

종양괴사인자로 유도된 기도 뮤신 생성, 뮤신 유전자 발현 및 NF-κB p65의 핵으로의 이동에 대한 크리신의 영향

신현대****,† · 이현재*† · 무함마드 아사두자만 식더* · 류지호* · 박수현* · 홍장희* · 석정호* · 이충재**#

*충남대학교 의과대학 약리학교실, **충남대학교 의과대학 정형외과학교실

(Received May 11, 2012; Revised June 15, 2012; Accepted June 19, 2012)

Effect of Chrysin on Tumor Necrosis Factor- α -induced Mucin Production, Mucin Gene Expression and Translocation of Nuclear Factor-kappa B in Cultured Airway Epithelial Cells

Hyun-Dae Shin****,†, Hyun Jae Lee*†, Md. Asaduzzaman Sikder*, Jiho Ryu*, Su Hyun Park*, Jang-Hee Hong*, Jeong Ho Seok* and Choong Jae Lee**#

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 303-131, Korea

**Department of Orthopedic Surgery, Chungnam National University Hospital, Daejeon 303-131, Korea

Abstract — Chrysin and chlorogenic acid are natural products derived from *Scutellariae Radix* and *Lonicerae Flos*, respectively. We examined whether chrysin and chlorogenic acid affect airway mucin production induced by TNF- α in NCI-H292 cells. Cells were pretreated with each agent for 30 min and then stimulated with TNF- α for 24 h. Of the two compounds, chrysin suppressed airway MUC5AC mucin production. Also, chrysin suppressed MUC5AC mucin gene expression and translocation of NF- κ B p65 induced by TNF- α . This result suggests that chrysin can regulate the production and gene expression of mucin induced by TNF- α through the inactivation of NF- κ B in airway epithelial cells.

Keywords □ airway, mucin, chrysin

인간의 호흡기에 존재하는 점액(mucus)은 섬모세포와의 협동 작용을 통해, 기도를 통해 유입되는 유해 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다. 기도 점액의 생체방어 작용은 점액의 생화학적 주 구성요소인 뮤신의 점탄성(viscoelasticity)에 기인한다. 그러나, 뮤신의 양과 질의 이상은 기도 생리의 이상뿐 아니라 인체의 방어작용에 영향을 주어 병리 현상을 유발할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 기도 질환에서 관찰되는 점액(객담)의 과다 분비는 이러한 질환의 예후를 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다.¹⁻⁴ 과다 생성 및 분비된 점액을 기도로부터 제거하는 데는 두 가지 방법이 있을 수 있다. 첫째, 물리적 방법에 의한 점액의 제거, 즉 점액의 점도를 낮춘 뒤 흡인해 내는 방법이고, 둘째는, 점액 생성 자체를 억제할 수 있는 약물의 투여이다. 물리적 방법은 기도 내부의 자극을 유발하고, 반사기전에 의해 점액 분비를 오히려 자극하

게 된다. 마취 하에서 그런 방법이 시도된다고 해도, 점액의 제거는 feedback mechanism을 통해 점액의 생성과 분비를 더욱더 자극하게 된다. 따라서, 점액에 점성을 부여하는 주 구성요소인 뮤신의 생성 자체를 조절하거나 혹은 분비를 조절하기 위한 약물학적 접근은 기도질환의 치료에 있어 중요한 방향이 될 수 있다.⁵ 한편, 전통 동양의학에서 황금(*Scutellariae Radix*) 및 금은화(*Lonicerae Flos*)는 경험적으로 호흡기 알러지 및 염증성 질환의 조절을 위해 사용되어 왔으며,⁶ 기존 연구 문헌을 살펴본 결과, 황금에 함유된 바이칼린(baicalin), 우고닌(wogonin) 등의 성분이 일차배양된 기도 배상세포에서 아데노신 삼인산(ATP)으로 자극된 뮤신 유리(분비)를 억제하거나,⁷ 바이칼레인(baicalein) 및 바이칼린(baicalin)이 기도 뮤신의 생성(production)을 억제할 수 있음이 보고되어 있었다.⁸ 그러나, 황금에서 유래한 또 다른 성분인 크리신(chrysin) 및 금은화에서 유래한 성분인 클로로젠산(chlorogenic acid)이 인간 기도 상피세포에서의 뮤신의 생성(production) 및 그 유전자의 발현에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 여부는 지금까지 검증된 바가 없었다. 따라서, 본 연구에서는 크리신과 클로로젠산이 인간 기도 상피세포에서 종양괴사

