사람 중이점막 상피세포에서 Uridine 5′-Triphosphate가 점액 분비에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
최재영[1] · 임정택[1] · 윤주헌[1,2]

Effect of Uridine 5′-Triphosphate on Mucin Secretion in Human Middle Ear Epithelial Cells

Jae Young Choi, MD[1], Jeong Taek Lim, MD[1] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [2]BK21 Project for Medical Science, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Extracellular uridine 5′-triphosphate (UTP) regulates a variety of biological functions in the airway epithelium including chloride and fluid transport, mucociliary clearance, and mucin secretion via P2Y purinergic receptors. This study was undertaken to investigate which P2Y purinergic receptors are expressed in the normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. We also determined the levels of mucin secretion and its mRNA expressions following stimulation with UTP. **Materials and Method** : The level of P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$ and $P2Y_{12}$) receptors and mucin gene 5AC (*MUC5AC*), *MUC5B*, *MUC8* messenger RNA (mRNA)s were measured by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). We also determined the levels of mucin secretion following stimulation with UTP by dot-blotting method in NHMEE cells. **Results** : Middle ear epithelial cells expressed $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$ and $P2Y_{12}$ receptors but not the $P2Y_4$ receptor. Apically applied UTP induced increased the mucin secretion. On the other hand, UTP did not enhance the mucin mRNA expression until 72 h had lapsed after treatment. **Conclusion** : Our study suggests that UTP acts as a secretogogue on mucin secretion in NHMEE cells. **(Korean J Otolaryngol 2003;46:100-4)**

KEY WORDS : Uridine triphosphate · Ear, middle · Mucous membrane · Mucins.

서 론

Uridine 5′-triphosphate(UTP)나 Adenosine 5′-triphosphate(ATP) 등의 뉴클레오타이드들은 세포막의 퓨린수용체를 통하여 세포외 신호전달물질로 작용하고 있다.[1)] 이 퓨린수용체는 이온채널과 연결된 P2X수용체와 G-단백과 결합된 P2Y 수용체로 나뉘며, 현재까지 인체에서는 8개의 P2X수용체($P2X_{1-7}$, $P2X_m$)와 6개의 P2Y수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$와 $P2Y_{12}$)가 밝혀져 있다.[1-3)]

최근 P2Y 수용체에 대한 약리학적 연구에 의해 UTP의 생물학적 중요성이 강조되고 있다. UTP는 히스타민 분비, 근육세포의 증식과 정자 형성 등의 다양한 세포반응을 조절하며,[2)] 기도점막에서도 UTP가 세포표면의 P2Y 수용체를 자극하여 이온수송[4)5)]과 섬모운동,[6)] 점액분비[7)8)] 등 점액섬모수송체계(mucociliary transport system)를 조절한다고 알려져 있다. 따라서, UTP의 작용기전에 대한 연구가 향후 기도질환에 대한 새로운 치료전략을 제공할 수 있으리라 기대된다.

실험동물의 중이점막[9)]과 중이세포주[10)]에서 다양한 뉴클레오타이드가 이온수송을 활성화시키는 것이 알려져 중이점막에서 퓨린수용체의 역할이 제기되고 있다. 그러나 중이점막에 어떠한 퓨린수용체가 존재하고, 이러한 수용체가 중이점막의 정상 생리와 병리에 어떠한 작용을 하는지에 대해서는 알려져 있지 않다. 저자들은 최근 계대 배양된 정상 사람 중이점막 상피(normal human middle ear epithelial ;

논문접수일 : 2002년 11월 7일 / 심사완료일 : 2002년 12월 9일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과교실
전화 : (02) 361-8482 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

NHMEE) 세포를 점액섬모상피로 분화시키는 데 성공하였는데,[11)12)] 삼출성 중이염 등의 각종 중이질환에서 점액성 분비물의 과분비가 주요 병인임을 고려하면,[13)] 배양된 사람 정상 중이점막 상피세포에서 어떠한 퓨린수용체가 발현되는지를 확인하고, 뉴클레오타이드가 분비물의 분비에 어떠한 역할을 하는 지를 이해하는 것이 중이질환의 치료에 임상적으로 커다란 도움이 될 것이다.

