

Effect of Polyinosinic-Polycytidylic Acid on MUC5B Expression in Human Airway Epithelial Cells

Yo Han Choi¹, Chang Hoon Bae¹, Hyeong Geun Kim¹, Bo Hyeon Seo¹,
Yoon Seok Choi¹, Si-Youn Song¹, and Yong-Dae Kim^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; and

²Regional Center for Respiratory Diseases, Yeungnam University Medical Center, Daegu, Korea

사람 호흡기 상피세포에서 MUC5B 발현에 대한 Polyinosinic-Polycytidylic Acid의 효과

최요한¹ · 배창훈¹ · 김형근¹ · 서보현¹ · 최윤석¹ · 송시연¹ · 김용대^{1,2}

영남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, ¹ 영남대학교병원 권역 호흡기 전문질환센터²

Received April 15, 2015

Revised June 3, 2015

Accepted June 3, 2015

Address for correspondence

Yong-Dae Kim, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-

Head and Neck Surgery,

College of Medicine,

Yeungnam University,

170 Hyeonchung-ro, Nam-gu,

Daegu 42415, Korea

Tel +82-53-620-3781

Fax +82-53-628-7884

E-mail ydkim@med.yu.ac.kr

Background and Objectives Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) is structurally similar to double-stranded RNA, and is known to induce various inflammatory mediators and to cause inflammatory reactions in airway epithelial cells. However, the effect of Poly I:C on secretion of mucins in human airway epithelial cells has been very rarely reported. In this study, the effect and brief signaling pathway of Poly I:C on the expression of mucin genes were investigated in human airway epithelial cells.

Materials and Method In mucin-producing human NCI-H292 airway epithelial cells and the primary cultures of normal human nasal epithelial cells, the effect and signaling pathway of Poly I:C on expression of mucin genes were investigated using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, real-time PCR, enzyme immunoassay, and immunoblot analysis with specific inhibitors and small interfering RNA (siRNA) for mitogen-activated protein kinase (MAPK).

Results Poly I:C induced the MUC5B expression, and activated the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK. U0126 (ERK1/2 MAPK inhibitor) and SB203580 (p38 MAPK inhibitor) inhibited the Poly I:C-induced MUC5B expression. In addition, the knockdown of ERK2 and p38 MAPK by siRNA significantly blocked the Poly I:C-induced MUC5B mRNA expression.

Conclusion Poly I:C induces the MUC5B expression via ERK2 and p38 MAPK signaling pathways in human airway epithelial cells. Therefore, Poly I:C may play a role in the regulation of mucus hypersecretion through MAPK signaling pathways in the human airway epithelial cells.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2015;58(9):615-21

Key Words Human airway epithelial cells · Mitogen-activated protein kinase · MUC5B · Polyinosinic-polycytidylic acid.

서론

호흡기 상피 표면은 적절한 습도를 유지해주고 윤활 역할을 하며, 흡기를 통해 들어오는 외부의 독성물질과 감염원에 대한 방어작용을 하는 점액(mucus)으로 덮여 있다.¹⁾ 그러나 상기도 바이러스 감염과 같은 급성 호흡기 질환과 만성 비염, 만성 부비동염, 천식과 같은 만성 염증성 호흡기 질환에서는

점액의 분비가 과도하게 일어날 수 있으며 점액의 배출이 지연되면 병의 경과를 악화시킬 수 있어, 점액의 과분비를 조절하는 것이 매우 중요하다.²⁾ 점액의 물리화학적, 생화학적 또는 유동학적 특성을 결정할 때 가장 큰 역할을 담당하는 점소(mucin)는 당단백으로 점액유전자에 의해 생성이 조절된다. 점액유전자는 현재까지 20여 개가 발견되었으며, 호흡기에서 발현되는 중요한 점액유전자는 MUC2와 MUC4, MUC5AC,

MUC5B, MUC8로 알려져 있다. 이 중에서 분비형 점소(secretory mucin)인 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현에 대해 상기도 영역에서 활발한 연구가 이루어지고 있다.^{1,3-5)}

Polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I:C)는 인공적으로 합성된 이중구조의 ribonucleotide 중합체로서 구조적으로 double-stranded RNA와 유사하며 toll-like receptor 3(TLR3)과 결합하여 세포내 바이러스성 감염 반응에 관여한다.⁶⁾ 또한 Poly I:C는 생체 내에서 interferon의 생성을 통하여 주로 자연살해세포를 활성화시킴으로써 세포 면역체계를 항진시키며, 그 밖에 대식세포와 살해 T 임파구를 활성화시켜서 염증반응에 관계한다고 보고되어 있다.^{7,8)} 그러나 염증반응에 의한 기도점액 과분비 과정에서 Poly I:C가 점액유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 보고된 바가 매우 적은 실정이다. 따라서 호흡기 상피세포에서 Poly I:C가 점액 유전자의 발현과 점액 단백질 생성에 어떠한 영향을 미치는지와 어떠한 경로를 통하여 점액유전자 발현이 되는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

