인체 정상기도 상피세포에서 배양시기에 따른 상피세포의 분화와 리소자임 발현에 대한 레티노익산의 효과

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
윤주헌 · 김경수 · 이호기 · 김성식 · 홍성수 · 조성우 · 이정권 · 박인용

Effect of Retinoic Acid on the Differentiation and Lysozyme Expression in Human Airway Epithelial Cells

Joo-Heon Yoon, MD, Kyung-Su Kim, MD, Ho-Ki Lee, MD, Sung-Shik Kim, MD, Seong-Soo Hong, MD, Sung-Woo Jo, MD, Jeung-Gweon Lee, MD and In Yong Park, MD
Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Bakground and Objectives : Retinoic acid (RA)-deprived cultures of normal human tracheobronchial epithelial (NHTBE) cells became squamous metaplastic, failed to produce mucin and instead secreted or released large amounts of lysozyme (LZ). The purpose of this study was to elucidate the relationship between RA-deficiency induced squamous metaplasia and increased LZ as a function of time. **Materials and Method** : The change of lysozyme protein and lysozyme mRNA was investigated over time in cultures using passage-2 normal human tracheobronchial epithelial (NHTBE)cells and passage-2 normal human keratinocytes (NHK). The amount of lysozyme and mucin was measured with dot blot, message of lysozyme with RT-PCR, and cornifin mRNA with Northern blot. **Results** : Lysozyme message levels were consistently higher in RA-sufficient than RA-deficient cultures. Intracellular and extracellular LZ increased to a peak on the day 16 and thereafter decreased in the RA-deficient cultures. LZ gene expression in the RA-deficient cultures was barely detectable on the day 7 but was clearly expressed between days 10 and 14 , but thereafter message levels decreased markedly. On day 12, large numbers of cells began to exfoliate in the RA-deficient cultures. Extracellular LZ appeared simultaneously at the apical surface, presumably released from the exfoliated cells, which contained high concentrations of LZ. Intracellular LZ levels were more than 11 fold less in NHK cells compared to NHTBE cells. **Conclusion** : This study suggests that cellular accumulation of lysozyme protein is a unique feature of metaplastic squamous differentiation. Further studies are needed to find out what mechanisms are involved. **(Korean J Otolaryngol 1998;42(12): 39-46)**

KEY WORDS : Lysozyme · Retinoic acid · Human airway epithelium.

서 론

인체에서 리소자임 단백질은 15 kD 크기의 저분자량 효소로서 주로 대식세포와 다양한 외분비선에서 분비되며 세균막의 중요한 구성성분인 peptidoglycan의 β - glycosidic 결합을 분해하는 항균력과 인체에 중요한 비면역성 방어능력을 지니고 있다.[1] 리소자임 단백질은 또한 각질세포에서도 분비되며 피부질환인 건선에서 증가한다고 알려져 있다.[2] 닭과 인체에서 여러 종의 리소자임 유전자가 클론되어 유전자 배열이 밝혀져 있으며 여러 인체 세포계에서 1.6 kb와 0.6 kb 크기의 유전자가 이미 밝혀진 바 있다.[3][4]

기도에서 리소자임 단백질은 면역조직학적염색에 의해 점막하 선조직의 장액선에 존재하는 것으로 알려져 있으나[5] 생화학적 검사에서는 점막상피세포에도 그 존재가 밝혀졌고[6] 폐의 폐포세포 II형도 계면활성제와 함께 리소자임 단백질을 분비하는 것으로 보고되어 있다.[7]

기도에서 상피세포의 분화조절과 점액 및 비점액성 분비의 조절에 레티노익산과 표피성장인자(epidermal growth factor)가 관여하는 것으로 알려져 있다.[8] Air - liquid interface(ALI) 배양법을 이용하여 배양액에 레티노익산

논문접수일 : 1998년 6월 30일 / 심사완료일 : 1998년 11월 10일
교신저자 : 윤주헌, 120 - 140 서울 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8484 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

존재상태에서 배양된 정상기도상피세포가 많은 양의 점액과 적은 양의 리소자임, 락토페린 및 secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)를 분비한다고 하였다.[8-11] Gray 등[10]이 사용한 배양법은 원주형 점액섬모상피세포에 특징적인 형태를 보여 주고 있으나 in vitro 실험에서 배양액에서 레티노익산을 제거하게 되면 편평상피가 생기게 되고 점액분비가 급격히 줄어든다고 하였다. 이러한 보고는 비타민 A 결핍식이가 기도에 심한 편평화생을 유발한다는 기존의 생체에서의 보고와 일치하고 있다.[12] 따라서 생체실험과 in vitro실험 모두에서 점액섬모상피세포로의 분화를 위해서는 레티노익산이 필수적이라는 것을 의미하고 있다.

