

## 염기성 아미노산인 라이신 중합체가 일차 배양된 햄스터 기관표면 상피세포에서의 점액소 유리에 미치는 영향

이충재<sup>†</sup> · 김 선 · 홍경희

삼육간호보건대학 보건과학연구소 및 치위생과 기초의학교실

### Effect of polymer of lysine on the mucin release from primary cultured hamster tracheal surface epithelial cells

Choong-Jae Lee<sup>†</sup>, Seon Kim and Kyung-Hee Hong

Lab of Basic Medical Sciences, Department of Dental Hygiene and Research Institute of Health Sciences, Sahmyook Nursing and Health College, Seoul 130-711, Korea

**ABSTRACT** In the present study, we tried to investigate whether poly-L-lysine(PLL)(MW 78,000 and 9,600) significantly affect mucin release from cultured hamster airway goblet cells. Confluent primary hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PLL to assess the effects on <sup>3</sup>H-mucin release. Possible cytotoxicities of PLL were assessed by measuring Lactate Dehydrogenase(LDH) release during treatment. The results were as follows : (1) PLL significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells in a dose-dependent manner; (2) there was no significant release of LDH by treatment of PLL 9,600; (3) however, in the case of treatment of PLL 78,000, there was significant release of LDH during treatment. We conclude that PLL which has molecular weight under 10,000 might inhibit mucin release from airway goblet cells without significant cytotoxicity. This finding suggests that PLL might be used as a tool of research for the hypersecretion of airway mucus.

**Key words** Airway, PLL, Mucin, HTSE

## 서 론

기관 강내 표면(tracheal luminal surface)에 존재하는 점액(mucus)은 mucociliaryclearance라 불리는 기전을 통해, 대기 중 입자와 화학물질 등에 대한 인체의 방어작용에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 점액의 보호기능은 주로 점액성 당단백질인 뮤신의 물리화학적 성질 때문인데, 이 뮤신은 수백만 dalton의 분자량을 가진 당단백질로서, 기도 뮤신의 양과 질의 이상은, 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어작용에 영향을 주어 더 심한 병리 현상을 유발한다. 기도 점액의 과다분비 혹은 점도의 변화는, 만성 기관지염, 천식, 낭포성 섬유증과 같은 다수의 기도질환에 이환된 환자 및 대기 오염이 심한 도시에 사는 사람들에게는 심각한 문제이다. 다수의 생약 및 거담제, 점액용해제 등이 환자의 기도로부터 끈끈한 점액을 제거하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있음<sup>2)</sup>에도 불구하고, 현재 객관적인 임상적, 약리학적 실험결과를 얻을

수 없는 실정이다. 한편, 대표적인 염증성, 폐쇄성 호흡기 질환인 천식 환자에서 관찰되는 기도조직에의 호산성구의 침윤 및 호산성구 증가는 천식발작에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 제시된 바 있다<sup>3,4)</sup>. 호산성구의 세포질 과립 내에는 major basic protein of eosinophil(MBP), eosinophil peroxidase(EPO)와 같은 염기성 단백질이 존재한다<sup>4)</sup>. MBP와 EPO는 등전점(isoelectric point)이 각각 10 이상이라고 보고되어 있으며, 양전하를 다량 보유하고 있는 폴리양이온성 펩티드인데, 이는 그 구성 아미노산중 양이온성 아미노산인 arginine 이나 lysine residue 때문임이 확인되어 있다. 많은 연구자들은 MBP 나 EPO의 작용이 그 특징적인 양이온성 때문이라는 점에 착안, lysine의 homopolymer인 PLL(poly-L-lysine)과 arginine의 homopolymer인 PLA(poly-L-arginine)와 같은 폴리양이온성 펩티드를 이용, 이들 물질의 호흡기계에 대한 작용을 연구해 왔다<sup>5-8)</sup>. 이러한 연구결과들에 착안한 본 연구에서도, 내인성 양이온성 펩티드인 MBP의 분자량과 유사한 범위의 분자량 9,600 정도의 PLL이, 호흡기 뮤신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차 배양된 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포에서의 뮤신 유리에 미치는 영향을 규명함으로써, 기도 배상세포로부터 뮤신(점액소)의 분비를 조절할 수 있는 후보물질을 탐색하고자

<sup>†</sup>Corresponding author  
Tel: 011-9736-9501  
Fax: 02-3407-8504  
E-mail: ttl@snhc.ac.kr