재 료

Poly I:C는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 MUC5AC(MS-145-P1) 일차 항체는 Neomarker(Fermont, CA, USA)에서, MUC5B(SC-23024) 일차 항체와 anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase(HRP)-conjugated 이차 항체, MUC5AC anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서, 억제제로 사용된 SB203580은 BioM(Plymouth Meeting, PA, USA)에서 U0126은 Calbiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 처리

사람 폐 점액 상피양 암 세포주(human pulmonary mucopidermoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 6-well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 접종하였다. 이후 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 95%의 산소와 5%의 이산화탄소가 혼합된 배양기에서 37°C의 온도로 배양하였다. 70~80% 정도의 융합기가 되면 세포를 0.5% fetal calf serum이 포함된 RPMI 1640 배지로 교체한 후 24시간 동안 배양하고, 다시 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 세척한 후 실험에 사용하였다.

Poly I:C의 효과를 알아보기 위해서 NCI-H292 세포에 2.5 ng/mL와 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL 농도의 Poly I:C를 각각 투여 후 배양하였다. 그리고 U0126과 SB203580에 의한 Poly I:C의 효과를 알아보기 위해 NCI-H292 세포에 2.5 ng/mL와 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL 농도의 Poly I:C를 전 처리하기 1시간 전에 2 µM의 U0126, 20 µM의 SB203580을 각각 투여하여 배양하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 NCI-H292 세포를 단독 배양하였다.

사람의 호흡기 상피세포를 얻기 위해서 알레르기에 대한 기저질환과 가족력이 없고, 피부단자시험(skin prick test)과 multiple simultaneous allergen test에서 음성반응이 나온 10명을 대상으로 하여 하비갑개 절제술을 시행 후 정상 하비갑개 조직을 얻었다. 일차 배양을 하기 위해 하비갑개 점막조직을 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척한 후, 90분 동안 dispase(Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)에 침전시켰다. 외과용 수술칼을 사용하여 하비갑개 점막의 표면을 벗겨내어, 1% PBS를 추가한 후 mesh를 통해 여과하였다. 이런 과정을 통해 얻은 하비갑개 점막의 상피세포들을 24-well(2.5×10^5 cells/well) plate에 접종한 후, Epi-Life medium(Cascade Biologics, Portland, OR, USA)과 keratinocyte growth supplement(5/500 mL of medium)에서 배양하였다. 일차 배양한 하비갑개 점막 상피세포에서 Poly I:C 효과를 알아보기 위해서 Poly I:C 10 ng/mL를 전 처리한 후 1시간 뒤에 각각 2 µM의 U0126, 20 µM의 SB203580을 투여하여 배양하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 하비갑개 점막 상피세포를 단독으로 배양하였다. 이 연구는 본원 임상 시험 심사 위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받아 시행하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석

PTC-200(MF Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR machine과 Gene Amp RNA PCR core kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법대로 시행하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide primer는 밝혀진 염기서열에 의해 제작하였으며, 각 반응의 내부 양성 대조군(internal positive control)은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. 실험에 사용된 primer의 염기배열은 MUC5AC의 경우 sense는 5'-TCA ACG GAG ACT GCG AGT ACA C-3', antisense는 5'-CTT GAT GGC CTT GGA GCA-3'이고 MUC5B의 경우 sense는 5'-CAC ATC CAC CCT TCC AAC-3', antisense는 5'-GGC TCA TTG TCG TCT CTG-3'이다. MUC4의 sense는 5'

-TTC TAA GAA CCA CCA GAC TCA GAG C-3', antisense는 5'-GAG ACA CAC CTG GAG AGA ATG AGC-3'이고, MUC16의 경우 sense는 5'-GCC TCT ACC TTA ACG GTT ACA ATG AA-3', antisense는 5'-GGT ACC CCA TGG CTG TTG TG-3'이다. GAPDH의 경우 sense는 5'-CCT CCA AGG AGT AAG ACC CC-3', antisense는 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'이었다. 실험에 사용되어 증폭된 mRNA 산물의 크기는 MUC5AC는 130 bp, MUC5B는 245 bp, MUC4는 467 bp, MUC16는 114 bp, GAPDH는 145 bp였다. MUC5AC와 MUC5B, MUC4, MUC16의 RT-PCR의 조건과 과정은 이미 보고된 연구들의 방식대로 시행하였다.^{9,10} 증폭된 중합효소연쇄반응의 산물은 SYBR green이 함유된 1% agarose gel을 통한 전기영동을 이용하여 분리 관찰하였다. 확인된 띠(band)의 세기는 Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA)를 이용하여 반정량적으로 분석하였고, 대조군의 density를 100으로 하였을 때 실험군의 density 값을 비율로 나타내어 relative density로 나타내었다.