본 연구에서 저자들은 passage - 2 NHMEE세포에서 어떠한 종류의 P2Y 퓨린수용체가 발현되는 지를 알아보았으며, 이 세포에서 UTP가 점액분비와 그 mRNA 발현 정도에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

사람 중이점막상피 세포의 동정과 배양

화학적 미로절제술(chemical labyrinthectomy)을 시행받은 6명의 환자들에서 정상으로 보이는 중이점막을 채취하였다. 채취한 조직은 4℃에서 18시간동안 1% Pronase (type 14 protease, Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 단일세포로 분리한 후, 섬유모세포(fibroblasts)와 내피세포(endothelial cells)의 제거를 위하여 세포를 플라스틱 용기에 넣고 37℃에서 30분간 배양하였다. 이전의 연구[11)12)]에서 기술한 방법대로 passage - 2 세포(1×10^5 cells/well)를 Transwell® 배양기(Costar, Cambridge, MA)에서 접종하였고, 이 세포들은 95% 공기와 5%의 CO_2하에서 7~9일간 bronchial epithelial cell basal medium(BEEM)과 Dulbecco 's modified Eagle 's medium(DMEM)의 1 : 1 혼합용액에서 합류(confluence)를 이룰 때까지 배양하였다.[11)] 이 후 세포표면의 배양액을 제거함으로써 air - liquid interface(ALI)를 형성하였다. 이 세포들을 다시 7일간 더 배양하여 분화시킨 후 실험을 진행하였으며 각각의 실험은 최소한 세 차례씩 시행하였다.

UTP로의 세포자극

대조군과 UTP - 자극군에서 세포 표면을 인산완충액(phosphate - buffered saline)으로 세척하여, 기존의 축적된 분비물들을 제거한 후 일정기간 동안의 세포 표면의 분비물을 채취하였다. 대조군을 얻기 위해서 세포표면에 1ml의 배양액을 넣고 세포를 10분, 30분, 60분 그리고 24시간 동안 배양한 후 표면의 배양액을 채취하였으며, 100 μM의 UTP(Sigma, St. Louis, MO)가 혼합된 배양액 1 ml를 동일한 세포의 표면에 넣고 10분, 30분, 60분 그리고 24시간 동안 각각 배양한 후, 배양액을 모아 이를 UTP - 자극군의 점액 분비량을 측정하는데 이용하였다. 세포 성분의 제거를 위해 채취된 시료들을 2500 r.p.m.에서 3분간 원심분리한 후 그 상층액에서 dot - blotting을 이용하여 점액의 양을 분석하였다.

분비물의 면역적 검출 및 정량

점액의 분비량을 측정하기 위하여, 각 자극 시간마다 대조군과 UTP - 자극군의 시료를 dot - blotting으로 정량하였다.[14)] 순수 인체 점액(a gift from Dr. C.W. Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)을 표준으로 사용하였고 점액에 대한 일차 항체로는 단클론 항체인 H6C5(a gift from Dr. C.W. Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)를 사용하였다. 채취된 분비물과 표준을 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막에 적용하여 일차항체와 반응시킨 다음 이차항체인 horseradish peroxidase conjugated goat anti - mouse 혹은 anti - rabbit IgG에 반응시켜 chemiluminescence (ECL kit ; Amersharm, Buckinghamshire, UK)로 발색시켰다. 표준 곡선은 linear regression analysis를 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였다.

