

폴리-엘-아르기닌이 햄스터 기도 배상세포에서의 뮤신 유리 및 흰쥐 기도 배상세포내 함유된 점액에 미치는 영향

이 총 재*

삼육간호보건대학 기초의학교실

Effects of Poly-L-arginine on the Mucin Release from Airway Goblet cells of Hamster and on the Mucosubstances of Airway Goblet cells of Rat

Choong Jae LEE*

Lab of Basic Medical Sciences, Sahmyook Nursing and Health College

(Received September 25, 2001; accepted November 26, 2001)

Abstract – In this study, we tried to investigate whether poly-L-arginine (PLA) (MW 10,800) significantly affect mucin release from cultured hamster airway goblet cells and the mucosubstances of hypersecretory airway goblet cells of rats. Confluent primary hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of varying concentrations of PLA to assess the effects on ^3H -mucin release. Possible cytotoxicities of PLA were assessed by measuring both Lactate Dehydrogenase (LDH) release and by checking the possible changes on the morphology of HTSE cells during treatment. For in vivo experiment, hyperplasia of rat airway goblet cells and increase in intraepithelial mucosubstances were induced by exposing rats to SO_2 for 3 weeks and varying concentrations of PLA were administered inhalationally to assess the effects on the mucosubstances of airway goblet cells of rats. The results were as follows : (1) PLA significantly inhibited mucin release from cultured HTSE cells in a dose-dependent manner; (2) there was no significant release of LDH and no significant change on the morphology of cultured HTSE cells during treatment; (3) PLA also affected the intraepithelial mucosubstances of hypersecretory rats and restored them to the levels of control animals. We conclude that PLA inhibit mucin release from airway goblet cells without significant cytotoxicity and possibly normalize the hypersecretion of airway mucosubstances *in vivo*. This finding suggests that PLA might function as an airway mucoregulative agent.

Key words □ airway, PLA, mucin, mucosubstance, HTSE, rat

호흡기는 산소의 흡입과 이산화탄소의 배출과 같은 생명 유지의 근간이 되는 기능을 수행함과 동시에 흡기 (inspiration)를 통해 인체에 유입되는 유해한 물질에 대해 생물학적 방어기능을 수행하고 있다(Netter, 1979). 기관강 표면(tracheal luminal surface)에 존재하는 점액(mucus)은 mucociliary clearance라 불리는 기전을 통해, 대기중 입자와 화학물질 등에 대한 인체의 방어작용에 있어서 중요한 역할을 한다(Newshound *et al.*, 1983). 점액의 보호기능은 주로 점액성 당단백질인 뮤신의 물리화학적 성질 때문인데, 이 뮤신은 수백만 dalton의 분자량을 가진 당단백질로서, 기도 뮤신의 양과 질의 이상은, 기도 생리의 이상뿐 아니라 인체의 방어작용에 영향을 주어 더 심한 병리 현상을 유발한다. 기도점액의 과다분비 혹은 점도의 변화는, 만성 기관

지염, 천식, 낭포성 섬유증과 같은 다수의 기도질환에 이환된 환자 및 대기오염이 심한 도시에 사는 사람들에게는 심각한 문제이다. 다수의 생약 및 거담제, 점액용해제 등이 환자의 기도로부터 끈끈한 점액을 제거하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있음(Mutschler *et al.*, 1995)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 증다증은 천식발작에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 제시된 바 있다(Frigas *et al.*, 1981; Gleich, 1990). 호산성구의 세포질 과립 내에는 major basic protein of eosinophil(MBP), eosinophil peroxidase(EPO)와 같은 염기성 단백질이 존재(Gleich, 1990)한다. MBP와 EPO는 등전점(isoelectric point)이 각각 10 이상이라고 보고되어 있으며, 양전하를 다량 보유하고 있는 폴리양이온성 펩티드인

*To whom correspondence should be addressed.

