

## 히스티딘 중합체가 일차배양 기도 상피세포에서의 뮤신 유리에 미치는 영향

전병규\* · 윤인대\*\* · 이재우\*\*\* · 이충재\*\*\*\*#

\*대구보건대학 방사선과, \*\*인제대학교 의과대학, \*\*\*엘지 생명과학, \*\*\*\*충남대학교 의학전문대학원 약리학교실

(Received July 15, 2010; Revised August 1, 2010; Accepted August 6, 2010)

### Effects of Histidine Polymers on Mucin Release from Primary Cultured Airway Epithelial Cells

Byeong Kyou Jeon\*, In Dae Yun\*\*, Jae Woo Lee\*\*\* and Choong Jae Lee\*\*\*\*#

\*Department of Radiologic Technology, Daegu Health College, Daegu 700-722, Korea

\*\*College of Medicine, Inje University, Pusan 614-735, Korea

\*\*\*LG Life Science, Seoul 150-721, Korea

\*\*\*\*Department of Pharmacology, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-131, Korea

**Abstract** — We investigated whether poly-L-histidine (PLH) significantly affect mucin release from cultured airway epithelial 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 PLH to assess the effect on <sup>3</sup>H-mucin release. PLH 9,850 and PLH 6,700 specifically inhibit mucin release from airway goblet cells without significant cytotoxicity. This finding suggests that poly-L-histidine might function as an airway mucoregulative agent.

**Keywords** □ airway mucin, HTSE cells, poly-L-histidine)

호흡기의 기관강 표면(tracheal luminal surface)에 존재하는 점액(mucus)은 mucociliary clearance라 불리는 기전을 통해, 대기 중 입자와 화학물질 등에 대한 인체의 방어작용에 있어서 중요한 역할을 한다.<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 이상뿐만 아니라 인체의 방어작용에 영향을 주어 병리적 현상을 유발한다. 기도점액의 과다분비 혹은 점도의 변화는, 만성 기관지염, 천식, 낭포성 섬유증과 같은 다수의 기도질환에 이환된 환자 및 대기오염이 심한 도시에 사는 사람들에게는 심각한 문제이다. 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 점액 과다분비로 인한 과량의 점액을 기도로부터 제거하는 데는 두 가지 방법이 있을 수 있다. 첫째, 물리적 방법에 의한 점액의 제거, 즉 점액의 점도를 낮춘 뒤 흡인해내는 방법이고, 둘째는, 점액 생

성 자체를 억제할 수 있는 약물의 투여이다. 물리적 방법은 기도 내부의 자극을 유발하고, 반사기전에 의해 점액 분비를 오히려 자극하게 된다. 마취 하에서 그런 방법이 시도된다고 해도, 점액의 제거는 feedback mechanism을 통해 점액의 생성과 분비를 더욱더 자극하게 된다. 따라서, 점액에 점조성을 부여하는 주 구성요소인 뮤신의 생성 자체를 조절하거나 혹은 유리(분비)를 조절하기 위한 약물학적 접근은 기도질환의 치료에 있어 중요한 방향이 될 수 있다.<sup>2)</sup> 한편, lysine의 homopolymer인 PLL(poly-L-lysine)과 arginine의 homopolymer인 PLA(poly-L-arginine)와 같은 양전하성 아미노산의 중합체인 폴리양이온성 펩티드가 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 뮤신 유리(분비)를 억제하는데, 그 억제 작용은 이러한 물질이 보유하고 있는 다량의 양전하에 기인한다는 연구결과가 보고되었다.<sup>3)</sup> 이러한 보고에 착안하여 본 연구에서는, arginine과 lysine 외에 또 다른 양전하성 아미노산인 histidine의 중합체가 호흡기 뮤신 유리(분비)에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 등전점 (isoelectric point)이 10 이상인 arginine과 lysine과는 달리, histidine은 등전점이 6 정도인 아미노산으로서, 생리적 pH 조건 하에서 전체 아미노

