

사람 정상 코점막 상피세포에서
배양기간에 따른 분비 및
섬모세포로의 분화

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 정 준

사람 정상 코점막 상피세포에서
배양기간에 따른 분비 및
섬모세포로의 분화

지도 윤 주 현 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 정 준

이정준의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

본 연구를 시작하여 논문을 완성하기까지 시종일관 아낌 없는 조언과 사랑과 격려로 지도해 주신 윤주현 선생님께 진심으로 감사 드립니다. 논문의 심사를 위해 수고해 주신 이원상 선생님, 신동환 선생님, 김응권 선생님, 성제경 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험의 진행과 연구 과정에 도움을 주신 문형진 선생님, 김창훈 선생님, 김성식 선생님께 감사의 뜻을 전합니다. 항상 따뜻한 마음으로 격려와 도움을 주신 이비인후과교실 선생님들과 의국원 여러분께도 감사드립니다.

지금의 저를 낳아주시고 길러주신 부모님과 좋은 아내를 허락하신 장인, 장모님께도 고마움과 사랑의 마음을 전하며 부족한 저를 새로운 연구의 세계에 눈뜨게 해주신 윤주현 선생님께 다시 한번 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 저를 항상 사랑으로 도와주고 격려해 주는 아내와 저의 보물인 태환, 현지와 이 기쁨을 함께 하고자 합니다.
감사합니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	3
1. 사람 정상 코점막 상피세포의 증식, 계대배양 및 냉동보관	3
2. 상피세포의 분화유도를 위한 air-liquid interface 배양	3
3. 형태학적 관찰	4
4. 면역세포화학염색을 통한 섬모세포와 분비세포의 구성비 측정	4
5. 점액 및 리소자임의 면역적 검출 및 정량	4
6. 점액과 리소자임의 mRNA 발현을 위한 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)	5
III. 결 과	6
1. 배양기간에 따른 섬모세포의 전자현미경적 형태변화	6
2. 배양기간에 따른 분비 및 섬모세포의 구성비	6
3. 배양기간별 점액 및 리소자임 단백질 분비의 정량	7
4. 배양기간별 점액 및 리소자임 mRNA 발현의 변화	8
IV. 고 찰	10
V. 결 론	12
참고문헌	12
영문요약	14

그림 차례

- 그림 1. 배양된 사람 코점막 상피세포의 주사전자현미경 소견 6
- 그림 2. 배양된 상피세포의 면역조직화학적 염색 소견 7
- 그림 3. 배양기간에 따른 섬모세포와 분비세포의 구성비 7
- 그림 4. 배양기간에 따른 점액과 리소자임의 분비량 8
- 그림 5. 배양기간에 따른 점액과 리소자임 mRNA의 발현 9

국문요약

사람 정상 코점막 상피세포에서 배양기간에 따른 분비 및 섬모세포로의 분화

호흡기 상피세포를 배양함에 있어 배양기간에 따라 세포의 분화정도, 세포의 형태, 점액유전자의 발현양상이 다를 수 있으므로 연구목적에 따라 적절한 처치시기를 결정하기 위해서는 이를 아는 것이 중요하다. 본 연구는 사람 정상 코점막 상피세포를 배양하여 섬모세포로 분화하는가를 알아보고 만약 섬모세포로 분화한다면 배양기간에 따라 섬모세포와 분비세포의 구성비율이 어떻게 변하는지를 알아보고자 하였으며, 또한 배양기간에 따른 점액과 리소자임의 분비량과 그 유전자의 발현을 알아보고자 하였다. 사람 정상 코점막을 계대배양하여 연구하기에 충분한 passage-2 cell을 얻은 후 이의 분화를 유도하기 위하여 air-liquid interface법으로 장기간 배양하였으며 합류를 이룬 후 2일, 1주, 2주, 4주에 배양된 세포의 형태학적 관찰 및 면역조직화학적 염색을 시행하였고, 각 배양시기마다 배양된 세포의 상층에서 24시간 동안 분비된 분비물을 채취하여 점액과 리소자임의 양을 immunoblotting으로 정량하였으며, 각 배양시기별로 세포에서 추출한 mRNA를 RT-PCR을 이용하여 발현시켰다.

섬모세포는 합류 후 2일째에는 관찰되지 않았고, 1주부터 관찰할 수 있었으며 배양기간별 구성비율은 1주에 $3.1 \pm 0.2\%$, 2주에 $7.4 \pm 0.5\%$, 4주에 $14.5 \pm 0.6\%$ 로 배양기간이 길어질수록 증가하는 양상을 보였다. 분비세포는 합류 후 2일째에 $35.6 \pm 2.8\%$, 1주에 $32.8 \pm 7.8\%$, 2주에 $32.8 \pm 2.5\%$, 4주에 $49.4 \pm 1.4\%$ 의 구성비를 보였으며 2주까지는 배양기간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 4주째에 약간 증가하였다. 각 배양기간별로 채취한 점액의 분비량은 합류 2일째에는 $69.0 \pm 9.7 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 1주째에 $147.1 \pm 12.4 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 2주째에 $473.0 \pm 36.8 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 4주째에 $459.5 \pm 62.2 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ 로 합류를 이룬 후 2주째에 급격히 증가하는 양상을 보이다가 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다. 리소자임의 분비량은 합류 2일째에 $122.3 \pm 17.2 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 1주에 $286.6 \pm 19.8 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 2주에 $342.6 \pm 25.6 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, 4주에 $684.2 \pm 53.4 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ 로 배양기간에 따라 계속 증가하는 양상을 보였다. RT-PCR을 통해 알아본 점액과 리소자임 mRNA 발현을 알아본 결과 합류 1, 2주째는 MUC5AC와 MUC5B mRNA가 주로 발현되었으며 상대적으로 MUC8과 리소자임 mRNA의 발현은 약한 반면, 합류 4주째에는 MUC5AC mRNA의 발현이 약해지며 MUC5B, MUC8, 리소자임 mRNA의 발현이 증가하는 양상이었다.