데, 이는 그 구성 아미노산중 양이온성 아미노산인 arginine 이나 lysine residue 때문임이 확인되어 있다. 많은 연구자들은 MBP나 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(Coyle *et al.*, 1993; Hammes and Singh, 1994; Singh *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 1993). 이러한 연구결과들에 착안한 본 연구에서도, 내인성 양이온성 펩티드인 MBP의 분자량과 유사한 범위의 분자량 10,800 정도의 PLA가, 호흡기 무신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양된 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포(Kim *et al.*, 1989) 및 기도점액의 과다분비 상태가 유발된 흰쥐(Pon *et al.*, 1994)에서의 무신 유리 및 기도 배상세포 내에 함유된 점액에 미치는 영향을 규명함으로써, 기도 배상세포로부터 무신(점액)의 분비를 조절할 수 있는 후보물질을 탐색하고자 하였다. 이러한 기초과학적 정보들은 만성 기관지염, 천식 등의 급성한 호흡기 질환으로 인한 고통의 경감과 아울러 호흡기 질환의 치료 효율 향상을 목표로 한 새로운 약물의 개발에 한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

실험재료 및 방법

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 해은부역에서 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-arginine(PLA) (MW 10,800), 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 GIBCO사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, Vitrogen 100은 Celtrix Lab.(Santa Clara, CA, U.S.A.)에서 구입하였으며, 기타 일반시약들은 reagent grade 이상

의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 이차증류수를 한번 더 탈이온하여 사용하였다.

햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험 방법은 Kim 등의 방법(Kim *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1989)을 사용하였다. 8내지 10주령의 웅성 햄스터를 이산화탄소로 질식사시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 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 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 재현탁 시켰다. Vitrogen 100을 이용하여 준비된 두꺼운 collagen gel(0.15 ml/cm²)이 도포된 24 well plate에 세포를 10⁴ cells/cm²의 밀도로 분포시켰다. 세포는, 습도가 충분히 유지되며, 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는, 37°C 세포배양기내에서 배양되었으며, 1-3일간 배양된 후에는 37°C 에서 32°C 조건으로 변경하여 배양하였다. 배양액 교체는 배양 개시후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

무신의 대사적 방사선 표지

Kim 등(Kim *et al.*, 1985)의 방법을 이용하였는데, 배양 세포중의 무신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10⁵ cells/well)에, 10 µCi/ml의 [6-³H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200 µl씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)되었다.

Poly-L-arginine(PLA)의 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액 (pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 Dulbecco's Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 최종농도 0.1 µM-10 µM의 PLA를 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 μ l의 상등액은 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용하기 위해 덜어 놓은 후, 방사성 유신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저장하였다(Kim *et al.*, 1985).

유신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 유신으로 정의하였다(Kim *et al.*, 1985). 수거된 PT, T sample을 0.1M 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 0.2M NaOH로 중화시키고 최종농도가 0.1%가 되도록 SDS 용액을 가한 뒤 2분간 끓인 다음 12,000 \times g 에서 5분간 원심분리했다. PT의 경우 원심분리후의 상등액 50 μ l에 150 μ l의 running buffer(50 mM NaAc, 0.1% SDS, pH 7.2), 2 μ l의 10% SDS, 3 μ l의 5M NaCl을 가했고, T의 경우에는 상등액 100 μ l에 100 μ l의 running buffer, 2 μ l의 10% SDS, 3 μ l의 5M NaCl을 가한 뒤 철저히 혼합하였다. 이렇게 조제된 loading sample 들을 running buffer로 평형화된 Sepharose CL-4B column (1 \times 50 cm)에 적용하였다. column은 0.336 ml/min의 유속으로 작동되었고, 한 분획의 용량은 0.42 ml로 하였다. 6 ml용량의 vial에 수거된 각 분획에 3.2 ml의 scintillation cocktail을 가하고 잘 섞은 뒤 Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac)를 이용, 방사선량을 측정하였다. 전체 분획중 void volume peak의 4분획의 방사선량 총합을 그 sample 중의 유신의 양으로 정의하였다. 각 culture well 간에 있을 수 있는 유신 기초유리율의 변이도를 보정하기 위하여, T기간 동안 유리된 유신의 양을 PT기간 동안 유리된 유신의 양으로 나누어 얻어지는 비율을 분비지수(secretory index)로 정의하고, 대조군과 약물처리군의 분비지수 평균값을 통계학적으로 비교함으로써, 유신유리에 미치는 약물의 효과를 검증하고자 하였다.