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-580-8255 (팩스) 042-585-6627
(E-mail) lcj123@cnu.ac.kr

†These two authors equally contributed to this work.

인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α)에 의해 증가된 뮤신의 생성, 뮤신 유전자의 발현, 기도 뮤신 유전자의 발현과 관련된 전사인자인 NF- κ B p65의 세포질로부터 핵으로의 이동(translocation) 단계에 대해 어떠한 영향을 미치는지를 검증함으로써, 효과적인 기도점액 과다생성(분비) 조절 신약의 개발을 위한 기초과학적 정보를 제공하고자 하였다.

실험방법

세포주 및 시약

NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection사(Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하였다. Protease inhibitor cocktail은 Roche사(Indianapolis, IN, U.S.A.)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate은 NeoMarkers사(Fremont, CA, U.S.A.)에서, trypsin-EDTA, tumor necrosis factor- α (TNF- α), Tween 20, bovine serum albumin(BSA), HEPES, dimethyl sulfoxide(DMSO), 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide solution(TMB), NP-40, EDTA, EGTA, HEPES, ethidium bromide, diethylpyrocarbonate(DEPC), 크리신, 클로로젠산 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham(Piscataway, NJ, U.S.A.)사에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology(Kyunggi-do, Korea)사에서, Accuprep RT premix kit는 Bioneer(Daejeon, Korea)사에서, 그리고 PCR Master Mix는 ABgene(Rochester, NY, U.S.A.)사에서, penicillin-G, streptomycin, fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, Anti-NF- κ B p65 antibody는 Santacruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, U.S.A.)에서, secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase는 Calbiochem(San Diego, CA, U.S.A.)에서, 기타 제반 시약들은 일급시약 등급 이상의 것들을 구입하여 사용하였다.

인간 기도상피 세포(NCI-H292) 배양 및 각 약물의 처리

세포는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37°C 배양기 내에서 HEPES(25 mM), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), FBS(10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액에서 배양하였는데, 1주에 2회 빈도로 subculture하였고 배양액은 2일마다 1회씩 교체해 주었다. 뮤신 생성 및 그 유전자 발현에 대한 약물의 작용을 검증하기 위하여, 뮤신 생성량 검증을 위해서는 24 well culture plate 를 기준으로, well 당 2.0×10⁴ cells/well 의 밀도로, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서는 6 well culture plate 를 기준으로, well 당 5.0×10⁴ cells/well 의 밀도로 각각 세포를 도포하고 배양하였다.

세포가 각 well의 70~80% 정도를 차지할 정도로 자라면, FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양하고, serum을 첨가하지 않은 배양액(serum-free medium)으로 세포를 세척한 후 약물 1~100 µM을 함유하는 배양액 200 µl(24 well plate 기준)을 well마다 가하였다. 30분이 경과한 후 TNF- α 0.2 nM을 세포에 투여한 후 37°C에서 추가로 24시간 동안 배양하였다.⁹⁻¹¹⁾

