사람 정상 코점막 상피세포에서 배양기간에 따른 분비 및 섬모세포로의 분화

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 서울보훈병원 이비인후과[2]
이정권[1] · 이정준[2] · 김현준[1] · 남지인[1] · 김민호[2] · 윤주헌[1]

Mucociliary Differentiation according to Time in Human Nasal Epithelial Cell Culture

Jeung-Gweon Lee, MD[1], Jeong-Joon Lee, MD[2], Hyun Jun Kim, MD[1], Ji In Nam, MD[1], Min Ho Kim, MD[2] and Joo-Heon Yoon, MD[1]

[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [2]Department of Otorhinolaryngology, Seoul Veterans Hospital, Seoul, Korea

ABSTRACT

In cell culture studies using human nasal epithelial cells, information regarding the state of differentiation, cell phenotype, and gene expression for mucus production would be important to have in relations to different culture time as these factors may vary according to the length of culture period. The primary purpose of this research was to determine whether the number of the ciliated cells increases as a function of differentiation in normal human nasal epithelial (NHNE) cells. When an increase was observed in the number of ciliated cells, we determined the composition ratio of ciliated cells and secretory cells according to the culture duration. At the same time, we also examined the levels of mucin and lysozyme secretion at the same time. The presence of ciliated cells was not evident up to 2 days after confluence. However, 3.1±0.2%, 7.4±0.5%, and 14.5±0.6% of the cells were ciliated 7, 14, and 28 days after confluence, respectively. Meanwhile, the percentage of secretory cells were 35.6±2.8%, 32.8±2.5%, 32.8±2.5%, and 49.4±1.4% on the 2, 7, 14 and 28 days after confluence, respectively. The amount of secreted mucin showed an abruptly increasing pattern by the 14th day of confluence, but showed no significant changes thereafter. The amount of secreted lysozyme increased as a function of differentiation. We concluded that in in vitro studies with NHNE cells, the time point of treatment should vary according to the purpose of the study. **(Korean J Otolaryngol 2003;46:216-21)**

KEY WORDS : Cell differentiation · Epithelial cells · Nose.

서 론

호흡기 상피세포에서 흔히 일어나는 점액과분비는 각종 비염이나 부비동염과 같은 상기도 질환의 공통적인 현상이다. 상기도는 기저세포와 여러 가지 종류의 분비세포와 섬모세포로 구성된 위중층섬모상피세포로 이루어져 있으며, 이러한 호흡기 상피세포 중 기도점액을 분비하는 주된 세포 두 가지는 점액(mucin)을 분비하는 점액성 분비세포와 리소자임, 락토페린, secretory IgA, secretory leukocyte protoase inhibitor(SLPI) 등을 분비하는 장액성 분비세포이며 이러한 점액들은 기도상피세포에서 능동적으로 만들어져 분비된다.

기도 상피세포의 배양은 분화된 기도상피세포의 기능과 환경오염물질, 세균이나 바이러스, 화학적 발암물질 등의 영향을 연구하는 데에 필수적이며, Gray 등[1]은 사람 정상 하기도 상피세포를 계대배양하여 passage-2(P-2) 기도 상피세포들이 분비물의 분비기전이나 분화를 연구하기에 가장 적합하다고 보고하였다. 한편, 기도질환의 발병빈도를 보면 상기도 질환들이 하기도 질환에 비해 훨씬 높음에도 불구하고 상기도 상피세포에 대한 연구는 비용에서 배양된 일차상피세포를 이용한 일부 연구가 있었을 뿐이며 계대배양을 통하여 체계적인 연구는 미흡한 실정이었다.

