사람 정상 코점막 상피세포에서 스테로이드 홀몬의 속효성, 비유전적 효과에 의한 세포내 칼슘농도와 점액 분비량의 감소작용

연세대학교 원주의과대학 이비인후-두경부외과학교실,[1] 생리학교실[2]
김태환[1] · 김대란[2] · 차승규[2] · 문정훈[1] · 김성일[1] · 박동준[1]

Rapid, Non-genomic Reduction of Intracelluar[Ca^{2+}] and Mucin Secretion by Steroid Hormones in Human Nasal Epithelial Cells

Tae Hwan Kim, MD[1], Dae Ran Kim, PhD[2], Seung Kyu Cha, PhD[2], Jeong Hun Moon[1], Sung Il Kim, MD[1] and Dong-Joon Park, MD[1]

[1]Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery and [2]Physiology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Airway mucus hypersecretion is one of the major clinical manifestation of patients suffering from various upper or lower respiratory tract diseases. But unfortunately, no drugs are yet available for controlling the airway mucus hypersecretion. Although pharmacological approaches for controlling airway mucus production is currently limited, among the few useful drugs, steroid hormones seem to be the most effective. The effect of steroid hormones is classically described as that of a genomic mechanism involving nucleus transcription. but there is a growing evidence for rapid, non-genomic effect of steroid hormones working through various second messenger systems and ion transporters. **Materials and Method** : In order to investigate a possible rapid, non-genomic effect of dexamethasone and aldosterone in cultured normal human nasal epithelial (NHNE) cell, the effect of dexamethasone and aldosterone was tested for intracellular calcium response ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) and mucin secretion to external ATP, a known secretagogue in airway epithelial cells, with fluorescence imaging system and ELISA, respectively. Also, we demonstrated the effect of dexamethasone on the mRNA expression of MUC5AC mucin gene for evidence of the existence of non-genomic mechanism of steroid hormones in NHNE cells. **Results** : Pretreatment with dexamethasone or aldosterone with various concentrations and duration caused a reduction in the $\Delta[Ca^{2+}]_i$ and mucin secretion to ATP. In RT-PCR, Ten minutes dexamethasone pretreatment did not attenuate the mRNA expression of MUC5AC mucin gene, but 24 hours of dexamethasone pretreatment did so. These data indicate that a few minutes of steroid hormone pretreatment can decrease the $\Delta[Ca^{2+}]_i$ and mucin secretion via a non-genomic mechanism. **Conclusion** : In this study, we confirmed the rapid, non-genomic effect of steroid hormones in NHNE cells and suggest this study as a research model for developing antisecretory drugs that have rapid effect. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:870-6)**

KEY WORDS : Nasal mucosa · Mucin · Dexamethasone · Aldosterone · MUC5AC.

서 론

기도점막을 덮고 있는 점액은 공기중의 먼지나 화학물질에 대한 방어기전으로 매우 중요한 역할을 한다. 그러므로 기도내 점액의 질적 또는 양적 이상은 정상 방어기전의 손상을 초래하고, 이로인해 병적상태를 유발하게 될 수 있다. 그중 기도점액과분비는 만성기관지염, 천식, 기관지확장증, 그리고 알레르기성 비염과 같은 상, 하기도 질환 환자의 중요한 임상증상으로 불행히 아직 이를 조절할 수 있는 유용한 약물이 없는 실정이다.[1)]

스테로이드 홀몬은 염증반응을 조절하는 일차선택 약물이다. 또한 기도점액분비를 조절하는 유용한 약물이 없는 상황에서 스테로이드 홀몬은 가장 효과적인 기도점액분비 조절 약물로서 여겨지고 있다. 일반적으로 알고있는 스테로이드 홀몬의 효과는 세포질내 cytosolic receptor와 결합

논문접수일 : 2005년 1월 31일 / 심사완료일 : 2005년 3월 17일
교신저자 : 박동준, 220 - 701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 이비인후 - 두경부외과학교실
전화 : (033) 741 - 0641 · 전송 : (033) 732 - 8287
E - mail : rhico@wonju.yonsei.ac.kr