PLA 처리시 HTSE 세포로부터 유리되는 젖산 탈수소효소(LDH) 활성 측정

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

PLA 처리 직후 HTSE 세포의 형태학적 변화

30분간의 PLA 처리 기간이 종료된 후, 반응액을 수거하고 대조세포 및 PLA 처리세포의 외형에 유발된 변화를 광학현미경으로 관찰한 후 사진촬영하여, 비교하였다.

통계처리

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

이산화황 노출 실험장치의 설계 및 제작

가로 100 cm,세로 60 cm, 높이 25 cm의 직육면체 상자를, 두께 1cm의 아크릴 수지판을 재료로 하여 제작하였다. 가로면에 실험동물이 출입할 수 있도록 가로, 세로 10 cm 크기의 출입문을 만들고, 가로면과 수직으로 접하고 있는 좌우 양면의 중앙부에 직경 5 cm의 구멍을 각 면당 3개씩 만든 후 그에 맞는 nipple과 polyethylene duct를 장착하였다. 한쪽 duct는 이산화황이 발생하는 초음파 가슴기의 분무구에 연결시키고, 반대쪽 duct는 0.5 미력 용량의 모터로 구동되는 환풍기의 흡기구에 연결시켜 실험 종료 후 잔류하는 이산화황 기체를 완전히 제거할 수 있도록 하였다(Fig. 1).

이산화황에의 노출

이산화황 노출방법은 Pon 등(Pon *et al.*, 1994)이 보고한 방법을 개량 및 변형하여 사용하였다. 15%(V/V) sodium metabisulfite(이하 MBS) 수용액을 초음파 가슴기(HU-456, 삼성전자(주))에 주입하고, 가슴기를 작동시켰다. 작동 후 2분 이내에 MBS의 증기가 충전하고 작동 종료시까지 실험장치 내부의 이산화황 농도는 150 ppm으로 유지되었다. 이산화황 농도 측정은 20-3,600 ppm 범위의 공기중 이산화황을 감지할 수 있는 Gastec detector kit(Gastec Co. Ltd. Japan)를 이용하였다. 동물을 대조군, 이산화황 1주 처리군, 이산화황 2주 처리군, 이산화황 3주 처리군, 이산화황 2주 처리후 최종 1주간 이산화황 및 PLA 동시처리(약물처리군) A군, B군, C군으로 분류하고, 각 군당 동물수는 3마리로 하였다. 노출기간은 1일 3시간, 1주일에 5일, 각 군별로 1주, 2주 혹은 3주간으로 했고, 대조군은 실험장치가 설치된 동일한 실내에 전 실험기간 동안, 1일 3시간의 이산화황 노출 조작만 제외하고 노출군과 동일한 조건하에 사육되었다.