Real-time PCR 분석

합성된 cDNA 1 µL를 대상으로 LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 real-time PCR을 이용한 점액 유전자 발현 반응을 시행하였다. Real-time PCR은 최종량이 10 µL가 되게 2.5 mM의 MgCl₂와 최종 농도가 0.5 µM이 되게 primer를 투여하였으며, 25 ng의 RNA 1 µL를 이용하여 실험을 수행하였다. 정량적인 PCR은 Light-Cycler(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 95°C에서 10초간 변성(denaturation)과정을 거치고 60°C에서 5초간 결합(annealing)반응을 시킨 후, 72°C에서 10초간 연장(extension)반응하였고, 이러한 과정을 45회 반복하였다. 증폭의 정확도는 변성곡선(melting curve, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 사용하여 평가하였다.

효소결합 면역흡착 분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay)

Poly I:C를 처리한 배양된 NCI-H292세포에서 lysis buffer [50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]로 단백을 추출하여 정량하였다. 추출한 단백 100 µg을 96-well plate에 담고 40°C에서 건조될 때까지 방치한 후 plate를 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% bovine serum albumin으로 실온에서 1시간 동안

차단한 후 PBS로 3회 세척한 다음 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:200으로 희석된 MUC5AC와 MUC5B 일차 항체로 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 이차 항체를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:5000으로 희석하여 각 well에 첨가하였고, 1시간 후에 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine 용액으로 발색한 후, 2N-H₂SO₄를 이용하여 중단시켰다. ELISA reader(EL800®, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 이용하여 단백질 양을 정량하였다.

Western blot 분석

NCI-H292 세포를 6-well plate에 담고 농도에 따라 Poly I:C를 처리하여 각각 배양하였다. 이후 각 세포들을 trypsin에 노출시키고 lysis buffer를 거친 후 4°C에서 700 g으로 원심 분리하여 각각의 pellet을 만들었다. 각각의 pellet을 lysis buffer(Invitrogen corporation, Carlsbad, CA, USA)에서 부유한 후 원심분리를 시행하여 정제된 상층액을 whole-cell lysate로 보관하였다. 이렇게 하여 분리된 50 µg의 단백을 10% reducing sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel을 이용한 전기영동을 실시하였고, 전기 영동된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 Tris-buffered saline와 Tween-20 buffer[20 mM/L Tris-HCl(pH 7.6), 135 mM/L NaCl, 1% Tween-20]와 5% nonfat dry milk로 처리하여 항체와의 비특이적 결합을 억제시킨 후 ERK1/2 mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 p38 MAPK 일차 항체로 각각 4시간 반응시켰다. 이후 Tris-buffered saline와 Tween-20 buffer로 세척하고 anti-rabbit 또는 anti-mouse HRP-conjugated ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK 이차 항체로 각각 1시간 반응한 다음 세척하여 enhanced chemiluminescence reagent kit를 이용하여 현상하여 10초간 X-ray film에 감광하여 각각의 단백질 띠(band)를 확인하였다. 확인된 띠의 세기는 Scion Image software(Scion Corporation, Frederick, MD, USA)를 이용하여 반정량적으로 분석하여 상대적인 density로 나타내었다.

siRNA 형질 전환

Small interfering RNA(siRNA) 형질 전환 실험의 사용 순서 및 조건은 ERK1, ERK2 및 p38 MAPK의 siRNA에 대해 제시된 제조사의 방법대로 시행하였다(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). 간략히 설명하자면 NCI-H292 세포를 6-well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 접종 후 RPMI 1640 배지를 이용하여 항생제 없이 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 80~90% 정도의 융합기가 되어 PBS로 세척한

후 OPTI-MEN I Reduced Serum Medium(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)을 세포에 첨가하였다. ERK1 MAPK siRNA와 핵산 전송 물질인 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)을 ERK1 MAPK siRNA-Lipofectamine 복합체를 만들기 위해 실온에서 OPTI-MEN I Reduced Serum Medium에서 20분간 배양한 후 ERK1 MAPK siRNA-Lipofectamine 복합체를 함유한 배지를 ERK1 MAPK siRNA 20 nM 농도의 각각의 well에 첨가 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. ERK1 MAPK siRNA-Lipofectamine 복합체 배지를 형질 전환 활성의 손실 없이 4시간 후 RPMI 1640 배지로 대체한 후 24시간 동안 ERK1 MAPK siRNA 형질 전환을 거친 세포를 10 ng/mL 농도의 Poly I:C에 노출시킨 후 RT-PCR로 MUC5B mRNA의 발현을 측정하였다. NCI-H292세포에서 ERK1 MAPK siRNA의 형질 전환은 90% 이상으로 측정되

었고, 대조군과 ERK2 MAPK siRNA, p38 MAPK siRNA의 형질 전환도 위와 동일한 과정으로 수행하였다.