점액과 퓨린수용체의 mRNA 발현을 위한 reverse transcription(RT) - polymerase chain reaction(PCR)

이미 보고된 방법에 의해 점액(*MUC5AC, MUC5B, MUC8*) mRNA의 발현을 보기위해 RT - PCR 방법을 시행하였다.[14)] UTP 자극 전과 자극 후 배양된 NHMEE 세포로부터 총 RNA를 얻은 후 이를 cDNA로 역전사하였다. Oligonucleotide primer는 이미 알려진 서열대로 고안하였다.[14)] 퓨린수용체의 존재여부를 확인하기 위하여 합류 7일째 배양된 passage - 2 NHMEE 세포에서 총 RNA를 얻어 cDNA로 역전사하였다. 퓨린수용체를 확인하기 위해 사용된 oligonucleotide primers는 Table 1과 같다. 증폭된 산물이 DNA 오염에 의한 것이 아니라 mRNA에 의한 것임을 확인하기 위하여 음성 대조군에서는 역전사효소를 빼고 역전사반응을 수행하였다. 사람 혈소판세포는 $P2Y_{11}$에 대한 양성 대조군으로 사용되었고, 정상 사람 뇌조직은 나머지 수용체에 대한 양성 대조군으로 사용되었다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel(FMC Bioproducts, Rockland, ME)에서 분리한 후 CSC Chemiluminescense Detection Module(Raytest, Straubenhardt, Germany)로 띠(band)의 형광상태를 분석하였다.

Table 1. The PCR primers for P2Y receptor

Name (accession No.)	Sequence	Site	Size (bp)
$P2Y_1$ (NM002563)	F : CCCTGGGCCGGCTCAAAAAGAAGAATG	613 - 639	389
	R : CAAGCCGGGCCCTCAAGTTCATCGTTTTC	1002 - 974	
$P2Y_2$ (NM002564)	F : GCTACAGGTGCCGCTTCAACGAGGACTTC	310 - 338	428
	R : GGCAGGCCAGCACCAACACCCACAC	738 - 714	
$P2Y_4$ (X91852)	F : CCACCTGGCATTGTCAGACACC	405 - 426	424
	R : GAGTGACCAGGCAGGGCACGC	820 - 809	
$P2Y_6$ (U52464)	F : CCCTGCTGGCCTGCTACTGTCTCCTG	823 - 848	455
	R : CTAATTCTCCGCATGGTTTGGGGTTGG	1278 - 1252	
$P2Y_{11}$ (AF030335)	F : CCCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCC	239 - 264	396
	R : CGCAGCCCAACCCCGCCAGCACCAG	635 - 611	
$P2Y_{12}$ (AF313449)	F : AAGATTCTCTCTGTTGTCATCTG	498 - 520	432
	R : ACAGAGTGCTCTCTTTCACATAG	927 - 905	

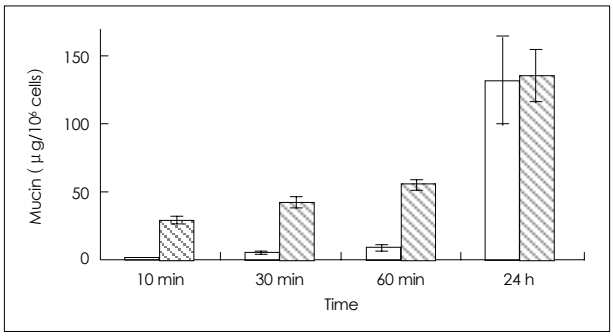

Fig. 1. Effect of UTP on mucin secretion in passage-2 normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells. Passage-2 NHMEE cells were exposed to 100 μM of UTP. Results are expressed as means ±SD. Apical treatment with UTP (hatched bars) dramatically increased mucin secretion at 10 min compared with the control (open bars) but this difference gradually decreased, and at 24 h after treatment, no significant difference was evident between the two groups.