하였다. 이러한 기초과학적 정보들은 만성 기관지염, 천식 등의 극심한 호흡기 질환으로 인한 고통의 경감과 아울러 호흡기 질환의 치료 효율 향상을 목표로 한 새로운 약물의 개발에 한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위한 8주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터 및 *in vivo* 실험을 위한 6~8주령의 웅성 S.D. rat을 동물 사육 및 수입업체인 해은무역에서 공급 받았다. 동물이 실험실에 도착한 후 2~3일간 실험실 환경에 순화시키고, 순화기간 중 일반상태를 관찰, 건강한 동물만을 사용하였다. 환기가 잘되고, 12시간 명암 주기가 유지되며, 실온이 25°C 내외로 유지되는 환경에서 사료와 식수를 자유로이 섭취시켰다.

### 2. 시약

Poly-L-lysine(PLL)(MW 78,000 and 9,600), pronase(Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase(Type VI-S), LDH assay kit(LD-L 10), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate 등은 Sigma 사(St. Louis, Mo., USA)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium(S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME), fetal bovine serum(FBS), Medium 199(M199) 등은 GIBCO 사(Grand Island, New York, USA)에서, Vitrogen 100은 Celtrix Lab.(Santa Clara, CA, USA)에서 구입하였으며, 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 이차증류수를 한번 더 탈이온하여 사용하였다.

### 3. 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등<sup>9,10)</sup>의 방법을 사용하였다. 8 내지 10 주령의 웅성 햄스터를 이산화탄소로 질식사 시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free Minimum Essential Medium에 용해시킨 0.1% pronase를 기관강 내에 주입하고, 4°C에서 16 시간 동안 방치하였다. 16시간 후, 기관강 내용물을 세척 및 수거하고, 10% fetal bovine serum을 함유하는 MEM 내에서 200×g로 원심분리 함으로써 수거한 세포를 2회 세척했다. 세척된 cell pellets는 insulin(5 µg/ml), transferrin(5 µg/ml), epidermal growth factor(12.5 ng/ml), hydrocortisone(0.1 µM), sodium selenite(0.01 µM), retinoic acid(0.1 µM), fetal bovine serum(5%, v/v), Penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), Gentamicin(50 µg/ml) 등이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 M199의 1:1 혼합 배양액에 재현탁시켰다. Vitrogen 100을 이용하여 준비된 두꺼운 collagen gel(0.15 ml/cm<sup>2</sup>)이 도포된 24 well plate에 세포를 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 분포시켰다. 세포는, 습도가 충분히 유지되며, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는, 37°C 세포배양기내에서 배양

되었으며, 1~3일간 배양된 후에는 37°C에서 32°C 조건으로 변경하여 배양하였다. 배양액 교체는 배양 개시후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

### 4. 뮤신의 대사적 방사선 표지

Kim 등의 방법<sup>10)</sup>을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10<sup>5</sup> cells/well)에 10 µCi/ml의 [6-<sup>3</sup>H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well 당 200 µl 씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radio-labeling)되었다.

### 5. Poly-L-lysine(PLL)의 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액(pre-treatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well 당 0.5 ml의 Dulbecco's Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사들을 제거한 뒤 최종농도 0.1 µM-10 µM의 PLL을 함유하는 PBS를 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample 들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50 µl의 상등액은 젖산 탈수소효소 활성 측정(LDH activity assay)에 사용하기 위해 덜어 놓은 후, 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저장하였다<sup>10)</sup>.

### 6. 뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude 되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였다<sup>10)</sup>. 수거된 PT, T sample을 0.1 M citric acid를 써서 pH 5.0으로 조정하고 100 unit/ml의 testicular hyaluronidase(Type VI-S)를 가한 뒤 37°C에서 16시간 동안 incubation 하였다. Incubation이 끝나면 digestion mixture를 0.2 M NaOH로 중화시키고 최종농도가 0.1%가 되도록 SDS 용액을 가한 뒤 2분간 끓인 다음 12,000×g에서 5분간 원심 분리했다. PT의 경우 원심분리 후의 상등액 50 µl에 150 µl의 running buffer(50 mM NaAc, 0.1% SDS, pH 7.2), 2 µl의 10% SDS, 3 µl의 5 M NaCl을 가했고, T의 경우에는 상등액 100 µl에 100 µl의 running buffer, 2 µl의 10% SDS, 3 µl의 5 M NaCl을 가한 뒤 철저히 혼합하였다. 이렇게 조제된 loading sample 들을 running buffer로 평형화된 Sepharose CL-4B column(1×50 cm)에 적용하였다. Column은 0.336 ml/min의 유속으로 작동되었고, 한 분획의 용량은 0.42 ml로 하였다. 6 ml 용량의 vial에 수거된 각 분획에 3.2 ml의 scintillation cocktail을 가하고 잘 섞은 뒤 Liquid Scintillation Counter(LKB Wallac)를 이용, 방사선량을 측정하였다. 전체 분획 중 void volume peak의 4분획의 방사선량 총합을 그 sample 중의 뮤신의 양으로 정의하였다. 각 culture well 간에 있을 수 있는 뮤신 기초 유리율의 변이도를 보정하기 위하여, T 기간 동안 유리된 뮤신의 양을 PT 기간 동안 유리된 뮤신의 양으로 나누어 얻어지는 비율을 분비지수(secretory index)로 정의하고, 대조군과 약물처리군의 분비지수 평균값을 통계학적으로

