

식이 폴리페놀들이
사람 호흡기 상피세포의
MUC5AC 유전자 발현과
사람 코점막의 생체 외 섬모 운동에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의학과

송기재

식이 폴리페놀들이
사람 호흡기 상피세포의
MUC5AC 유전자 발현과
사람 코점막의 생체 외 섬모 운동에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의학과

송기재

식이 폴리페놀들이
사람 호흡기 상피세포의
MUC5AC 유전자 발현과
사람 코점막의 생체 외 섬모 운동에
미치는 영향

지도교수 김경수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의학과

송기재

송기재의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 경 수 인

심사위원 용 태 순 인

심사위원 김 현 준 인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 끊임없는 관심과 배려, 그리고 세심한 지도를 베풀어주신 김경수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 논문의 작성과 심사에 많은 지도편달을 해주신 용태순 교수님, 김현준 교수님께도 진심으로 감사를 드리는 바입니다.

귀중한 자료를 얻을 수 있도록 많은 도움을 주신 김소연 연구원께 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 묵묵히 힘이 되어준 가족들에게 사랑의 마음을 전하며 이 논문을 바칩니다.

2008년 12월

송 기 재 올림

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
III. 결과	10
1. <i>MUC5AC</i> 유전자 발현의 변화.....	10
2. 세포 증식률의 변화.....	13
3. 섬모 운동의 변화.....	16
IV. 고찰	19
V. 결론	23
참고문헌	24
영문요약	27

표 차례

표 1. Change of IL- 1β -induced <i>MUC5AC</i> gene expression by polyphenols.....	11
표 2. Cell proliferation in treatment with polyphenols.....	14
표 3. Change of ciliary movement in treatment of polyphenols.....	17

그림 차례

그림 1. Change of IL- 1β -induced <i>MUC5AC</i> gene expression by polyphenols.....	12
그림 2. Cell proliferation in treatment with polyphenols	15
그림 3. Change of ciliary movement in treatment of polyphenols.....	18

<국문요약>

식이 폴리페놀들이 사람 호흡기 상피세포의 *MUC5AC* 유전자 발현과 사람 코점막의 생체 외 섬모 운동에 미치는 영향

식이 폴리페놀(Polyphenol)이란 우리가 섭취하는 음식 특히 식물에 포함되어 있는 폴리페놀을 일컫는데 최근 먹거리에 대한 관심이 높아지면서 이에 대한 연구가 활발하다. 이들은 항염증 (anti-inflammatory), 항산화(anti-oxidative), 항돌연변이(anti-mutagenic), 항암, 세포고사 유도 등의 작용을 하지만 폴리페놀이 코점막에서 발생하는 점액과분비나 섬모운동에 어떤 영향을 미치는가에 대해서는 연구가 미미한 실정이다. 이에 본 연구의 목적으로 첫째, 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 여러 식이 폴리페놀([6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin)을 처리하여 폴리페놀이 *MUC5AC* 유전자 발현을 억제하는 가를 알아보려고 하였다. 다음으로 세포의 증식을 억제하지 않고 *MUC5AC* 유전자 발현을 억제하는 농도로 폴리페놀을 사람 코점막에 처리하여 폴리페놀이 섬모운동에 미치는 영향을 보고자 하였다.

NCI-H292 세포주에 4종의 폴리페놀([6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin)을 각각 투여하였다. 이들이 *MUC5AC* 유전자 발현을 억제하는 최소농도를 real-time PCR법으로 알아본 결과, [6]-gingerol은 1 μ M, EGCG 20 μ M, quercetin 40 μ M, curcumin은 10 μ M이었으며, 실험한 폴리페놀들은 이 농도에서 세포증식을 억제하지 않았다. 정상 사람 코점막에서의 섬모운동 변화는 [6]-gingerol, quercetin, EGCG의 경우 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나

curcumin에서는 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 [6]-gingerol, quercetin, EGCG 등은 호흡기 상피세포의 점액분비를 효과적으로 억제하며 코점막 섬모운동은 정상적으로 유지하므로 임상적으로 이용 가능한 점액분비 억제물질로 생각된다.