상기도 점막에 대한 여러 가지 염증성 매개물이나 화학적 발암물질의 영향을 연구하는 데에 있어서 사람 코점막을 배양하여 이용하는 것은 아주 중요한 방법 중의 하나이며 최근 각광받고 있는 실험방법으로서, Yoon 등[2]은 정상 성인

논문접수일 : 2002년 11월 25일 / 심사완료일 : 2003년 2월 10일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8484 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

코점막을 계대배양하여 분비능력을 온전히 유지하는 데에 성공하였으며, passage - 2 정상 성인 코점막이 본래의 코점막의 특성을 유지하고 있어 상기도 세포의 생물학적 연구에 적절하다고 보고하였다.

사람 코점막을 배양함에 있어서 배양기간에 따른 세포의 분화정도, 세포의 형태, 점액의 분비량을 아는 것이 중요한데, 이는 배양기간에 따라 이런 특성들이 변화할 수 있기 때문이며, 따라서 같은 방법으로 실험을 했다고 해도 재료로 사용한 세포의 배양기간이 다르면 실험결과에 많은 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

본 연구의 목적은 계대배양된 코점막 상피세포가 섬모상피세포로의 분화능력을 가지고 있어서 실제로 섬모상피세포의 수가 증가하는지를 알아보고 만약 섬모상피세포의 수가 증가한다면 배양기간에 따른 섬모상피세포와 분비세포의 비율을 측정하고자 하였으며, 또한 점액과 리소자임의 분비량을 알아보는 것이다.

재료 및 방법

사람 정상 코점막 상피세포의 증식, 계대배양 및 냉동보관

비중격 만곡증으로 수술받는 환자의 비강에서 하비갑개의 코점막을 채취하여 1% Pronase(type 14)가 포함되어 있는 Dulbecco 's modified Eagle 's medium(DMEM, Gibco, NY, U.S.A.)와 Ham 's F12 nutrient mixture(F12, Gibco, NY, U.S.A.)의 1 : 1 혼합용액에서 18시간 동안 처치하여 상피세포를 분리하였다. 이를 플라스틱 용기에 평판한 후 37℃ 배양기에서 60분간 배양하여 섬유모세포 등을 제거하고 다시 플라스틱 용기에 평판한 후 배양하였다. 배양액으로는 bronchial epithelial growth media(BEGM)을 사용하였으며 hydrocortisone(0.5 μg/ml), insulin(5 μg/ml), transferring(10 μg/ml), epinephrine(0.5 μg/ml), triiodothyronine(6.5 ng/ml), gentamycin(50 μg/ml), amphotericin B(50 ng/ml), epidermoid growth factor(25 ng/ml), all - transretinoic acid(10~7 M), bovine serum albumin(1.5 μg/ml), bovine pituitary extract(1% vol/vol)을 배양액에 추가하였다. 배양액은 평판 하루 후에 갈아주었으며, 그 후로는 2일에 한 번씩 갈아주었다. 80% 합류(confluency)를 이루는 시점에서 trypsin/EDTA를 이용하여 세포들을 플라스틱 용기로부터 분리시켜 단세포로 유리시킨 후 세포의 수가 2,000 cells/cm^2가 되도록 희석하여 플라스틱 배양용기에 이차배양을 하였으며, 이 passage - 2 세포가 70~80%의 합류를 이루었을 때 다시 단세포로 만들어 액화 질소에 1.8×10^6 cell/vial로 냉동보관 하였다.

