

흰쥐 내임파관에서 라이소자임과 락토페린의 분포와 발현

건국대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 가정의학과학교실,² 신경외과학교실³, 건국대학교 충주병원 의과학연구소⁴
최석찬¹ · 안정윤¹ · 이형준¹ · 강성호^{1,4} · 김보형^{1,4} · 임대준^{1,4} · 도현진^{2,4} · 정영선^{3,4}

Activation of Lysozyme and Lactoferrin in Endolymphatic Duct of Rats

Seok-Chan Choi, MD¹, Jeong-Yoon Ahn, MD¹, Hyung-Jun Lee, MD¹, Sung-Ho Kang, MD^{1,4},
Bo-Hyung Kim, MD^{1,4}, Dae-Jun Lim, MD^{1,4}, Hyun-Jin Do, MD^{2,4} and Young-Sun Jung, MD^{3,4}

¹Department of Otolaryngology; ²Family Medicine; ³Neurosurgery, College of Medicine Konkuk University, Chungju; and
⁴Konkuk University Chungju Hospital Research Institute of Clinical Medicine, Chungju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Secretory activity, particularly of antibacterial agents such as lysozyme and lactoferrin, is an important aspect of the mucosal defense mechanism. The development of these agents may have a direct bearing on the susceptibility of the mucosa to infection. The antibacterial secretory enzymes such as lysozymes and lactoferrins are found in various mucosal tissues, and it has been suggested that these enzymes contribute to the defense against local mucosal infection. Specifically, lysozyme and lactoferrin are important components of innate immunity against pathogens at mucosal surfaces. The purpose of this study is to identify the distribution and expression of lysozyme, lactoferrin in endolymphatic duct of rat. **Materials and Method** : Normal rats (129P3/J, 10 cases) were used for this study. The expression level and distribution of lysozyme mRNA were analyzed by RT-PCR and quantitative image analysis. **Results** : The expression of lysozyme and lactoferrin mRNA in endolymphatic ducts of rats was compared by quantitative image analysis. **Results** : The results indicate that the relative expression of lysozyme mRNA resulted as 2.5 times greater than that of lactoferrin mRNA. **Conclusion** : The distribution and expression of lysozyme and lactoferrin in the endolymphatic duct of rat were identified. The study suggests that innate immunity such as lysozyme and lactoferrin are important components of defense mechanisms along with mucociliary clearance. Additionally, the authors think that the activity of lysozymes is more effective than that of lactoferrin in the endolymphatic duct of rat. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:482-5)

KEY WORDS : Lysozyme · Lactoferrin · Endolymphatic duct · Rat.

서 론

내이는 측두골에 덮여 있으며 미로(labyrinth)구조를 이룬다. 미로는 골미로(bony labyrinth)와 막미로(membranous labyrinth)로 나누어지는데 뼈로 된 골미로 안에 막미로가 있는 구조이다.

막미로 안의 내임파관은 내이에서 무균상태를 유지하고 있는데 이것은 항체와 면역세포가 주축이 되는 선천면역(innate immunity)에 의해 보호된다.

최근 들어서는 선천면역에 대한 관심이 높아지면서 선천

성 면역 물질에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 그 중 라이소자임과 락토페린은 살균 효과를 갖는 효소로서 점막의 국소감염에 대한 방어작용에 기여한다고 알려져 있으며¹⁾ 인체의 여러 점막조직과 점막조직에서 분비되는 분비액에서 발견된다.

눈물, 기관지, 침샘, 위점막 등에는 두 효소가 모두 분포하고, 비점막, 소장 점막, 자궁 경부 내막 등에는 라이소자임만이 분포하고 있다.

현재까지 라이소자임과 락토페린에 관한 연구는 주로 중이와 이관에 관한 연구²⁻⁵⁾였으며 내이의 내림파관에서 라이소자임과 락토페린에 관한 연구는 전무하다.