인간 기도상피 세포에서의 MUC5AC 뮤신 생성 측정

각 약물의 처리 기간이 종료된 후, 세포 용해용 완충액(20 mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가하여 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출한 후 효소연계 면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 뮤신의 생성량을 다음과 같이 측정하였다. 수거된 cell lysate를 PBS로 1/10 배 희석하고 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100 µl씩 분포시킨 후 42°C에서 완전히 건조시켰다. 그 후 PBS-Tween 20(0.05%, PBS-T) 용액 200 µl/well을 이용, 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200 µl를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200 µl로 3회 세척하고 MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을 2% BSA에 1:200의 비율로 희석한 후에, 각 well당 100 µl씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고 2차 항체인 Horse radish peroxidase(HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1:3,000의 비율로 희석한 후, 각 well당 100 µl씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide(TMB) 용액 100 µl를 각 well에 첨가하고 5분 후 1 N H₂SO₄ 50 µl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군의 MUC5AC를 정량하였다.⁹⁻¹¹⁾

인간 기도상피 세포 내에 존재하는 total RNA의 분리

24시간 동안 약물 처리한 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5 ml 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 이어서, total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit(total RNA isolation reagent)를 이용해 (0.5 ml/4×10⁵ cells) 세포를 lysis시키고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform을 첨가, 15초간 vortexing하고 상온에 2~3분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm(Hanil centrifuge, MICRO 17 R)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 µl를

새 microtube에 옮겼다. 상층 액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate(DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하고 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20 µl의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer(Beckman, DU-650)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 측정 후 실험에 사용하였다(1.0A260=single strand RNA 40 µg/ml).¹²⁾

PCR(Polymerase Chain Reaction)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 Genotec(주)(Daejeon, Korea)에 주문, 합성하였다. NCI-H292 세포에서의 human MUC5AC 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'이었다. 정량적 대조 유전자로 사용된 Rig/S15 유전자 primer의 염기서열은(sense primer) 5'-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C-3' 및 (antisense primer) 5'-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG-3'이었다.

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(Reverse Transcription)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1 µg을 75°C에서 5분간 가열함으로써 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 µl를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여, PCR을 40회 실시(PCR thermal cycler, Takara MP-300, Japan)하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초간 각각 시행하였다.

전기영동에 의한 중합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 변동여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 µl를 10×gel loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 용액 및 1 µg/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기 영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기(ultraviolet

transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

핵 분획과 세포질 분획의 준비

150 mm culture dish에 배양하여 70~80% 정도 증식된 NCI-H292 cells에, 37°C에서 24시간 동안 크리신 20 µM을 전 처리하고 이어지는 30분 동안 TNF-α(50 ng/ml)를 처리하였다. 처리가 종료된 후, 세포는 ice-cold PBS로 2회간 세척하고 세포만 조심스럽게 긁어 모아 3 ml PBS를 함유하는 15 ml 시험관에 옮겨 두었다. 이 세포 현탁액을 1,500 rpm, 4°C(Hanil centrifuge, MICRO 17 R) 조건에서 5분간 원심분리한 후, 상등액은 제거하고 침전물(pellet)에 800 µl의 ice-cold buffer A(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol(DTT), 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF))를 가하고 부드럽게 피펫팅하여 세포를 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음 위에서 15분간 방치한 후 10% NP-40 50 µl를 가하고 4°C, 12,000 rpm 조건에서 2분간 원심분리하였다. 이 결과로 얻어지는 상등액이 세포질 분획을 함유하고 있으므로 따로 냉동 보관해 두고, 침전물에는 150 µl의 ice-cold buffer C(20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT; 1 mM PMSF, 20% glycerol)를 가하여 철저히 혼합한 후 4°C 조건에서 30분간 방치하였다. 다시 12,000 rpm, 4°C 조건에서 10분간 원심분리한 후 핵 분획이 함유된 상등액을 수거하였다. 각 분획들은 -20°C 조건에서 보관되었고, 다음 단계의 실험에 사용되기 전에 각 분획 중의 총 단백질량은 Bradford method를 이용하여 측정되었다.