상피세포의 분화유도를 위한 Air - liquid interface(ALI) 배양

세포의 분화를 위해서 반투과성막으로 상하가 구분된 배양기(Transwell - clear, Costar Corp., Cambridge, MA, U.S.A.)에 BEBM과 DMEM을 1 : 1로 혼합한 무혈장 배양액을 넣고, 냉동 보관된 1×10^5개의 인체 정상 코점막 상피세포(normal human nasal epithelial cells, passage - 2)를 부유하여 평판하였다.[3] 이때 배양액에 첨가된 호르몬과 각종 성장인자들은 표피양 성장인자들(epidermoid growth factor)을 25 ng/ml에서 0.5 ng/ml로 조정한 것 이외에는 계대 배양시와 동일하게 하였다. 세포들은 첫 9일간은 배양액에 잠긴 상태로 두며 배양액은 위 및 아래쪽 부분을 배양 시작 후 1일과 이후 격일간격으로 갈아주었다. 9일간 배양액에 잠긴 상태로 배양한 후 위쪽 배양액을 제거하여 air - liquid interface(ALI)를 형성하여 세포의 상부를 공기에 노출시켰으며 아래쪽 배양액은 매일 교환하였다. 배양은 37℃, 5% CO_2에서 진행하였다. 배양기간은 100% 합류를 이룬 후 2일, 1주일, 2주일, 4주일로 하였으며, 각 시기 당 3 well을 배양하였고 동일한 배양을 3회 반복하였다.

형태학적 관찰

코점막 상피세포를 각 배양기간마다 한 well을 10% 중성포르말린에 고정한 후 2% 아가로스 젤에 샌드위치형으로 넣어 굳힌 후 파라핀에 포매하여 5 μm 두께로 절단하였다. 절단된 조직들은 H & E 염색을 실시하여 세포의 분화 정도와 섬모세포의 존재를 확인하였다. 또한 각 배양시기마다 세포의 형태를 주사전자현미경(SEM ; H - 800, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 이를 위해서 chamber slide에 배양된 세포를 4℃의 2.5% glutaraldehyde에 4~6시간 고정시킨 후 0.1 M 인산 완충용액으로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 2시간 다시 고정한 후 탈수과정을 거쳐 critical point drying 후 금도금(300 μm thickness)하여 관찰하였다.

면역세포화학염색을 통한 섬모세포와 분비세포의 구성비 측정

각 배양시기마다 10^5개의 세포로 cytospin slide를 만든 후 4℃의 아세톤 : 메틸알코올 1 : 1용액에 고정 후 섬모세포와 분비세포의 구성비를 확인하기 위해 면역화학적 염색을 시행하였다. 섬모세포의 염색을 위해서는 β - tubulin에 대한 단클론항체(1 : 1000, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하였으며 분비세포는 점액에 대한 단클론항체인 H6C5 (1 : 1000, a generous gift from Dr. Davis, University

of North Carolina, NC, U.S.A.)를 이용하여 검출하였다. β-tubulin에 대한 항체 및 H6C5에 양성인 세포의 비율을 측정하기 위하여 총 1,000개의 세포 중 양성인 세포의 수를 세어 측정하였다.

점액 및 리소자임의 면역적 검출 및 정량

각 배양시기마다 배양된 세포의 상층에서 24시간동안 채취된 분비물에서 점액과 리소자임의 양을 immunoblotting으로 정량하였다. 순수 인체점액(a gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)과 리소자임(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 표준으로 사용하였으며 점액에 대한 일차항체로는 단클론항체인 H6C5를 사용하였고, 리소자임에 대한 일차항체로는 다크론항체인 rabbit anti-serum항체(1 : 1000, Dako, Capenteria, U.S.A.)를 사용하였다. 채취된 분비물과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막에 적용하여 일차항체와 반응시킨 후 horse-radish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG에 반응시켰으며, chemiluminescence(ECL kit, Amersham, Buckingamshire, U.K.)로 발색시켰다. Standard curve를 선형회귀분석을 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 분비물의 실험결과를 평균±표준편차로서 나타냈으며, 통계학적 처리는 Student *t*-test로 하였다.

결 과

배양기간에 따른 섬모세포의 전자현미경적 형태변화

전자현미경으로 관찰한 결과 합류를 이룬 후 1주일째부터 섬모세포의 분화가 관찰되기 시작하여 합류 2주일 후에는 다수의 분화세포가 관찰되었고 합류 4주째에는 그 수가 현저히 증가되어 있었고, 정상적인 섬모를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

배양기간에 따른 분비 및 섬모세포의 구성비

Cytospin 슬라이드에서 면역조직화학적염색을 시행한 결과 β-tubulin에 대한 항체에 양성을 보이는 섬모세포(Fig.