장액선 분비물의 하나인 리소자임은 체내에 존재하는 항균제로서, 발견이후 많은 관심을 끌어 최초로 삼차원적 구조가 밝혀진 최초의 단백질이나, 인체에 감염을 유발시키는 대부분의 세균은 리소자임을 파괴하는 효소를 분비하여 그 효과가 없는 것으로 판명됨에 따라 1980년대 이후 거의 관심을 끌지 못하였다. 그러나 최근들어 AIDS 말기환자나 면역이 억제된 환자에서 리소자임의 분비를 증가시킴으로써 morbidity와 mortality를 줄이기 위한 목적으로 인체내의 자연 항균제인 리소자임의 조절기전에 대한 연구가 진행되고 있다.

이전 연구에서 저자들은 레티노익산 유무에 따라 리소자임 단백질과 mRNA양을 비교하여 배양 14일째 레티노익산 결핍상태에서는 레티노익산 존재상태에 비해 리소자임 단백질은 더 많았은데 반해 리소자임 mRNA는 오히려 더 적은 흥미로운 현상을 보고하였다.[11] 이러한 현상은 배양 14일 이전에 이미 리소자임 mRNA가 발현이 되었다가 리소자임 측정 시점인 배양 14일째는 리소자임 mRNA가 적어짐으로써 나타날 수 있다. 이에 저자들은 정상기도 상피세포에서 배양시기에 따라 상피세포의 분화, 리소자임 단백질 분비 및 리소자임 mRNA 발현에 레티노익산이 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

인체 정상기도 상피세포와 정상각질 상피세포의 Air-Liquid interface(ALI) 배양

10^5개의 인체 정상기도 상피세포(normal human tracheobronchial epithelial cells, passage-2, strain 2002, Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)를, 반투과성막(Trans-clear, Costar Corp., Cambridge, MA, USA)에 3.0 mg/ml의 제1형 콜라젠젤(Collaborative Res., New Bedford, MA, USA)을 입혀 수산화암모니아가 들어 있는 밀폐된 곳에서 굳힌 후 혈장없이, 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 배양액(Table 1)에 부유하여 평판하였다. 세포들은 첫 7일간은 잠수상태로 두며 배양액은 ALI를 만드는 7일까지 배양용기의 위 및 아래쪽 부분을 모두 격일로 갈아주었다. 그후는 배양액은 아래쪽 부분만 매일 교환해 주며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켰다. 배양은 37℃, 5% CO_2에서 진행하였다.

각질 상피세포의 배양은 passage-1 인체 정상각질 상피세포(normal human keratinocytes, Clonetics Corp.)를 플라스틱 배양기에서 완전한 배양액(keratinocyte growth medium ; KGM, Clonetics Corp.)하에서 증식시켜 passage-2 각질 상피세포를 만들었으며 모든 배양조건은 인체 정상기도 상피세포와 동일하게 처리하였다. Passage-2 인체 정상각질 상피세포의 분화를 유도하기 위해 기본 배양액으로 5일간 배양한 후, 분화를 촉진하기 위해 2.0 mM의 칼슘을 첨가하여 인체 정상기도 상피세포와 동일한 조건에서 분화를 유도하였다.

점액 및 리소자임 분비의 면역적 검출 및 정량

배양된 인체 정상기도 상피세포에서 분비물 측정방법은 Gray 등[10]의 immunoblot assay를 이용하였다. 분비물은 배양세포들이 24시간동안 분비한 양을 PBS로 세척 후 수집하였고, 세포내의 양은 cell lysate를 만들어 사용하였다. 점액과 리소자임은 immunoblot으로 측정하였다. 순수 인체 점액(generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)과 리소자임(Sigma, St. Louis, MO,

Table 1. Normal human tracheobronchial epithelial cell culture media

Components	Concentration	Supplier
BEGM : DMEM	1 : 1 mixture	Clonetics orp., GIBCO
Insulin	5.0 μg/ml	Clonetics Corp.
Hydrocortisone	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Epinephrine	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Triiodothyronine	6.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Transferrin	10 ng/ml	Clonetics Corp
Epidermal growth factor	0.5 ng/ml	Collaborative Res.
All-trans retionic acid	50 nM	Sigma
Bovine pituitary extract	1% v/v	Pel Freez
Gentamycin : Amphotericin	50 μg/ml : 50 ng/ml	Clonetics Corp.
Bovine serum albumen	1.5 μg/ml	Sigma

*BEGM : Bronchial epithelial cell growth medium
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

USA)을 표준으로 사용하였다. 일차 항체로는 점액은 단클론성 항체인 17Q2(St. George 등[13], 1985 ; generous gift from Dr. Judith St. George, Genzyme Corp., Framingham, MA, USA)를 리소자임은 다클론성 리소자임 항체(Dako, Capintera, CA, USA)를 사용하였다. 배양된 세포에서 채취된 분비물과 표준(standard)들은 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, Bucking-hamshire, UK)로 발색시켰다. 표준곡선을 직선회귀분석을 이용하여 그린 후, 각 검사물의 발색정도와 비교하여 정량하였다. 리소자임 항체의 특이성은 Western blot에 의해 확인하였으며 각 실험에서 배양된 세포들의 수는 세포들을 트립신처리하여 분리한 후 혈구계로 측정하였다. 각 실험결과는 같은 실험을 3회이상 시행하여 평균±표준편차로서 나타냈으며 통계학적 처리는 Student's t-test로 하였다.