NF-κB p65의 핵으로의 이동 단계에 미치는 약물의 영향 검증

NF-κB p65 단백질을 함유하는 핵 분획과 세포질 분획(each 50 µg as protein)을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. Gel 상에서 분리된 단백질들을 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane에 전기적으로 흡착시켰고 0.05% Tween 20을 함유하는 5% skim milk in PBS로 blocking한 후, primary antibody against NF-κB p65를 첨가하고 반응을 진행시켰다. 0.05% tween 20을 함유하는 PBS로 세척한 후 horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 첨가하고 반응을 진행시켰다. 결과로 생성되는 immunoreaction band는 enhanced chemiluminescence kit(ECL; Amersham, NJ, U.S.A.)를 제조자의 설명에 따라 적용함으로써 가시적으로 검출해 내고 대조군, TNF-α 단독군, 크리신 처리군 별로 상호 비교하여 크리신이 NF-κB p65 단백질의 핵으로의 이동 단계에 미치는 영향을 검증하였다.

통계처리

모든 측정 결과는 Mean±S.E.M.으로 환산한 후, 약물 처리군

의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

크리신이 TNF-α로 자극된 MUC5AC 기도뮤신 생성 증가현상에 미치는 영향

Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼, 크리신은 최고 농도에서 0.2 nM의 TNF-α 처리로 증가된 MUC5AC 기도뮤신의 생성을 억제하였다. 각 처리 농도별 뮤신의 양은 대조군, TNF 0.2 nM 단독 처리군, 크리신 10⁻⁶M+TNF, 크리신 10⁻⁵M+TNF, 크리신 10⁻⁴M+TNF 처리군에서 각각 100±6%, 480±27%, 456±29%, 423±36%, 139±14%이었다(Fig. 1).

클로로젠산이 TNF-α로 자극된 MUC5AC 기도뮤신 생성 증가현상에 미치는 영향

Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼, 클로로젠산은 전 처리농도 범위에서 0.2 nM의 TNF-α 처리로 증가된 MUC5AC 기도뮤신의 생성을 억제하지 못하였다. 각 처리 농도별 뮤신의 양은 대조군, TNF 0.2 nM 단독 처리군, 클로로젠산 10⁻⁶M+TNF, 클로로젠산 10⁻⁵M+TNF, 클로로젠산 10⁻⁴M+TNF 처리군에서 각각 100±8%, 210±13%, 208±10%, 190±6%, 191±4%이었다(Fig. 2).

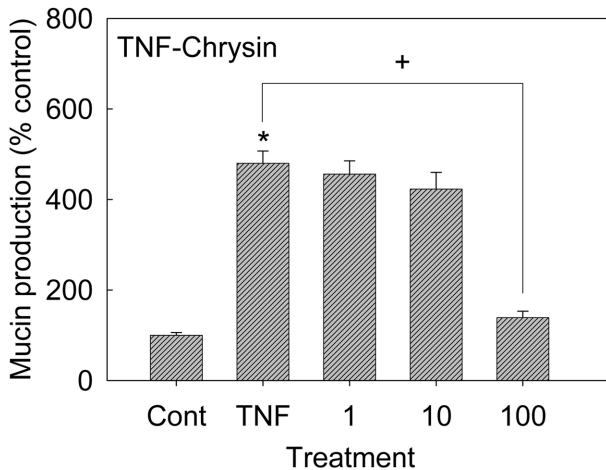


Fig. 1 – Effect of chrysin on TNF-α-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with varying concentrations of chrysin for 30 min and then stimulated with TNF-α (0.2 nM) for 24 h, respectively. Cell lysates were collected for measurement of MUC5AC mucin production by ELISA. Each bar represents a mean±S.E.M. of 3~4 culture wells in comparison with that of control set at 100%. * Significantly different from control ($p < 0.05$). + significantly different from TNF-α alone ($p < 0.05$). (cont: control, concentration unit is μM).