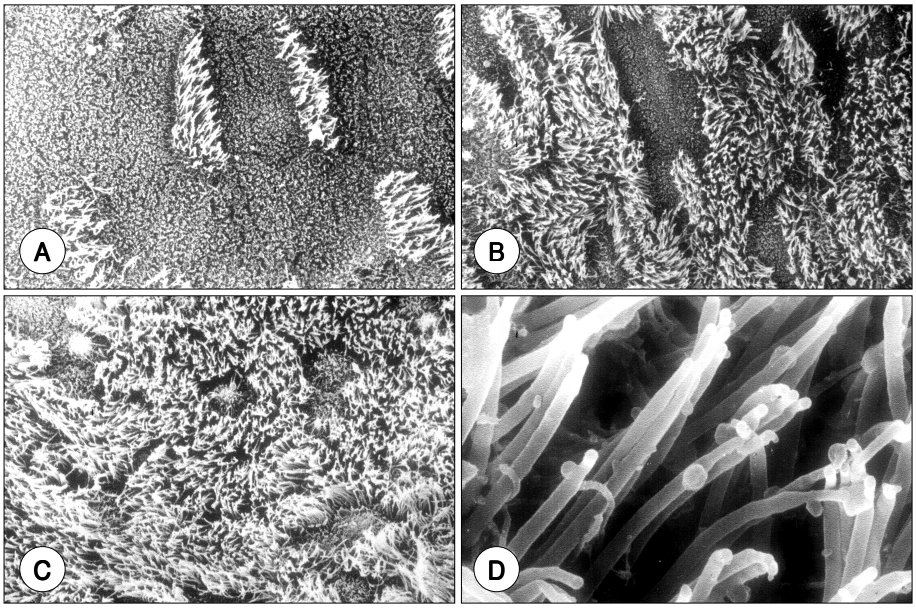

Fig. 1. Scanning electron microscopic findigns of cltured human nasal epithelial cells. Ciliated cells were first observed on the 7th day after confluence (A). On the 14th day after confluence, a small increase in the number of ciliated cells was seen (B) and on the 28th day after confluence, a markedly increased number of ciliated cells was observed (C) and their cilia looked healthy (D).

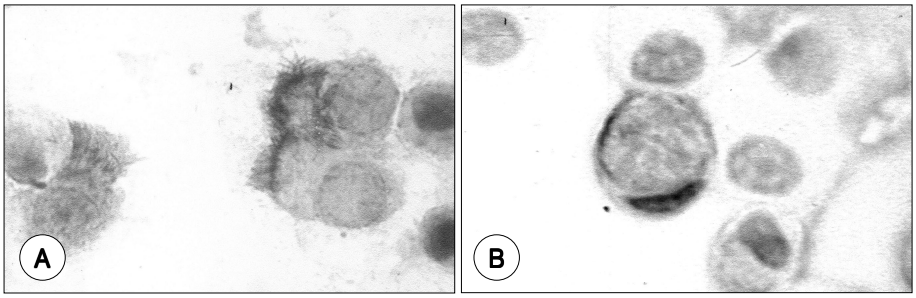

Fig. 2. Ciliated and secretory cells differentiated from human nasal epithelial cells. Ciliated cells reactive with β-tubulin antibody (A) and secretory cells with H6C5 antimucin antibody are shown (B).