Cornifin mRNA의 발현을 위한 Northern blot

Total RNA를 세포들에서 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 분리하였으며 10 μg의 RNA를 6.6% 포름알데하이드를 함유하는 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동한 후 capillary blotting에 의해 Nytran 막(Schleicher & Schuell, Keene, NH)에 옮겼다. 토끼의 cornifin-α cDNA probe(Marvin 등[14] ; a generous gift from Dr. Jetten AM)를 ^{32}P-deoxycytidine 5'triphosphate로 방사선 표지하였다. Northern blots는 62℃에서 하이브리드형성시켰으며 60℃에서 30분간 0.1× SSC / 0.1% SDS로 세척하였으며 같은 용액으로 실온에서 5분씩 2회 세척하였다. 28S rRNA는 각 그룹간의 RNA loading이 표준화된 것을 검색하기 위해 사용하였으며 ^{32}P end-labelled oligonucleotide probe (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 반응시켰다. 결과는 Hypefilm (Amersham)으로 발현시켰다.

리소자임 mRNA 발현을 위한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

사람 리소자임(Chung 등[15] ; Genbank accession #J0380q, 5'primer : CTCTCATTGTTCTGGGGC, 3' primer : ACGGACAACCCTCTTTGC)에 대해 이미 발표된 염기배열을 이용해 리소자임은 350 bp로 디자인하였다. RT-PCR의 control gene으로서 β2 microglobulin (β2M) oligonucleotide amplimers는 335 bp를 만드는데 Clontech Lab.으로부터 구입하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler를 이용해 시행하였으며 간단히 방법을 소개하면 total RNA(1 μg/20 μl reaction volume)를 random hexanucleotide primers와 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용해 cDNA로 reverse transcribe시켰다. 리소자임을 위해서는 RT reaction의 40%, β2M에는 4%를 사용해 각 0.2mM의 primers를 이용해 증폭시켰다. PCR에서 1.5 mM $MgCl_2$를 이용하였으며 optimization후 denaturation은 95℃에서 1분간, annealing temperature는 리소자임은 55℃, β2M은 60℃에서 1분간, extension은 72℃에서 1분간 시행하였다.

그 다음 상기 기술된 각 배양조건에서 각 유전자의 mRNA 발현을 비교하기 위해 비교역학분석을 시행하였다. PCR 산물은 50 ng/ml ethidium bromide를 함유하는 2% Seakem agarose gel(FMC, Rockland, ME, USA)에서 전기영동으로 분리하여 폴라로이드 55 필름으로 사진을 찍었다. Negative films을 Molecular Dynamics Densitometer (Sunnyvale, CA, USA)로 주사하여 그 발현강도를 ImageQuant software를 이용하여 분석하였다. PCR의 직선범위는 PCR cycle 수당 발현강도를 정량하여 정하였다. 리소자임의 직선범위는 25 30회에서 얻어졌다. 최종 산물이 mRNA로부터 생기고 genomic DNA오염이 없었다는 것을 증명하기 위해 RT reaction에서 reverse transcri-ptase를 생략함으로써 음성대조군으로 삼았으며 RT-PCR의 특이성은 PCR fragment의 염기서열(dsDNA Cycle Sequencing System, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 의해 확인하였다.

결 과

리소자임 및 점액분비에 대한 레티노익산의 효과

레티노익산 결핍으로 인한 인체 정상기도 상피세포의 편평화생이 일어나는 동안 언제 리소자임 분비가 변화하는 지를 알기 위해, 세포들을 레티노익산이 결핍된 배양액과 레티노익산(5×10^{-8}M)이 보충되어 있는 배양액에서도 동시에 실험을 진행하였다. 배양 14일째 분비액(apical secretion)과 total RNA를 채취하였다. 분비된 점액의 양을 점액섬모상피로의 분화표지로 삼았고 cornifin-α mRNA발현을 편평화생의 표지로 삼았다.[14] 같은 실험에서 분비된 리소자임과 세포내에 있는 리소자임의 양을 측정하였고, 또한 리소자임 mRNA도 함께 측정하였다. Fig. 1은 서로 다른 3회의 실험을 정리한 것으로, 레티노익산 존재상태에서는 많은 양의 점액을 분비하였고(Fig. 1A), cornifin message 발현은 매우 약하였다(Fig. 1B). 반대로 레티노익산이 결핍된 상태에

서는 점액분비는 아주 적었으며 cornifin message 발현은 아주 강하였다.

배양 14일째 리소자임의 분비량은 레티노익산 존재상태에서 10^6 세포당 2.3 5.3 μg, 레티노익산 결핍상태에서는 10^6 세포당 48 52 μg이었다(Fig. 2A). 또한 배양 14일째 리소자임 mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 측정하였는데 리소자임 분비가 레티노익산 결핍상태에서 레티노익산이 있을 때보다 훨씬 많았음에도 불구하고, 리소자임 mRNA 발현은, 레티노익산 존재상태에서 레티노익산 결핍상태보다 훨씬 강하였다(Fig. 2B).