결론적으로 사람 코점막 상피세포를 배양함에 있어 배양기간에 따라 다른 특성을 보이므로 연구목적에 따라 처치의 시기가 달라져야 함을 알 수 있으며 충분히 분화된 사람 코점막 상피세포에서 MUC5B와 MUC8 유전자가 점액분비에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 점액섬모분화, 코점막 상피세포, 분비세포, 섬모세포, 점액

사람 정상 코점막 상피세포에서 배양기간에 따른 분비 및 섬모세포로의 분화

<지도 윤 주 현 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 정 준

I. 서 론

호흡기 상피세포에서 흔히 일어나는 점액과분비는 각종 비염이나 부비동염과 같은 상기도 질환의 공통적인 현상이다. 상기도는 기저세포와 여러 가지 종류의 분비세포와 섬모세포로 구성된 위중층섬모상피세포로 이루어져 있으며, 이러한 호흡기 상피세포 중 기도점액을 분비하는 주된 세포 두 가지는 점액(mucin)을 분비하는 점액성 분비세포와 리소자임, 락토페린, secretory IgA, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) 등을 분비하는 장액성 분비세포이며 이러한 점액들은 기도상피세포에서 능동적으로 만들어져 분비된다.

기도 상피세포의 배양은 분화된 기도상피세포의 기능과 환경오염물질, 세균이나 바이러스, 화학적 발암물질 등의 영향을 연구하는 데에 필수적이며, Gray 등¹은 사람 정상 하기도 상피세포를 계대배양하여 passage-2(P-2) 기도 상피세포들이 분비물의 분비기전이나 분화를 연구하기에 가장 적합하다고 보고하였다. 한편 기도질환의 발병빈도를 보면 상기도 질환들이 하기도 질환에 비해 훨씬 높음에도 불구하고 상기도 상피세포에 대한 연구는 비용에서 배양된 일차상피세포를 이용한 일부 연구가 있었을 뿐이며 계대배양을 통하여 체계적인 연구는 미흡한 실정이었다.

상기도 점막에 대한 여러 가지 염증성 매개물이나 화학적 발암물질의 영향을 연구하는 데에 있어서 사람 코점막을 배양하여 이용하는 것은 아주 중요한 방법중의 하나이며 최근 각광받고 있는 실험방법으로서 윤 등²은 정상 성인 코점막을 계대배양하여 분비능력을 온전히 유지하는 데에 성공하였으며, passage-2 정상 성인 코점막이 본래의 코점막의 특성을 유지하고 있어 상기도 세포의 생물학적 연구에 적절하다고 보고하였다.

사람 코점막을 배양함에 있어서 배양기간에 따른 세포의 분화정도, 세포의 형태, 점액유전자의 발현양상을 아는 것이 중요한데, 이는 배양기간에 따라 이런 특성들이 변화할 수

있기 때문이다. 따라서 같은 방법으로 실험을 했다고 해도 재료로 사용한 세포의 배양기간이 다르면 실험결과에 많은 영향을 미칠 수 있다.

본 연구의 목적은 계대배양된 코점막 상피세포가 섬모상피세포로의 분화능력을 가지고 있어서 실제로 섬모상피세포의 수가 증가하는지를 알아보고 만약 섬모상피세포의 수가 증가한다면 배양기간에 따른 섬모상피세포와 분비세포의 비율을 측정하고자 하였으며, 또한 점액과 리소자임의 분비 및 유전자 발현을 알아보는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 사람 정상 코점막 상피세포의 증식, 계대배양 및 냉동보관

비중격 만곡증으로 수술받는 환자의 비강에서 하비갑개의 코점막을 채취하여 1% Pronase (type 14)가 포함되어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, NY, U.S.A.)와 Ham's F12 nutrient mixture (F12, Gibco, NY, U.S.A.)의 1 : 1 혼합용액에서 18시간 동안 처치하여 상피세포를 분리하였다. 이를 플라스틱 용기에 평판한 후 37°C 배양기에서 60분간 배양하여 섬유모세포 등을 제거하고 다시 플라스틱 용기에 평판한 후 배양하였다. 배양액으로는 bronchial epithelial growth media (BEGM)을 사용하였으며 hydrocortisone (0.5µg/ml), insulin (5µg/ml), transferrin (10µg/ml), epinephrin (0.5µtriiodothyronine (6.5 ng/ml), gentamycin (50µamphotericin B (50 ng/ml), epidermoid growth factor (25 ng/ml), all-transretinoid acid (10^{-7} M), bovine serum albumin (1.5µg/ml), bovine pituitary extract (1% vol/vol)을 배양액에 추가하였다. 배양액은 평판 하루 후에 갈아주었으며, 그 후로는 2일에 한번씩 갈아주었다. 80% 합류(confluency)를 이루는 시점에서 trypsin/EDTA를 이용하여 세포들을 플라스틱 용기로부터 분리시켜 단세포로 유리시킨 후 세포의 수가 2,000 cells/cm² 이 되도록 희석하여 플라스틱 배양용기에 이차배양을 하였으며, 이 passage-2 세포가 70~80%의 합류를 이루었을 때 다시 단세포로 만들어 액화 질소에 1.8×10^6 cell/vial로 냉동보관하였다.

2. 상피세포의 분화유도를 위한 air-liquid interface (ALI) 배양

세포의 분화를 위해서 반투과성막으로 상하가 구분된 배양기(Transwell-clear, Costar Corp., Cambridge, MA, U.S.A.)에 BEBM과 DMEM을 1 : 1로 혼합한 무혈장 배양액을 넣고, 냉동 보관된 1×10^5 개의 인체 정상 코점막 상피세포(normal human nasal epithelial cells, passage-2)를 부유하여 평판하였다.³ 이때 배양액에 첨가된 호르몬과 각종 성장인자들은 epidermoid growth factor를 25 ng/ml에서 0.5 ng/ml로 조정한 것 이외에는 계대 배양시와 동일하게 하였다. 세포들은 첫 9일간은 배양액에 잠긴 상태로 두며 배양액은 위 및 아래쪽 부분을 배양 시작 후 1일과 이후 격일 간격으로 갈아주었다. 9일간 배양액에 잠긴 상태로

배양한 후 위쪽 배양액을 제거하여 air-liquid interface (ALI)를 형성하여 세포의 상부를 공기에 노출시켰으며 아래쪽 배양액은 매일 교환하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂에서 진행하였다. 배양기간은 100% 합류를 이룬 후 2일, 1주일, 2주일, 4주일로 하였으며, 각 시기 당 3 well을 배양하였고 동일한 배양을 3회 반복하였다.