기관내 PLA의 흡입투여

PLA의 PBS(pH 7.2)용액을 최종농도 50(A군), 500(B군), 5,000 μ M(C군) 농도로 각각 조제하여, 이산화황 2주 처리후 최종 1주간 이산화황 및 PLA 동시처리(약물처리군) A군, B군, C군에 소속된 동물들에게 개체당 100 μ l를 Nebulizer(PARI master, starnberg, Germany)를 이용, 기도내 흡입 투여시켰다(Fig. 1). 즉, 총 3주간의 이산화황 노출기간 중 마지막 1주간(총5일), 매일 반복적으로 PLA를 투

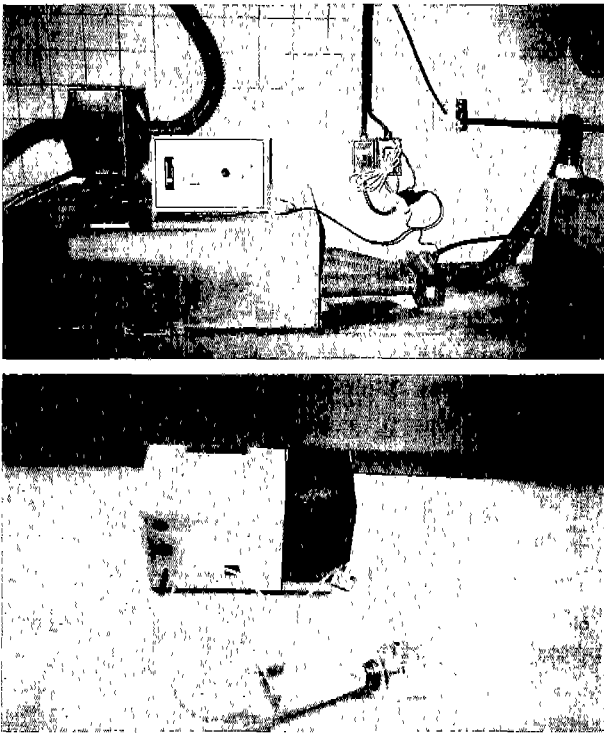


Fig. 1. Apparatus for SO₂ exposure and nebulizer for inhalational administration of PLA. Prepared and manipulated as described in Materials and Methods.

여하는데, PLA 투여는 오전 10시에서 11시 사이에, 이산화황 노출은 오후 1시에서 4시까지, 각각 실시하였다.

기도 과다분비 유발 여부 및 PLA의 약리작용 확인

1주, 2주, 혹은 3주간의 노출기간이 종료된 후, 각 군에 소속된 해당 실험동물을 이산화탄소로 질식사시킨 후 기관을 절개, 분리한 후, 냉각된 10% 중성원충 포르말린액에 넣어 24 시간동안 고정하였다. 고정한 조직을 파라핀으로 포매(embedding)하였다. Microtome을 이용, 5 μm 두께로 잘라 조직절편을 제작하고, 탈파라핀 과정을 거치고, Periodic Acid-Schiff(PAS) 염색을 실시한 후 광학현미경하에서 관찰하고 사진 촬영하였다. 대조군, 이산화황 처리군, PLA 투여군의 기관 내강 배상세포의 증식 여부 및 배상세포 내 점액함유 정도를 비교함으로써 기도점액 과다분비 유발여부 및 PLA가 배상세포 내 점액함유 정도에 미치는 영향을 평가하였다.

결과 및 고찰

양이온성을 보유한 다수의 물질들은 호흡기에서의 과민반응(Coyle *et al.*, 1993, Gleich *et al.*, 1988, Uchida *et al.*, 1993, Wardaw *et al.*, 1988)을 일으키거나, 상피세포막

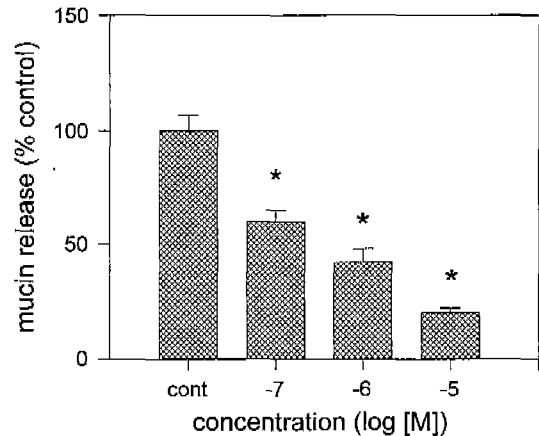


Fig. 2. Effect of PLA on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.1-10 μM of PLA and the amount of ³H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. *significantly different from control (p<0.05).