비교함으로써, 뮤신유리에 미치는 약물의 효과를 검증하고자 하였다.

### 7. PLL 처리시 HTSE 세포로부터 유리되는 젖산 탈수소 효소(LDH) 활성 측정

LDH 활성 측정은 commercial kit(Sigma, LD-L 10)을 이용하였다. 50 µl의 배양 상등액을 assay kit의 reaction mixture와 혼합하고 340 nm에서의 경시적 흡광도 증가치를 UV-spectrophotometer로 측정, LDH 활성도를 계산하였다.

### 8. 통계처리

모든 측정 결과는 mean±S.E.M.으로 환산된 후, 약물처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타났다. 통계처리는 unpaired Student's *t*-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

염기성 아미노산을 함유함으로써 cationicity를 나타내는 물질들은 기도 상피세포로부터의 뮤신유리를 증가시키는 경향을 나타낼 것으로 추정되어 왔는데, 그 이유는 그러한 물질들이 호흡기에서의 과민반응을 일으키거나<sup>5,8,11,12</sup>, 상피세포막의 투과도를 증가시키는 등<sup>6,13</sup>의 작용을 나타내기 때문이었다. 그러나, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포(HTSE)에서, EPO와 MBP 등의 염기성, 양이온성 내인성 펩티드가 뮤신유리를 억제한다는 보고는<sup>14</sup>, 위에서 언급된 실험결과들에 근거한 추정과는 상반된 보고였다. 이러한 실험결과와 연계된 본 연구에서도, PLL 등의 염기성 아미노산의 중합체가 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포를 대상으로 한 *in vitro*에서의 뮤신유리를 억제하는 것으로 나타났다. 일차배양된 HTSE 세포에 대해 PLL 78,000은 1 µM 농도에서 뮤신유리를 85% 가량 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 PLL 9,600은 10 µM 농도에서 뮤신유리를 80% 가량 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 lysine이나 arginine 등 염기성 아미노산의 중합체가 기도의 상피세포층으로부터의 뮤신유리를 억제함으로써 낭포성 섬유증, 천식 등에서 관찰되는 기도점액 과다분비 현상의 조절물질로 작용할 가능성을 제시하는 것이라 볼 수 있다. 또한, 기도 상피세포 뿐 아니라 소화기 혹은 여타의 점액을 분비하는 상피세포의 기능 연구에 있어서 하나의 연구수단으로서 이용될 가능성도 제시하는 것이라 볼 수 있다. 한편, 호산성구 유래의 내인성 염기성 단백질 중 일부는 인체의 호흡기계에 독성을 나타내는 것으로 보고되어 왔는데, 구체적으로 기도 상피세포의 부종, 박리 등이 보고되어 있다<sup>3,15,16</sup>. 이러한 보고들은 말기성 천식환자에게서 혈중 호산성구 증다증(hypereosinophilia)이 관찰되며, 호산성구의 기도내 침윤이 천식의 증상 발현에 중요한 역할을 할 것이라는 임상적 견해에 근거한 실험결과들이다<sup>3,4,11,12</sup>. 따라서, 본 연구에서도 뮤신유리 억제 작용을 발현하는 PLL이 동일한 배양세포에 대해 세포독성을 발현할 가능성을 검증해 보고자 하였다. 세포막이 손상되면 그 세포는 정상기능을 잃게 된다. 세포질 내에 존재하는 효소인 LDH는 유해물질 혹은 유해한 세포 외 환경으로 인한 세포막의 손상에 의해 세포 외로 유리될 수 있으며, 따라서 PLL에 의해 발현