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-580-8255 (팩스) 042-585-6627  
(E-mail) LCJ123@cnu.ac.kr

산의 10% 정도가 양전하를 보유하고 있으므로, 뮤신 유리 억제에 있어서 histidine의 중합체도 arginine과 lysine의 중합체와 동일한 영향을 발현하는 지 여부를 검증함으로써 기도 상피세포로부터 뮤신(점액)의 유리(분비)를 효과적으로 조절할 수 있는 또 다른 후보물질을 발굴하고자 하였다. 이러한 기초과학적 정보들은 만성 기관지염, 천식 등 극심한 호흡기 질환의 치료 효용 향상을 목표로 한 새로운 약물의 개발에 한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

## 실험방법

### 실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위하여, 8주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 전문 사육업체인 (주)다물 (Daejeon, Korea)로부터 공급받았다. 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.

### 시약

Poly-L-histidine(MW 9,850, PLH 9,850), poly-L-histidine(MW 6,700, PLH 6,700), pronase(Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase(Type VI-S), trypsin-EDTA, LDH assay kit(LD-L 10), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)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-BRL사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, Type I collagen은 Regenmed(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였다.

### 햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등의 방법<sup>4,6)</sup>을 사용하였다. 8 내지 10주령의 웅성 햄스터를 이산화탄소로 질식사시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> free Minimum Essential Medium에 용해시킨 0.1% pronase를 기관강 내에 주입하고, 4°C에서 16시간 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 pellets

는 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 재현탁 시켰다. Type I collagen을 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 세포 배양기내에서 배양되었으며, 1~3 일간 배양된 후에는 37°C에서 32°C 조건으로 변경하여 배양하였다. 배양액 교체는 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

### 뮤신의 대사적 방사능 표지(radiolabeling)

Kim 등의 방법<sup>4,6)</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, Amersham, U.S.A.)을 함유하는 완전배양액(insulin(5 µg/ml), transferrin(5 µg/ml), epidermal growth factor(12.5 ng/ml), hydrocortisone(0.1 µM), sodium selenite(0.01 µM), fetal bovine serum(5%, V/V)(이하 FBS), retinoic acid(0.1 µM), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), gentamicin(50 µg/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 Medium 199(M199)의 1:1 혼합 배양액)을 well당 200 µl씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지(metabolic radiolabeling)되었다.

### 약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사능 표지가 완결된 후 배양액(pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 Dulbecco's Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>- free PBS(Phosphate-Buffered Saline)를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤, 다양한 농도의 약물을 함유하는 PBS 200 µl를 well마다 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50 µl의 상등액은 젯산 탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)을 위해 따로 덜어두고 나머지는 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저장하였다.<sup>4,6)</sup>

### 뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신

으로 정의하였다.<sup>4,6)</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 incubation하였다. 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 원심분리했다. PT의 경우 원심 분리 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 sample들을 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 가지고 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 기초유리율의 변이도를 보정하기 위하여, T기간 동안 유리된 뮤신의 양을 PT기간 동안 유리된 뮤신의 양으로 나누어 얻어지는 비율을 분비지수(secretory index)로 정의하고, 대조군과 약물 처리군의 분비지수 평균값을 통계학적으로 비교함으로써, 뮤신 유리에 미치는 약물의 효과를 검증하고자 하였다.

#### PLH 9,850 및 PLH 6,700 투여 배양액(drug-treated sample)의 Sepharose CL-4B column을 통한 전체 용출양상 분석

배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate,  $5 \times 10^5$  cells/well)에, 10 µCi/ml의 [ $^3\text{H}$ ] glucosamine(39.2 Ci/mmol)을 함유하는 완전배양액을 well당 200 µl씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사능 표지하였고, 방사능 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 따로 보관해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 각 약물을 함유하는 PBS 200 µl를 well마다 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 얻어진 T sample을 1.0×50 cm 규격의 Sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35 ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 LSC를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 Sample과 각 약물의 처리가 뮤신 및 그보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출양상에 미치는 영향을 비교하였다.<sup>7,8)</sup>