하여 복합체를 형성 후 핵으로 이동하여 단백질 합성을 통해 효과를 나타내는 유전적 기전으로 알려져 있다. 그러나 몇 시간의 잠복기후 효과가 나타나는 스테로이드 홀몬의 유전적 기전과 더불어 다양한 제 2 messenger와 ion tranporter를 통한 속효성, 비유전적 효과가 있다는 여러 보고들이 있다. 이런 스테로이드 홀몬의 속효성, 비유전적 효과는 endometrial cell, vascular smooth muscle, 그리고 renal cortical collecting duct 등의 여러 세포들에서 존재한다.[2-4] 또한 사람 기도점막 상피세포에서 dexamethasone과 aldosterone에 의한 속효성, 비유전적 효과를 보이기도 한다.[5)6)]

본 저자들은 배양된 정상 사람 코점막 상피세포(normal human nasal epithelial cell : NHNE cell)에서 점액분비 세포의 강력한 분비 촉진제로 알려져 있는 adenosine triphosphate(ATP)에 의해 세포내 칼슘농도와 점액분비의 변화를 확인하고 이에 대하여 dexamethasone과 aldosterone의 속효성, 비유전적 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

화학물질 및 실험용액

Fura-2/AM은 Molecular probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, ATP, dexamethasone, 및 aldosterone을 포함한 다른 모든 물질은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 칼슘 측정을 위한 세포외 관류액(external solusion)의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES 그리고 10 glucose(pH 7.4)이었다.

세포배양

사람 코점막 상피조직은 비중격 만곡증으로 수술을 받는 환자의 하비갑개 전단 1 cm 후방에서 채취하였다. 채취된 조직은 0.15% protease(Sigma, St. Louis, MO)가 들어간 1 : 1 DMEM/F12에 넣고 4℃에서 15~18시간동안 효소분해하였다. 분해된 세포들은 섬유아세포를 제거하기 위해 Petri dish 넣고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30분간 두었다. 그 후 부유된 상피세포 6×10^5개를 75 cm^2 tissue culture flask에 넣은 후 배양하였다. 배양액은 bovine pituitary extract, insulin, hydrocortisone, GA-1000, retinoic acid, transferrin, triiodothyroinine, epinephrine, 그리고 hEGF를 포함한 bronchial epithelial growth medium(Clonetics, Walkersville, MD, USA)을 사용하였다. 배양된 세포가 80~90%의 합류가 이루어질 때까지 이틀에 한번씩 배양액을 갈아 주었다. 합류가 다 이루어지면 trypsin/EDTA를 처리하여 분리후 액체질소에 냉동보관하였다. 세포수는 hemocytometer를 사용하여 집계하였다.

형광 현미경을 이용한 세포내 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$)의 측정

세포내 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$)의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템(fluorescence imaging system)을 사용하였다. 먼저 배양액 1 mL에 4 μM Fura-2/AM을 첨가후 여기에 단층의 passage-2 사람 코점막 상피세포가 붙어있는 coverslip을 넣은 다음 암실, 실온에서 30분간 부하시켰다. 부하가 끝나면 도립현미경(IX51, Olympus, Japan) 위의 관류 챔버(Warner Instrument, Hamden, CT, USA)에 올려놓고 표준 관류액을 중력에 의해 2 mL/min 속도로 15분간 관류시켜 충분한 탈에스테르화(deesterification)가 되도록 하였다.

형광이미지는 75-W Xenon lamp로부터 나오는 광원(light source)중 Fura-2/AM에 적합한 340 nm와 380 nm의 파장으로 여기(excitation)시켰을때 510 nm의 파장에서 방출(emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라(Cascade, Roper, USA)를 통해 증폭시켜 이미지로 나타내었으며, 형광 강도의 비율(F_{340}/F_{380})이 세포내 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$)를 반영하였다. 세포내 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$)의 변화의 측정은 먼저 기도 염증시 점액 과분비를 유도하는 중요한 염증물질중의 하나인 ATP를 투여하여 코점막 상피세포의 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. ATP는 퓨린 수용체인 P2X와 P2Y를 모두 자극하는 비특이적 촉진제로서 ATP(100 μM)를 2분간 투여하면서 3초 간격으로 측정하였고 약 5분간 약물을 세척시 30초 간격으로 측정하여 광원에 의한 세포손상을 최소화하였다. 그 후 다시 10분간 dexamethasone 또는 aldosterone을 각 농도(10^{-9}-10^{-6}M)에 따라 10분간 전처치하여 3초 간격으로 측정하고 2분간 ATP(100 μM)와 dexamethasone 또는 aldosterone을 동시에 투여하며 형광이미지를 측정하였다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1(Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포에 ATP(100 μM)를 단독 투여 후 나타난 340/380 ratio값의 최고값을 기준값으로 하여 스테로이드 홀몬을 전처치 후 ATP 투여시의 340/380 ratio의 최고값을 기준값에 대한 백분율(% above control)로 나타내어 비교 분석하였다.