핵심되는 말 : 식이 폴리페놀, *MUC5AC*, 생체 외 섬모 운동

식이 Polyphenol들이 사람의 호흡기 상피세포의 *MUC5AC* 유전자 발현과 사람 코점막의 생체 외 섬모 운동에 미치는 영향

<지도교수 김경수>

연세대학교 대학원 의학과

송기재

I. 서론

식이 폴리페놀(polyphenol)이란 우리가 섭취하는 음식 특히 식물에 포함되어 있는 폴리페놀을 일컫는다. 폴리페놀은 flavonoid, stilbene, lignan, phenolic acid 등의 4종으로 구분되는데 이 성분들은 식물의 이차 대사산물로서 자외선이나 곤충에 대한 방어기전에 중요한 역할을 한다.¹ 이중에서도 생강의 주요 활성성분인 6-gingerol, 녹차에 포함된 catechin 성분과 주요 구성 성분인 EGCG, 적포도주에 포함된 resveratrol과 quercetin, 카레에 포함된 curcumin, 콩에 포함된 genistein, indole-3-carbinol, 은행잎에 포함된 kaempferol, quercetin과 rutin, 감귤류에 포함된 hesperidine과 naringin 등을 포함하여 많은 성분이 존재한다.^{2,3} 인체가 섭취하는 양이 미국인의 경우 하루 1 g 정도로, flavonoid에 속한 flavonol의 경우 하루 20-25 mg을 섭취한다고 한다. 또한 flavonoid의 혈중농도가 10 μM 이하이며 정적상태(steady-state)의 농도는 1 μM 이하로 전체 폴리페놀의 농도는 이 이상으로 생각되고 있다.^{4,5} 이처럼 폴리페놀이

인체에 미치는 영향에 대해 최근 많은 연구가 행해지고 있으며
떡거리에 대한 관심이 높아지면서 이 방면의 연구가 더욱 활발해
지고 있다. 폴리페놀은 항염증(anti-inflammatory), 항산화(anti-
oxidative), 항돌연변이(anti-mutagenic), 항암, 세포고사 유도 등의
작용을 하며 이러한 작용의 기전으로 cyclooxygenase, lipoxygenase,
phospholipase A2, nitric oxide, NF- κ B 등의 억제 작용, non-
steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)의 유도
작용 등이 언급되고 있다.⁶ 그러나 폴리페놀이 사람 코점막에서
발생하는 점액과분비나 섬모운동에 미치는 영향에 대해서는 연구가
미미한 실정이다.^{7,8}

비염을 비롯한 급, 만성 부비동염, 기관지염과 기관지 천식 같은
염증성 기도 질환에서 과분비된 점액은 기도 점막의 점액섬모
운동능을 감소시키고 이차적인 세균 감염을 유발하여 다양한 호흡기
질환을 초래하게 된다. 이 때 점액의 과분비는 여러 종류의
사이토카인이나 펩타이드, 염증성 매개 물질이 직간접적으로 관여하여
*MUC5AC*나 *MUC8*과 같은 점액 유전자의 발현을 상향 조절시켜
일어나게 되는데,⁹ 대표적인 염증 유발 사이토카인인 IL-1 β 가
기도점막 상피세포에서 과다 분비되는 경우에는 기도 염증 반응이
더욱 촉발되는 것으로 알려져 있다.¹⁰ 또한 최근 사람 정상 코점막
상피세포 및 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(NCI-H292 세포주)에
대한 연구에서, IL-1 β 에 의해 유도되는 *MUC5AC*의 과발현이
ERK/p38 MAP kinase-MSK1-CREB 신호전달 체계의 순차적인
활성화에 의해 기도 상피세포에서 일어나는 것임이 밝혀진 후,¹¹ 점액
과분비 조절을 통한 염증성 기도 질환의 치료 전략에 새로운 관점을
제공하게 되었다. 현재까지 사람 호흡기 상피세포에서 점액 과분비

조절 물질로서 dexamethasone 혹은 budesonide가 점액 생산 및 점액 유전자의 발현을 억제한다는 연구 결과가 있으나,¹² [6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin과 같은 식이 폴리페놀 성분에 의한 기도 점액 과분비 조절에 대한 연구는 미흡한 실정이다.^{7,8,13,14,15,16}

이에 본 연구의 목적으로 첫째, 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포에 여러 식이 폴리페놀([6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin)을 처치하여 폴리페놀이 *MUC5AC* 유전자 발현을 억제하는가를 알아보고자 하였다. 다음으로 세포의 증식을 억제하지 않고 *MUC5AC* 유전자 발현을 억제하는 농도로 폴리페놀을 사람 코점막에 처치하여 폴리페놀이 섬모운동에 미치는 영향을 보고자 하였다. 궁극적으로 이 연구를 통해 효과적으로 *MUC5AC* 유전자를 억제하고 섬모운동에는 영향을 미치지 않거나 증강시키는 폴리페놀을 발굴하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

(1) 재료

사람 폐 점액상피양 암종 세포주(human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. EGCG, curcumin, quercetin은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서, [6]-gingerol은 Calbiochem Biochemicals (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. IL-1 β 는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

(2) 세포 배양

NCI-H292 세포주는 95%의 공기와 5%의 이산화탄소, 가습화된 환경에서 37°C의 온도로 10% fetal bovine serum과 2 mM L-glutamine, penicillin(100 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 분주 후 밤새 배양한 다음 세포를 24시간 동안 0.5% fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양한 후 실험하였다.

(3) 실험 조건

MUC5AC 유전자를 유도하기 위한 IL-1 β 의 농도는 기존 실험에서 밝혀진 10 ng/ml의 농도로 이용하였다. [6]-gingerol은 DMSO를 용매로 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M로 설정하였고, curcumin와 quercetin은 DMSO를 용매로 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M로 설정하였다. EGCG는 H₂O를

용매로 실험농도를 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M로 설정하였다. 6-well plate에 배양된 세포는 IL-1 β 를 처리하기 1시간 이전에 각 식이 polyphenol을 처리한 다음 IL-1 β 를 24시간 동안 처리하였다.