배양시기에 따른 상피세포의 분화, 리소자임 단백질 및 리소자임 mRNA의 변화

다음 단계로 배양시기에 따른 리소자임 단백질과 리소자임 mRNA의 변화가 형태학상 점액섬모상피 혹은 편평상피와 어떤 연관성을 갖는 지를 알아보았다. 상피세포들은 레티노익산 유무에 관계없이 비슷한 속도로 증식하였으며 같은 시기에 plateau에 접어들었다(Fig. 3A). 따라서 레티노익산 유무에 따라 탈락되는 세포의 수를 측정하였는데(Fig. 3B), 레티노익산이 있을 때는 배양 2주동안 세포탈락이 1,000 2,000개로 매우 낮게 유지되었고 그 후는 24시간동안 2 4×10^5개로 약간 증가하였다. 레티노익산 결핍상태에서는 세포의 탈락이 배양 12일째 이미 3×10^5개 이상이었으며 배양 16일째는 10^6개 이상으로 현저히 증가하였다.

레티노익산이 있을 때는, 세포들은 배양 7일째 이미 점액을 분비하는 것이 관찰되어(Fig. 4A) 점액성 분화는 세포들이 성장의 plateau에 도달하기 전에 이미 일어난다는 것을 의미하였다. 배양 10일째부터는 점액성 분화가 절정에 달하여 10^6 세포당 100 400 μg의 점액이 분비되었으며 cornifin mRNA는 배양초기에는 약하게 발현되었다(Fig. 4B). 레티노익산 결핍상태에서는 전 배양시기동안 점액분비가 매우 적었으며(Fig. 4A), cornifin mRNA는 배양초기에는 약하게 발현이 되었으나 시간이 갈수록 점차 발현이 강하게 되었다(Fig. 4B). 분비된 리소자임의 양과 리소자임 mRNA 발현이 일치하지 않는 이유를 알기 위해

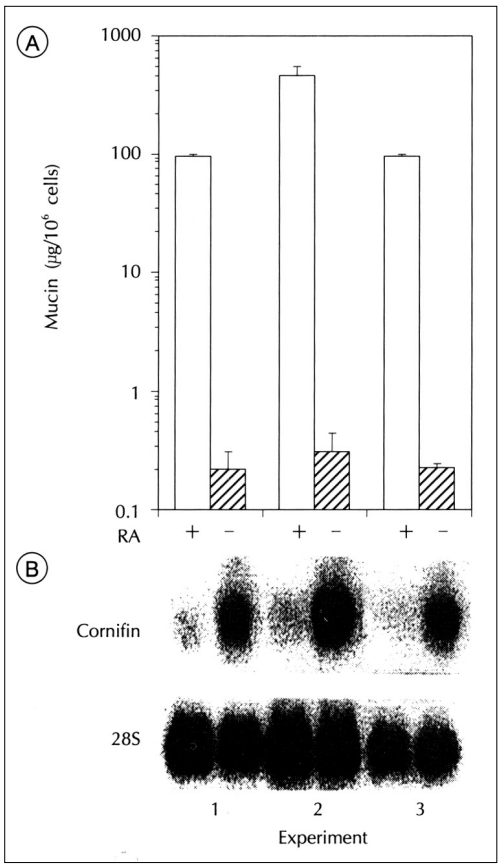

Fig. 1. The effect of RA on mucin secretion and cornifin mRNA levels. NHTBE cells were cultured for 14 days in RA-sufficient (□) media or RA-deficient (▨) media. A. Apical washings were collected and assayed by immunoblotting for mucin. The data represent the mean±SD from triplicate cultures. B. Total RNA was isolated and the levels of cornifin mRNA and 28S rRNA determined by Northern blotting.

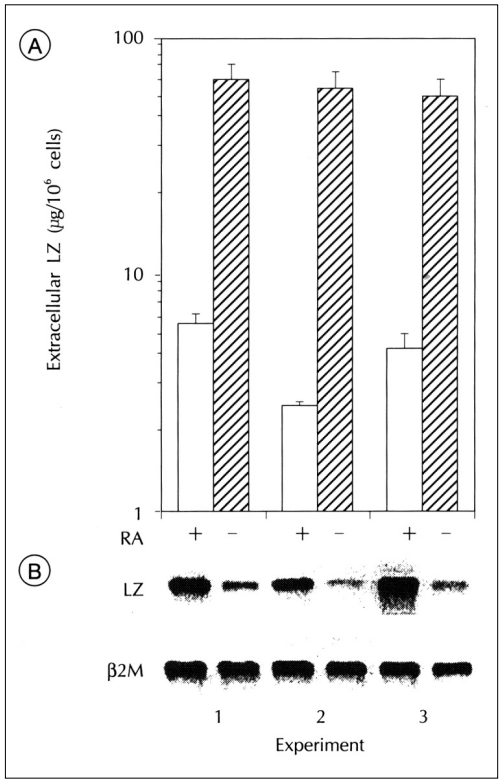

Fig. 2. The effect of RA on extracellular LZ protein and LZ mRNA levels. A. Extracellular LZ levels from RA-sufficient (□) and RA-deficient (▨) cultures were determined in the apical washings obtained from the 3 experiments shown in Fig. 1. The data represent the mean±SD of triplicate samples. B. The levels of LZ and β2M mRNA expression were determined by RT-PCR from the total RNA collected from the experiments shown in Fig. 1.