효소결합면역흡착검사(ELISA)를 이용한 점액분비의 분석

정상 사람 코점막 상피세포의 점액분비의 측정은 Lin 등[7)]

의 방법을 변형하여 효소결합면역흡착검사법(ELISA)로 시행하였다.

우선 12 well culture flask에 한 well당 passage - 2 코점막 상피세포 2×10^5/mL을 0.5 mL씩 넣고, 80~90%의 합류가 이루어질 때까지 배양하였다. 합류가 모두 이루어지면 대조군, 비전처지군, dexamethasone(10^{-7}M) 전처치군, aldosterone(10^{-9}M) 전처치군으로 나누고, 전처치시 약물 노출 시간을 10분, 1시간, 24시간 으로 하였다. 전처치군에서 사용한 dexamethasone과 aldosterone의 농도는 세포 이미징 실험에서 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 상승을 가장 많이 감소시킨 농도로 결정하였다. 전처치가 끝난 후 대조군을 제외한 모든 well에 ATP(100 μM)를 30분간 처리하고 모든 well의 상층액을 수거하였다. 수거한 상층액은 double - sandwich ELISA method를 통하여 각 군들의 흡광도(optical density)를 대조군과 비교하여 대조군에서 검출된 양을 초과하는 만큼의 양을 백분율(% above control)로 나타내었다. double sandwich ELISA method를 요약하면 다음과 같다.

정제된 17B1(Covance research product, Berkeley, CA) IgG 10 μL를 coating buffer(0.05 M sodium carbonate buffer, pH9.6) 10 mL에 희석후 96 well EIA plate (Costar Co, cambridge, MA)에 넣고 실온에서 12~16시간 방치하여 well에 흡착시켰다. 그 후 0.05% PBS - Tween®20(PBS - T)의 용액을 이용하여 세척하였고 1% 우혈청알부민(bovine serum albumin : BSA), 5% sucrose, 그리고 0.05 NaN_3를 포함한 PBS를 각 well에 300 μL씩 넣고 1시간동안 반응시켜 well에 흡착되지 않고 남은 부위에 BSA가 흡착되게 하여 비특이적 반응이 일어나는 것을 방지하였다. 1시간후 다시 세척을 하고 채취한 상층액을 정해진 순서에 따라 각 well 당 100 μL씩 넣고 실온에서 2시간동안 방치하였다. 다시 이를 세척후 1% BSA와 0.05% Tween®20을 섞은 TBS용액(TBS buffer : 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0)에 17Q2(Covance research products, Berkeley, CA) alkaline phosphatase - conjugated IgG를 넣고 이를 각 well당 100 μL씩 넣고 실온에서 2시간 방치 후 세척을 하였다. 마지막으로 phosphate substrate solution(p - Nitrophenyl phosphate liqiud substrate, Sigma, St. Louis, MO)을 넣어 발색반응을 시켜 ELISA판독기로 405 nm에서 측정하였다.

역전사 연쇄중합반응(RT - PCR)을 통한 MUC5AC 유전자의 분석

Dexamethasone 전처치 시간에 따른 MUC5AC의 유전자 표현 감소 여부를 알아봄으로써 10분간 dexamethasone 전처치후 나타나는 점액분비의 감소가 유전적 효과에 의한 것인지 아닌지를 간접적으로 알아보고자 하였다. 3개의 10 cm^2 plastic tissue culture dish를 대조군, 10분 dexamethasone(10^{-7}M) 전처치군, 24시간 dexamethasone(10^{-7}M) 전처치군으로 나누고 dish당 배양액 10 mL에 Passage - 2 코점막 상피세포 8×10^5개를 넣은 후 80~90% 가량 합류가 이루어질 때까지 배양하였다.