통 계

통계 처리는 Windows용 SPSS version 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 *p*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 정하여 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였다.

결 과

NCI-H292 세포에서 Poly I:C가 점액유전자 발현에 미치는 영향

NCI-H292 세포에서 Poly I:C를 각각 2.5 ng/mL와 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL 투여한 모든 군에서

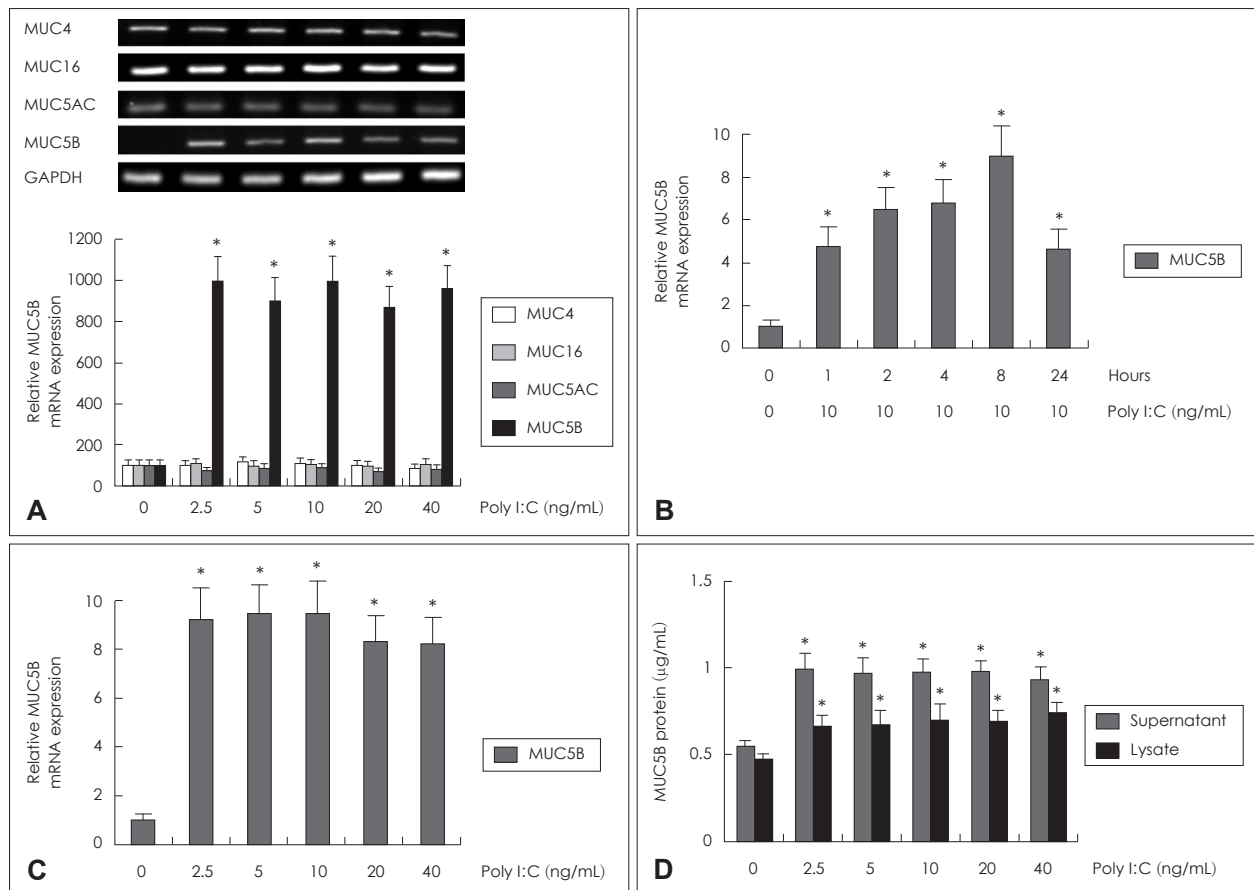


Fig. 1. Effects of Poly I:C on mucin gene expression in human NCI-H292 cells. Results of RT-PCR showed that Poly I:C significantly induced the expression of MUC5B mRNA. However, the expressions of MUC4, MUC16, and MUC5AC mRNA were not induced by Poly I:C (A). Results of real-time PCR showed that the expression of MUC5B mRNA was significantly increased at all times, and peaked at 8 hours after exposure to Poly I:C (10 ng/mL). And the expression of MUC5B mRNA was significantly increased at all concentration of Poly I:C, and peak at 10 ng/mL of Poly I:C (B and C). Results of ELISA showed that the production of MUC5B protein was significantly increased at all concentrations of Poly I:C (D). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean±S.D. of three independent experiments performed in triplicate. **p*<0.05 compared with zero value. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Poly I:C: polyinosinic-polycytidylic acid, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