#### 약물 처리 후 배양세포의 세포질로부터 유리된 젓산 탈수소 효소 활성 측정(LDH activity assay)

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.<sup>3,7,9)</sup>

#### 약물처리 24시간 후 배양세포의 culture matrix로부터 박리된 부유 세포수의 측정

약물이 배양된 세포에 대해 나타낼 수 있는 독성의 지표로서 30분간 약물처리 후 24시간 동안 culture matrix로부터 박리되어 배양 상등액으로 부유되는 세포의 수를 측정하였다. 30분간의 약물투여가 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. T sample을 수거하고 PBS로 배양세포를 2회 세척한 뒤, 신선한 완전배양액에 혼합된  $^3\text{H}$ -glucosamine(10 µCi/ml)을 well마다 가하고, 24시간 동안 다시 배양하였다. 24시간이 지나면 spent medium을 수거하고, 수거된 sample을 4°C에서 200×g로 5분간 원심분리함으로써 부유세포를 침강시켰다. 상등액을 제거한 뒤 침강된 세포에 37°C에서 10분간 0.02% trypsin과 0.5% EDTA를 처리하여 세포들을 분리시켰고, hemacytometer를 이용, 세포의 수를 측정하였다.

#### 통계처리

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

## 실험결과

#### Poly-L-histidine(PLH)의 뮤신 유리에 대한 영향

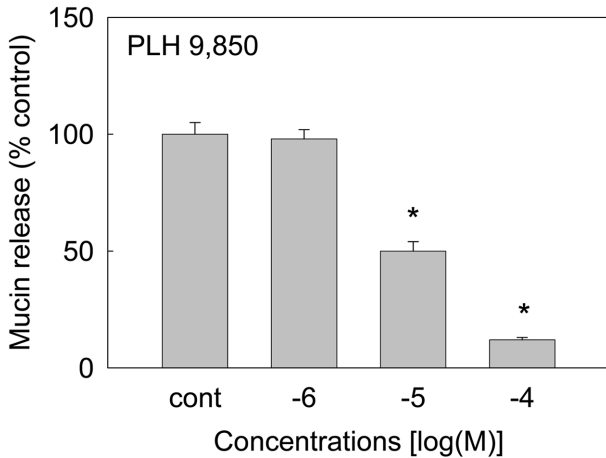
PLH 9,850과 PLH 6,700은 공히  $10^4\text{M}$  농도에서 뮤신 유리를 80~90% 가량 감소(억제)시켰다(Fig. 1, 2).

#### Poly-L-histidine(PLH)을 처리한 세포 배양액의 Sepharose CL-4B column을 통한 total elution profile 분석

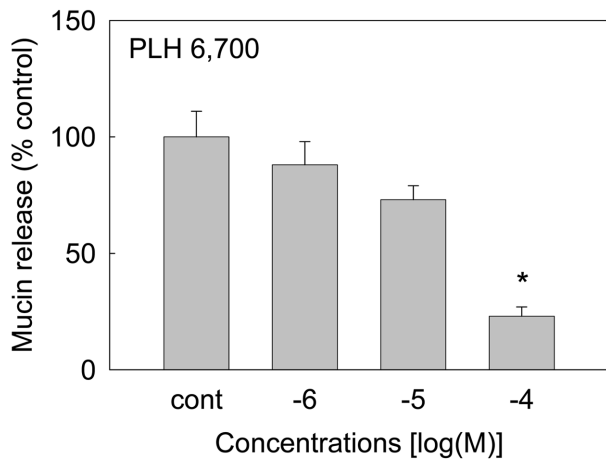
PLH 9,850과 PLH 6,700은 주로 뮤신의 유리(분비)에만 영향을 주며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 분비에는 유의성 있는 영향을 주지 않았다(Fig. 3, 4).