먼저 guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform 추출 방법을 사용하여 배양된 passage - 2 코점막 상피세포로부터 전체 RNA를 분리하였다.[8] 즉, 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 lysis시킨 다음 phenol 및 chloroform을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 보관하였다. 이를 4℃도에서 10,000×g로 20분간 원심 분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액을 동량의 isopropanol과 섞은 다음 - 70℃에서 1시간 이상 RNA를 침전시켰다. 다시 4℃에서 10,000×g로 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

cDNA의 합성은 2 μg RNA와 0.5 μg random hexamer를 먼저 70℃에서 5분간 반응시키고, reverse transcriptase 200 units, dNTP 25 nmoles, RNase inhibitor 20 units 등이 포함되게 하여 37℃에서 1시간 반응시킴으로써 이루어 졌다. 이어 PCR이 이루어 졌으며, 이에 필요한 MUC5AC에 대한 시발체(primer)는 이미 발표된 인간 MUC5AC cDNA 염기서열(Genbank accession No. AF015521)을 토대로, 5 'primer, 5 '- ACATCAGGAACAGCTTCGAG - 3 '와 3 'primer, 5 '- ATCATAGGCTTCGTGCAGAC - 3 '를 사용하여 283 bp의 기대 크기로 제작하였다. PCR 반응액에는 합성된 cDNA 0.05 μg, 각각의 primer pair(10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq DNA polimerase (Perkin - Elmer, Norwalk, CT), 10 nmoles의 dNTP 등이 포함되게 하여, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분으로 35 cycle 동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 U.V. 하에서 관찰하였다.

결 과

세포내 칼슘이온농도 변화에 대한 Dexamethasone과 Aldosterone 효과

칼슘 이미징 시스템을 통해 실험한 결과 사람 코점막 상피세포에서 ATP(100 μM)을 투여시 세포내 칼슘이온농도의

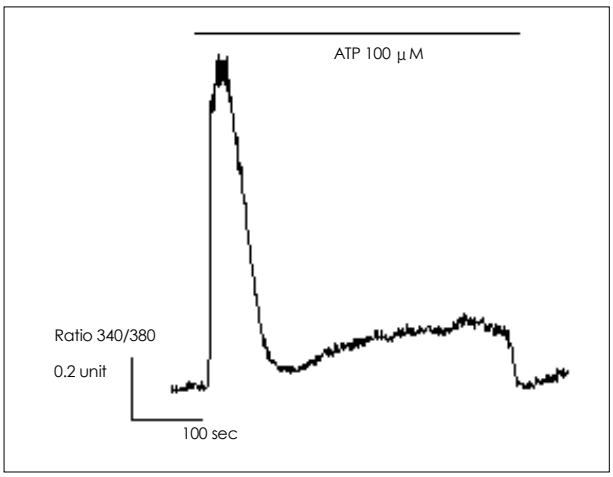

Fig. 1. Typical change in $[Ca^{2+}]_i$ on exposure of cultured normal human nasal epithelial cells to ATP (100 uM).

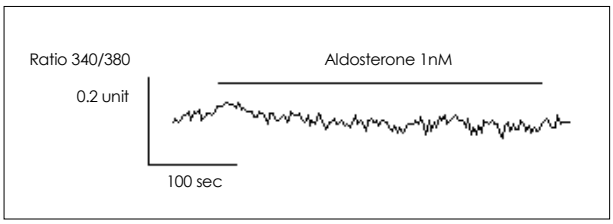

Fig. 2. Aldosterone did not produce any subsequent change $[Ca^{2+}]_i$ in cultured normal human nasal epithelial cells. The same result was shown at the experiment with dexamethasone.

상승을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 기도 점막 상피세포에서 세포내 칼슘이온농도를 떨어뜨린다고 알려져 있는 dexamethasone과 aldosterone은 코점막 상피세포에 1 nM부터 1 μM까지 단독 투여시 세포내 칼슘이온농도의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

코점막 상피세포에 dexamethasone 또는 aldosterone을 10분간 전처치후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 ATP 단독 투여 후 10분간 전처치 없이 있은 후 ATP를 재 투여 시 나타난 세포내 칼슘이온농도의 최고값을 기준값과 비교하여 나타낸 백분율(% above control) 값과 비교 시 1 nM부터 1 μM까지 모든 전처치군에서 세포내 칼슘이온농도가 통계학적으로 유의한 수준으로 감소가 나타났음을 확인하였다. 또한 전처군에서 전처치후 ATP의 반응을 본 후 5분간 세척하고 다시 ATP를 투여하였을 때 세포내 칼슘이온농도의 변화효과가 계속 유지 됨을 확인할 수 있었다(Figs. 3 and 4).