의 투과도를 증가시키는 등(Elferink, 1991, Hammes *et al.*, 1994)의 작용을 나타낸다. 이상의 보고들에 근거하여, 양이온성을 보유하는 물질은 기도 상피세포로부터의 뮤신유리를 증가시키는 경향을 나타낼 것으로 추정되어 왔다. 그러나, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포(HTSE)에서, EPO와 MBP 등의 양이온성 내인성 펩티드가 뮤신유리를 억제한다는 보고(Ko, 1995) 및 동일한 연구자들에 의한 최근의 보고(Ko *et al.*, 1999)는, 위에서 언급된 실험결과들에 근거한 추정과는 상반된 보고였다. 이러한 실험결과와 연계된 본 연구에서도, PLA 등의 양이온성 펩티드가 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포를 대상으로 한 *in vitro*에서의 뮤신유리를 억제할 뿐만 아니라, *in vivo*에서도 흰쥐의 기도 배상세포 내부의 점액 함유 정도에 유의성 있는 영향을 미치는 것으로 나타났다. 일차배양된 HTSE 세포에 대해 PLA는 10 M 농도에서 뮤신유리를 80% 가량 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한, 호산성구 유래의 내인성 양이온성 단백질 중 일부는 인체의 호흡기계에 독성을 나타내는 것으로 보고되어 왔는데, 구체적으로 기도 상피세포의 부종, 박리 등이 보고(Frigas *et al.*, 1980, Frigas *et al.*, 1981, Motogima *et al.*, 1989)되어 있다. 이러한 보고들은 말기성 천식환자에게서 혈중 호산성구 증다증(hypereosinophilia)이 관찰되며, 호산성구의 기도내 침윤이 천식의 증상 발현에 중요한 역할을 할 것이라는 임상적 견해에 근거(Frigas *et al.*, 1981, Gleich, 1990, Wardaw *et al.*, 1988, Gleich *et al.*, 1988)한 실험결과들이다. 따라서, 본 연구에서도 뮤신유리 억제 작용을 발현하는 PLA가 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, PLA에 의해 발현될 수 있는 세포독성의 한 지표로 채택될 수 있다. Fig. 3에 나타난 결과에서 볼 수 있듯이 PLA는 대조군과 비교시 LDH 유리를 유의성 있게 증가시키지 않았음을 알 수 있다. PLA에 의한 세포독성의 또다른 지표로서, PLA 처리 직후 일차배양 HTSE 세포의 외형에 생기는 형태학적 변화가 채택될 수 있다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 대조세포에서 관찰되는, 즉 광학현미경 하에서 관찰할 때 작고, 촘촘하고, 균일하게 분포되어 있으며, 밝아 보이는 배양 세포의 전형적 외형(Wasano *et al.*, 1988)이, PLA를 처리한 세포에서도 그대로 유지되고 있었으며, 유의성 있는 세

포 외형의 변화를 발견할 수 없었다. 이상의 두 결과는, PLA가 일차배양 HTSE 세포에 대해 독성을 유발하지 않음을 시사하는 결과이다. *In vivo* 실험의 최적화에 있어서는, 활성을 검증하고자 하는 물질의 투여 대상이 되는 질환 혹은 질환군의 병태생리를 비교적 정확히 반영할 수 있는 질환모델 동물의 선정 혹은 개발이 관건이라 할 수 있다. 본 연구에서는 양이온성 폴리펩티드인 PLA가 *in vivo*에서 점액 과다분비 상태가 유발된 흰쥐의 기도 배상세포 내부의 점액 함유정도에 어떠한 영향을 주는지 규명하기 위하여, Pon 등(Pon *et al.*, 1994)이 보고한 *in vivo*모델 유발 방법을 개량 및 변형하여 사용하였다. 적절한 크기의 노출 chamber를 제작하고, *in situ*에서 이산화황 기체를 유리하는 MBS 용액을 초음파 가슴기로 분무시켜 고전적인 이산화황 기체에의 노출 상태와 유사한 기도손상을 일으켰다. 앞서 언