세포내에 존재하는 리소자임의 양을 동시에 측정하였다. 레티노익산 존재상태에서는, 세포내 리소자임의 양은 배양 7일과 18일 사이에 10^6 세포당 6 12 μg을 유지하였고 분비된 리소자임의 양은 배양 12일째 처음 측정되기 시작하여 점차 증가하여 배양 18일째는 10^6 세포당 6.5 μg을 분비하였다(Fig. 5A and B). 레티노익산 결핍상태에서는, 세포내 리소자임의 양은 배양 7일째 10^6 세포당 26 μg이었고 점차 증가하여 배양 16일째 10^6세포당 190 μg으로 절정에 달하였다. 분비된 리소자임은 배양 12일째 처음 측정되었으며 역시 배양 16일째 10^6 세포당 157 μg으로 절정에 달하였다.

레티노익산 존재상태에서 리소자임 mRNA 발현은 배양 7일째 아주 약하게 나타났으며 그 후는 아주 강하게 나타났다(Fig. 5C). 레티노익산 결핍상태에서는 리소자임 mRNA 발현은 배양 7일째 아주 약하게 나타났다가 배양 10 14일 사이에 아주 강해졌으며 배양 16일부터는 급격히 감소하였다(Fig. 5C). 레티노익산 결핍상태에서의 리소자임 mRNA 발현은 배양 16일과 18일을 제외하고는 레티노익산이 있는 상태와 유사하였다. Control gene으로 사용한 β2 micro-globulin은 전 배양시기에 일정하였고 레티노익산에 의해 크게 영향을 받지 않았다(Fig. 5C).

레티노익산 결핍상태에서 배양 14일째 세포내 리소자임의 양을 측정한 결과, 부착되어 있는 세포들은 10^6 세포당 178 μg을 함유하고 있었고 탈락된 세포들은 10^6 세포당 498 μg을 함유하고 있었다. 한편 레티노익산 유무에 관계없이 부착되어 있는 세포의 수는 배양 12일에서 16일 사이에 5 6×10^6개로 일정하게 유지되었다.

피부각질 상피세포도 적은 양의 리소자임을 분비하는 것으로 보고되어 있어 리소자임의 세포내 축적이 정상적인 편평 분화때에 일어나는 것인지 혹은 병적인 편평화생때 일어나는 것인지를 알아보고자 하였다. 정상적으로 분화시킨 인체 정상각질 상피세포와 레티노익산 결핍으로 유도한 인체 정상기도 상피세포를 같은 조건에서 배양시켰다. 인체 정상각질 상피세포는 배양 5일째까지는 낮은 Ca^{++} 농도에서 배양후 분화를 촉진하기 위해 2.0 mM Ca^{++}이 들어있는 배양액을 사용하였다. 배양 14일째, 분비된 리소자

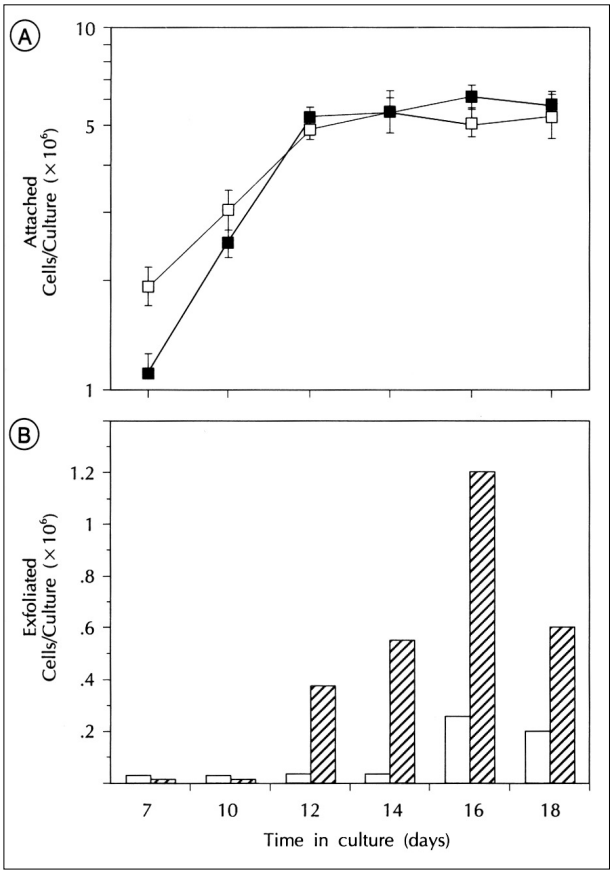

Fig. 3. The effect of RA on growth and cell exfoliation of cultured NHTBE cells. A. NHTBE cells were grown in RA-sufficient (□) or RA-deficient (▨) media. At indicated times the number of attached cells was determined following enzymatic dissociation of the cultures. B. Prior to the enzymatic dissociation of the cultures, the apical surfaces were gently washed with PBS to determine the number of exfoliated cells present in RA-sufficient (□) and RA-deficient cultures (▨). The data for attached cells represent the mean cell number±SD obtained from triplicated cultures. The exfoliated cells from three cultures per time point were pooled.