Dexamethasone과 aldosterone에 의한 ATP 유도 점액 분비량의 변화

코점막 상피세포에서 비 전처치군에서 30분간 ATP 100 μM을 투여 후 검출된 점액의 양은 대조군에 대하여 약 250% 가량의 뚜렷한 상승을 확인하였다. 그러나 dexame-

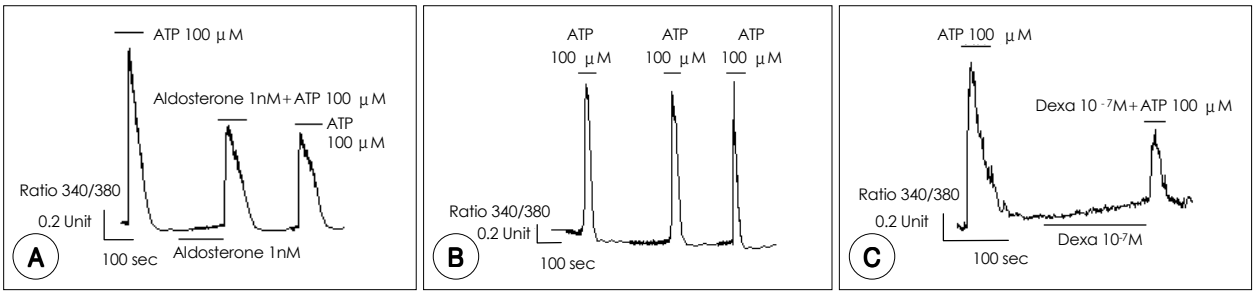

Fig. 3. A, ATP-induced [Ca2+]i response before and after pretreatment with aldosterone in NHNE cells. B, Effect of ATP-induced [Ca2+]i without pretreatment at the same timelaps of experiment A. C, Pretreatment with dexamethasone produced the decline of ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ response same as pretreatment with aldosterone.

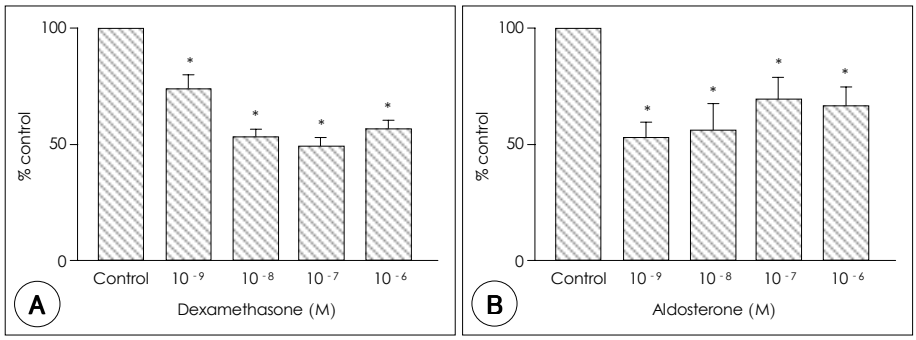

Fig. 4. Effect of dexamethasone (A) and aldosterone (B) on ATP induced $[Ca^{2+}]_i$ with various concentrations of aldosterone or dexamethasone(10^{-9}-10^{-6}M) in NHNE cells. The most effective concentration was 10^{-7}M (dexamethasone) and 10^{-9}M (aldosterone), respectively.

thasone 또는 aldosterone을 10분, 1시간, 그리고 24시간 동안 전처치 후 ATP 100 μM을 30분간 처치하였을 경우 비 전처치군에 보인 점액분비의 증가보다 감소되는 것을 확인하였다. 그 중 1시간과 24시간 전처치군은 비 전처치군에 비해 통계적으로 의미있게 감소되었음을 확인하였고, 10분 전처치군에서는 dexamethasone은 통계적 의의를 보였으나 aldosterone은 통계적 의의가 없게나와 aldosterone이 dexamethasone보다 다소 반응 속도가 늦음을 알 수 있었다(Fig. 5).