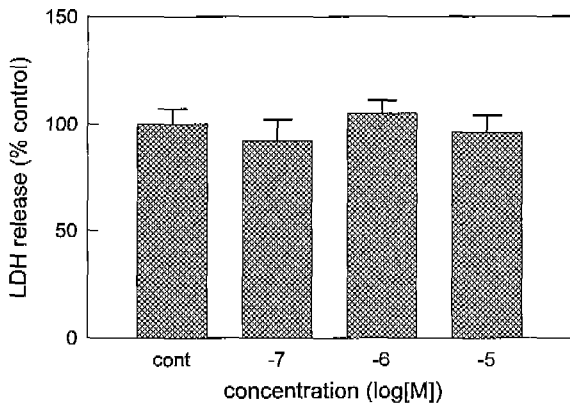


Fig. 3. Effect of PLA on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of PLA for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.

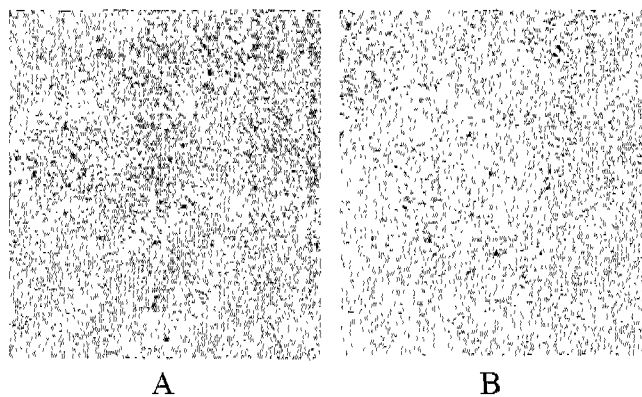


Fig. 4. Effect of PLA on the morphology of cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with 10 M of PLA for 30 min. At the end of the treatment, cultured cells were observed under light microscope. No significant changes on the morphology of the cultured cells were detected as described in Results and Discussions. (A; Control, B; PLA)