MUC5B mRNA 발현이 의미 있게 증가하였으며 MUC4 mRNA와 MUC16 mRNA, MUC5AC mRNA 발현은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 1A). Poly I:C의 배양 시간에 따른 MUC5B mRNA 발현을 알아보기 위하여 Poly I:C 10 ng/mL를 투여 후 각각 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간 배양 후 MUC5B mRNA의 농도를 측정하였으며, 배양 8시간 후 MUC5B mRNA 발현이 가장 증가되었으나 시간의존성은 없었다(Fig. 1B). Poly I:C의 용량에 따른 MUC5B mRNA 발현과 단백질 생성을 알아보기 위하여 NCI-H292 세포 Poly I:C를 투여했을 때 MUC5B mRNA 발현과 단백질 생성은 모든 용량에서 증가되었으나 용량의존성은 없었다(Fig. 1C and D).

NCI-H292 세포에서 Poly I:C가 ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK를 통한 MUC5B의 발현에 미치는 영향

Poly I:C에 의한 MUC5B 발현에서 신호전달 경로를 알아보기 위하여 NCI-H292 세포에서 Poly I:C 10 ng/mL를 투여한 후 시간에 따른 ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK의 인산화 분석한 결과 ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK 모두 시간이 지남에 따라 인산화가 의미 있게 증가하였다(Fig. 2A). NCI-H292 세포에 ERK1/2 MAPK의 억제제인 U0126과 p38 MAPK의 억제제인 SB203580으로 각각 전 처리 후 Poly I:C 10 ng/mL를 투여하였을 때 MUC5B mRNA의 발현과 단백질 생성은 대조군과 비교하였을 때 의미 있게 감소되었다(Fig. 2B