(4) Reverse transcriptase (RT)-PCR

전체 RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 각 조건으로 배양된 세포에서 얻었으며 전체 RNA에서 cDNA로의 역전사는 1 μ g/20 μ l의 전체 RNA를 random hexanucleotide primer와 Moloney murine leukemia virus 역전사효소(Gibco-BRL)를 이용하였고, 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 oligonucleotide 시발체(primer)는 *MUC5AC*의 GenBankTM sequence (GenBankTM accession number AJ001402)에 근거하여 5' primer CGACA ACTACTTCTGCGGTGC; 3' primer GCACTCATCCTTCCTGTCGTT를 사용하여 337 bp를 증폭하였다. 각 반응의 대조군으로 사용된 β_2 -microglobulin(β_2 M)의 oligonucleotide primer는 Clontech Laboratories(Palo Alto, CA, USA; 335 bp fragment)에서 구입하였다. *MUC5AC*의 중합효소 연쇄반응은 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성(denaturation) 과정과 60 $^{\circ}$ C에서 60초간 결합(annealing) 반응, 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 연장(extension) 반응을 35회 진행하였고 증폭된 PCR 산물은 2% 한천 겔에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 밴드를 관찰하였고, 이를 sequencing하여 염기 서열을 확인하였다.

(5) Real-time PCR 분석

Primer와 probe는 Perkin Elmer Life Sciences Primer Express software를 이용해 만들어 PE Biosystem에서 구입하였다. TaqMan PCR Universal PCR Master Mix (PE Biosystem, Foster City, CA, USA)와 실험조건은 생산자의 protocol을 이용하였다. 1 mg의 cDNA, primer 농도 800 nM의 oligonucleotides, 200 nM TaqMan hybridization probe 등을 25 μ l로 사용하였다. Real-time PCR의 probe는 5'-end에 carboxyfluoscein (FAM)으로 labelling 하였고, 3'-end에 quencher carboxytetramethyl fluoresceing (TAMRA)를 labelling 하였다. MUC5AC와 β 2-microglobulin의 primer와 TaqMan probe는 다음과 같다. MUC5AC(Forward : 5'-CAGCCACGTCCCCTTCAATA-3'; Reverse : 5'-ACCGCATTTGGGCATCC-3'; TaqMan probe : 6FAM-CCACCTCCGAGCCCGTCACTGAG-TAMRA), β 2-microglobulin(Forward : 5'-CGCTCCGTGGCCTTAGC-3', Reverse : 5'-GAGTACGCTGGATAGCCTCCA-3' ; TaqMan probe : 6FAM-TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGC-TAMRA) Real-time reverse transcription-PCR은 PerkinsElmer Life Science ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Foster City, CA, USA)을 사용하였다. MUC5AC mRNA의 상대적 양은 threshold method을 이용하여 comparative cycle로 정하였고 β 2M을 대조군으로 하여 normalization을 하였다. 통계분석은 ANOVA with post hoc test를 이용하여 p values <0.05를 유의한 것으로 하였다.

(6) 세포증식 분석

NCI-H292 세포주를 well당 2,000개씩 분주하여 96 well plate에서 16시간 동안 배양한 다음 각 조건으로 실험 후 세포증식 분석을 시행하였다. 분석은 Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay Kit (Promega Inc., Madison, WI, USA)를 사용하였다. 방법으로 kit에 포함된 tetrazolium 합성물 2 ml와 phenazine ethosulfate 100 μ l를 섞은 후 well당 20 μ l의 혼합 용액을 첨가하였다. 이 후 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 환경에서 96 well plate를 배양한 후 spectrophotometer(490 nm 파장)로 optical density(O.D.)를 측정하였다. 통계분석은 ANOVA with post hoc test를 이용하여 p values <0.05를 유의한 것으로 하였다.

(7) 섬모운동 횟수 검사

비,부비동내 염증이 없으며, 경첩형동 뇌하수체 수술, 비강내 조직 검사 혹은 코막힘으로 부비동 수술을 받는 환자 등에서 건강한 점막을 채취하여 incubating chamber에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하며 6시간 동안 안정화를 시킨 후 MUC5AC 발현을 억제하는 최소농도의 polyphenol을 각각 처리하여 시간대별(0, 3 시간, 6시간, 12시간, 24시간)로 inverted microscope로 관찰하였다. 섬모운동의 관찰은 섬모운동이 활발한 부분을 찾아 5군데 부분을 선정 후 관찰된 영상을 microscope용 digital camera로 녹화하여 영상처리용 전용 컴퓨터에 저장하였다. 이후 저장된 영상을 변환하여 ciliary beat frequency를 측정하는 program으로 섬모 운동 횟수를 측정하였다. 통계분석은 ANOVA with post hoc test를 이용하여 p values <0.05를 유의한 것으로 하였다.