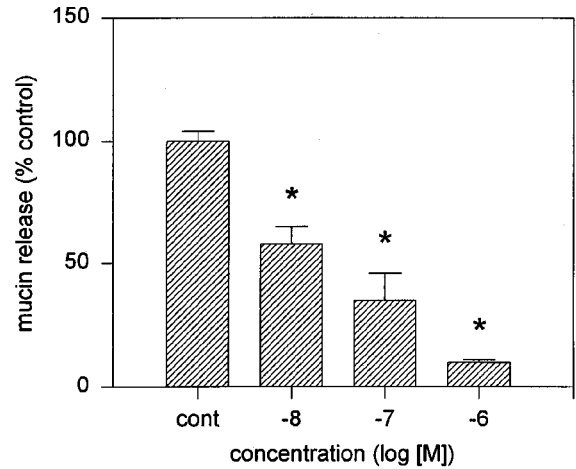


Fig. 1. Effect of PLL 78,000 on mucin release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.01 - 1 µM of PLL and the amount of <sup>3</sup>H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control(p<0.05).

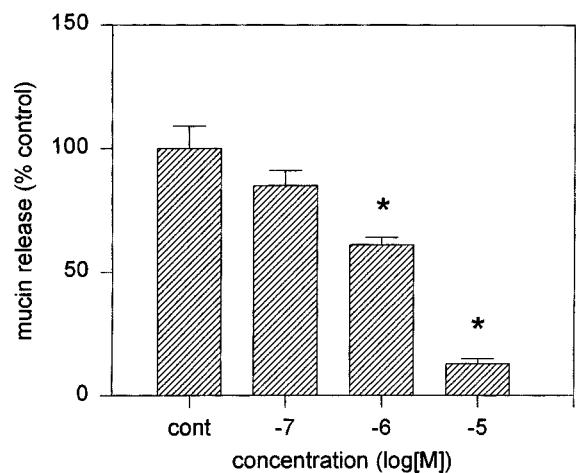
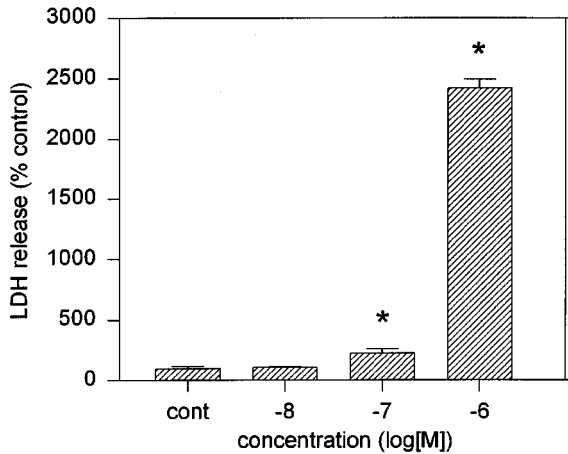


Fig. 2. Effect of PLL 9,600 on mucin release from cultured HTSE cells.

Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.1 - 10 µM of PLL and the amount of <sup>3</sup>H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control(p<0.05).

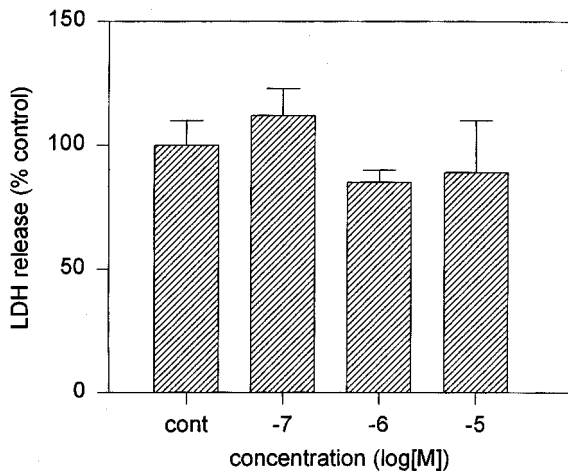
될 수 있는 세포독성의 한 지표로 채택될 수 있다. Fig. 3에 나타난 결과에서 볼 수 있듯이 PLL 9,600은 대조군과 비교시 LDH 유리를 유의성 있게 증가시키지 않았음을 알 수 있다. 그러나, Fig. 4에서 볼 수 있듯이, PLL 78,000의 경우에는 최고농도에서 상당량의 LDH가 유리되었음을 알 수 있고, 이러한 결과는 분자량 9,600의 PLL의 경우에만 독성이 발현되지 않는 안전한 범위에서 뮤신유리 억제활성이 강력하게 발현될 가능성을 제시하는 결과이다. 다수의 연구자들에 의하면,