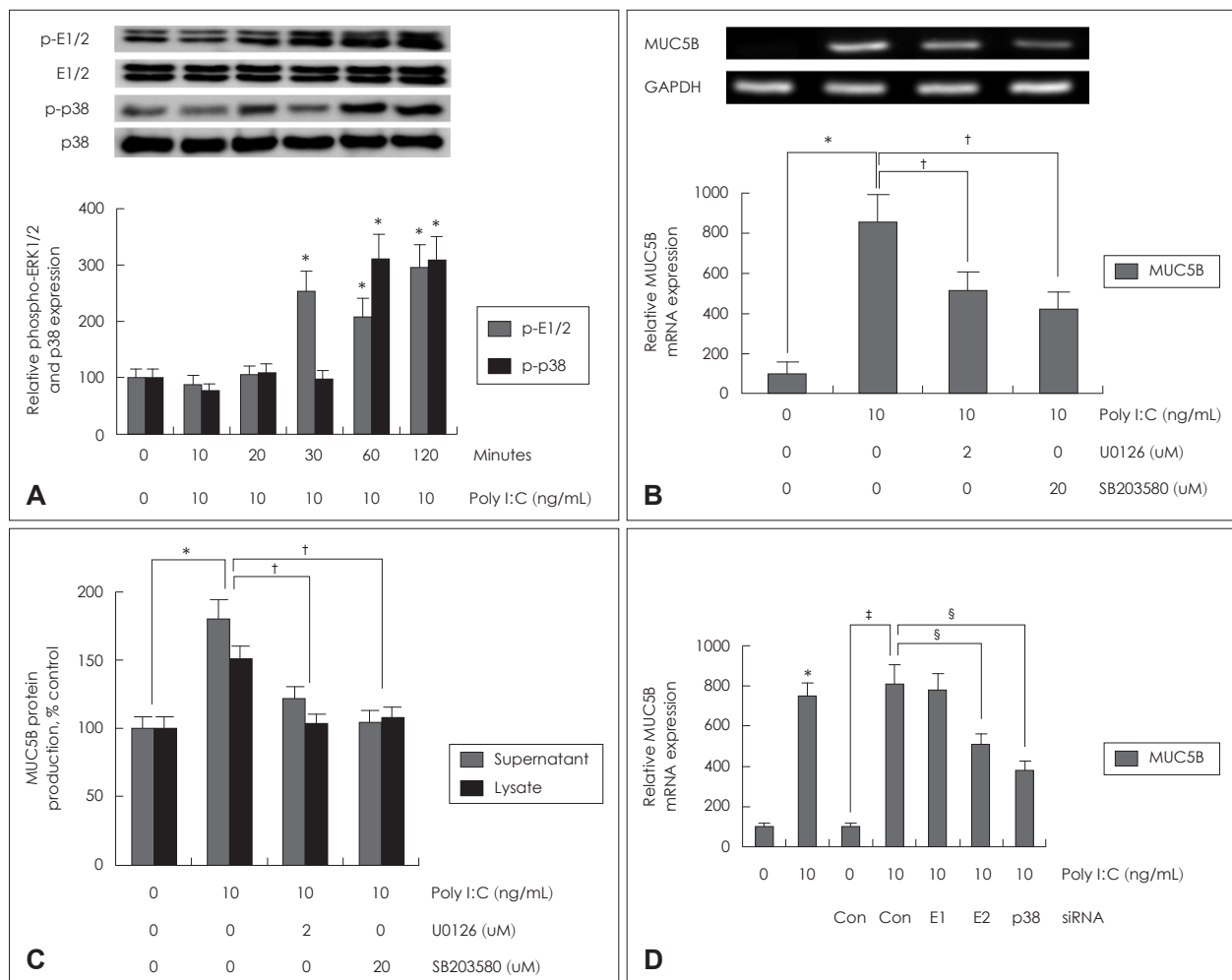


Fig. 2. Roles of ERK1/2 and p38 MAPK on Poly I:C-induced MUC5B expression in human NCI-H292 cells. Results of Western blot showed that Poly I:C significantly activated the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK (A). Result of RT-PCR and ELISA showed that Poly I:C-induced MUC5B expression was significantly attenuated by pretreatment with U0126 (an ERK1/2 MAPK inhibitor) and SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) (B and C). Results of real-time PCR showed that the knockdown of ERK2 and p38 MAPK by siRNA significantly blocked Poly I:C-induced MUC5B mRNA expression (D). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean ± S.D. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with zero value, † $p < 0.05$ compared with Poly I:C (10 ng/mL), § $p < 0.05$ compared zero value with control siRNA, § $p < 0.05$ compared with Poly I:C (10 ng/mL) and control siRNA. Con: control, E1: extracellular regulated kinase 1, E2: extracellular regulated kinase 2, p-E1/2: phosphorylated extracellular regulated kinase 1/2, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MAPK: mitogen-activated protein kinase, p-p38: phosphorylated p38, Poly I:C: polyinosinic-polycytidylic acid, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, siRNA: small interfering RNA.

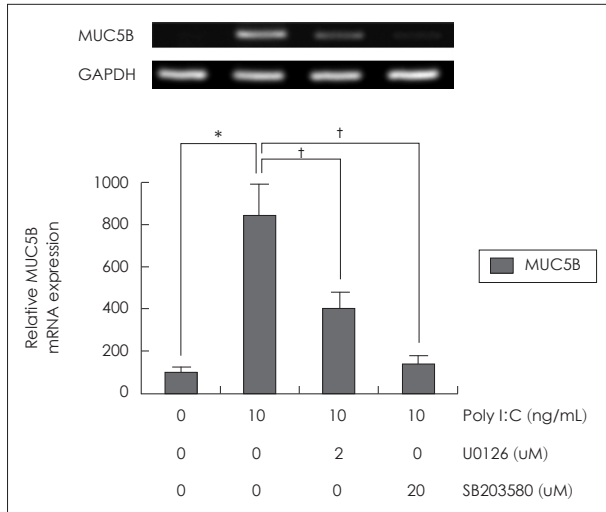


Fig. 3. Effects of Poly I:C on MUC5B expression in human nasal epithelial cells. Results of RT-PCR showed that the expression of MUC5B mRNA was significantly upregulated by Poly I:C. Poly I:C-induced MUC5B mRNA expression was significantly attenuated by pretreatment with U0126 (an ERK1/2 MAPK inhibitor) and SB203580 (a p38 MAPK inhibitor). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean±S.D. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with zero value, † $p < 0.05$ compared with Poly I:C (10 ng/mL). GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Poly I:C: polyinosinic-polycytidylic acid, RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, MAPK: mitogen-activated protein kinase.

and C). ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK의 신호전달 경로를 검증하기 위하여 NCI-H292 세포를 ERK1 MAPK siRNA와 ERK2 MAPK siRNA, p38 MAPK siRNA로 형질 전환시킨 후 Poly I:C 10 ng/mL를 투여한 후 분석한 결과 ERK2 MAPK siRNA와 p38 MAPK siRNA로 형질 전환시킨 MUC5B mRNA 발현은 대조군과 비교하였을 때 의미 있게 감소하였으나, ERK1 MAPK siRNA로 형질 전환시킨 군은 대조군과 비교하였을 때 유의한 변화가 없었다(Fig. 2D).

