IY. *Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: Expression of mucin and lysozyme. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:594-601.*
14) Ko WH, Law VW, Wong HY, Wilson SM. *The simultaneous measurement of epithelial ion transport and intracellular free Ca^{2+} in cultured equine sweat gland secretory epithelium. J Membr Biol 1999; 170:205-11.*
15) King BF, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. *Metabotropic receptors for ATP and UTP: Exploring the correspondence between*

native and recombinant nucleotide receptors.Trends Pharmacol Sci 1998;19:506-14.

16) Lazarowski ER, Paradiso AM, Watt WC, Harden TK, Boucher RC. *UDP activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the P2Y2 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:2599-603.*

17) Yen PT, Herman P, Van den Abbeele T, Tan CT, Bordure P, Marianowski R, *et al. Extracellular ATP modulates ion transport via P2Y purinoceptors in a middle-ear epithelial cell line. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 1997;59:170-5.*

18) Soltoff SP. *Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or $[Ca^{2+}]i$ elevation can substitute for receptor activation. J Biol Chem 1998;273:23110-7.*

19) Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J. *Spontaneous $[Ca^{2+}]i$ fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1, 4, 5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store. J Biol Chem 1990;265:3005-8.*