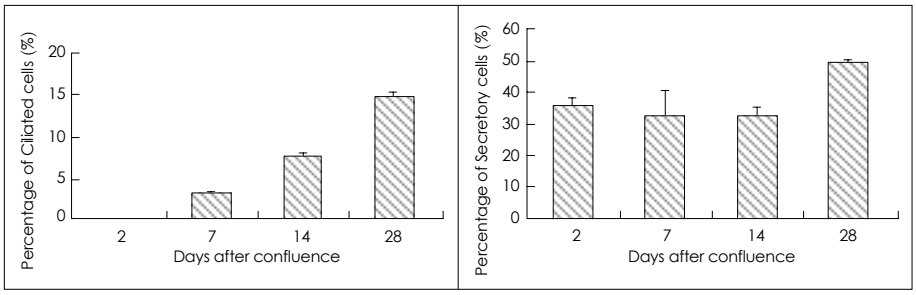

Fig. 3. Percentages of ciliated and secretory cells according to culture duration. The presence of ciliated cells was not evident up to 2 days after confluence. However, they composed 3.1±0.2%, 7.4±0.5% and 14.5±0.6% of the cultured cells on the 7th, the 14th and the 28th day after confluence respectively (A). Meanwhile, the percentage of secretory cells were 35.6±2.8%, 32.8±2.5%, 32.8±2.5%, and 49.4±1.4% on the 2nd, 7th, 14th and 28th day after confluence (B). These figures are representative of three separate experiments.

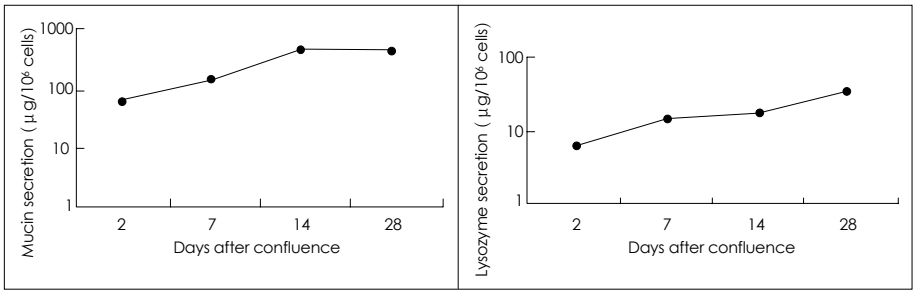

Fig. 4. Mucin and lysozyme secretion according to culture duration. The amount of secreted mucin showed and abruptly increasing pattern on the 14th day after confluence, but showed no significant changes thereafter (A). The amount of secreted lysozyme showed an increasing pattern as a function of differentiation (B). These figures are representative of three separate experiments.

2A)는 합류 후 2일째에는 관찰되지 않았으나 1주일째에는 전체세포 중 섬모세포의 비율이 3.1±0.2%, 2주일째에는 7.4±0.5%, 4주일째에는 14.5±0.6%로 배양 기간이 길어질수록 증가하는 양상을 보였다(Fig. 3A). 한편 H6C5에 양성반응을 보이는 분비세포(Fig. 2B)의 비율은 합류 2일째에는 35.6±2.8%, 1주일째에는 32.8±7.8%, 2주일째에는 32.8±2.5%, 배양기간에 따른 큰 차이는 보이지 않았으나 4주일째에는 49.4±1.4%로 약간 증가하였다(Fig. 3B).

배양기간별 점액 및 리소자임 단백질 분비의 정량

정상 코점막 상피세포를 계대배양하여 채취한 점액의 분비량은 합류 2일째에는 69.0±9.7 μg/10^6cells, 합류 1주일째에는 147.1±12.4 μg/10^6cells, 합류 2주째에는 473.0±36.8 μg/10^6cells, 합류 4주째에는 459.5±62.2 μg/10^6cells로 합류를 이룬지 2주째 급격히 증가하는 양상을 보이다가 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4A).

리소자임의 분비량은 합류 2일째에는 122.3±17.2 μg/10^6cells, 합류 1주일째에는 286.6±19.8 μg/10^6cells, 합류 2주째에는 342.6±25.6 μg/10^6cells, 합류 4주째에는 684.2±53.4 μg/10^6cells로 합류를 이룬지 2주까지는 서서히 증가하다가 섬모세포가 많아지는 4주째 급격히 증가하는 양상이 관찰되었다(Fig. 4B).