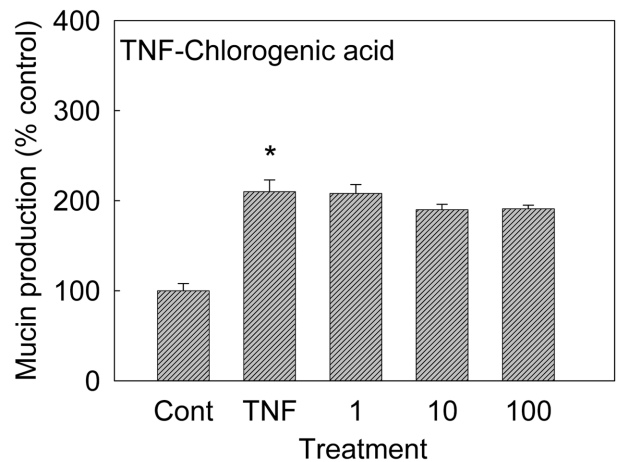


Fig. 2 – Effect of chlorogenic acid on TNF-α-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with varying concentrations of chlorogenic acid for 30 min and then stimulated with TNF-α (0.2 nM) for 24 h, respectively. Cell lysates were collected for measurement of MUC5AC mucin production by ELISA. Each bar represents a mean±S.E.M. of 3~4 culture wells in comparison with that of control set at 100%. * Significantly different from control ($p < 0.05$). (cont: control, concentration unit is μM).

크리신이 TNF-α로 자극된 MUC5AC 기도뮤신 유전자 발현에 미치는 영향

Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼, 크리신은 100 μM 농도에서 TNF-α 처리로 증가된 MUC5AC 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

크리신이 TNF-α로 자극된 NF-κB p65의 핵으로의 이동에 미치는 영향

Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼, NCI-H292 cells에서 TNF-α에 의한 NF-κB p65의 세포질로부터 핵으로의 이동(translocation)은 크리신 20 μM 전처리(pretreatment)에 의하여 억제되었다

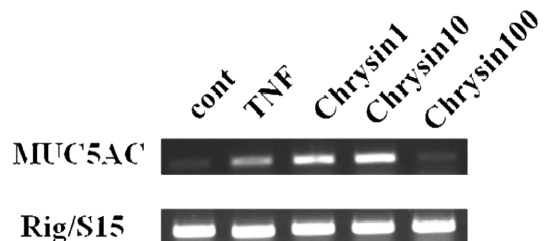


Fig. 3 – Effect of chrysin TNF-α-induced MUC5AC gene expression from NCI-H292 cells.

NCI-H292 cells were pretreated with varying concentrations of chrysin for 30 min and then stimulated with TNF-α (0.2 nM) for 24 h. MUC5AC gene expression was measured by RT-PCR. As quantitative control, Rig/S15 rRNA, which encodes a small ribosomal subunit protein, a housekeeping gene that was constitutively expressed, was used. (cont: control).

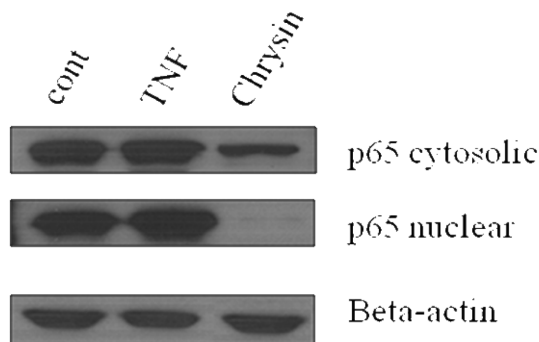


Fig. 4 – Effect of chrysin on translocation of NF- κ B p65 by TNF- α in NCI-H292 cells.

Cells were preincubated for 24 h at 37°C with chrysin 20 μ M and then treated with TNF- α (50 ng/ml) for 30 min. Protein extracts were prepared and examined for NF- κ B translocation as described in Materials and Methods. (cont: control, TNF: TNF- α only, p65 Cytosolic: p65 in cytosolic fraction, p65 Nuclear: p65 in nuclear fraction).

(Fig. 4).