Dexamethasone에 의한 MUC5AC 유전자 표현에 대한 영향

효소결합면역흡착검사에서 aldosterone과 dexamethasone 전처치 후 나타난 ATP에 의한 점액분비량의 감소 중 10분과 24시간 전처치시 나타난 점액분비량의 감소가 점액유전자의 전사과정에 영향을 미쳐 나타나는 유전적 효과인지를 알아보기 위해 기도세포의 대표적인 점액유전자인 MUC5AC에 대한 유전자 표현여부를 역전사 연쇄 중합 반응으로 확인하였다. 그 결과 대조군과 10분 dexamethasone 전처치군의 경우 MUC5AC mRNA가 확연히 관찰되었으나 24시간 dexamethasone의 전처치가 있었던 군은 MUC5AC mRNA의 발현이 억제되었음을 확인하였다(Fig. 6). 이를 통해 10분 dexamethasone 전처군에서의 ATP에 의한 점액분비의 감소는 비유전적 효과에 의한 것임을 증명할 수 있었다.

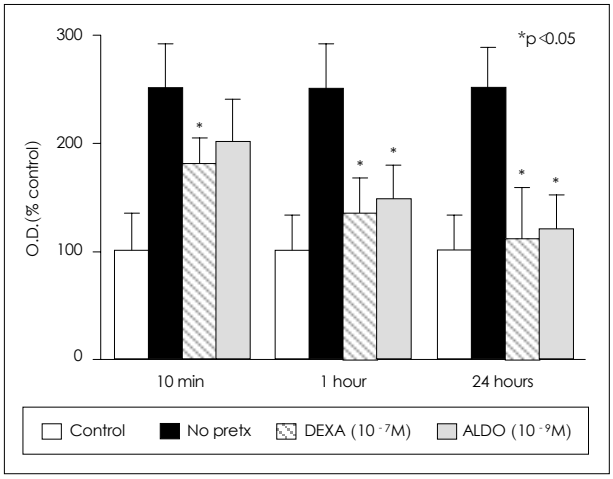

Fig. 5. Effect of dexamethasone and aldosterone on the ATP-induced mucin secretion. NHNE cells were pretreated with dexamethasone (10^{-7}M) or aldosterone (10^{-9}M) for 10 min, 1 hour, and 24 hours before treatment of ATP (100 μM). The data are representative of three independent experiments.

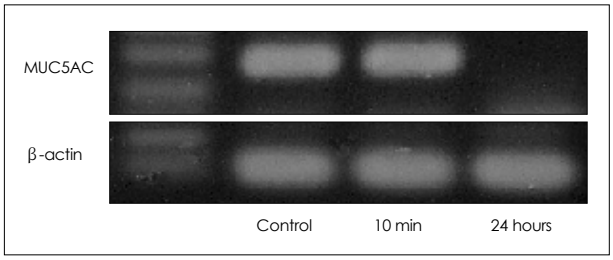

Fig. 6. Effect of dexamethasone on mRNA expression of MUC5AC mucin gene in NHNE cells. Cultured NHNE cells were stimulated with ATP (100 μM) for 30 minutes to dexamethasone pretreated cells. β-actin is an internal positive control.

고 찰

본 저자들은 이번 실험의 결과를 통해 배양된 정상 사람 코점막 상피세포에서 dexamethasone과 aldosterone의 점액부비에 미치는 속효성, 비유전적 효과에 대한 증거를 제시할 수 있었으며 이는 Fernando 등[9]이 사람 코점막 상피세포에서 aldosterone의 속효성 효과에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 보고한 이후에 사람 코점막 상피세포에서 dexamethasone과 aldosterone의 속효성, 비유전적 효과를 보고한 첫 논문이라 생각된다.

스테로이드 홀몬의 세포내 칼슘이온농도에 대한 속효성 효과는 여러 세포에서 이미 발표되었다. Mineralocorticoid 인 aldosterone의 경우 human bronchial epithelial 16HBE14o - cell과 skeletal muscle에서 세포내 칼슘이온농도를 낮추며,[5)10)] vascular smooth muscle, rat colonic epithelial cell, T84 cell, 그리고 murine cortical collecting duct cell에서 빠른 상승을 유발한다고 하였다.[4)11)12)] 또한 17β - estradiol은 cardiac myocyte와 coronary arterial smooth muscle에서 세포내 칼슘이온농도를 빠르게 낮춘다고 하였으며,[13)14)] glucocorticoid는 cortical collecting duct, proximal tubule, 그리고 vascular smooth muscle에선 세포내 칼슘이온농도의 빠른 상승을,[3)4)15)] 반대로 myocyte, human lymphoblast, airway smooth muscle, 그리고 16HBE14o - cell에선 감소를 보고하였다.[6)10)16)17)] 이런 다양한 반응들은 스테로이드 홀몬과 세포의 종류에 따라 속효성, 비유전적 효과가 각기 다른 수용체와 신호전달체계를 경유하므로 생겨나는 것으로 추측하고 있다. 사람 코점막 상피세포의 경우 Fernando 등[9]은 aldosterone의 속효성 효과에 의해 세포내 칼슘이온농도의 상승이 나타났음을 보고하였다. 그러나 본 저자들의 실험에선 aldosterone뿐 아니라 dexamethasone에서도 ATP없이 단독 투여시 세포내 칼슘이온농도의 변화를 확인할 수 없었다.