#### Poly-L-histidine(PLH)의 HTSE 세포로부터의 LDH release에 대한 영향 검증

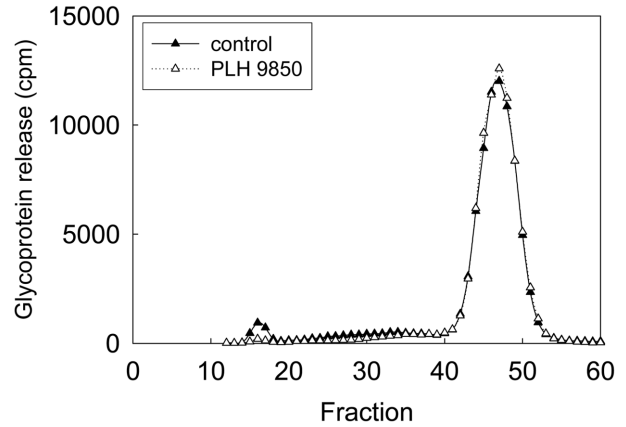
PLH 9,850과 PLH 6,700은 공히  $10^6\text{M} \sim 10^4\text{M}$ , 즉 전 농도 범위에서 LDH release에 유의성 있는 영향을 주지 않으므로써,



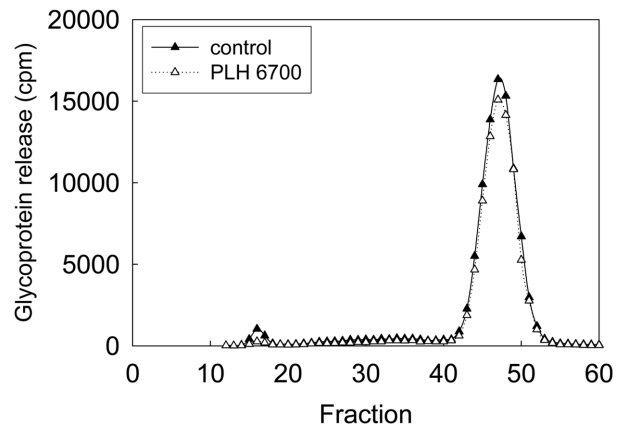
**Fig. 1** – Effect of PLH 9,850 on mucin release from airway goblet cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PLH 9,850. The amounts of <sup>3</sup>H-mucins in the spent media were measured as described in Materials and Methods. Each bar represents mean ± S.E.M. from 4 culture wells in comparison with that of control set at 100%. \*: significantly different from control (p<0.05).



**Fig. 2** – Effect of PLH 6,700 on mucin release from airway goblet cells. Confluent 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 PLH 6,700. The amounts of <sup>3</sup>H-mucins in the spent media were measured as described in Materials and Methods. Each bar represents mean ± S.E.M. from 4 culture wells in comparison with that of control set at 100%. \*: significantly different from control (p<0.05).



**Fig. 3** – Effect of PLH 9,850 on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of 10<sup>-4</sup> M of PLH 9,850 and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed.



**Fig. 4** – Effect of PLH 6,700 on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with <sup>3</sup>H-glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of 10<sup>-4</sup> M of PLH 6,700 and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed.

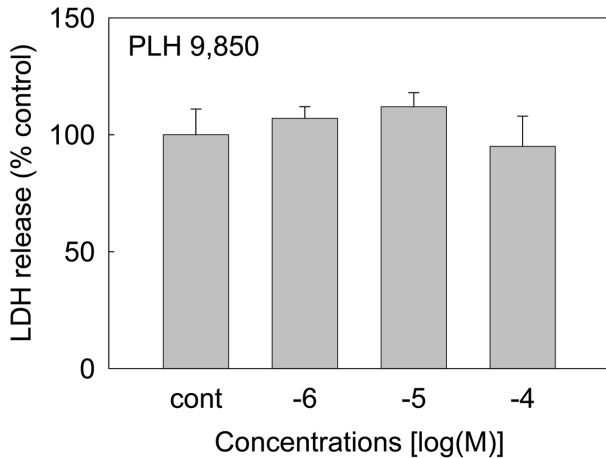
세포독성을 발현하지 않았다(Fig. 5, 6).