고 찰

호흡기 질환을 연구하기 위하여 사람의 호흡기 상피세포로 실험을 하는 것이 가장 바람직하지만 일차배양세포를 가지고는 한 사람에서 다양한 실험군을 만들 수 있을 만한 충분한 세포 수를 얻기가 어렵고, 여러 사람의 일차 상피세포를 사용할 경우 donor to donor variation이 커서 결과 해석이 어려운 점, 오염될 가능성에 대한 문제점 등으로 인하여 실험 디자인에 제한이 있었다. 1996년 Gray 등[1]은 사람 하기도 상피세포를 점액분비세포와 섬모상피세포로 분화하는 능력의 소실없이 계대배양하여 각 passage에서 그 특성을 밝힘으로써, 실험에 충분한 양의 세포를 확보하는데 성공하였으며, Yoon 등[2]은 사람 코점막 상피세포를 이용하여 분비세포와 섬모세포로의 분화능력을 소실하지 않은 상태에서 계대배양에 성공하여 상기도 상피세포의 연구에 새로운 전기를 마련하였다. 호흡기 상피세포의 배양을 이용한 대부분의 실험이 배양 후 1~2주의 초기에 이루어지

며 이 때에도 배양기간에 따라 세포의 분화정도나 세포의 형태, 점액의 분비량이 변화할 수 있으며, 따라서 좀 더 믿을만한 결과를 얻기 위해서는 호흡기 상피세포의 장기간의 배양을 통해 각 배양시기별로 특성의 변화를 관찰해 볼 필요가 있다.

본 연구에서는 사람 정상 코점막 상피세포를 계대배양하여 passage - 2 cell을 확보해서 4주 이상 장기간 배양하여 각 배양시기별 특성의 변화를 관찰하고 분석하였다.

본 연구의 결과 섬모상피세포는 분화를 유도하기 위한 air - liquid interface법으로 배양하여 합류를 이룬 후 1주일째에 처음 관찰되었으며 이는 과거의 보고[1)5)6)]와 비슷한 결과였다. 섬모상피세포는 합류 후 1주일부터 증가하기 시작하여 합류 후 4주째에 14.5%로 가장 높은 구성비율을 보였으며, 이는 하기도 상피세포를 이용하여 합류 3주째에 13.6%의 섬모상피세포의 구성비율을 보고한 Gray 등[1)]의 연구결과와 같은 양상이었다. 이러한 결과를 통해 코점막 상피세포를 배양하여 섬모상피세포를 연구하기 위해서는 충분히 분화가 이루어지는 합류 후 4주째에 시행하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 한편 생체내의 코점막을 직접 채취하여 섬모상피세포의 구성비율을 측정하여 59%로 보고한 Chapelin 등[7)]의 결과와 비교해 볼 때 실험실에서 유도한 섬모상피세포로의 분화와는 큰 차이를 보이고 있으며, 이는 앞으로 배양액의 구성성분과 배양기법을 개발하여 발전시켜 나아가야 할 과제라고 사료된다.

한편 배양기간별 분비세포의 비율은 합류 후 2일째부터 합류 2주 후까지는 상피세포의 32~35% 정도였으며 합류 4주 후에는 증가하여 상피세포의 49.4%가 분비세포였다. 이처럼 분비세포가 섬모세포보다 일찍 분화하는 것은 기도점막상피세포 배양시 일반적인 현상이다. 또한 이 결과는 사람 정상 코점막 상피세포에서의 분비세포의 비율인 24%[7)] 보다 오히려 높은 편이다. 따라서 분비세포에 대한 연구는 합류 2일째부터 시행할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 배양기간에 따라 점액성 분비물인 점액과 장액성 분비물인 리소자임의 분비량을 dot - blotting을 이용해 정량적으로 측정하였다. 분비된 점액의 양은 배양기간에 따라 증가하여 합류 후 2주째에 plateau phase에 도달하였다. 이와 같이 합류를 이룬지 2일 이후부터 배양 2주까지는 분비세포의 비율은 큰 변화가 없으나 점액 분비량이 합류 후 2주까지 증가한 것은 합류 후 2주까지는 일정세포가 분비하는 점액의 양이 점차 증가한다는 것을 암시한다고 하겠다. 합류 후 4주째에는 분비세포가 49.4%로 증가하였는데도 불구하고 점액의 양은 증가하지 않은 것은 분비세포의 노화에 의해 점액 분비능력이 다소 떨어진 것으로 사료된다. 그러나 장액성 분비물인 리소자임은 합류 후 4주째까지 계속 증가하는 양상을 보여 점액분비 양상과는 다소 차이가 있었다. 이러한 결과는 점액과 리소자임을 분비하는 세포가 서로 다를 수 있음을 암시한다고 하겠다.