**Fig. 3. Effect of PLL 78,000 on LDH release from cultured HTSE cells.**

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of PLL for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

\*: significantly different from control ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4. Effect of PLL 9,600 on LDH release from cultured HTSE cells.**

Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of PLL for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

염기성 양이온성 물질들의 분자량에 따라 그 생물학적 활성이 다르게 나타난다는 보고를 확인할 수 있으나, 본 연구에 사용된 두 물질간에, 뮤신유리 억제 활성에는 차이가 없으나 세포독성 발현에서는 현저한 차이가 나는 이유에 대해서는 더 많은 연구가 이루어질 필요가 있다. 동시에, 추가적인 연구결과가 도출된 후에 확실히 언급할 수 있는 문제이나, 이러한 정보들은 PLL과 같은 염기성 아미노산의 중합체가 기도점액 과다분비 질환에서의 안전한 점액분비 조절약물로 이용되기 위해서 적어도 분자량이 낮으면 낮을수록 더 이상적일 것이라는 추정을 가능케 한다. 현재 본 연구자 등에 의해 이러한 주제들과 관련된 후속연구가 진행되고 있다.

## 요약

본 연구에서는 분자량 78,000과 9,600의 poly-L-lysine(PLL)이 일차배양된 햄스터의 기관표면 상피세포로부터의 뮤신유리에 어떠한 영향을 미치는지를 검증하고자 하였다. 완전히 다 자란 배양세포에  $^3\text{H}$ -glucosamine을 함유하는 완전 배양액을 첨가하고 24시간 배양함으로써 배양세포 중의 뮤신에 대사적 방사선 표지를 완결한 후 다양한 농도의 PLL을 30분간 처리하고, 유리되는 방사성 뮤신의 함량을 측정하였다. PLL에 의한 세포독성 발현여부를 검증하기 위하여 PLL 처리 후 배양세포로부터 유리되어 배양액 중에 존재하는 Lactate Dehydrogenase(LDH)의 활성을 측정하였다. 실험 결과, PLL은 분자량 78,000 및 9,600의 두 물질 공히 용량 의존적으로 뮤신유리를 억제하였다. 그러나 세포독성의 지표인 LDH 유리에 대한 영향은 PLL 9,600의 경우에는 유의성이 없었으나, PLL 78,000의 경우에는 현저한 유리 증가를 보였다. 이러한 결과는 PLL의 경우, 분자량이 10,000 이하의 범위에서 세포독성을 발현하지 않으면서도 뮤신유리를 특이적으로 억제할 가능성을 제시하고 있으며, 동시에 PLL이 기도점액 과다분비 현상을 연구함에 있어서 유용한 실험수단으로 이용될 가능성도 제시하고 있는 것이다.

## 참고문헌

1. Newshound MT, Biennenstock J: Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease, Baum, G.L. and Wolinsky, E.(eds) 3rd ed. Little Brown and Company, 1983.
2. Mutschler E, Derendorf H: Drug actions. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, 410-411, 1995.
3. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ: Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* 56: 345-353. 1981.
4. Gleich GJ: The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 85: 422-436, 1990.
5. Coyle AJ, Ackerman SJ, Irvin, CG: Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am Rev Respir Dis* 147: 896-900, 1993.
6. Hammes M, Singh, A: Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayer to albumin. *J Lab Clin Med* 123: 437-446, 1994.
7. Singh AK, Kasinath BS, Lewis EJ: Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1120: 337-342, 1992.
8. Uchida DA, Ackerman SJ, Coyle AJ, Larsen GL, Weller PF, Freed J, Irvin CG: The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat *in vivo*. *Am Rev Respir Dis* 147: 982-988, 1993.
9. Kim, KC, Opaskar-Hincman H, Bhaskar KR: Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp Lung Res* 15: 299-314. 1989.
10. Kim KC, Rearick, JI, Nettesheim P, Jetten AM: Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J Biol Chem* 260: 4021-4027, 1985.
11. Gleich GJ, Flavahan NA, Fugisawa T, Vanhoutte PM: The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium; a model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 81: 776-781, 1988.
12. Wardaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB: Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects

- with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 137: 62-69, 1988.
13. Elferink JGR: Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations. *Inflammation* 15(2): 103-115, 1991.
  14. Ko KH: Inhibitor for secretion of mucin. The patent in the Republic of Korea, Registered No. 6828. 1995.
  15. Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ: Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 42: 35-43, 1980.
  16. Motogima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ: Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 139: 801-805, 1989.

(Received May 18, 2002; Accepted June 18, 2002)