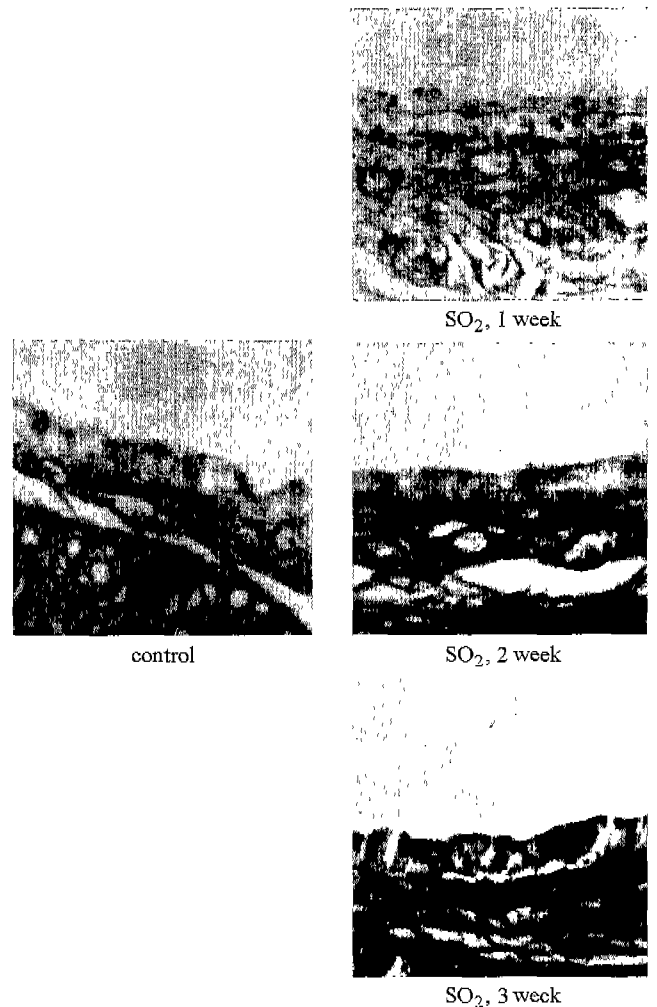


Fig. 5. Induction of hypersecretion of mucus in rat airway goblet cells. The hyperplasia of rat airway goblet cells and increase in intraepithelial mucosubstances were induced by exposing rats to SO₂ for 3 weeks.

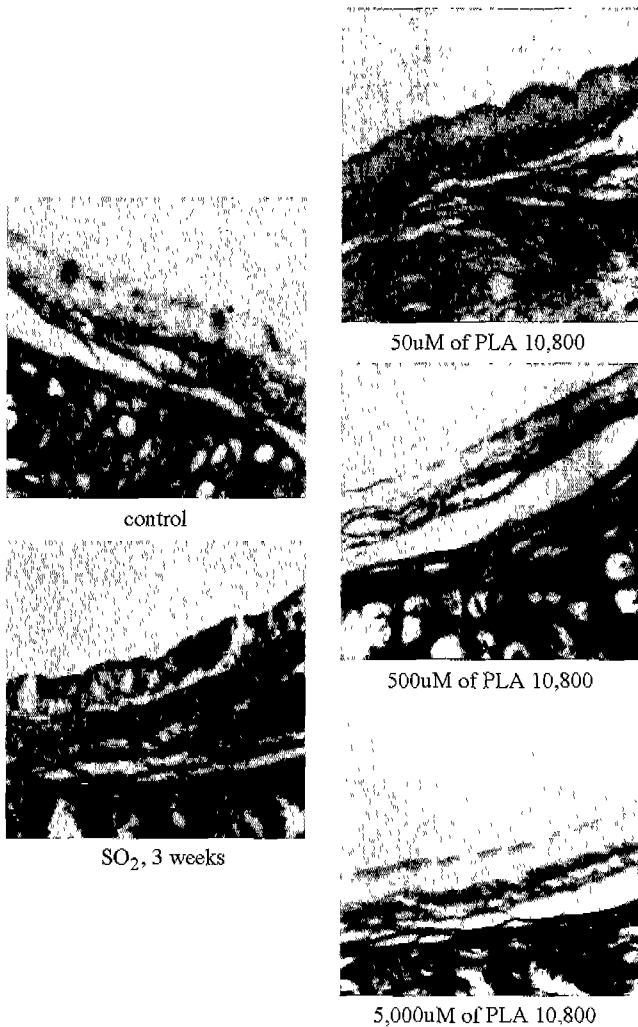


Fig. 6. Effects of PLA on intraepithelial mucosubstances of hypersecretory rats. PLA affected the intraepithelial mucosubstances of hypersecretory rats and restored them to the levels of control rats.

급된 바처럼, 흰쥐를 MBS aerosol 에 3주간 노출시켰을 때 기도 배상세포의 수가 증가하고, 배상세포 내 점액 함유도가 증가하는 등의 특성을 지닌 이 모델을 이용, *in vivo* 실험을 수행한 결과, 대조군과 비교할 때, 이산화황 1주 처리, 2주 처리, 3주 처리군의 경우 이산화황 노출기간이 길어짐에 따라, 기관 배상세포수의 증식 및 배상세포 내 점액 함유 정도도 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 3주 처리군의 경우에 점액 과다분비 상태가 가장 강하게 유발되었으므로, 이 시점을 기도점액 과다분비 유발의 기준으로 하였다. 또한, 이산화황 3주 처리로 기도점액 과다분비 상태가 유발된 동물의 경우와 비교하여, 각각 50, 500, 5,000 μM 농도의 PLA를, 분류된 각 동물군의 개체당 각각 100 μl 씩 매일 반복적으로 1주간 흡입 투여시, 농도 의존적으로 배상세포 내 점액함유 정도를 정상화하여, 대조군의 수준까지 회