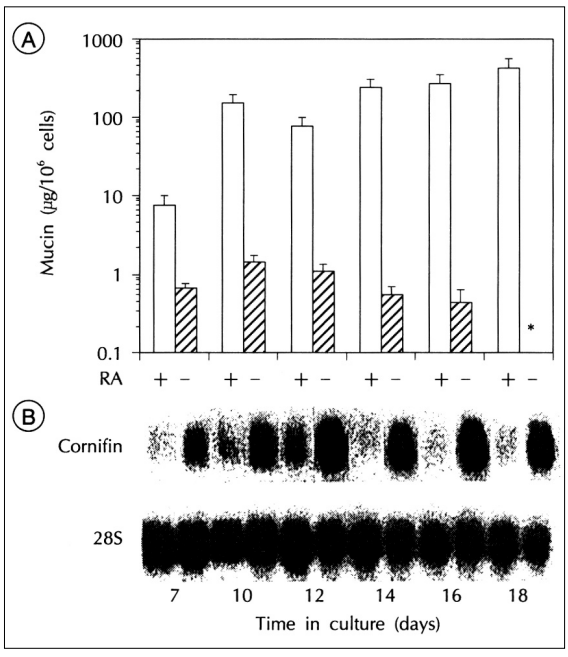

Fig. 4. The effect of RA on mucin secretion and cornifin gene expression during different phases of growth (same experiment shown in Fig. 4.). A. Apical secretions were collected from RA-sufficient (□) and RA-deficient (▨) cultures and were assayed for mucin. Data represent the mean±SD of triplicate cultures. B. Total RNA was collected at the indicated times and the levels of cornifin mRNA and 28S RRNA expression were determined by Northern blotting.

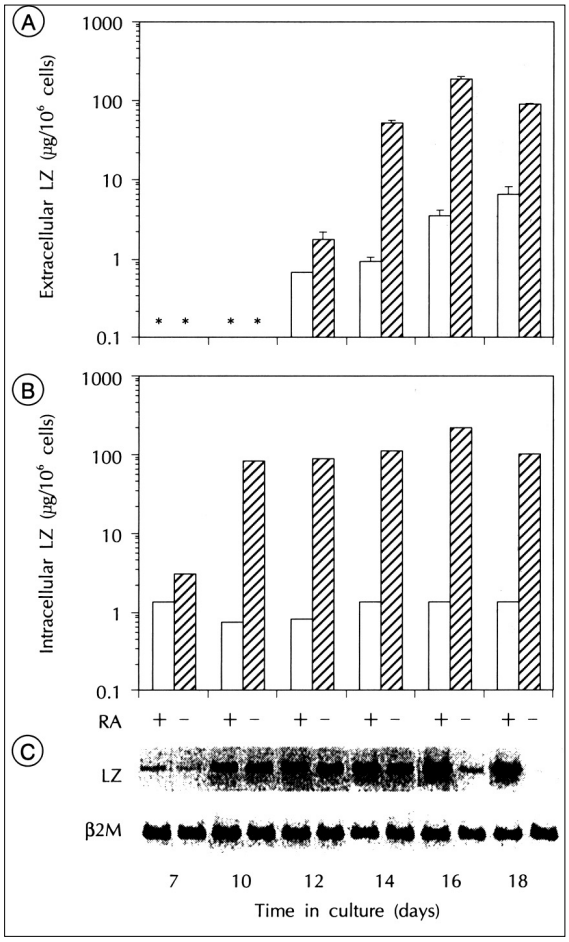

Fig. 5. The effect of RA on LZ protein levels and LZ mRNA expression during different phases of growth. (Same experiment as shown in Fig. 3). A. Extracellular LZ protein present in the apical washings. Data represent the mean± SD of triplicate cultures ; B. Cell lysates were collected and pooled from 2 cultures at each time point and the levels of intracellular LZ protein were determined. C. LZ and β2M mRNA levels were determined by RT-RCR from total RNA(□ =RA sufficient culture, ▨=RA deficient culture).

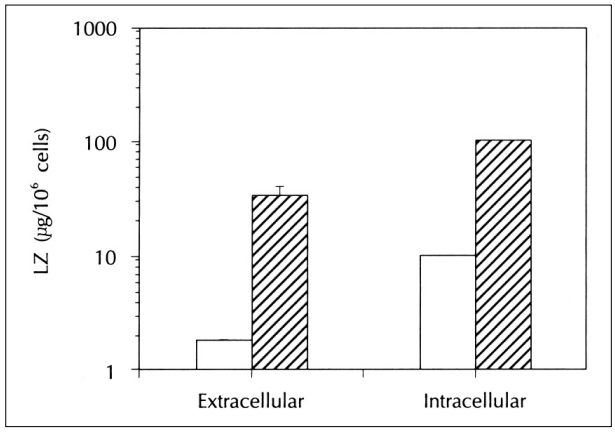

Fig. 6. The comparsion of LZ levels in Ra-deficient NHTBE and NHK cultures. NHTBE (▨) and NHK (□) were grown in RA-deficient culture media. The extracellular and intracellurlar levels of LZ were determined in late stage cultures that were undergoing squamous differentiation.