고 찰

임상적으로 기도점액의 과다 생성 및 분비를 유의하게 조절할 수 있는 유망한 약물은 당질 코르티코이드계 약물로 알려져 있으나 동반되는 광범위한 부작용이 치료 약물로서의 가치를 제한하고 있는 실정이다.⁵⁾ 동시에, 호흡기 질환의 임상에서 과다 분비된 점액의 효율적 제거를 목적으로 다수의 점액용해제 및 거담제 등이 사용되고 있으나 그 작용 및 작용 기전이 불명확하며 약물 투여 및 점액의 물리적 제거에 따르는 반사적 과다분비 현상 등으로 인하여 점액 과다분비 질환의 효율적 조절은 용이하지 않은 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 호흡기에 존재하는 뮤신은 펩티드 골격과 탄수화물 가지로 이루어진 수백만 dalton의 분자량을 가진 당단백질(glycoprotein)로서, 뮤신의 펩티드 골격을 coding 하는 유전자를 MUC로 약칭하는데 현재까지 MUC 1, 2, 3A, 3B, 4, 5AC, 5B, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 등의 20 여종의 MUC 유전자가 발견되었으며, 이 가운데 MUC5AC와 MUC5B 유전자의 산물인 MUC5AC와 MUC5B 뮤신이 인간의 호흡기에서 발견되는 gel-forming mucin을 구성하고 있다.¹⁴⁾ 한편, 인간 기도 뮤신의 생성, 유전자 발현 조절과 연관된 연구 모델로 자주 사용되는 인간의 기도 상피세포인 NCI-H292 세포에 대해, TNF- α 는 TNF 수용체(tumor necrosis factor receptor)를 매개로 NF- κ B(nuclear factor kappa B)로 이어지는 신호전달 경로를 거쳐, 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성을 증가(자극)시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 이러한 선행 연구정보에 근거하여 수행된 본 연구의 결과에서 볼 수 있는 바, 황금에서 유래한 성분인 크리신은 TNF- α 로 증가(자극)된 MUC5AC 뮤신의

생성을 억제하는 경향을 보였지만, 금은화에서 유래한 성분인 클로로젠산은 동일한 조건에서 MUC5AC 뮤신의 생성에 유의한 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있다(Fig. 1, 2). 두 성분 중 크리신이 MUC5AC 뮤신의 생성을 억제할 수 있다면 그 유전자의 발현, 즉 전사 단계에서는 어떠한 영향을 미치는 지 검증해 본 결과, 크리신은 뮤신 생성을 억제하는 농도에서 MUC5AC mRNA의 발현 수준을 감소시켰음을 알게 되었다(Fig. 3). 다음으로, MUC5AC 유전자의 중요 전사조절 인자로 알려진 NF- κ B는 세포질 내에서 I κ B(inhibitory kappa B)와 결합되어 불활성 상태로 있지만, TNF- α 등에 의한 자극에 의해 비활성 상태의 IKK(inhibitory kappa B kinase)가 활성화됨으로써 이어 I κ B- α 가 인산화되면, p65로 대표되는 단백질들이 세포핵 내로 이동함으로써 MUC5AC 유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.^{9,10,17,18)} 전술한 바와 같이, TNF- α 는 TNF 수용체(tumor necrosis factor receptor)를 매개로 NF- κ B(nuclear factor-kappa B)로 이어지는 신호전달 경로를 거쳐 기도 뮤신인 MUC5AC 뮤신의 생성을 증가(자극)시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 따라서, 크리신이 NCI-H292 cell에서 TNF- α -유도성 NF- κ B p65의 핵 내로의 이동(translocation)에 대하여 어떠한 작용을 나타내는지, 다시 말해 기도 상피세포 내 NF- κ B p65 단백질의 활성화 과정에 미치는 영향을 western blotting을 이용하여 검증하였다. 실험 결과(Fig. 4)를 통해 알 수 있는 것처럼, 크리신 전 처리(pretreatment)는 TNF- α -유도 NF- κ B p65의 활성화를 억제할 가능성을 확인할 수 있었다. 비록 이러한 연구 결과만으로는 크리신의 분자 수준에서의 작용 기전을 규명했다고는 할 수 없지만, 크리신이 기도 상피세포에서 핵내 전사 영역으로의 NF- κ B translocation 차단을 통하여, 기도 MUC5AC 뮤신의 생성과 유전자 발현을 조절할 가능성을 시사하는 결과라고 판단된다. 종합하여 보면, 비록 제한적이지만 본 연구에서 얻어진 이러한 지견들은 호흡기 점액의 과다생성 및 분비를 보이는 천식, 만성 기관지염 등 다양한 호흡기 염증성 질환의 진행 과정에서 기도 뮤신의 과다한 생성 억제에 초점을 둔, 점액 조절용 신약후보물질 개발에 대한 기초과학적 정보를 제공함에 있어서 일부나마 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 말씀