**30분간의 PLH 투여 후 24시간 경과 시, HTSE 세포의 culture matrix부터 박리(exfoliation) 정도 측정**

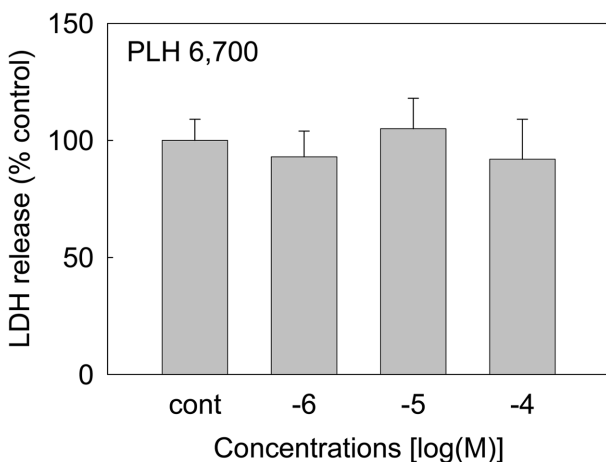
PLH 9,850과 PLH 6,700 각각 10<sup>-4</sup> M 농도로 투여 시,

**고 찰**

양전하를 띠는 화합물들은 호흡기에서의 과민반응<sup>10-13</sup>을 일으키거나, 상피세포막의 투과도를 증가시키는 등<sup>9-14</sup>의 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 보고들에 근거하여, 양전하

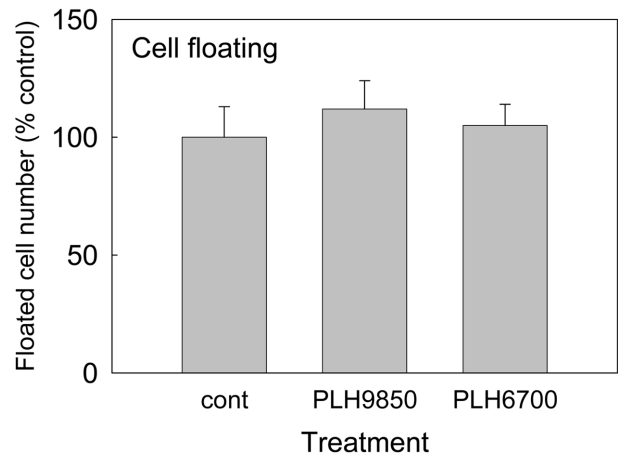


**Fig. 5** – Effect of PLH 9,850 on LDH release from airway goblet cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PLH 9,850. The supernatants were collected for LDH activity assay as described in Materials and Methods. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells in comparison with that of control set at 100%.



**Fig. 6** – Effect of PLH 6,700 on LDH release from airway goblet cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PLH 6,700. The supernatants were collected for LDH activity assay as described in Materials and Methods. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells in comparison with that of control set at 100%.

를 보유하는 물질은 기도 상피세포로부터의 뮤신 유리를 증가시키는 경향을 나타낼 것으로 추정되어 왔다. 그러나, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포(HTSE)에서, arginine과 lysine의 homopolypeptide가 뮤신 유리를 억제한다는 보고는 기 보고된 연구결과에 근거한 추정과는 반대되는 연구결과를 적시하고 있다.<sup>3)</sup> 이러한 연구결과에 착안하여 본 연구에서 활성 검증을 시



**Fig. 7** – Effects of PLH 9,850 and PLH 6,700 on the number of floated cells during 24 hr after 30 min treatment. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with  $^3\text{H}$ -glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of  $10^{-4}\text{M}$  of PLH 9,850 or  $10^{-4}\text{M}$  of PLH 6,700. After collecting the treatment samples, cultures were washed with PBS and reincubated in the presence of fresh medium for 24 hr. And then, the number of floated cells in spent media was counted. Each bar represents a mean  $\pm$  S.E.M. from 4 culture wells.