임의 양은 인체 정상각질 상피세포에서는 10^6 세포당 1.8 μg이었고 정상기도 상피세포에서는 10^6 세포당 35 μg였다(Fig. 6). 한편 세포내 리소자임의 양은 인체 정상각질 상피세포에서는 10^6 세포당 9.0 μg이었고 정상기도 상피세포에서는 10^6 세포당 105 μg이었다(Fig. 6).

고 찰

현재까지 어떤 분비자극물질과 호중구 엘라스타제(neutrophil elastase)가 리소자임 단백질의 분비를 촉진시킨다는 것외에는 리소자임 단백질의 조절에 대해 알려진 것이 거의 없다.[5)16)] Yoon 등[11)]은 인체 정상 기도상피세포는 RA결핍상태에서 편평화생이 일어나며 많은 양의 리소자임을 분비하는 반면 점액분비는 현저히 줄어든다고 보고하였다. 그리하여 본 연구에서는 레티노익산 결핍으로 인한 편평화생과 리소자임의 변화와의 관계를 알아보고자 하였다.

1925년 Wolbach 및 Howe[17)]이 쥐에서 비타민 A 결핍으로 편평화생이 유도되었다고 보고한 이래 기도 상피세포의 변형에 관한 연구가 뒤따르고 있다. 최근 Zhang 및 Mc-Dowell은 비타민 결핍 햄스터의 기관에서 진행된 편평화생의 기저층에서 심한 세포증식과 많은 세포의 탈락을 보고하였다.[18)] 편평화생 상피에서 상피세포의 탈락과 증식을 일으키는 여러가지 요인이 있을 수 있는데, 일반적으로 1992년 Zhang 및 McDowell이 보고한 염증세포에서 분비된 분열유발인자들과 사이토카인들이고 그 외에 본 연구에서 입증된 리소자임도 한 요인이 될 수 있을 것으로 생각된다. 즉 레티노익산 결핍상태에서 인체 정상기도 상피세포들은 염기성인 리소자임을 많이 함유하고 있었고 그 결과 세포의 탈락을 촉진하고 이러한 세포 탈락은 세포의 증식을 유도하여 새로운 세포들이 상피세포의 수를 일정하게 유지하고 있었다. 그러나 비타민 A 결핍 기도상피세포의 편평화생이 리소자임 분비증가에 의한 것인지는 확실하지 않은데 이와 유사한 기전이 생체에서 진행된 편평화생에서도 일어날 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구결과에서 밝혀진 바와 같이 레티노익산이 있는 상태보다 결핍상태에서 탈락세포수와 이들 세포들이 함유한 리소자임의 양이 의의있게 증가한 것은 레티노익산이 편평화생에 직·간접적으로 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

리소자임 mRNA의 발현 조절에 대한 분자생물학적 연

구는 광범위하게 진행되어 종과 세포에 특이적인 것으로 보고되어 있고[4)19)] 여러 개의 cisacting promotor와 enhancer가 분리되어 유전자 특성이 밝혀져 있다.[1)] 리소자임 mRNA의 조절을 연구하기 위해 가장 많이 사용되는 모델은 닭의 난관과 쥐의 대식세포이다. 닭의 난관에서 리소자임 mRNA 발현은 스테로이드호르몬 의존성인데 반해 조혈계에서의 리소자임 발현은 대식세포의 성숙과 면역조절물질에 의한 대식세포의 활성화와 밀접한 관계가 있다.[4)] 본 연구결과에서 기도 상피세포에서 리소자임의 조절에 관여하는 리소자임 mRNA발현은 레티노익산 유무에 관계없이 리소자임 mRNA는 세포의 분화와 연관이 있다고 할 수 있다. 레티노익산 존재상태에서 리소자임 mRNA 발현이 되면 일정한 수준으로 계속 유지되었으며 분비된 리소자임 및 세포내 리소자임 단백질은 모두 낮은 상태에서 일정하게 유지되었다. 반면에 레티노익산 결핍상태에서는 편평화생의 초기에는 리소자임 mRNA발현이 일정하게 유지되었으며 동시에 세포내 리소자임의 양은 레티노익산이 있는 상태에 비해 매우 증가하였다. 편평화생의 배양후기에는 세포내 및 분비된 리소자임의 양은 현저히 증가한 반면 리소자임 mRNA발현이 급격히 감소하였다. 이것은 리소자임 유전자 전사(transcription)에 대해, 급격히 증가된 리소자임 단백질이 negative feedback 조절을 하거나 리소자임 mRNA의 안정성이 감소된 것을 의미한다고 생각된다.