하비갑개 점막 상피세포에서 Poly I:C가 MUC5B의 발현에 미치는 영향

일차 배양된 하비갑개 점막 상피세포에서 Poly I:C의 영향을 알아보기 위하여 Poly I:C 10 ng/mL를 하비갑개 점막 상피세포에 투여한 후 분석한 결과 MUC5B mRNA 발현은 대조군과 비교하였을 때 의미 있게 증가하였고, U0126과 SB203580으로 전 처치 후 Poly I:C 10 ng/mL를 투여하였을 때는 MUC5B mRNA의 발현이 의미 있게 감소하였다(Fig. 3).

고 찰

Poly I:C는 분자식이 $C_{19}H_{27}N_7O_{16}P_2$ 이고 분자 중량은 671.402504 g/M인 물질로서 inosinic acid의 중합체와 cy-

tidylic acid의 중합체가 결합된 dsRNA와 유사한 구조를 가지고 있다. Poly I:C의 생물학적 기능은 TLR3을 통해 신호 전달을 하여 생체 내에서 interferon과 여러 cytokine의 분비를 유도하여 염증반응을 매개하고 수지상 세포 및 자연살해 세포를 활성화시켜 선천성 및 후천성 면역을 항진시키는 것으로 알려져 있다.^{11,12)} 최근 연구에서는 Poly I:C와 anti-programmed death-ligand 1과 착물을 형성하여 CD8 T 임파구를 매개로 한 항종양 작용과 구강 상피암에서 항암제에 의한 세포 성장 억제 효과를 촉진시키고,¹³⁾ 쥐에서 지속적인 Poly I:C의 자극이 폐의 염증을 발생시키고 사람에서 천식과 만성 폐쇄성 폐질환을 유발의 원인이 될 수 있다고 보고되었다.⁷⁾ 사람의 기관지 상피세포에서 Poly I:C가 rhinovirus 감염을 증가시키고 염증을 유발하며,⁸⁾ 쥐의 코 상피세포에서 Poly I:C의 자극이 과민성을 유발한다고 보고되었다.¹⁴⁾ 따라서 보고된 여러 연구들을 종합해 보았을 때 Poly I:C가 상기도 바이러스 감염과 같은 급성 호흡기 질환과 만성 비염, 만성 부비동염, 천식 같은 만성 호흡기 질환에서 염증성 반응과 점액 과분비와 관련이 있을 것으로 생각된다. 하지만 아직 호흡기 상피세포에서 Poly I:C가 점액유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지는 아직까지 명확하지 않다. 본 연구의 NCI-H292 세포와 하비갑개 점막 상피세포에서 Poly I:C는 MUC4와 MUC16, MUC5AC, MUC5B 발현 중 MUC5B 발현만 유일하게 증가시킴을 확인하였고, 이 결과는 Poly I:C가 사람의 호흡기 상피세포에서 점액의 과분비에 관여한다는 것을 제시할 수 있다.

신호전달 체계에 대해서 살펴보면 MUC5B는 신경의 활성화와 interleukin(IL)-6, IL-9, IL-13과 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 다양한 자극에 의해 주로 MAPK 신호전달 경로를 통해 발현되는 것으로 알려져 있다.^{5,10)} 최근 연구에 따르면 사람의 호흡기 상피세포에서 phorbol 12-myristate 13-acetate로 유발된 MUC5B 발현은 matrix metalloproteinase-9와 p38 MAPK 신호전달 경로를 통해 일어나고,⁵⁾ insulin-like growth factor-1에 의한 MUC5B 발현은 ERK1 MAPK와 p38 MAPK의 신호전달 경로를 통하여 일어나는 것으로 보고되었다.¹⁵⁾ Poly I:C는 대동맥 판막 간질세포에서 ERK1/2 MAPK와 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B) 신호전달 경로를 통해 골 형성 효과를 유발하여 석회화 대동맥 판막질환과 관련이 있고,¹⁶⁾ 사람의 각막세포에서는 Poly I:C가 MAPK와 NF- κ B의 신호전달 경로로 통해 matrix metalloproteinases의 발현에 관여한다고 보고되었다.¹⁷⁾ 최근 연구에서는 사람의 코 상피세포에서 Poly I:C가 TLR3과 p38 MAPK 신호전달 경로를 통하여 JAM-A단백 발현의 억제와 IL-8과 TNF- α 의 분비