3. 형태학적 관찰

코점막 상피세포를 각 배양기간 마다 한 well을 10% 중성포르말린에 고정한 후 2% 아가로스젤에 샌드위치형으로 넣어 굳힌 후 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 절단하였다. 절단된 조직들은 H & E 염색을 실시하여 세포의 분화 정도와 섬모세포의 존재를 확인하였다. 또한 각 배양기간마다 세포의 형태를 주사전자현미경(SEM; H-800, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 이를 위해서 chamber slide에 배양된 세포를 4°C의 2.5% glutaraldehyde에 4~6시간 고정시킨 후 0.1 M 인산 완충용액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 2시간 다시 고정한 후 탈수과정을 거쳐 critical point drying 후 금도금(300 μ m thickness)하여 관찰하였다.

4. 면역세포화학염색을 통한 섬모세포와 분비세포의 구성비 측정

각 배양시기마다 10⁵개의 세포로 cytopsin slide를 만든 후 4°C의 아세톤 : 메틸알코올 1 : 1 용액에 고정 후 섬모세포와 분비세포의 구성비를 확인하기 위해 면역화학적 염색을 시행하였다. 섬모세포의 염색을 위해서는 α -tubulin에 대한 단클론항체(1 : 1000, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하였으며 분비세포는 점액에 대한 단클론항체인 H6C5 (1 : 1000, a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, U.S.A.)를 이용하여 검출하였다. α -tubulin에 대한 항체 및 H6C5에 양성인 세포의 비율을 측정하기 위하여 총 1,000개의 세포 중 양성인 세포의 수를 세어 측정하였다.

5. 점액 및 리소자임의 면역적 검출 및 정량

각 배양시기마다 배양된 세포의 상층에서 24시간동안 채취된 분비물에서 점액과 리소자임의 양을 immunoblotting으로 정량하였다. 순수 인체점액(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, U.S.A.)과 리소자임(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 표준으로 사용하였으며 점액에 대한 일차항체로는 단클론항체인 H6C5 (1 : 1000, a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, U.S.A.)를 사용하였고, 리소자임에 대한 일차항체로는 다클론항체인 rabbit anti-serum항체(1 : 1000, Dako, Carpinteria, U.S.A.)를 사용하였다. 채취된 분비물과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막에 적용하여 일차항체와 반응시킨 후 horse-radish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG에 반응시켰으며, chemiluminescence (ECL kit, Amersham, Buckinghamshire,

U.K.)로 발색시켰다. Standard curve를 선형회귀분석을 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색 정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 분비물의 실험결과를 평균±표준편차로서 나타냈으며, 통계학적 처리는 Student *t*-test로 하였다.

6. 점액과 리소자임의 mRNA 발현을 위한 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)

점액의 mRNA level이 northern blot에 의해 신뢰성 있게 검출이 되지 않아 Gusman 등⁴이 보고한 RT-PCR을 사용하였다. 3가지 점액유전자(MUC5AC, MUC5B, MUC8)와 리소자임 그리고 대조유전자로 사용한 β -2 microglobulin (β -2M)의 mRNA에 대하여 Gene Amp PCR Kit (Perkin Elmer Biosystem, Foster City, CA, U.S.A.)와 Gene Amp PCR system 2,400 (Perkin Elmer Biosystems)을 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 방법을 간단히 소개하면 각 배양 세포에서 추출된 total RNA ($1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$)를 random primers와 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용해 cDNA로 역전사(RT)시켰다. 이때 생성된 cDNA $4\mu\text{l}$ 를 취하여 (β -2M의 경우는 $0.4\mu\text{l}$) 최종농도가 AmpliTaq DNA polymerase (QIAGEN, Valencia, CA, U.S.A.)는 2.5 U/ $100\mu\text{l}$, primer는 0.2 mM, MgCl_2 는 1.5 mM이 되도록 혼합한 후 이를 증폭시켰다. 이때 사용한 oligonucleotide primer는 사람 MUC5AC (Genbank accession #U06711, 5 primer: TCCGGCTCATCTTCTCC; 3 primer: ACTTGGGCACTGGTGCTG)와 MUC5B (Genbank accession # Z72496, 5primer: ACTCCAGAGACTGTCCACAC; 3 primer: TACCACTGTCTGTGTGCTA)와 MUC8 (Genbank accession # U14383, 5primer: ACAGGGTTTCTCCTCATTG, 3 primer: CGTTTATTCAGCACTGTTC)에 대한 이미 발표된 염기배열을 이용해, MUC5AC는 680 bp, MUC5B는 388 bp, MUC8은 239 bp로 디자인하였다. 대조유전자로 사용한 β -2 microglobulein (β -2M)의 primer는 335 bp를 만드는데 Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 반응물의 증폭주기는 denaturation은 95°C 에서 1분간, annealing은 MUC5AC, MUC5B, β -2M은 60°C 에서 1분간, MUC8과 리소자임은 55°C 에서 1분간 시행하였으며 extension은 72°C 에서 1분간 시행하였다. 각 증폭주기를 MUC5AC와 MUC8은 35회, MUC5B는 27회, 리소자임은 25회 그리고 β -2M은 30회 반복하였다. 최종 산물이 mRNA로부터 생기고 genomic DNA 오염이 없었다는 것을 증명하기 위해 RT reaction에서 reverse transcriptase를 생략하여 음성대조군으로 삼았다.

PCR 산물을 50 ng/ml ethidium bromide가 포함된 2% Seakem agarose gel (FMC Bio-Products, Rockland, ME, U.S.A.)에서 1시간 동안 전기영동으로 분리한 후 CSC Chemiluminescence Detection Module ver 1. 0(Raytest, Straubenhardt, Germany)로 band의 형광상태를 측정하였다.