정상적인 편평분화가 일어나는 상황에서 배양된 상피세포는 세포내 리소자임의 양이 매우 낮은 것으로 보고되어 있으며[14)] 또한 인체 정상각질 상피세포와 레티노익산 결핍으로 유발된 편평화생에서 리소자임의 양을 비교한 결과에서 나타나듯이, 인체 정상각질 상피세포에는 적은 양의 리소자임이 있었으나 레티노익산 결핍으로 인한 편평화생에는 매우 많은 양의 리소자임이 측정되어 레티노익산 결핍상태에서 나타나는 리소자임의 세포내 과다한 축적은 병적인 편평화생시에만 일어나는 특이한 현상으로 생각되었다.

위 연구결과를 종합하면,[1)] 레티노익산 결핍상태에서 레티노익산이 있는 상태에 비해 탈락하는 세포가 매우 많았으나 탈락되는 세포의 수가 리소자임 단백질의 양을 결정하는 인자는 아니었다.[2)] 레티노익산 결핍상태에서 세포내 및 분비된 리소자임 단백질이 배양 16일째에 절정을 이루는 것과 동시에 리소자임 mRNA발현이 급격히 감소함으로써, negative feedback 기전이 있을 것으로 생각되었다.[3)] 레티노익산 결핍상태에서 나타나는 리소자임의 과다한 세포내 축적은, 정상적인 편평분화가 일어나는 정상각질 상피세포에서는 관찰되지 않음으로써 레티노익산 결핍상태에서 일어나는 편평화생의 특이적 현상이었다.

결 론

레티노익산 결핍상태에서 일어나는 세포내 리소자임 단백질의 과다한 축적은 레티노익산 결핍시 나타나는 편평화생의 특이적 현상이었으며 향후 이의 기전을 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심단어 : 리소자임 · 레티노익산 · 인체 기도 상피.

REFERENCES

1) Short ML, Nickel J, Schmitz A, Renkawitz R. *Lysozyme gene expression and regulation. Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology. In P. Jolles, ed. Basel Birkhauser Verlag 1996; 75:243-57.*
2) Chen VL, France DS, Martinelli GP. *De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cell. J Invest Dermatol 1986;87:585-7.*
3) Peters CWB, Kruse U, Pollwein R, Grzenchik KH, Sippel AE. *The human lysozyme sequence organization and chromosomal localization. Eur J Biochem 1989;182:507-16.*
4) Bonifer C, Bosch FX, Faust N, Schuhmann A, Sippel AE. *Evolution of gene regulation as revealed by differential regulation of the chicken lysozyme transgene and the endogenous mouse: Lysozyme gene in mouse macrophages. Eur J Biochem 1994;226:227-35.*
5) Tom-Moy M, Basbaum CB, Nadel JA. *Localization and release of lysozyme from ferret trachea: Effect of adrenergic and cholinergic drugs. Cell Tissue Res 1983;228:549-62.*
6) Konstan MW, Cheng PW, Boat TF. *A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. Exp Lung Res 1982;3:175-81.*
7) Beers MF, Kim CY, Dodia C, Fisher AB. *Synthesis of type II cell lamellar body lysozyme-15 kD protein (lbl-15) by perfused rat lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:240-8.*
8) Guzman K, Randell SH, Nettesheim P. *Epidermal growth factor regulates expression of the mucous phenotype of rat tracheal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1995;217:412-8.*
9) Davenport EA, Nettesheim P. *Regulation of mucociliary differentiation of rat tracheal epithelial cells by type 1 collagen gel substratum. Am J Respir Cell Mol Biol 1996b;14:19-26.*
10) Gray TE, Guzman K, Davis Cw, Abdullah LH, Nettesheim P. *Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:104-12.*
11) Yoon JH, Gray T, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. *Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine and extracellular matrix. Am J Respir Mol Cell Biol 1997;16:724-31.*
12) McDowell EM, Keenan KP, Huang M. *Restoration of mucociliary tracheal epithelium following deprivation of vitamin A. Virchow Arch 1984;45:221-40.*
13) St. George JA, Crauz DL, Zicker SC, Edison JR, Dungworth DL Plopper CG. *An immunohistochemical characterization of rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. Am Rev Respir Dis 1985;132:556-63.*
14) Marvin KW, George MD, Fujimoto W, Saunders NA, Bernacki S, Jetten AJ. *Cornifin, a cross-linked envelope precursor in keratinocytes that is down-regulated by retinoids. Proc Natl Acad Sci*

USA 1992;89:11026-30.

15) Chung LP, Keshav S, Gordon S. *Cloning of human LZ cDNA: Inverted Alu repeat in the mRNA and in situ hybridization for macrophages and Paneth cells. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:6227-31*.

16) Tabachnik E, Schuster A, Gold WM, Nadel JA. *Role of neutrophil elastase in allergen-induced LZ secretion in dog trachea. J Appl Physiol 1992;73:695-700*.

17) Wolbach SB, Howe PR. *Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. J Exp Med 1925;42:753-77*.

18) Zhang XM, McDowell EM. *Vitamin A deficiency and inflammation: The pivotal role of secretory cells in the development of atropic, hyperplastic and metaplastic change in the tracheal epithelium in vitro. Virchows Arch B Cell Pathol 1992;62:375-87*.

19) Clarke S, Greaves DR, Chung LP, Tree P, Gordon S. *The human LZ promotor directs reporter gene expression to activated myelomonocytic cells in trangenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1434-8*.