본 연구를 통하여 사람 정상 코점막 상피세포를 배양하면 합류 후 1주내에 섬모상피세포가 나타나기 시작하여 점차 증가하며, 분비세포는 합류 후 2일 후부터 4주까지 비교적 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.

향후 본 연구결과를 이용하여 연구목적에 맞는 배양기간을 선택하여 그 시점에서의 세포의 분화정도에 따른 특성을 기본으로 하여 적절한 처치를 할 수 있을 것으로 사료되며 이는 호흡기 질환의 흔한 증상인 점액과분비나 편평화생된 상피세포를 정상 상피세포로 환원시키는 치료제의 개발이나 병인연구에 기여할 수 있을 것으로 생각하며 앞으로 배양액의 구성성분과 배양기법에 대한 연구를 통하여 좀 더 생체와 비슷한 세포의 분화과정을 유도할 수 있도록 노력이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구를 통하여 사람 코점막 상피세포를 배양함에 있어 배양기간에 따라 세포의 분화나 세포의 형태, 점액 및 리소자임의 분비량이 변화함을 알 수 있었고 이러한 결과는 코점막 상피세포의 배양을 이용한 연구를 진행할 때는 실험목적에 따라 배양기간이 달라야 한다는 것을 암시한다.

중심 단어 : 코점막 · 상피세포 · 세포분화.

본 연구는 연세대학교 의과대학 2002년도 교수연구비(2001 - 10)에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

1) Gray TE, Guzman K, Davis CW, Lubna H, Abdullah LH, Nettesheim P. *Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:104-12.*
2) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG, Park IY. *Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: expression of mucin and lysozyme. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:594-601.*
3) Kaartinen L, Nettesheim P, Adler KB, Randell SH. *Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1993; 29:481-92.*
4) Guzman K, Gray TE, Yoon JH, Nettesheim P. *Quantitation of mucin RNA by PCR reveals induction of both MUC2 and MUC5AC mRNA levels by retinoids. Am J Physiol 1996;271:L1023-8.*
5) Hanamure Y, Deguchi K, Ohyama M. *Ciliogenesis and mucus syn-*

thesis in cultured human respiratory epithelial cells. Ann Otol Rhinol Laryngol 1994;103:889-95.

6) Usui S, Shimizu T, Kishioka C, Fujita K, Sakakura Y. *Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:271-7.*
7) Chapelin C, Coste A, Gilain L, Poron F, Verra F, Escudier E. *Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation. Eur Respir J 1996;9:2474-8.*
8) Yoon JH, Park IY. *Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. Rhinology 1998;36:146-52.*
9) Rose MC. *Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. Am J Physiol 1992;263:413-29.*
10) Kim SS, Kim KS, Lee JG, Park IY, Koo JS, Yoon JH. *Levels of intracellular protein and messenger RNA of mucin and lysozyme in normal human nasal and polyp epithelium. Laryngoscope 2000;110:276-80.*
11) Choi JY, Lee WS, Kim CH, Yoon JH. *Ciliary and secretory differentiation of normal human middle ear epithelial cells. Korean J Otolaryngol 2002;45:208-13.*