본 연구는 내이에 감염이나 염증이 발생하였을 경우 이를 보호하기 위하여 라이소자임과 락토페린의 발현을 확인하고 정량적 비교분석을 통해 생물학적 중요성을 알아보고자 한다.

논문접수일 : 2008년 11월 27일 / 심사완료일 : 2009년 4월 9일
교신저자 : 강성호, 380-704 충북 충주시 교현2동 620-5
건국대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (043) 840-8280 · 전송 : (043) 843-6165
E-mail : kkdin@kku.ac.kr

재료 및 방법

조직채취

정상 129P3/J 흰쥐 10마리를 ketamine/xylazine 마취제(70 mg/mL ketamine, 7.5 mg/mL xylazine)를 복강내로 주사하여 마취시킨 후 내임파관 조직을 채취하였다.

면역조직화학 염색

조직을 심관류법으로 고정시킨 후 4°C에서 다시 24시간을 재고정하였고, 4% paraformaldehyde(pH7.4)가 함유된 7% EDTA 용액에 3주 동안 처리하여 탈석회화 하였다. 이 조직을 파라핀 속에 고정하여 6 μm 간격으로 박편하여 파라핀을 제거한 후 PBS에서 처리하였고 항원복구(antigen retrieval)는 37°C에서 30분간 citrate buffer(0.01 M, pH6.0)에서 시행하였다.

내인성 peroxidase의 활성을 막기 위해 각 절편은 상온에서 1% H₂O₂용액에서 30분간 처리하였다. 이것을 다시 PBS로 세척하고 라이소자임에 대한 일차항체로 37°C에서 rabbit polyclonal anti-human lysozyme, lactoferrin antibody(1 : 500 ; DAKO, Carpinteria, CA)을 20분간 전처리한 후 4°C에서 10시간 동안 처리하였다. 그 후 PBS로 다시 세척하고 상온에서 30분간 EnVision+ (Dako, Carpinteria, CA, USA)의 이차항체와 ABC 처리 후 0.05% 3,3 P-diaminobenzidine으로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색한 후 관찰하였다.

RT-PCR, Quantitative, real-time PCR

총 RNA는 TRIzol reagent(Gibco BRL, Rockville, MD)를 이용하여 분리하고 Superscript II-kit(Gibco BRL, Rockville, MD)를 사용하여 complementary DNA(cDNA)를 역전사하였다. PCR은 MJ PTC-200 Pelter cyler 내에서 cDNA를 각각 95°C에서 15분간, 94°C에서 30초간 35회, 60°C에서 30초간, 그리고 72°C에서 1분간 시행하였다. 사용한 시동체(primer)의 순서(sequence)는 다음과 같다.

rat lysozyme

forward GGTGTAATGACGGCAAAACC

reverse AGACTCCGCAGTTCCGAATA

rat lactoferrin

forward TCTCCGCCAGGCACA

reverse GGAGGCCGAGGAGCA

House keeping gene으로는 rat 18S-rRNA를 사용하였으며 forward GTGGAGCGATTTGTCTGGTT reverse CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG였다.

반응 후 산물은 1.5% 우무겔(agarose gel)을 이용해 분리하였고 ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 촬영하였다. Quantitative PCR을 위해 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Atlanta, GA)을 이용하여 정량화하였다. 조직간의 유전자양을 비교하기 위하여 18S-rRNA를 사용하였다.

결 과

면역조직화학 염색

면역조직화학 염색상 양성인 세포들은 내임파관 상피의 장액세포에서 라이소자임과 락토페린의 농도와 항체의 역가에 따라 연한 갈색 또는 진한 갈색으로 염색되었다(Figs. 1 and 2).

RT-PCR, Quantitative, real-time PCR

내임파관에서 라이소자임과 락토페린 모두 18S-rRNA에 대해 발현되었으며, 라이소자임이 락토페린에 비해 2.5배 증가를 보였다(Figs. 3 and 4).