III. 결 과

1. 배양기간에 따른 섬모세포의 전자현미경적 형태변화

전자현미경으로 관찰한 결과 합류를 이룬 후 1주일째부터 섬모세포의 분화가 관찰되기 시작하여 합류 2주일 후에는 다수의 분화세포가 관찰되었고 합류 4주째에는 그 수가 현저히 증가되어 있었고, 정상적인 섬모를 관찰할 수 있었다(그림 1).

2. 배양기간에 따른 분비 및 섬모세포의 구성비

Cytospin 슬라이드에서 면역조직화학적염색을 시행한 결과 β -tubulin에 대한 항체에 양성 을 보이는 섬모세포(그림 2A)는 합류 후 2일째에는 관찰되지 않았으나 1주일째에는 전체 세포중 섬모세포의 비율이 $3.1\pm 0.2\%$, 2주일째에는 $7.4\pm 0.5\%$, 4주일째에는 $14.5\pm 0.6\%$ 로 배양 시기가 지날수록 증가하는 양상을 보였다(그림 3A). 한편 H6C5에 양성반응을 보이는 분비세포(그림 2B)의 비율은 합류 2일째에는 $35.6\pm 2.8\%$, 1주일째에는 $32.8\pm 7.8\%$, 2주일째

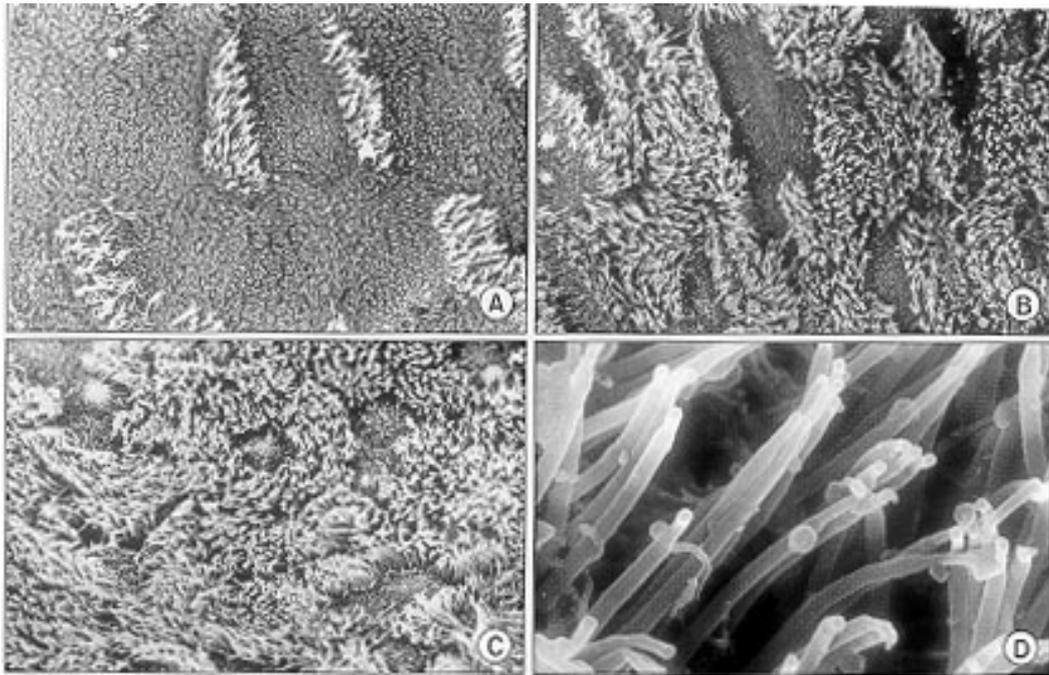


그림 1. 배양된 사람 코점막 상피세포의 주사전자현미경 소견. A. 합류 후 1주째의 사진으로 섬모 세포가 처음 관찰됨($\times 3,500$). B. 합류 후 2주째의 소견. 섬모세포의 증가가 관찰됨($\times 3,500$). C. 합류 후 4주째의 소견. 현저히 증가된 섬모세포의 모습이 관찰됨($\times 3,500$). D. 확대한 소견으로 정상적인 모습의 섬모가 관찰됨($\times 35,000$).

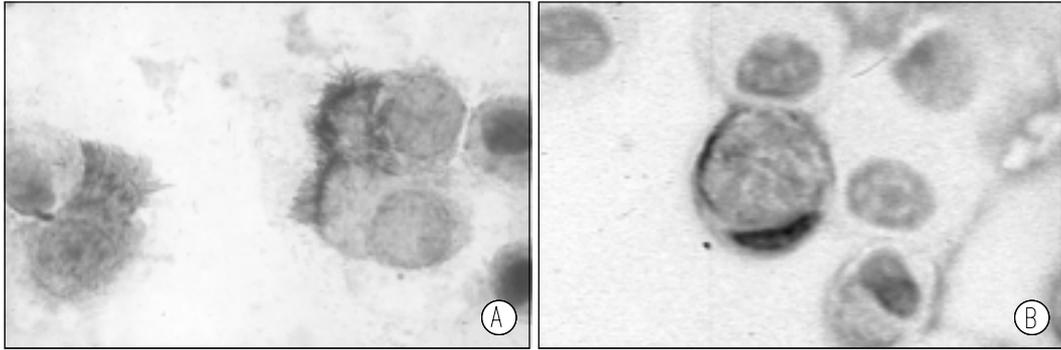


그림 2. 배양된 상피세포의 면역조직화학적 염색 소견. A. α -tubulin에 대한 항체에 양성을 보이는 섬모세포($\times 1,000$). B. H6C5에 양성반응을 보이는 분비세포($\times 1,000$).