복시키는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이는 PLA가 *in vivo*에서도 기도점액의 유리(분비) 혹은 점액함유 과립 내에서의 점액생성에도 관여함으로써, 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 기도점액 과다분비 상태를 정상화할 가능성을 시사하는 것이며, 본 연구자 등은 현재 이러한 현상에 개재된 기전을 규명하고자 후속 연구를 진행 중이다.

참고문헌

- Coyle, A. J., Ackerman, S. J. and Irvin, C. G. (1993). Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 896-900.
- Elferink, J. G. R. (1991). Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations. *Inflammation* **15**(2), 103-115.
- Frigas, E., Loegering, D. A. and Gleich, G. J. (1980). Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab. Invest.* **42**, 35-43.
- Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., Farrow, G. M. and Gleich, G. J. (1981). Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* **56**, 345-353.
- Gleich, G. J., Flavahan, N. A., Fugisawa, T. and Vanhoutte, P. M. (1988). The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium; a model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 776-781.
- Gleich, G. J. (1990). The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 422-436.
- Gleich, G. J., Adolphson, C. R. and Leiferman, K. M. (1992). Eosinophils, In "Inflammation: Basic principles and clinical correlates"(2nd edn), Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R., Raven press, Ltd., New York. pp 663-700.
- Hammes, M. and Singh, A. (1994). Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayer to albumin. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 437-446.
- Kim, K. C., Opaskar-Hincman, H. and Bhaskar, K. R. (1989). Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.* **15**, 299-314.
- Kim, K. C., Rearick, J. I., Nettesheim, P., and Jetten, A. M. (1985). Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* **260**, 4021-4027.
- Ko, K. H. (1995). Inhibitor for secretion of mucin. The patent in the Republic of Korea, Registered No. 6828.
- Ko, K. H., Lee, C. J., Shin, C. Y., Jo, M.-J. and Kim, K. C. (1999). Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.* **277**(21), L811-L815.
- Motogima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. and Gleich, G. J. (1989). Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 801-805.

- Mutschler, E. and Derendorf, H. (1995). Drug actions. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, 410-411.
- Netter, F. H. (1979) Respiratory system of the ciba collection of medical illustrations, Vol. 7, 3-208.
- Newshound, M. T. and Biennenstock, J. (1983). Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease, Baum, G.L. and Wolinsky, E.(eds) 3rd ed., Little Brown and Company.
- Pon, D. J., Van Staden, C. J., Boulet, L. and Rodger, I. W. (1994) Hyperplastic effects of aerosolized sodium metasilfite on rat airway mucus-secretory epithelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 1025-1030.
- Singh, A. K., Kasinath, B. S. and Lewis, E. J. (1992). Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1120**, 337-342.
- Uchida, D. A., Ackerman, S. J., Coyle, A. J., Larsen, G. L., Weller, P. F., Freed, J. and Irvin, C. G. (1993). The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat *in vivo*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 982-988.
- Wasano, K., Kim, K. C., Niles, R. M., and Brody, J. S. (1988) Membrane differentiation markers of airway epithelial secretory cells. *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 167-178.
- Wardaw, A. J., Dunnette, S., Gleich, G. J., Collins, J. V. and Kay, A. B. (1988) Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 62-69.
- Wasmoen, T. L., Bell, M. P., Roegering, D. A., Gleich, G. J., Prendergast, F. G. and McKean, D. J. (1988). Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J. Biol. Chem.* **263**(25), 12559-12563.