III. 결과

(1) Polyphenol 에 의한 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 유전자 발현의 변화

각 Polyphenol을 처리한 이후 IL-1 유도MUC5AC 유전자 발현의 변화는 <표 1.>과 같다. Quercetin, EGCG, [6]-gingerol은 농도의존성으로 유전자 발현이 감소하였으나 curcumin의 경우 10 μ M에서는 MUC5AC가 감소하였으나 40 μ M에서는 오히려 MUC5AC가 증가하였다. 이러한 결과로 MUC5AC의 발현을 감소시키는 폴리페놀의 최소농도는 [6]-gingerol은 1 μ M, Quercetin은 40 μ M, EGCG는 20 μ M, Curcumin은 10 μ M농도로 결정하여 다음 실험에 이용하였다 (그림 1.).

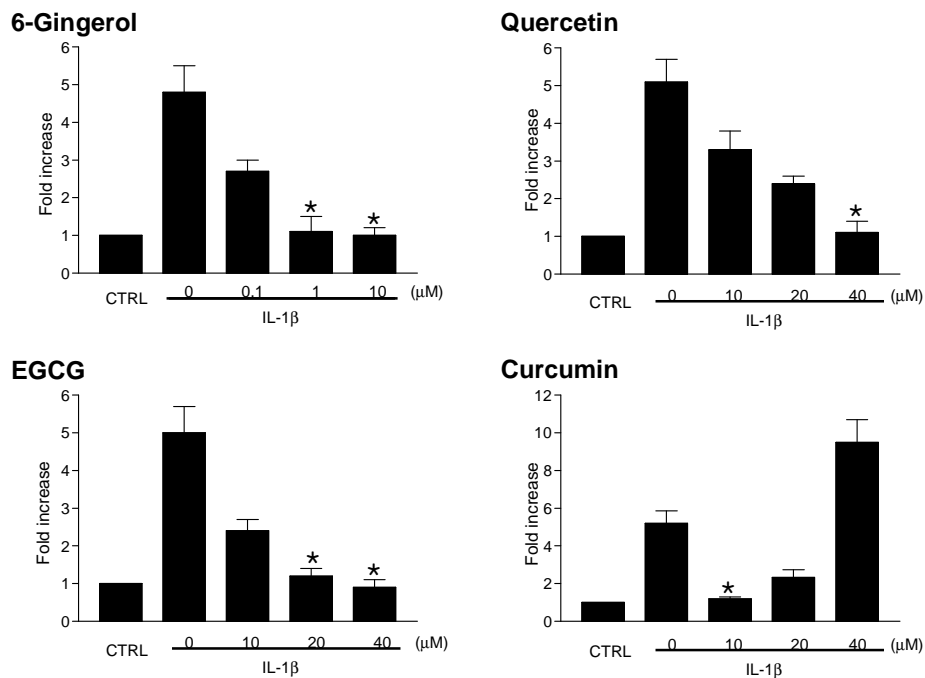
<Table 1.> Change of IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression by polyphenols

	0	0.1 μM	1 μM	10 μM
[6]-Gingerol	4.8 \pm 0.7	2.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2

	0	10 μM	20 μM	40 μM
Quercetin	5.1 \pm 0.6	3.3 \pm 0.5	2.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3
EGCG	5.0 \pm 0.7	2.4 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
Curcumin	5.3 \pm 0.5	1.2 \pm 0.1	2.3 \pm 0.4	9.5 \pm 1.2

Ratio: *MUC5AC* expression of polyphenol-treated cells in treatment with IL-1 β / *MUC5AC* expression of the control cells

Value: mean \pm standard deviation.



(Fig. 1.) Change of IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression by polyphenols

NCI-H292 cells were respectively pretreated with various concentrations of polyphenols for 1 h and then treated with 10 ng/mL of IL-1 β for 24 h. Real-time PCR for *MUC5AC* mRNA expression were performed on each group. Compared with cells treated only with IL-1 β (0 μ M), expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed by pretreatment with 1 μ M [6]-gingerol, 40 μ M quercetin, and 20 μ M EGCG and the suppression is dose-dependent. In 10 μ M curcumin-treated cells, expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed, but, in 40 μ M curcumin-treated cells, expression of *MUC5AC* mRNA is increased. * p<0.05 when compared with IL-1 β only-treated cells.

(2) 세포 증식 분석

세포 증식의 변화는 <표 2.>와 같다. Curcumin 40 μ M에서 $68.3\pm 3.6\%$ 로 생존 세포가 80%이하로 떨어진 것을 제외하면 다른 모든 조건에서는 세포 증식이 유의하게 감소하지 않아 상기 결정된 농도가 세포 증식에는 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다 (그림 2.)