본 실험은 몇 분 이내에 그 효과가 나타나는 속효성과 점액유전자의 표현이 감소되지 않음을 확인함으로써 스테로

이드 홀몬의 비유전적 효과를 확인하였다. 그러나 이런 비유전적 효과에 관여하는 결정적인 수용체에 대해선 많은 연구에도 불구하고 아직 명확히 밝혀지지 못한 상태이며, 다수의 연구자들도 단지 세포질내의 수용체가 아닌 세포막 수용체에 의해 속효성, 비유전적 효과를 나타내지 않는가 생각하고 있다.

Urbach 등[5)6)]은 배양된 사람 기관지 상피세포와 16HBE14o - cell에서 dexamethasone과 aldsoterone의한 세포내 칼슘이온농도의 저하를 확인하였고 이러한 효과가 adenylate cyclase와 protein kinase A를 경유한 thapsigargin - sensitive Ca^{2+} - ATPase에 의한 것임을 증명하였다. 그러나 본 저자들의 경우 코점막 상피세포에 dexamethasone또는 aldosterone을 단독 투여시 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰할 수 없었으므로 코점막 상피세포에서 스테로이드 홀몬의 속효성, 비유전적 효과에 관여하는 세포내 신호전달체계는 세포주(cell line)와 primary cell의 차이 또는 코점막 상피세포와 기관지 점막상피세포와의 차이에 따라 다름을 추측할 수 있었다.

Nucleotide들은 상, 하기도의 다양한 세포들에 중요한 생물학적 작용을 하고 있으며, 특히 상피세포의 첨단 세포막에 있는 P2Y 수용체는 inositol 1,4,5 - triphosphate(IP3)와 세포내 칼슘이온의 이동을 매개하여 초기 분비에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. Choi 등[18)]은 배양된 정상 사람 코점막 상피세포에서 P2Y subtype으로 $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_{11}$가 발현되어 있으며 $P2Y_6$는 발현되지 않았다고 하였다. 본 저자들 또한 본 논문에 개재하진 않았지만 배양된 정상 사람 코점막 상피세포에서 P2Y subtype을 조사한 결과 동일한 결과를 얻었다. ATP는 P2Y 수용체뿐 아니라 P2X 수용체까지 자극하는 강력한 촉진제로서 다양한 세포내 신호전달체계를 경유한다고 알려져 있다. 본 저자들은 코점막 상피세포에서 ATP의 투여로 인한 빠른 세포내 칼슘이온농도의 상승과 점액분비의 증가를 확인하였다. 또한 dexamethasone과 aldosterone을 전처치후 ATP를 투여하여 전처치전의 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도와 점액분비의 상승이 전처치후 감소함을 증명하여 dexamethasone과 aldosterone의 속효성의 항분비 효과를 확인하였다.

스테로이드 홀몬의 점액분비감소 효과를 보고한 이전의 실험들의 경우 그 효과가 유전적 과정을 거침을 증명하기 위해 스테로이드 홀몬에 의한 점액유전자의 발현 억제 여부를 증거로 제시하였다. Kai 등[19)]과 Kim 등[20)]은 각각 dexamethasone과 budesonide가 NCI - H292(human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line)배양 세포에서 점액유전자의 발현을 억제함을 증명하였고 이를 통해 스테로이드 홀몬의 점액분비의 감소효과가 유전적 효과에 의한 것임을 주장하였다. 본 저자들도 24시간동안 dexamethasone에 노출된 코점막 상피세포에서 MUC5AC 점액유전자의 표현감소를 확인함으로써 24시간 dexamethasone 전처치후 코점막 상피세포에서 나타난 점액분비의 감소는 유전적 효과에 의한 것임을 확인하였다. 이에 반하여 10분간 dexamethasone 전처치후 점액유전자의 표현감소가 없이 나타난 점액분비의 감소는 비유전적 효과임을 증명할 수 있었다.