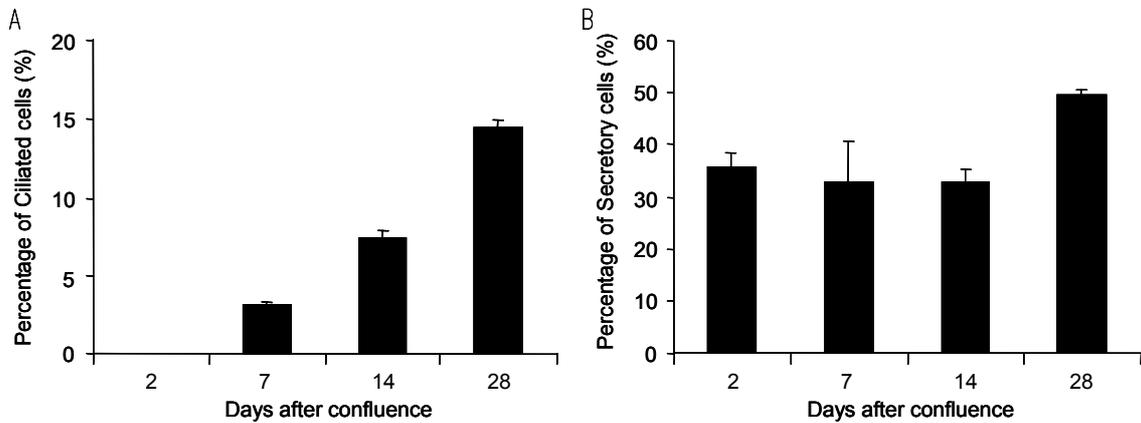


그림 3. 배양기간에 따른 섬모세포와 분비세포의 구성비. A. 배양기간에 따른 섬모세포의 구성비율의 변화로 배양기간이 길어질수록 증가하는 양상임. B. 배양기간에 따른 분비세포의 구성비율의 변화로 합류 후 2주까지는 큰 변화가 없다가 4주째에 약간 증가하는 양상임.

에는 $32.8 \pm 2.5\%$, 배양기간에 따른 큰 차이는 보이지 않았으나 4주일째에는 $49.4 \pm 1.4\%$ 로 약간 증가하였다(그림 3B).

3. 배양기간별 점액 및 리소자임 단백질 분비의 정량

정상 코점막 상피세포를 계대배양하여 채취한 점액의 분비량은 합류 2일째에는 $69.0 \pm 9.7 \mu\text{g}/10^6$ cells, 합류 1주일째에는 $147.1 \pm 12.4 \mu\text{g}/10^6$ cells, 합류 2주째에는 $473.0 \pm 36.8 \mu\text{g}/10^6$ cells, 합류 4주째에는 $459.5 \pm 62.2 \mu\text{g}/10^6$ cells로 합류를 이룬지 2주째 급격히 증가하는 양상을 보이다가 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다(그림 4A).

리소자임의 분비량은 합류 2일째에는 $122.3 \pm 17.2 \mu\text{g}/10^6$ cells, 합류 1주일째에는

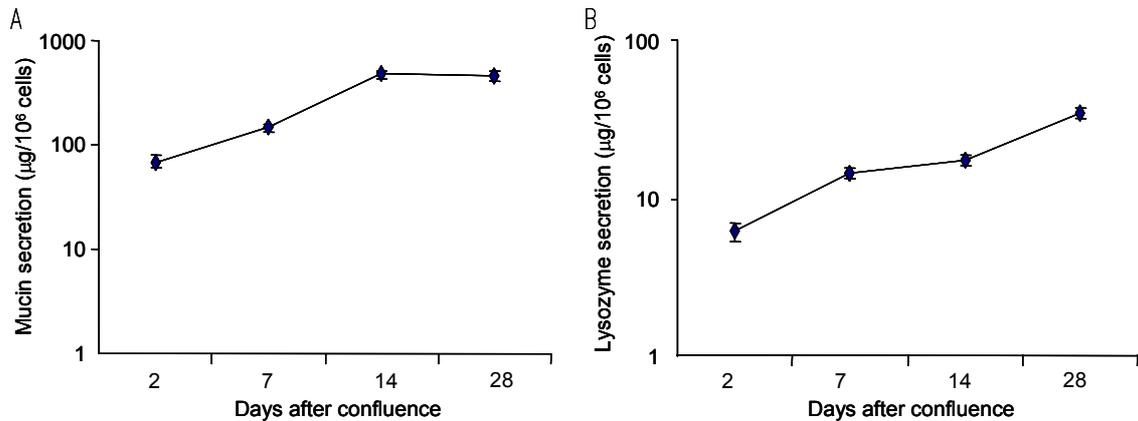


그림 4. 배양기간에 따른 점액과 리소자임의 분비량. A. 배양기간에 따른 점액 분비량의 변화. 합류 후 2주째 급격히 증가하는 양상을 보이다가 이후에는 큰 변화가 없음. B. 배양기간에 따른 리소자임 분비량의 변화. 합류 후 2주까지는 서서히 증가하다가 4주째 급격히 증가하는 양상이 관찰됨.

286.6±19.8µg/10⁶ cells, 합류 2주째에는 342.6±25.6µg/10⁶ cells, 합류 4주째에는 684.2±53.4µg/10⁶ cells로 합류를 이룬지 2주까지는 서서히 증가하다가 섬모세포가 많아지는 4주째 급격히 증가하는 양상이 관찰되었다(그림 4B).

4. 배양기간별 점액 및 리소자임 mRNA 발현의 변화

배양기간에 따라 발현되는 점액과 리소자임 mRNA의 변화를 RT-PCR을 통해 알아보았다. MUC5AC mRNA의 경우 합류 후 2일째부터 소량이 검출되기 시작한 후 1주, 2주까지는 증가하는 양상을 유지하고 있었으나 합류 4주째는 발현정도가 미미하였다. MUC5B mRNA의 경우는 역시 합류 2일째부터 소량이 검출된 후 합류 1주 후에는 보다 증가하였으며 이후에는 합류 4주째까지 꾸준히 발현되는 양이 증가하였다. MUC8 mRNA의 경우는 합류 2일째에 미미하게 발현되었으며 합류 1주 후부터는 발현되는 양이 증가하는 양상을 보인 후 합류 2주째는 1주째와 비슷한 검출정도를 보였으나 합류 4주째에는 그 검출량이 다시 증가하였다(그림 5). 이상의 결과를 종합하면 합류 1, 2주째는 MUC5B와 MUC5AC mRNA가 주로 발현되었으며 상대적으로 MUC8 mRNA의 발현은 약한 반면, 합류 4주째는 MUC5AC mRNA의 발현이 약해지며 MUC5B와 MUC8 mRNA가 주로 발현된다. 리소자임은 합류 후 4주째까지 꾸준히 mRNA의 발현이 증가하는 양상이었다.