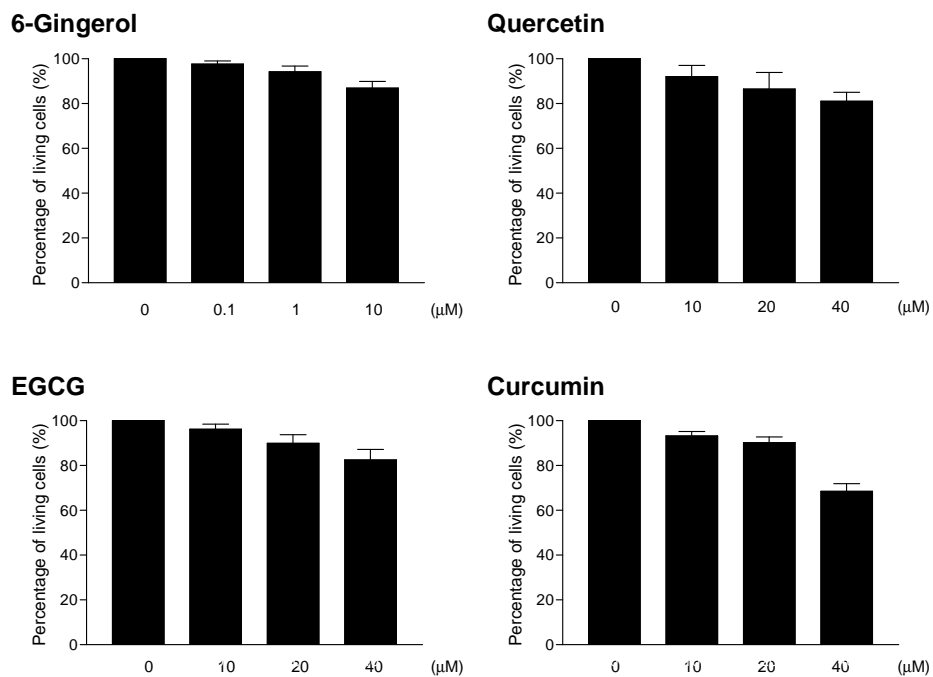
<Table 2.> Cell proliferation in treatment with polyphenols

	0.1 μM	1 μM	10 μM
[6]-Gingerol	97.5 \pm 1.5	94.1 \pm 2.5	86.8 \pm 2.9

	10 μM	20 μM	40 μM
Quercetin	92.8 \pm 4.7	86.3 \pm 7.5	81.0 \pm 4.1
EGCG	96.1 \pm 2.2	89.8 \pm 3.8	82.3 \pm 4.8
Curcumin	93.2 \pm 1.9	90.2 \pm 2.5	68.3 \pm 3.6

Cell proliferation: mean proliferation of experimental group/mean proliferation of control x 100. (%)

Value: mean \pm standard deviation.



(Fig. 2.) Cell proliferation in treatment with polyphenols

In all examined concentration except 40 μM of curcumin, [6]-gingerol, quercetin, EGCG, and curcumin don't damage cell proliferation.

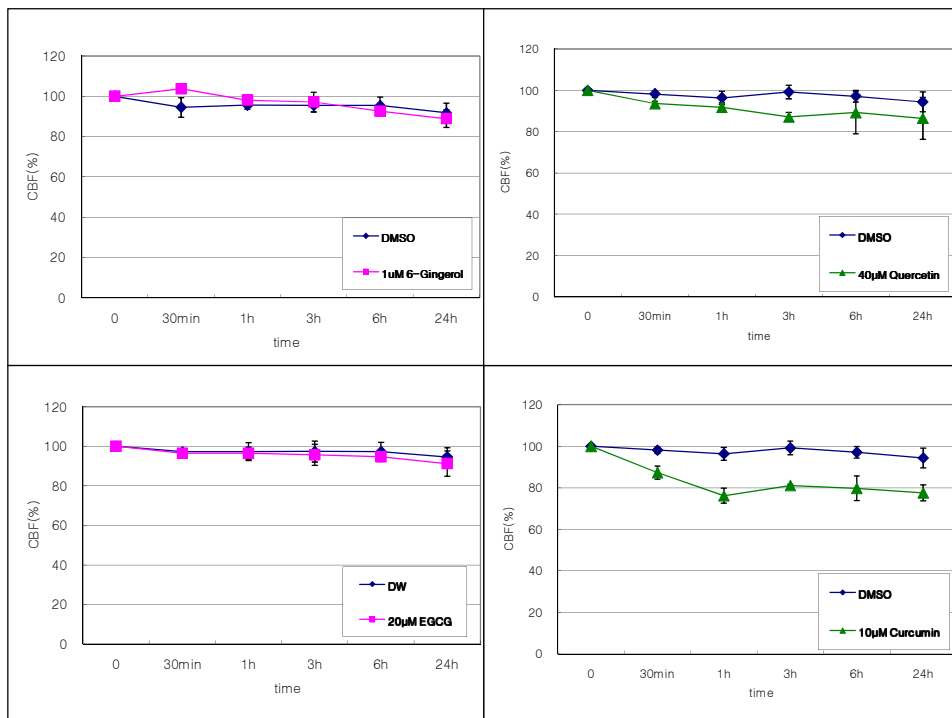
(3) 섬모 운동의 변화

MUC5AC 를 억제하는 폴리페놀의 최소농도를 정상 코점막에 각각 투여한 다음 섬모운동의 변화를 알아보았다. <표 3.>의 결과처럼 Quercetin, EGCG, [6]-gingerol은 30분에서 24시간까지의 모든 시간대에서 섬모운동의 변화가 보이지 않았다. 반면 curcumin의 경우 투여 1시간부터 유의하게 섬모운동이 대조군에 비해 감소하여 이후 모든 시간대에서 섬모운동이 감소하였다 ($p<0.05$) <표 3.> (그림 3.)