고 찰

점막은 다양한 방어기전에 의해 보호되고 있으며 점막섬모 운동에 의한 기계적인 방어작용, immunoglobulin A와 같은 항체 단백질에 의한 면역 방어작용, 염증세포의 식균

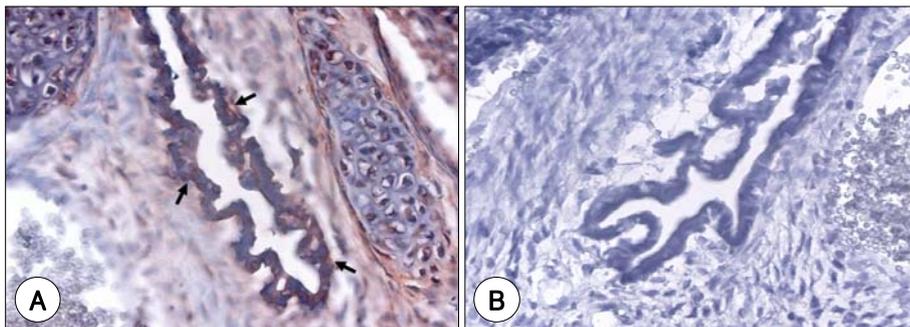


Fig. 1. Immunohistochemical analysis. A : Lysozymes (1 : 500 rabbit polyclonal anti-human lysozyme antibody) were expressed epithelia of endolymphatic duct (arrows). B : Normal control (×400).

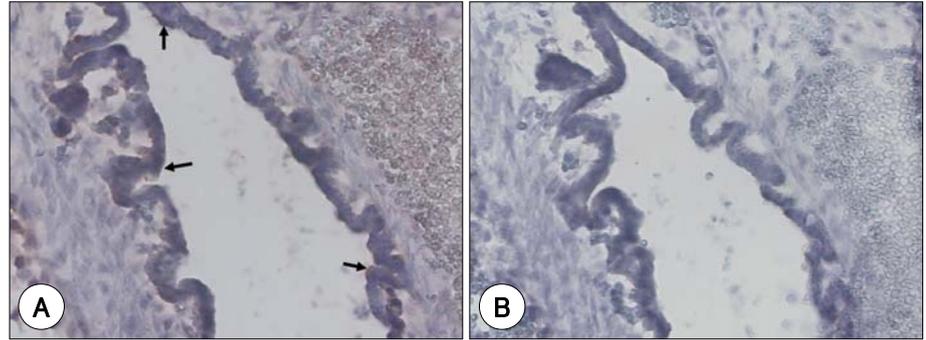


Fig. 2. Immunohistochemical analysis. A : Lactoferrin (1 : 500 rabbit polyclonal anti-human lactoferrin antibody) were expressed epithelia of endolymphatic duct (arrows). B : Normal control ($\times 400$).

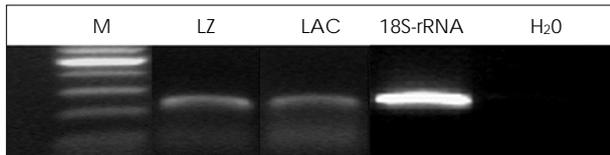


Fig. 3. The expression of mRNA of lysozyme (194 bp), lactoferrin (196 bp) and 18S-rRNA (200 bp) in the endolymphatic duct epithelial surface rat.

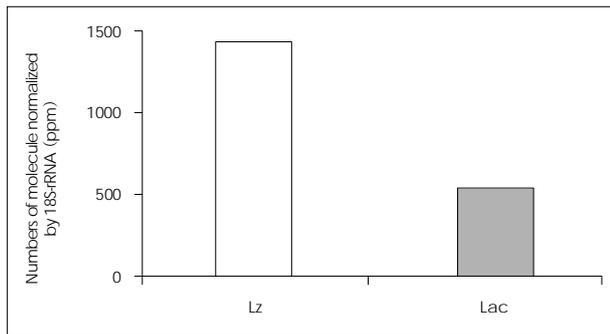


Fig. 4. Quantitative real-time PCR of lysozyme and lactoferrin in the endolymphatic duct epithelial surface rat.