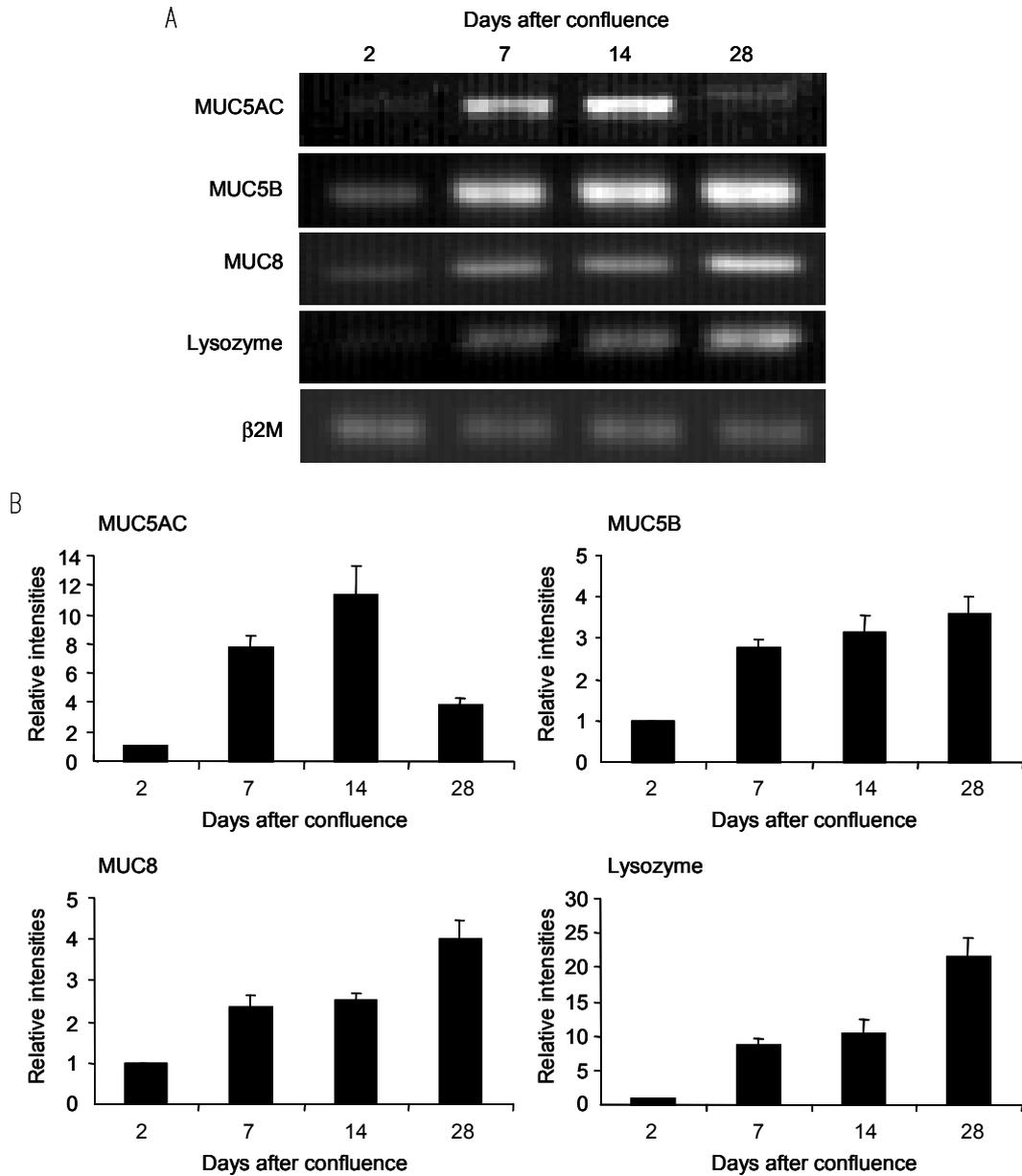


그림 5. 배양기간에 따른 점액과 리소자임 mRNA의 발현. A. RT-PCR 산물의 전기영동 후 자외선 영상. B. 각 점액 유전자 및 리소자임 mRNA 발현을 상대적인 강도(relative intensity)로 표시한 그래프. 합류 1, 2주째는 MUC5AC와 MUC5B mRNA가 주로 발현되고 상대적으로 MUC8과 리소자임 mRNA의 발현은 약한 반면, 합류 4주째에는 MUC5AC mRNA의 발현이 약해지며 MUC5B, MUC8, 리소자임 mRNA의 발현이 증가하는 양상임.

IV. 고 찰

호흡기 질환을 연구하기 위하여 사람의 호흡기 상피세포로 실험을 하는 것이 가장 바람직하지만 일차배양세포를 가지고는 한 사람에서 다양한 실험군을 만들 수 있을 만한 충분한 세포수를 얻기가 어렵고, 여러 사람의 일차 상피세포를 사용할 경우 donor to donor variation이 커서 결과 해석이 어려운 점, 오염될 가능성에 대한 문제점 등으로 인하여 실험 디자인에 제한점이 있었다. 1996년 Gray 등¹은 사람 하기도 상피세포를 점액분비세포와 섬모상피세포로 분화하는 능력의 소실없이 계대배양하여 각 passage에서 그 특성을 밝힘으로써, 실험에 충분한 양의 세포를 확보하는데 성공하였으며 윤 등²은 사람 코점막 상피세포를 이용하여 분비세포와 섬모세포로의 분화능력을 소실하지 않는 상태에서 계대배양에 성공하여 상기도 상피세포의 연구에 새로운 전기를 마련하였다. 호흡기 상피세포의 배양을 이용한 대부분의 실험이 배양 후 1~2주의 초기에 이루어지며 이 때에도 배양기간에 따라 세포의 분화정도나 세포의 형태, 점액의 분비와 그 유전자의 발현양상이 변화할 수 있으며, 따라서 좀 더 믿을만한 결과를 얻기 위해서는 호흡기 상피세포의 장기간의 배양을 통해 각 배양시기별로 특성의 변화를 관찰해볼 필요가 있다.