Material	Hour					
	0	0.5	1	3	6	24
[6]-Gingerol (1µM)	100	103.74±1.58	98.12±1.63	97.17±4.87	92.56±1.36	88.88±4.41
Quercetin (40µM)	100	93.57±1.10	91.76±2.21	87.14±2.19	89.24±10.29	86.45±10.16
EGCG (20µM)	100	96.49±1.40	96.49±3.04	95.68±5.32	94.74±2.50	91.27±6.36
Curcumin (10µM)	100	87.36±3.17	76.27±3.67	81.18±0.54	79.83±5.89	77.62±3.86

<Table 3.> Change of Ciliary movement in treatment of polyphenols

[6]-gingerol, quercetin, EGCG shows no significant decrease of ciliary movement, but curcumin shows significant decrease of ciliary movement decrease since 1 hour after treatment($p<0.05$)



(Fig. 3.) Change of Ciliary movement in treatment of polyphenols [6]-gingerol, quercetin, EGCG shows no significant decrease of ciliary movement, but curcumin shows significant decrease of ciliary movement decrease since 1 hour after treatment($p < 0.05$)

IV. 고찰

기도 점액의 과분비는 만성 부비동염, 천식 등과 같은 기도 염증 질환에서 나타나는 대표적인 병적 산물이다. 상기도 염증은 점액 분비를 증가시키는데, 여러 가지 염증성 매개 물질과 사이토카인이 직간접적으로 점액 분비를 촉진하게 된다. 현재까지 TNF- α , neutrophilic elastase, IL-4, IL-9 등과 같은 염증성 매개체는 점액 분비와 점액 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 그 중 IL-1 β 는 다양한 세포에서 분비되는 다기능의 염증 전구 사이토카인으로서 상기도 염증 반응 유도에 있어서 가장 중요한 매개체로 생각된다.⁹ 현재까지 알려진 점액 유전자로는 13 개가 있으며, 이중 호흡기에 관여하는 유전자로는 *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6*, *MUC7*, *MUC8* 등이 알려져 있는데 이중 *MUC5AC* 는 가장 중요한 분비성 점액유전자이다.¹⁷ 윤 등은 IL-1 β 에 의한 *MUC5AC* 유도 과정에 있어 ERK, p38, MAP kinase 를 통한 신호 전달 체계가 중요한 역할을 하며, IL-1 β 에 의한 점액 단백질의 발현은 전사 단계에서 조절됨을 밝힌 바 있다.^{10,11} 이에 본 실험에서는 다양한 식이 폴리페놀들을 이용하여 IL-1 β 에 의한 *MUC5AC* 발현의 변화를 살펴보고 *MUC5AC* 발현 감소를 유도하는 최소농도를 확인하여 해당 농도에서 섬모운동의 변화를 보았다.

실험 결과 배양된 NCI-H292 세포주에 대해 1 μ M, 10 μ M 의 [6]-gingerol 을 전처리할 경우 *MUC5AC* 의 발현이 유의하게 감소하였으며 해당 농도의 경우 세포 증식에는 유의한 변화를 야기하지 않았다. 이에 점액 유전자 발현을 억제하는 최소 농도인

1 μM 의 [6]-gingerol 을 사람 코점막 상피세포에 처리하여 섬모운동 회수의 변화를 실험한 결과 대조군과 비교 시 모든 시간대에서 유의한 섬모운동의 변화는 보이지 않았다. Quercetin 과 EGCG 는 각각 40 μM , 20 μM 에서 점액 유전자 발현을 감소시키기 시작하였으며 이 농도에서 세포 증식의 변화는 일어나지 않았다. 또한 섬모운동회수는 30 분-24 시간까지의 모든 시간대에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과는 *MUC5AC* 유전자 발현억제에 대해 NCI-H292 세포주에서 dexametasone 이 *MUC2* 와 *MUC5AC* 점액 유전자의 발현을 억제시켰다는 보고¹² 와 budesonide 가 IL-1 β 에 의해 항진된 *MUC2/5AC* 점액 유전자와 점액 단백질의 생성을 억제하였다는 보고^{18,19} 와 일치하는 결과였다. 또한 폴리페놀에 대한 다른 연구결과로 [6]-gingerol 과 EGCG 에 대한 결과와도 점액 유전자 억제에 대해서 일치하였다.^{13,14,15,16} [6]-gingerol 의 경우 기존의 연구에서는 10 μM 에서 *MUC5AC* 유전자 발현억제가 보였는데 이는 세포주는 같으나 RT-PCR 을 이용한 실험으로 본 실험에서 이용한 real-time PCR 이 민감도가 뛰어나므로¹⁰ 본 결과에서는 1 μM 부터 억제가 보인 것으로 생각한다. 한편 EGCG 의 경우 다른 연구에서는 사람 정상 코점막 상피세포를 대상으로 실험을 하여 50 μM 부터 *MUC5AC* 유전자 발현억제가 보였고 본 실험은 세포주를 이용하여 10 μM 부터 억제가 보인 것으로 보인다.¹⁰ 즉, 정상 세포의 경우 항상성이 있어 약물에 대한 반응이 세포주보다 높은 농도를 요구하거나 반응 시간이 늦어 이러한 결과가 보인 것으로 생각한다.