작용, 라이소자임, 락토페린 등과 같은 항세균 분비효소에 의한 생물학적 방어작용이 있다.²⁾ 신체내의 점막은 이러한 방어기전이 세균 침입에 대하여 복합적으로 작용하고 있다.

또한 만성중이염 환자의 중이 저류액내에 라이소자임과 락토페린의 농도가 높다는 보고²⁾와 이관에서 라이소자임과 락토페린이 항세균작용에 기여한다는 것은 잘 알려진 바이다.⁶⁾ 이는 중이 및 이관의 상피세포와 중이내 염증세포인 다형 백혈구와 식균세포에서의 분비 증가에 의한 것으로 알려져 있다.

라이소자임은 1922년 Fleming이 비점액으로부터 처음 분리하여 특정 세균들을 살균할 수 있는 물질로 자연계에 널리 분포하고 있음을 보고 하였다.³⁾

라이소자임의 분비는 아드레날린성, 콜린성 약물에 영향을 받아 bethanechol, phenylephrine, terbutalin 등에 의해 증가되고, atropin, propranolol, phentolamine은 위의 약제 효과를 차단하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 또한 substan-

ce P는 점막하 선조직에 직접 작용하거나 중추신경계의 분비운동신경을 자극하여 간접적으로 라이소자임의 분비를 촉진시킨다고 알려졌다.⁵⁾

라이소자임의 살균기전은 세균의 세포벽의 proteoglycans에 일반적으로 존재하는 N-acetyl muramic acid와 N-acetyl glucosamine 사이의 결합을 분해하여 균을 죽이는 것으로 점막 표면과 홍막액, 백혈구의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾

락토페린은 분자량이 80KDa인 철결합성 당단백질로서 박테리아 성장에 필수적인 철성분과 결합하여 박테리아의 성장을 저해하고¹⁾ 다형핵 백혈구가 내피세포(endothelium)에 부착하는 것을 촉진시켜 다형핵 백혈구를 염증부위에 유지시키는 역할을 한다.⁹⁾ 또한 락토페린은 세포의 성장과 분화, 항균작용, 항암작용, 면역체계의 활성화 조절 등이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 하지만 면역체계의 활성화에 대한 락토페린의 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.⁸⁾

한편 Giebink 등¹³⁾은 라이소자임은 주로 다형핵 백혈구와 상피세포에서 분비되고 락토페린은 다형핵 백혈구에서 분비된다고 보고하였다.

Hanamure 등¹⁴⁾은 Chinchilla에서 immunohistochemical technique을 사용하여 중이점막과 이관점막에서의 라이소자임 분비세포와 락토페린 분비세포의 분포를 확인하였고, 라이소자임과 락토페린을 분비하는 분비세포가 중이점막보다 이관점막에 더 많은 것을 보고하였으며 특히 라이소자임 분비세포가 주로 이관의 인두개구부에 위치한다고 하였다.

이렇게 중이점막과 이관에서의 라이소자임과 락토페린의 발현에 관한 연구는 Chinchilla,¹⁴⁾ Mongolian gerbil,¹⁵⁾ Guinea pig¹⁶⁾에서 보고되었으며 실험동물에 따라 점액성 또는 장액성으로 분비세포가 다른 종특이성을 보인다.⁶⁾ 반면, 내이의 내임파관 점막에서 라이소자임과 락토페린의 발현은 보고된 적이 없다.