도하였던 histidine은 등전점(isoelectric point)이 10 이상인 arginine이나 lysine과는 달리, 등전점이 6 정도인 아미노산으로서, 생리적 pH 조건 하에서 전체 아미노산의 10% 정도가 양전하를 보유하고 있다. 실험결과에서 볼 수 있듯이, histidine의 중합체인 분자량 9,850의 poly-L-histidine, 즉 PLH 9,850과 분자량 6,700의 poly-L-histidine, 즉 PLH 6,700은  $10^{-4}\text{M}$  농도에서 뮤신 유리를 80~90% 가량 감소(억제)시켰다(Fig. 1, 2). 그렇다면, 뮤신 유리를 억제하는 것으로 나타난 PLH 9,850과 PLH 6,700이 거대 당단백질인 뮤신의 유리에만 특이적으로 영향을 미치는지 혹은 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사능 표지 당단백질들의 분비(유리)에도 영향을 미치는지 여부를 검증, 약물의 뮤신 유리 억제작용에서의 특이성을 규명하고자 하였다. 겔 여과 크로마토그래피(Gel filtration chromatography)에서는 여과용 수지(resin)에 loading되는 혼합물 중의 구성 성분들을 그 분자의 크기(size) 별로 분리한다. 따라서, 특정 혼합물을 loading한 후 void volume로부터 total volume까지, 즉 그 혼합물 중 가장 큰 크기의 물질부터 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다.<sup>15)</sup> 일차배양된 HTSE세포에  $^3\text{H}$ -glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 glucosamine을 함유하는 여타의 당단백질에 방사능 표지한 후 일정 기간 동안 세포를 배양하면  $^3\text{H}$ -표지 당단백질들이 배양액 중으로 유리된다. 이때, 이 배양액을 Sepharose CL-4B column에 loading 하면,  $^3\text{H}$ -표지 당단백질 중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터 가장 크기가

작은  $^3\text{H}$ -glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상(elution profile)이 나타난다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로 약물을 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정 부분에 변화가 생겼다면 그 변화는 특정 크기의  $^3\text{H}$ -당단백질 분비(유리)량의 변화를 의미한다. 실험결과(Fig. 3, 4)에서 볼 수 있듯이, PLH 9,850과 PLH 6,700은 뮤신과 같은 거대분자가 용출되는 fraction인 void volume fraction에 대해서만 주로 영향을 나타내고, 여타의 included volume 및 total volume에 해당하는 fraction에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않음을 알 수 있다. 이러한 실험결과는, PLH 9,850과 PLH 6,700이 뮤신과 같은 거대 당단백질의 유리에 주로 영향을 주며, 그보다 크기가 작고 구조도 다른 당단백질들의 분비(유리)에는 유의성 있는 영향을 미칠 가능성이 낮다는 점, 즉 뮤신 유리에 대한 작용에서 특이성을 나타냄을 의미하는 것이다. 동시에, 뮤신유리를 조절하는 효능을 발현하는 PLH 9,850과 PLH 6,700이 HTSE 세포에 대한 독성을 유발하지 않아야 함은 유효하면서도 안전성이 담보되어야 하는 약물로서의 기본 요건이라 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 세포막 손상의 한 지표인 LDH 활성 측정을 통하여 PLH의 독성발현 가능성을 검증하고자 하였다. 세포막이 손상되면 세포는 그 완전성과 정상기능을 상실하는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 그러므로, 세포막 손상 시 분비되는 LDH의 활성도 측정은 세포독성 유발여부 측정 수단 중 하나로 이용될 수 있다.<sup>17,18)</sup> 실험결과에서 볼 수 있듯이, PLH 9,850과 PLH 6,700은 LDH 유리에 유의성 있는 영향을 나타내지 않음으로써 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. 5, 6). 그러나, PLH 9,850과 PLH 6,700의 효능 및 독성은 본 연구에서 최초로 검증된 실험결과이므로 추가적인 독성 검증이 필요할 것으로 판단되어, 세포독성의 또다른 지표로 30분간 약물처리 후 24시간 동안 culture matrix로부터 박리되어 배양 상등액으로 부유되는 세포의 수를 측정하였다. 이러한 현상은 기도 뮤신이 과다하게 유리되는 제반 질환에서 관찰되는 기도 상피세포의 desquamation 또는 exfoliation과 유사한 현상으로 간주할 수 있다. 실험결과(Fig. 7)에서 볼 수 있는 바, PLH 9,850과 PLH 6,700은 대조군과 비교 시 부유 세포 수에 있어서 유의성 있는 차이를 보이지 않음으로써, 세포독성을 유발하지 않음을 확인할 수 있었다. 이상의 실험결과는, PLH 9,850과 PLH 6,700이 PLL이나 PLA의 경우와 유사하게 세포독성을 발현하지 않는 농도 범위에서 뮤신 유리를 특이적으로 억제하며, 따라서 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 병리현상인 점액 과분비의 조절약물로 응용될 가능성을 시사하고 있는 것이다.