섬모운동의 경우 가능하면 섬모운동을 항진시켰으면 하는 것이 실험 전의 생각이었다. 그러나 섬모운동에 대한 참고문헌에 의하면 대부분의 약물들은 섬모운동을 저하시키며 섬모운동이 증가되는 것도 오히려 비강 내의 기능을 악화시키므로 섬모운동의 운동이 정상적으로 유지되는 것이 코의 정상 기능을 유지하는 면에서는 더욱 도움이 된다 하겠다.^{20,21} 본 실험 결과도 이러한 측면에서 추후 임상 적용이 가능하다고 생각한다.

한편 curcumin 은 10 μ M 에서는 유의하게 IL-1 β 유도 *MUC5AC* 유전자 발현의 감소를 유도하였으나 40 μ M 의 농도에서는 오히려 점액 유전자 발현이 증가하는 결과를 보였다. 따라서 본 실험에서는 점액 유전자 발현의 감소를 보였던 10 μ M 농도에서 세포증식 및 섬모운동 회수를 확인하였다. 세포 증식률의 변화는 $93.2\pm 1.9\%$ 로 이 농도에서는 유의한 세포증식 억제를 보이지 않으므로 이 농도로 섬모운동의 변화를 보았다. 섬모운동은 30 분째부터 하강 소견을 보이고 1 시간째 최대 75%정도로 하강하여 유의한 섬모운동 감소를 보였고 이러한 소견은 이후 24 시간까지 지속되었다. curcumin 에 의한 점액분비 감소와 증가에 대해서는 curcumin 은 카레의 매운 맛을 내는데 주요한 성분이므로 저농도에서는 분비가 억제되나 높은 농도에서는 자극에 의해 점액이 증가하는 것으로 생각되나 이에 대해서는 추후 연구가 필요하리라 본다. 점액분비에 대한 다른 연구에서는 curcumin 100 μ M 에서 점액분비가 증가하였다고 하여,⁸ 본 연구의 20, 40 μ M 에서의 결과와 일치하였다. 이처럼 curcumin 의 점액분비 감소와 증가에 대한 영향은 그 고유한 성질에 의한 것으로 생각되며 이에 대해서는 추가 연구가 필요하리라 본다. 이러한

점액의 분비 증가는 감귤류의 주요한 폴리페놀인 hesperidine 에서도 관찰되어 각 성분의 고유한 성질임을 알 수 있었다.⁷ 또한 본 실험결과에 의하면 curcumin 은 섬모운동을 저하시켜 코의 기능저하를 야기할 수 있으므로²² 이의 임상적 사용에 부정적으로 작용한다 하겠다.

이러한 결과를 종합하면 [6]-gingerol, quercetin, EGCG 등은 섬모운동에 변화를 주지 않고 점액 분비를 감소시키는데 유용할 것으로 생각하나, curcumin 은 섬모운동에 감소를 야기하므로 임상 응용에 문제가 있으리라 생각한다.

V. 결론

[6]-gingerol, quercetin, EGCG 등은 호흡기 상피세포의 점액분비를 효과적으로 억제하며 코점막 섬모운동은 정상적으로 유지하므로 임상적으로 이용 가능한 점액분비 억제물질로 생각된다.

<참고문헌>

1. Cragg GM, Newman DJ, Weiss RB. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Semin Oncol* 1997;24:156-63.
2. P. M. Dewick, The Biosynthesis of shikimate Metabolites, *Natural Product Reports* 1995;12:579-607.
3. E. Matuschek, U. Svanberg. Oxidation of polyphenols and the effect on in vitro iron accessibility in a model food system. *Journal of Food Science* 2002;67(1):420-424.
4. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117-91.
5. Sampson L, Rimm E, Hootman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavane intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 2002;102:1414-20.
6. Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *J Yonsei Med* 2005;46:585-596.
7. Lee CJ, Lee JH, Seok JH, Hur GM, Park JS, Bae SH et al. Effects of betaine, coumarin, and flavonoids on mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial cells. *Phytother. Res.* 2004;18:301-305.
8. Lee CJ, Lee JH, Seok JH, Hur GM, Park YC, Seol IC et al. Effects of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells. *Planta Med.* 2003;Jun 69(6):523-6
9. Kim HU, Kim CH, Lee YH, Lee JG, Yoon JH. Expression of *MUC5AC* and *MUC8* mRNA in human nasal mucosa. *Korean J Otolaryngol* 2001;44:490-4.
10. Kim YD, Kwon EJ, Cho JS, Lee JE, Woo HJ, Beak SH et al. Regulation of IL-1 β -mediated *MUC2* gene and mucin in human airway epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2002;45:35-40
11. Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Yoon JH et al. Interleukin-