결 론

본 연구를 통해 정상 사람 코점막 상피세포에서 dexamethasone과 aldosterone의 속효성, 비유전적 효과에 의한 항분비 효과를 확인하였고, 이를 속효성의 항분비 제제 개발에 있어서 하나의 연구모델로 제시하는 바이다.

중심 단어 : 코점막 · 점액 · 덱사메타존 · 알도스테론 · MUC5AC.

본 논문은 원이호 연구기금과 2003년도 연세 원주의대 학생 연구비의 보조로 이루어졌음.

REFERENCES

1) Kim KC, Gleich GJ, Lee MK. *Two eosinophil granule proteins, eosinophil peroxidase and major basic protein, inhibit mucin release from hamster tracheal surface epithelial cells in primary culture. Inflamm Res 1999;48:314-7.*
2) Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Margioris AN, Gravanis A, Stournaras K. *Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: Evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. J Cell Biol 1996;62:251-61.*
3) Steiner A, Vogt E, Locher R, Vetter W. *Stimulation of the phosphoinositide signalling system as a possible mechanism for glucocorticoid action in blood pressure control. J Hypertens 1988;6:S366-8.*
4) Harvey BJ, Higgins M. *Non-genomic effects of aldosterone on Ca^{2+} in M-1 cortical collecting duct cells. Kidney Int 2000;57:1395-403.*
5) Urbach V, Harvey BJ. *Rapid and non-genomic reduction of intracellular[Ca^{2+}] induced by aldosterone in human bronchial epithelium. J Physiol 2001;537:267-75.*
6) Urbach V, Walsh DE, Mainprice B, Bousquet J, Harvey BJ. *Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl- secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. J Physiol 2002;545:869-78.*
7) Lin H, Carlson DM, St George JA, Plopper CG, Wu R. *An ELISA method for the quantitation of tracheal mucin from human and non-human primates. Am J Respir Cell Mol Biol 1989;1:41-8.*
8) Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Annal Biochem 1987;162:156-9.*
9) Fernando G, Gunter SS, Rudolf MH, Axel U, Peter CS, Ursula K, *et al. Impaired rapid mineralocorticoid action on free intracellular calcium in pseudohypoaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:831-4.*
10) Passaquin AC, Lhote P, Ruegg UT. *Calcium influx inhibition by st-*

eroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. Br J Pharmacol 1998;124:1751-9.

11) Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M. *Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: Subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. Biochem Biophys Res Commun 1994; 204:475-81.*

12) Maguire D, Macnamara B, Cuffe JE, Winter D, Doolan CM, Urbach V, *et al. Rapid responses to aldosterone in human distal colon. Steroids 1999;64:51-63.*

13) Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, Macleod KT. *Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca^{2+} current and intracellular free Ca^{2+} in guineapig isolated cardiac myocytes. Br J Pharmacol 1992;106:739-5.*

14) Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. *Estrogen inceases Ca^{2+} efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. Am J Physiol 1999;276:H926-34.*

15) Han HJ, Kim DH, Park SH, Lee YS, Lee JH, Yang SI. *Regulatory mechanism of polarized membrane transport by glucocorticoid in renal proximal tubule cells: Involvement of $[Ca^{2+}]i$. J Vet Med Sci 1999;61:1197-202.*

16) Gardner JP, Zhang L. *Glucocorticoid modulation of Ca^{2+} homeostasis in human B lymphoblasts. J Physiol 1999;514:385-96.*

17) Chhabra SK, Khanduja A, Jain D. *Decreased sodium-potassium and calcium adenosine triphosphatase activity in asthma: Modulation by inhaled and oral corticosteroids. Indian J Chest Dis Allied Sci 1999; 41:15-26.*

18) Choi JY, Namkung W, Shin JH, Yoon JH. *Uridine-5'-triphosphate and adenosine triphosphate γS induce mucin secretion via Ca^{2+}-dependent pathways in human nasal epithelial cells. Acta Otolaryngol 2003;123:1080-6.*

19) 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; 271:484-8.*

20) Kim YD, Cho JS, Chang KY, Sin JH, Song SY, Yoon SK. *Budesonide down-regulates IL-1β-mediated MUC2/MUC5AC genes expression and mucin secretion in human airway epithelial cells. Korean J Otolaryngol 2002;45:873-7.*