본 연구에서는 사람 정상 코점막 상피세포를 계대배양하여 passage-2 cell을 확보해서 4주 이상 장기간 배양하여 각 배양시기별 특성의 변화를 관찰하고 분석하였다.

본 연구의 결과 섬모상피세포는 분화를 유도하기 위한 air-liquid interface법으로 배양하여 합류를 이룬 후 1주일째에 처음 관찰되었으며 이는 과거 Usui,⁶ Gray,¹ Hanamura⁵ 등의 보고와 비슷한 결과이었다. 섬모상피세포는 합류 후 1주일부터 증가하기 시작하여 합류 후 4주째에 14.5%로 가장 높은 구성비율을 보였으며, 이는 하기도 상피세포를 이용하여 합류 3주째에 13.6%의 섬모상피세포의 구성비율을 보고한 Gray 등¹의 연구결과와 같은 양상이었다. 이러한 결과를 통해 코점막 상피세포를 배양하여 섬모상피세포를 연구하기 위해서는 충분히 분화가 이루어지는 합류 후 4주째에 시행하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 한편 생체내의 코점막을 직접 채취하여 섬모상피세포의 구성비율을 측정하여 59%로 보고한 Chapelin 등⁷의 결과와 비교해 볼 때 실험실에서 유도한 섬모상피세포로 분화한 결과와는 큰 차이를 보이고 있으며, 이는 앞으로 배양액의 구성성분과 배양기법을 개발하여 발전시켜 나아가야 할 과제라고 사료된다.

한편 배양기간별 분비세포의 비율은 합류 후 2일째부터 합류 2주 후까지는 상피세포의 32~35% 정도였으며 합류 4주 후에는 증가하여 상피세포의 49.4%가 분비세포이었다. 이처럼 분비세포가 섬모세포보다 일찍 분화하는 것은 기도점막상피세포 배양 시 일반적인 현상이다. 또한 이 결과는 사람 정상 코점막 상피세포에서의 분비세포의 비율인 24%⁷보다 오히려 높은 편이다. 따라서 분비세포에 대한 연구는 합류 2일째부터 시행할 수 있을 것으

로 사료된다.

본 연구에서는 배양기간에 따라 점액성 분비물인 점액과 장액성 분비물인 리소자임의 분비량을 dot-blotting을 이용해 정량적으로 측정하였다. 분비된 점액의 양은 배양기간에 따라 증가하여 합류 후 2주째에 plateau phase에 도달하였다. 이와 같이 합류를 이룬지 2일 이후부터 배양 2주까지는 분비세포의 비율은 큰 변화가 없으나 점액 분비량이 합류 후 2주까지 증가한 것은 합류 후 2주까지는 일정세포가 분비하는 점액의 양이 점차 증가한다는 것을 암시한다고 하겠다. 합류 후 4주째에는 분비세포가 49.4%로 증가하였는데도 불구하고 점액의 양은 증가하지 않은 것은 분비세포의 노화에 의해 점액 분비능력이 다소 떨어진 것으로 사료된다. 그러나 장액성 분비물인 리소자임은 합류 후 4주째까지 계속 증가하는 양상을 보여 점액분비 양상과는 다소 차이가 있었다. 이러한 결과는 점액과 리소자임을 분비하는 세포가 서로 다를 수 있음을 암시한다고 하겠다.

본 연구에서는 분화된 코점막 상피세포에서 대표적 점액 유전자인 MUC5AC, MUC5B, MUC8 및 리소자임 mRNA의 발현을 배양기간별로 조사하였다. 점액유전자는 현재 13가지가 밝혀져 있지만⁸⁻¹² 본 연구에서는 하기도 점막(lower airway)에서 주요 점액으로 알려진 MUC5AC, MUC5B^{13,14}와 polyp epithelium에서 증가하는 것으로 나타난 MUC8¹⁷을 선택하였다. MUC5AC mRNA는 합류 후 2주째까지는 양이 증가하는 소견을 보였으나 4주째(배양 37일)에는 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 배양 39일까지 MUC5AC mRNA의 발현이 계속 증가하였다는 Bernacki 등¹⁵의 보고와 상이하다. 이러한 차이의 이유로는, 사람 중이점막 상피세포를 이용하여 같은 방법으로 실험하였을 때도 합류 후 4주째 MUC5AC mRNA 발현이 급격히 감소한다고 보고한 최 등¹⁸의 결과로 볼 때, Bernacki 등¹⁵은 collagen coated membrane을 사용하였으나 본 연구에서는 collagen coating이 되어 있지 않은 transwell-clear membrane을 사용하였기 때문일 가능성이 있다고 생각한다. MUC5B mRNA는 합류 후 1주째 급격히 증가한 이후 합류 4주 후까지 배양기간이 길어질수록 발현이 증가하는 양상이었다. 이러한 결과는 Thornton 등¹⁶ 및 Bernacki 등¹⁵의 보고와 일치하고 있다. 한편 MUC8 mRNA는 배양기간이 길어짐에 따라 점차 발현이 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 배양기간에 관계없이 MUC8 mRNA 발현이 미미하게 발현된다는 Bernacki 등¹⁵의 보고와 상이하지만 in-vivo 상태의 정상 코점막 상피세포에서 MUC8 mRNA가 잘 발현된다는 김 등¹⁷의 보고와는 일치한다. 점액의 분비량은 합류 후 2주 후부터는 plateau phase에 도달하였지만 점액 유전자는 배양기간에 따라 서로 다른 발현 양상을 보였다. 즉 합류 후 2일째에는 모든 점액유전자와 리소자임 유전자 발현이 매우 미약하고, 합류 1, 2주째에는 MUC5AC와 MUC5B mRNA가 잘 발현되고, 합류 4주후에는 MUC5AC mRNA의 발현이 급격히 감소하며 대신 MUC8 mRNA의 발현이 증가하여 MUC5B와 MUC8 mRNA가 잘 발현되고 있다. 리소자임 mRNA는 합류 후 4주까지 점차적으로 발현이 증가하였다. 따라서 코점막 상피세포의 분화정도에 따라 발현되는 점액 유전자가 서로 다르다는 것을 암시하고

있다. 이와 같은 연구결과를 볼 때 분화가 된 정상 코점막 상피세포에서는 MUC5AC, MUC5B와 함께 MUC8 유전자도 점액분비에 중요한 역할을 할 것으로 유추할 수 있다.