- 1 β and tumor necrosis factor- α induce *MUC5AC* overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:23243-23250.
12. Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, et al. Dexamethasone suppresses mucus production and *MUC-2* and *MUC-5AC* gene expression by NCI-H292 cells. *Am J Physiol* 1996;271:484-488.
 13. Chang JH, Kim JH, Lee KW, Cho CI, Chun JH, Kim KS. Suppression of IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression by Ginkgo biloba extract(EGb761) in human airway epithelial cells. *Korean J Rhinology* 2007;14(1):49-55
 14. Kim JH. [6]-gingerol suppresses IL-1 β -induced *MUC5AC* gene expression in human airway epithelial cells via both ERK and p38 MAPK signal transduction pathways. Yonsei university;2006
 15. Nam JI. Suppression of *MUC5AC* gene expression by the components of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) in human airway epithelial cells. Yonsei university;2008
 16. KIM HJ, Park SH, Park SY, Moon Uy, Lee BD, Yoon SH, Lee JG, Beak SJ, Yoon JH. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 β -induced *MUC5AC* gene expression and *MUC5AC* secretion in normal human nasal epithelial cells. *J Nutr Biochem*. 2008;19:536-544
 17. Yoon JH, Park IY. Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. *Rhinology* 1998;36:146-52
 18. Kim YD, Cho JS, Chang KY, Sin JH, Song SY, Yoon SK. Budesonide down-regulates IL-1 β -mediated *MUC2/MUC5AC* genes expression and mucin secretion in human airway epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2002;45:873-7.
 19. Kim YD, Kwon EJ, Kwon TK, Baek SH, Song SY, Suh JS. Regulation of IL-1 β -mediated *MUC2* gene in NCI-H292 human airway epithelial cells.

- Biochem Biophys Res Commun 2000;274:112-16.
20. Wyatt Todd A., Forget Mary A., Sisson Joseph H. Ethanol stimulates ciliary beating by dual cyclic nucleotide kinase activation in bovine bronchial epithelial cells. *The American Journal of Pathology* 2003;vol.163:1157-1166
 21. Braverman I, Wright ED, Wang CG et al. Human nasal ciliary-beat frequency in normal and chronic sinusitis subjects. *J Otolaryngol* 1998;27:145-152
 22. Joki S, Toskala E, Sanno V. Correlation between ciliary beat frequency and the structure of ciliated epithelia in pathologic human nasal mucosa. *Laryngoscope* 1998;108 :426-430

Abstract

Effects of dietary polyphenols on expression of *MUC5AC* gene in respiratory epithelial cells and on ciliary movement in human nasal mucosa

Kee Jae Song

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

1. Background and objective

Dietary polyphenols have been widely consumed in food, and their anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-mutagenic activities have been recently studied. However, the effect on mucin hypersecretion or mucociliary movement of dietary polyphenol has not been elucidated yet. Therefore, this study was to investigate whether dietary polyphenols ([6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin) inhibit *MUC5AC* gene expression, and if so, whether they would have effect on the ciliary movement of human nasal mucosa.

2. Material and method

After NCI-H292 cells had been treated with IL-1 β (10 ng/ml) and pretreated with 4 different dietary polyphenols ([6]-gingerol, EGCG, curcumin, quercetin), the mRNA expression of *MUC5AC*

was determined by real-time polymerase chain reaction. Normal nasal mucosa was obtained during sphenoid sinusotomy and treated with minimal inhibitory concentration of each polyphenol. Ciliary movement was assessed via inverted microscope and computerized program.

3. Result

Minimal inhibitory concentration of *MUC5AC* gene expression in each polyphenol was found as following; [6]-gingerol 1 μM , EGCG 20 μM , quercetin 40 μM , and curcumin 10 μM . Each polyphenol did not influence cell proliferation at this minimal inhibitory concentration. In assessment of ciliary movement, [6]-gingerol, quercetin, EGCG did not show any difference between control group and experiment group, but curcumin showed decrease of ciliary movement.

4. Conclusion

[6]-gingerol, quercetin, and EGCG suppress *MUC5AC* gene expression and maintain normal ciliary movements. Therefore, these polyphenols may be used as anti-hypersecretory agents and the further clinical study will be needed.

Key Words : polyphenol, *MUC5AC*, ciliary movement