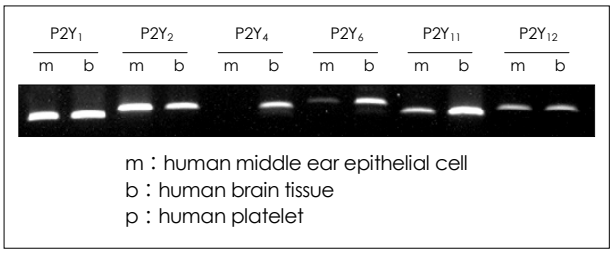

Fig. 2. RT-PCR analysis for P2Y receptor mRNA NHNEE cells compared with positive controls (b : human brain tissue, p : human platelet). Passage-2 NHMEE cells expressed mRNA for the $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$ and $P2Y_{12}$ receptors, but not for $P2Y_4$.

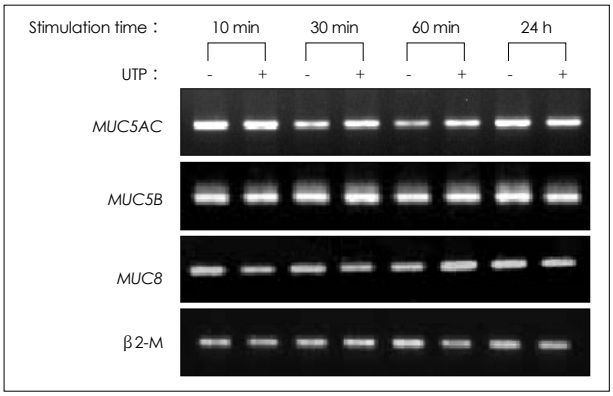

Fig. 3. Time-course study of the effects of UTP on *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC8* mRNA expression in passage-2 normal human middle ear epithelial cells. RNAs were isolated at various times before and after UTP (100 μM) treatment. No significant difference was evident between the two groups. The expression levels of β-2M mRNA (PCR control gene) remained constant.

결 과

Passage-2 NHMEE 세포에서 점액 분비에 대한 UTP 자극효과

100 μM UTP로 자극하였을 때 자극 10분 후에 점액의 분비량이 대조군에 비해 35배 증가하였다(대조군 : 0.76±0.43 μg/10^6 cells, 자극군 : 28.10±2.10 μg/10^6 cells). 30분(대조군 : 4.70±0.43 μg/10^6 cells, 자극군 : 42.20±4.70 μg/10^6 cells)과 60분(대조군 : 7.90±1.90 μg/10^6 cells, 자극군 : 55.30±3.10 μg/10^6 cells)에서도 UTP 자극군에서 점액의 분비가 증가하였으나 자극시간이 길어질수록 UTP 자극효과는 줄어들어 24시간(대조군 : 131.90±32.20 μg/10^6 cells, 자극군 : 134.80±59.30 μg/10^6 cells)에서는 두 군간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

NHMEE 세포에서 퓨린수용체의 발현

RT-PCR결과 배양된 passage-2 NHMEE 세포에서 $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$과 $P2Y_{12}$ 수용체에 대한 mRNA가 발현되었으나, $P2Y_4$ 수용체에 대한 mRNA는 발현되지 않았다. 역전사효소가 없었던 음성 대조군에서는 PCR 산물이 관찰되지 않았다. 사람 뇌조직과 사람 혈소판 세포 등

의 양성 대조군들은 명확히 퓨린수용체를 발현하였다(Fig. 2).

UTP 처치 시간에 따른 점액 mRNA 발현양상

Passage - 2 NHMEE 세포에서의 점액 유전자 발현에 UTP가 미치는 영향을 알아보고자 다양한 자극 시간에서 조사해 보았다. 이 결과 100 μM UTP 자극 후 24시간까지 세가지 점액(*MUC5AC, MUC5B, MUC8*) mRNA 발현이 대조군에 비해 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