본 연구를 통하여 사람 정상 코점막 상피세포를 배양하면 합류 후 1주내에 섬모상피세포가 나타나기 시작하여 점차 증가하며, 분비세포는 합류 후 2일 후부터 4주까지 비교적 일정하게 유지됨을 알 수 있었고, 점액유전자의 발현양상은 분화 초기에는 MUC5AC와 MUC5B mRNA가, 분화가 진행될수록 MUC5B, MUC8 및 리소자임 mRNA가 잘 발현됨을 알 수 있었다.

향후 본 연구결과를 이용하여 연구목적에 맞는 배양기간을 선택하여 그 시점에서의 세포의 분화정도에 따른 특성을 기본으로 하여 적절한 처치를 할 수 있을 것으로 사료되며 이는 호흡기 질환의 흔한 증상인 점액과분비나 편평화생된 상피세포를 정상 상피세포로 환원시키는 치료제의 개발이나 병인연구에 기여할 수 있을 것으로 생각하며 앞으로 배양액의 구성성분과 배양기법에 대한 연구를 통하여 좀 더 생체와 비슷한 세포의 분화과정을 유도할 수 있도록 노력해야 할 것으로 생각한다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 사람 코점막 상피세포를 배양함에 있어 배양기간에 따라 세포의 분화나 세포의 형태, 점액 및 리소자임의 분비량 및 각 유전자의 발현양상이 변화함을 알 수 있었고 이러한 결과는 코점막 상피세포의 배양을 이용한 연구를 진행할 때는 실험목적에 따라 배양기간이 달라야 한다는 것을 암시한다. 즉 섬모상피에 관한 연구를 시행할 때는 합류 4주 후에 시행하는 것이 좋으며 점액분비세포에 대한 연구는 합류 후 2일째부터 시행이 가능하다고 생각한다. 또한 충분히 분화된 정상 코점막 상피세포에서는 MUC5AC 보다는 MUC5B 및 MUC8 유전자가 점액분비에 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Gray TE, Guzman K, Davis CW, Lubna H, Abdullah LH, Nettesheim P. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:104-12.
2. 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.
3. Kaartinen L, Nettesheim P, Adler KB, Randell SH. Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993;29:481-92.
4. Guzman K, Gray TE, Yoon JH, Nettesheim P. Quantitation of mucin RNA by PCR reveals

- induction of both MUC2 and MUC5AC mRNA levels by retinoids. *Am J Physiol* 1996;271:L1023-8.
5. Hanamura Y, Deguchi K, Ohyama M. Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:889-95.
 6. Usui S, Shimizu T, Kishioka C, Fujita K, Sakakura Y. Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:271-7.
 7. Chapelin C, Coste A, Gilain L, Poron F, Verra F, Escudier E. Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation. *Eur Respir J* 1996;9:2474-8.
 8. Yoon JH, Park IY. Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. *Rhinology* 1998;36:146-52.
 9. Rose MC. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. *Am J Physiol* 1992;263:413-29.
 10. Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril* 1997;68:702-8.
 11. Williams SJ, McGucklin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999;59:4083-9.
 12. Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGucklin MA. MUC13 - a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2001;26:18327-36.
 13. Hovenberg HW, Davis JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J* 1996;13:839-47.
 14. Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. *J Bio Chem* 1997;272:9561-6.
 15. Bernacki SH, Nelson AL, Abdullah L, Sheehan JK, Harris A, William Davis C. Mucin gene expression during differentiation of human airway epithelia in vitro. MUC4 and MUC5B are strongly induced. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:595-604.
 16. Thornton DJ, Gray T, Nettesheim P, Howard M, Koo JS, Sheehan JK. Characterization of mucins from cultured normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:1118-28.
 17. Kim SS, Kim KS, Lee JG, Park IY, Koo JS, Yoon JH. Levels of intracellular protein and messenger RNA of mucin and lysozyme in normal human nasal and polyp epithelium. *Laryngoscope* 2000;110:276-280.
 18. Choi JY, Lee WS, Kim CH, Yoon JH. Ciliary and secretory differentiation of normal human middle ear epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2002;45:208-13.

Abstract

Mucociliary differentiation according to time in culture of human nasal epithelial cells

Jeong-Joon Lee

*Brain Korea 21 Project for Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joo-Heon Yoon)

It is important to know the state of differentiation, cell phenotype, and expression of genes for mucus production at the time of study because these may be different at different times during the culture period. The primary purpose of this study was to determine whether the number of the ciliated cells increases as a function of differentiation in NHNE cells. If we observed that there was an increase in the number of ciliated cells, we determined the composition ratio of ciliated cells and secretory cells according to the culture duration. We also examined the levels of mucin and lysozyme secretion, and their gene expression at the same time. The presence of ciliated cells was not evident up to 2 days after confluence. However, $3.1\pm 0.2\%$, $7.4\pm 0.5\%$ and $14.5\pm 0.6\%$ of the cells were ciliated on the 7th, the 14th and the 28th day after confluence respectively. Meanwhile, the percentage of secretory cells were $35.6\pm 2.8\%$, $32.8\pm 2.5\%$, $32.8\pm 2.5\%$, and $49.4\pm 1.4\%$ on the 2nd, the 7th, 14th and 28th day after confluence. The amount of secreted mucin showed an abruptly increasing pattern by the 14th day after confluence, but showed no significant changes thereafter. The amount of secreted lysozyme increased as a function of differentiation. MUC5AC and MUC5B mRNA were mainly expressed between the 7th and the 14th day after confluence with relatively weak MUC8 and lysozyme expression. However, as the MUC5AC mRNA expression became weaker, MUC5B, MUC8 and lysozyme mRNA expression became stronger by the 28th day after confluence. In conclusion, we speculate that in *in vitro* studies with NHNE cells, the time point of treatment should vary according to the purpose of the study. In addition, the MUC5B and MUC8 gene may play an important role in mucin secretion in fully differentiated human nasal epithelial cells.

Key Words: mucociliary differentiation, nasal epithelial cells, ciliated cell, secretory cell, mucin