This study was financially supported by research fund of Center for Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis of Chungnam National University Hospital in 2010.

ABBREVIATIONS

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

PBS : phosphate-buffered saline
 TNF-α : tumor necrosis factor-α
 RT-PCR : reverse transcription - polymerase chain reaction
 NF-κB : Nuclear factor kappa B
 PVDF : polyvinylidene difluoride
 SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

참고문헌

- 1) Voynow, J. A. and Rubin, B. K. : Mucins, mucus, and sputum. *Chest* **135**, 505 (2009).
- 2) 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).
- 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**, L811 (1999).
- 4) 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).
- 5) Mutschler, E. and Derendorf, H. : *Drug actions*. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, 410 (1995).
- 6) Jang, I. M. : *Treatise on asian herbal medicines*. Haksul-pyunsukwan in Research institute of natural products of Seoul National University, Seoul (2003).
- 7) Heo, H. J., Lee, H. J., Kim, Y. S., Kang, S. S., Son, K. H., Seok, J. H., Seo, U. K. and Lee, C. J. : Effects of baicalin and wogonin on mucin release from cultured airway epithelial cells. *Phytother. Res.* **21**, 1130 (2007).
- 8) Lee, H. J., Lee, S. Y., Kim, Y. S., Jeon, B. K., Lee, J. W., Kim, Y. S., Bae, H. S. and Lee, C. J. : Effects of Baicalin, Baicalein and Schizandrin on Airway Mucin Production induced by epidermal growth factor and phorbol ester. *Biomol. Ther.* **18**, 396 (2010).
- 9) Song, K. S., Lee, W. J., Chung, K. C., Koo, J. S., Yang, E. J., Choi, J. Y. and Yoon, J. H. : IL-1β and TNF-α induced MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinase-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 23243 (2003).
- 10) Shao, M. X., Ueki, I. F. and Nadel, J. A. : TNF-α converting enzyme mediated MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11618 (2003).
- 11) Hewson, C. A., Edbrooke, M. R. and Johnston, S. L. : PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF-α, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J. Mol. Biol.* **344**, 683 (2004).
- 12) Karlinsey, J., Stamatoyannopoulos, G. and Enver, T. : Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* **180**, 303 (1989).
- 13) Ellis, E. F. : Asthma in childhood. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **72**(Suppl), 526 (1985).
- 14) Rogers, D. F. and Barnes, P. J. : Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann. Med.* **38**, 116 (2006).
- 15) Takeyama, K., Dabbagh, K., Jeong, Shim J., Dao-Pick, T., Ueki, I. F. and Nadel, J. A. : Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J. Immunol.* **164**, 1546 (2000).
- 16) Takeyama, K., Dabbagh, K., Lee, H., Agusti, C., Lausier, J. A., Ueki, I. F., Grattan, K. M. and Nadel, J. A. : Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **6**, 3081 (1999).
- 17) Li, J. D., Dohrman, A. F., Gallup, M., Miyata, S., Gum, J. R., Kim, Y. S., Nadel, J. A., Prince, A. and Basbaum, C. B. : Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 967 (1997).
- 18) Ishinaga, H., Takeuchi, K., Kishioka, C., Suzuki, S. and Basbaum, C. : Pranlukast inhibits NF-κB activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells. *Pharmacol.* **73**, 89 (2005).