최근 뉴클레오타이드가 기도 상피에서 P2Y 수용체를 통해 이온과 체액 수송, 섬모운동, 그리고 점액분비 등의 다양한 생물학적 기능을 조절한다는 사실이 밝혀지고 있다.[4-8] 중이점막에서도 이온 수송에 P2Y 수용체가 관여한다는 사실이 몇몇 연구자들에 의해 제시되고 있다. Yen 등[10]은 중이점막 상피세포주에서 여러가지 세포외 뉴클레오타이드(extracellular nucleotides)가 이온 수송을 조절하고 있음을 보고하였고, Furokawa 등[9]도 mongolian gerbil의 중이점막 상피세포를 다양한 뉴클레오타이드로 자극하였을 때 클로라이드 분비가 촉진됐다고 보고하였다. 하지만 현재까지 중이점막 상피세포에서 퓨린수용체 유전자의 발현에 대한 보고는 없으며, 사람 중이점막에서 점액분비에 대한 퓨린수용체 작용제(agonist) 효과에 대해서도 알려지지 않았다.

지금까지 사람에서의 P2Y 수용체는 6가지 아형($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$과 $P2Y_{12}$)이 발견되었는데,[1-3] 본 연구에서는 passage - 2 NHMEE 세포에서 $P2Y_4$를 제외한 5가지 수용체의 mRNA가 발현되었다. 이 중 $P2Y_2$, $P2Y_4$와 $P2Y_6$ 수용체의 발현은 상기도점막 상피세포에서의 발현양상[15][16]과 유사하나, $P2Y_4$ mRNA는 발현되지 않아 상기도점막 상피세포와는 다른 양상을 보였다. 이와 더불어 본 연구에서는 아직까지 상기도점막 상피세포에서 발현이 보고되지 않은 $P2Y_1$, $P2Y_{11}$과 $P2Y_{12}$도 발현되었다. 이처럼 저자들의 실험결과 중이점막 상피세포에서의 P2Y 수용체의 발현양상이 상기도점막 상피세포와 다름을 알 수 있었다.

P2Y 수용체는 다양한 뉴클레오타이드에 의해 활성화되는데, ATP, ATPγS 그리고 2 - methylthio - ATP는 adenosine nucleotide - specific P2Y 수용체($P2Y_1$, $P2Y_{11}$)에 작용하고 UTP, UTPγS, UDP는 $P2Y_2$, $P2Y_4$ 및 $P2Y_6$와 같은 uracil - sensitive P2Y 수용체를 통해 세포반응을 조절한다. 특히 UTP는 앞서 언급한 세가지 uracil - sensitive 수용체를 통해 기도점막에서 점액분비를 조절한다고 알려져 있어 본 연구에서 저자들은 NHMEE 세포에서 점액 분비에 대한 UTP 자극효과를 조사하였다.

저자들의 연구 결과 UTP는 NHMEE 세포에서 점액 분비를 현저하게 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 UTP에 의한 점액분비는 기도점막 상피,[7][8] 코점막[18]과 결막[19] 등의 다른 조직에 비해 보다 강하게 나타났는데, 이런 반응의 정확한 이유는 알 수 없지만 점액량 측정방법의 차이와 UTP에 대한 상피세포의 반응이 조직마다 다르기 때문일 것이다. 저자들의 실험에서 점액 분비는 자극 10분 이내에 신속히 일어났는데, 이러한 반응은 UTP가 세포의 세포질로부터 이미 만들어진 점액의 세포외유출(exocytosis)을 촉진시키는 분비촉진제(secretogogues)로 작용함을 시사한다. 흥미롭게도 대조군과 UTP - 자극군에서의 점액 분비량은 UTP 자극 후 24시간에는 거의 동일해졌다. 이러한 현상은 이미 분비된 점액이 세포내 점액 유전자의 mRNA 전사를 억제하여 더 이상의 점액 분비를 막는 작용을 하기 때문일 것으로 추측된다.