를 유도한다고 보고되었다.¹⁸⁾

따라서 보고된 여러 연구들을 통해 Poly I:C가 MUC5B 발현에 MAPK 신호전달 경로가 관여할 것으로 추정되어, 본 연구에서는 여러 신호전달 경로 중 ERK1/2 MAPK와 p38 MAPK 신호전달 경로에 중점을 두어 연구하였다. 본 연구의 NCI-H292 세포와 하비갑개 점막 상피세포에서 Poly I:C 투여 후 ERK1/2와 p38 MAPK의 인산화가 증가되었고, ERK1/2 MAPK의 억제제인 U0126과 p38 MAPK의 억제제인 SB203580을 처치한 결과 MUC5B 발현이 감소하였으며, 또한 ERK2 MAPK siRNA와 p38 MAPK siRNA로 형질 전환시킨 후 Poly I:C로 유도된 MUC5B 발현이 감소하였다. 이 결과들은 Poly I:C가 사람의 호흡기 상피세포에서 점액의 과분비에 ERK2 MAPK와 p38 MAPK 신호전달 경로가 관여한다는 것을 제시할 수 있다. 하지만 사람의 호흡기 상피세포에서 Poly I:C의 명확한 점액의 과분비 효과를 확인하기 위해서는 다른 종류의 세포나 동물을 이용하여 보다 많은 점액유전자의 발현 양상과 여러 가지 신호전달 경로에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 호흡기 상피세포에서 Poly I:C가 점액의 과분비와 관련성이 있음을 알 수 있었으며, 이는 사람의 호흡기 상피세포에서 점액의 성상 변화와 과분비를 억제할 수 있는 새로운 조절제의 개발에 기초적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Lee JH, Kim GO, Na HG, Park NK, Kim HS, Kim JK, et al. Effect of anthocyanidin on MUC5AC and MUC5B expression in airway epithelial cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2013; 56(5):291-6.
- 2) Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 2007;117(5):932-8.
- 3) Park NK, Choi YS, Lee JH, Kim HS, Kim JK, Ahn JH, et al. Effect of udenafil on MUC5B expression in human airway epithelial Cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2013;56(8):501-5.
- 4) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2001;44(6):600-5.
- 5) Song EJ, Bae CH, Kim JY, Kim YW, Park SY, Song SY, et al. Effect of epigallocatechin-3-gallate on PMA-Induced MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2013;6(4):237-42.
- 6) Ma Y, Chen Q, Ross AC. Retinoic acid and polyriboinosinic: polyribocytidylic acid stimulate robust anti-tetanus antibody production while differentially regulating type 1/type 2 cytokines and lymphocyte populations. *J Immunol* 2005;174(12):7961-9.
- 7) Stowell NC, Seideman J, Raymond HA, Smalley KA, Lamb RJ, Egenolf DD, et al. Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir Res* 2009; 10:43.
- 8) Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005;79(19):12273-9.
- 9) Woo HJ, Bae CH, Song SY, Lee HM, Kim YD. Expression of membrane-bound mucins in human nasal mucosa: different patterns for MUC4 and MUC16. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136(6):603-9.
- 10) Song SY, Woo HJ, Bae CH, Kim YW, Kim YD. Expression of leptin receptor in nasal polyps: leptin as a mucosecretagogue. *Laryngoscope* 2010;120(5):1046-50.
- 11) Nagato T, Lee YR, Harabuchi Y, Celis E. Combinatorial immunotherapy of polyinosinic-polycytidylic acid and blockade of programmed death-ligand 1 induce effective CD8 T-cell responses against established tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20(5):1223-34.
- 12) Kumar H, Koyama S, Ishii KJ, Kawai T, Akira S. Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2008;180(2):683-7.
- 13) Park JH, Jeon DI, Yoon HE, Kwon SM, Kim SA, Ahn SG, et al. Poly I:C inhibits cell proliferation and enhances the growth inhibitory effect of paclitaxel in oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand* 2012;70(3):241-5.
- 14) Starkhammar M, Kumlien Georén S, Swedin L, Dahlén SE, Adner M, Cardell LO. Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. *PLoS One* 2012;7(2):e32110.
- 15) Bae CH, Kim JS, Song SY, Kim YW, Park SY, Kim YD. Insulin-like growth factor-1 induces MUC8 and MUC5B expression via ERK1 and p38 MAPK in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430(2):683-8.
- 16) Zhan Q, Song R, Zeng Q, Yao Q, Ao L, Xu D, et al. Activation of TLR3 induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells through the NF-κB and ERK1/2 pathways. *Int J Biol Sci* 2015; 11(4):482-93.
- 17) Kimura K, Nomi N, Yan ZH, Orita T, Nishida T. Inhibition of poly(I:C)-induced matrix metalloproteinase expression in human corneal fibroblasts by triptolide. *Mol Vis* 2011;17:526-32.
- 18) Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, et al. Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF-α via distinct NF-κB pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;250(1):29-38.