본 연구결과로 내임파관의 무균상태 유지 및 감염에 대한 항세균 방어작용으로 라이소자임과 락토페린의 발현을 확인할 수 있었으며 라이소자임의 발현양이 락토페린의 발

현량의 2.5배였고, 이는 락토페린보다 라이소자임이 왕성한 분비작용을 한다는 것을 의미할 뿐만 아니라 항생물질로서 작용한다는 증거로 볼 수 있다.¹⁷⁾ 더불어 흰쥐의 내임파관 상피의 장액성 세포에서 라이소자임과 락토페린이 분비되지만 중이점막과 이관의 라이소자임과 락토페린의 연구들에서와 같이 분비세포가 다른 중특이성이⁶⁾ 있으므로 향후 Chinchillas,¹⁴⁾ Mongolian gerbil,¹⁵⁾ Guinea pig 등¹⁶⁾과 같은 실험동물에서 연구도 필요할 것으로 사료된다.

결 론

흰쥐의 내임파관에서 라이소자임과 락토페린의 발현을 확인할 수 있었으며, 외부감염에 대해 내임파관은 내이를 보호하기 위하여 선천성 면역물질인 라이소자임과 락토페린이 중요한 역할을 하는 것으로 사료되며, 특히 락토페린보다 라이소자임의 역할이 클 것으로 생각된다. 또한 내임파관 연구의 실험동물로 흰쥐를 사용하는데 있어 기초자료로 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

중심 단어 : 라이소자임 · 락토페린 · 내임파관 · 흰쥐.

이 논문은 2008년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

REFERENCES

- 1) Arnold RR, Cole MF, McGhee JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 1977;197(4300):263-5.
- 2) Lim DJ, Liu YS, Birck H. Secretory lysozyme of the human middle ear mucosa: Immunocytochemical localization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;85(1 pt 1):50-60.
- 3) Fleming A. On remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Ser B* 1922;93:306-17.
- 4) Tom-Moy M, Basbaum CB, Nadel JA. Localization and release of lysozyme from ferret trachea: Effects of adrenergic and cholinergic drugs. *Cell Tissue Res* 1983;228(3):549-62.
- 5) Davis B, Tseng HC. Neural regulation of lysozyme secretion from tracheal submucosal glands of ferrets in vivo. *J Appl Physiol* 1991;71(3):939-44.
- 6) Park KH, Park HJ, Choung YH, Song JW. Distribution of lysozyme and lactoferrin secreting cells in Eustachian tube of normal BALB/c mouse. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 1999;42(7):811-5.
- 7) Leitch EC, Willcox MD. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol* 1998;47(9):837-42.
- 8) Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. 2006;84(3):282-90.
- 9) Oseas R, Yang H-H, Baehner RL, Boxer LA. Lactoferrin. A promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood* 1981;57:939-45.
- 10) Mathur GP, Gupta N, Mathur S, Gupta V, Pradhan S, Dwivedi JN, et al. Breastfeeding and childhood cancer. *Indian Pediatr* 1993;30:651-7.
- 11) Hardell L, Dreifaldt AC. Breast-feeding duration and the risk of malignant diseases in childhood in Sweden. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(3):179-85.
- 12) Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, et al. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1601-10.
- 13) Giebink GS, Carlson BA, Hetherington SV, Hostetter MK, Le CT, Juhn Sk. Bacterial and polymorphonuclear leukocyte contribution to middle ear inflammation in chronic otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985;94(4 pt 1):398-402.
- 14) Hanamura Y, Lim DJ. Normal distribution of lysozyme and lactoferrin-secreting cells in the chinchilla tubotympanum. *Am J Otolaryngol* 1986;7(6):410-25.
- 15) Park KH, Chun YM, Kan JW, Chung MH. Normal distribution of lysozyme secreting cells in eustachian tube of Mongolian gerbil. *Korean J Otolaryngol* 1996;39:1283-9.
- 16) Mogi G, Maeda S, Watanabe N. The development of mucosal immunity in guinea pig middle ears. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1980;1(4):331-49.
- 17) Lee HY, Andalibi A, Webster P, Moon SK, Teufert K, Kang SH, et al. Antimicrobial activity of innate immune molecules against streptococcus pneumoniae, moraxella catarrhalis and nontypeable haemophilus influenzae. *BMC Infect Dis* 2004;4:12.