## 참고문헌

1) Ellis, E. F. : Asthma in childhood. *J. Allergy. Clin. Immunol.*

- 72(suppl), 526 (1985).
- 2) Mutschler, E. and Derendorf, H. : *Drug actions*. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, 410 (1995).
- 3) Ko, K. H., Lee, C. J., Shin, C. Y., Jo, M.-J. and Kim, K. C. : Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.* **277**(21), L811 (1999).
- 4) Kim, K. C., Rearick, J. I., Nettesheim, P. and Jetten, A. M. : Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* **260**, 4021 (1985).
- 5) Kim, K. C., Opaskar-Hincman, H. and Bhaskar, K. R. : Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.* **15**, 299 (1989).
- 6) Kim, K. C. : Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.* **21**, 617 (1985).
- 7) Lee, C. J. : Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J. Appl. Pharmacol.* **9**(3), 218 (2001).
- 8) Lee, C. J., Paik, S. H., Ko, K. H. and Kim, K. C. : Effects of polycationic peptides on mucin release from airway goblet cells : relationship between polymer size and activity. *Inflamm. Res.* **51**, 490 (2002).
- 9) Elferink, J. G. R. : Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations. *Inflammation.* **15**(2), 103 (1991).
- 10) Coyle, A. J., Ackerman, S. J. and Irvin, C. G. : Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 896 (1993).
- 11) Gleich, G. J., Flavahan, N. A., Fugisawa, T. and Vanhoutte, P. M. : The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium; a model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 776 (1988).
- 12) Uchida, D. A., Ackerman, S. J., Coyle, A. J., Larsen, G. L., Weller, P. F., Freed, J. and Irvin, C. G. : The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat *in vivo*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 982 (1993).
- 13) Wardaw, A. J., Dunnette, S., Gleich, G. J., Collins, J. V. and Kay, A. B. : Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 62 (1988).
- 14) Hammes, M. and Singh, A. : Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayer to albumin. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 437 (1994).
- 15) Cheng, P. W., Sherman, J. M., Boat, T. E. and Bruce, M. : Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal. Biochem.* **117**, 301 (1981).
- 16) Yu, X.-Y., Schofield, B. H., Croxton, T., Takahashi, N.,

- Gabrielson, E. W. and Spannhake, E. W. : Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 188 (1994).
- 17) Frigas, E., Loegering, D. A. and Gleich, G. J. : Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab. Invest.* **42**, 35 (1980).
- 18) Motogima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. and Gleich, G. J. : Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 801 (1989).