기도점막에서의 UTP에 의한 점액 분비와는 달리 UTP가 점액 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바 없다. 저자들은 UTP에 의한 점액분비가 점액 유전자의 발현 증가를 동반하는지를 확인하기 위하여, RT - PCR을 이용하여 UTP 자극 전과 후의 점액 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 기도에서 분비되는 대표적인 점액인 *MUC5AC*와 *MUC5B*[20]와 함께, 저자들의 이전 보고[12]에서 NHMEE 세포배양 후기에 증가를 보인 *MUC8* mRNA에 대하여 조사하였다. 그 결과 점액의 mRNA는 UTP로 자극하더라도 자극 후 24시간까지 큰 변화가 없었다. 저자들은 점액 mRNA 발현량이 24시간 이후에 변하는 지도 조사하였으나 자극 후 72시간에도 UTP에 의한 유전자의 변화는 없었다(data not shown). 따라서 사람 중이점막에서 UTP는 점액 유전자 발현의 증가 없이 단지 세포질내에 이미 만들어진 점액분비를 촉진시키는 분비촉진제(secretogogue)로서 작용함을 알 수 있었다.

결론적으로 본 연구를 통해 NHMEE 세포에서 $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$과 $P2Y_{12}$가 발현되고 있으며, 점액 유전자 발현의 증가 없이 UTP가 점액분비를 촉진하고 있음을 보여주고 있다.

UTP에 의한 점액의 과분비는 삼출성 중이염 환자에서 중이 삼출액의 점도를 증가시켜 만성화를 일으킬 수 있을 것이다. 그러므로, 중이점막에서 UTP에 의해 야기된 점액의 과분비에 대한 억제가 만성 삼출성 중이염의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이다.

중심 단어 : Uridine triphosphate · 중이 · 점막 · 점액.

본 연구는 2001년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Ralevic V, Burnstock G. *Receptors for Purines and Pyrimidines. Pharmacol Rev 1998;50:413-92.*
2) Lazarovski ER, Boucher RC. *UTP as an extracellular signaling molecule. News Physiol Sci 2001;16:1-5.*
3) Storey F. *The P2Y12 receptor as a therapeutic target in cardiovascular disease. Platelets 2001;12:197-209.*
4) Boucher RC. *Human airway ion transport. Part one. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:271-81.*
5) Boucher RC. *Human airway ion transport. Part two. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:581-93.*
6) Korngreen A, Priel Z. *Purinergic stimulation of rabbit ciliated airway epithelia: control by multiple calcium sources. J Physiol 1996;497:53-66.*
7) Kim KC, Lee BC. *P2 purinoreceptor regulation of mucin release by airway goblet cells in primary culture. Br J Pharmacol 1991;103:1053-6.*
8) Kim KC, Park HR, Shin CY, Akiyama T, Ko KH. *Nucleotide-induced mucin release from primary hamster tracheal surface epithelial cells involves the P2u purinoceptor. Eur Respir J 1996;9:542-8.*
9) Furukawa M, Ikeda K, Oshima T, Suzuki H, Yamaya M, Sasaki H, *et al. Effects of extracellular ATP on ion transport and [Ca^{2+}] in Mongolian gerbil middle ear epithelium. Am J Physiol 1997;272:827-36.*
10) Yen PT, Herman P, T van DA, Tan CT, Bourdure 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.*
11) Moon SK, Lim DJ, Lee HK, Kim HN, Yoo JH. *Mucin gene expression in cultured human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh) 2000;120:933-9.*
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 (stockh) in press.*
13) Chung MH, Choi JY, Lee WS, Kim HN, Yoon JH. *Compositional difference in middle ear effusion: mucous versus serous. Laryngoscope 2002;112:152-5.*
14) 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.*
15) 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.*
16) Communi D, Paindavoine P, Place GA, Parmentier M, Boeynaems JM. *Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. Br J Pharmacol 1999;127:562-8.*
17) von Kugelgen I, Wetter A. *Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000;362:310-23.*
18) Lethem MI, Dowell ML, Van Scott M, Yankaskas JR, Egan T, Boucher RC, *et al. Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;9:315-22.*
19) Jumblatt JE, Jumblatt MM. *Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. Exp Eye Res 1998;67:341-6.*
20) Thoronton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucin. J Biol Chem 1997;272:9561-6.*