정상 코점막 상피세포에서 UTP와 ATPγS에 의한 Ca^{2+} 의존성 경로를 통한 점액 분비

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실[2]
김현준[1] · 최재영[2] · 김진영[2] · 서용석[2] · 이정권[2] · 윤주헌[2]

UTP and ATPγS Induce Mucin Secretion via Ca^{2+} Dependant Pathways in Human Nasal Epithelial Cells

Hyun Jun Kim, MD[1], Jae-Young Choi, MD[2], Jin Young Kim, MD[2], Yong Seok Seo, MD[2], Jeung-Gweon Lee, MD[2] and Joo-Heon Yoon, MD[2]

[1]Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon; and [2]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Nucleotides such as adenosine triphosphate (ATP) and uridine-5-triphosphate (UTP) play fundamental roles in the early stage of secretion in nasal epithelial cells via P2Y receptor. In the present study, we examined the expression pattern of P2Y subtypes and their functions on Ca^{2+} influx ($[Ca^{2+}]_i$) in normal human nasal epithelial (NHNE) cells. We also examined the effect of UTP (agonist for $P2Y_2$) and ATPγS (agonist for $P2Y_{11}$) on mucin secretion and mucin gene expression. **Materials and Method** : The expression pattern of P2Y receptors and mRNA levels of *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC8* were examined after treatment with UTP and ATPγS by RT-PCR. Mucin was quantitated by immunoblotting assay. We measured the $[Ca^{2+}]_i$ in NHNE cells with a double perfusion chamber. **Results** : Two uracil-sensitive receptors ($P2Y_2$, $P2Y_4$) and two adenine-sensitive receptors ($P2Y_1$, $P2Y_{11}$) were expressed in NHNE cells. UTP and ATPγS increased $[Ca^{2+}]_i$ via caffeine-sensitive pathways, and these two agonists stimulated mucin secretion to a similar magnitude without their gene enhancement. In addition, the mucin stimulatory effects subsided when the intracellular Ca^{2+} was removed by 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester. **Conclusion** : Our study showed that $P2Y_2$ and $P2Y_{11}$ receptors were expressed in NHNE cells and that their agonists, UTP and ATPγS, act as secretogogues on mucin secretion via Ca^{2+}-dependent pathways. **(Korean J Otolaryngol 2003;46:302-8)**

KEY WORDS : Nucleotides · Nasal Mucosa · Receptors purinergic · Caffeine.

서 론

Adenosine triphosphate(ATP)와 uridine-5'-triphosphate(UTP)와 같은 nucleotide들은 상피세포의 첨단 세포막에 있는 P2Y 수용체를 통해 초기 분비에 중요한 역할을 한다.[1] 인체에서는 $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$의 5개의 subtype이 클로닝되었고, 각각 활발하게 기능함이 확인되었다. 이들 수용체들은 주로 adenine nucleotide에 의해 활성화되는 선택적인 퓨린 수용체인 $P2Y_1$과 $P2Y_{11}$, uracil nucleotide에 의해 활성화되는 피리미딘 수용체인 $P2Y_4$와 $P2Y_6$, 그리고 adenine과 uracil에 모두 반응하는 $P2Y_2$로 나누어진다.[2][3]

기관기도 상피에서는 $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$과 같은 uracil 반응성 수용체가 발현되며[4] 이온 수송이나 섬모 운동, 점액 유리 같은 점액섬모처리 기능을 조절한다.[5-7] 비강 상피세포에서도 uracil 반응성 퓨린 수용체들도 비슷한 역할을 한다고 보고되어 있다.[8][9] 그러나, 이러한 내용들은 약리학적 접근법에 의하여 촉진 및 억제물질의 유효성을 측정하였기 때문에 비강 상피세포내 P2Y 수용체들의 특성은 아직 완전하게 밝혀지지 않았다.

배양된 사람 코 상피세포를 이용한 저자들의 예비 실험

논문접수일 : 2003년 2월 4일 / 심사완료일 : 2003년 3월 5일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8484, 8470 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

에서는 uracil 반응성 수용체 촉진제들뿐 아니라, 2'-and 3'-O-4-benzoylbenzoyl-ATP(BzATP)나 ATPγS 같은 선택적 $P2Y_{11}$ 촉진제도 세포내 칼슘유입을 촉진시켰다. $P2Y_{11}$ 수용체는 사람 태반으로부터 클로닝되어 백혈구 성숙에 관여하나,[10] 기도 상피에서는 아직 발현이 확인되지 않았다.

이에 저자들은 첫째, 배양된 사람 코 상피세포에서 어떤 P2Y subtype들이 존재하는지와 각각의 P2Y subtype이 세포내 칼슘 유입을 유발시키는지를 조사하였다. 둘째, $P2Y_2$의 촉진제인 UTP와 $P2Y_{11}$의 촉진제인 ATPγS의 점액 분비에 미치는 영향과 점액 유전자들의 발현양상을 조사하였다. 셋째, 세포내 칼슘유입을 막았을 때 UTP와 ATPγS에 의한 점액 분비가 얼마나 억제되는지를 조사하였다.

대상 및 방법

화학물질 및 용액

Fura-2-AM은 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, ATP, ATPγS, UTP, UDP, 2-methylthioadenosine 5'-triphosphate(2MeS-ATP), BzATP 및 caffeine을 포함한 다른 모든 물질은 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 관내강막과 기저외측막에 사용된 표준 관류용액은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM D-Glucose, 10 mM HEPES(pH .4 with NaOH)을 함유하고 있다.

세포배양

Passage-2사람 정상 코점막 상피세포(NHNE)의 배양은 Yoon 등이 보고한 방법을 이용하였다.[11] 5.0×10^4개의 코점막 상피세포(NHNE)를 0.45 μm 직경의 pore를 가진 0.1 cm^2의 Transwell-clear culture insert(Costar Co, Cambridge, Mass, USA)에 배양하였다. 세포들은 합류를 이룰 때까지 bronchial epithelial growth medium(BEGM)과 Dulbeco's modified Eagle's medium(DMEM)이 1:1로 혼합된 용액에 여러 첨가물이 포함된 배지에서 배양되었다.[11]

세포내 칼슘치($[Ca^{2+}]_i$)의 측정

단층의 세포군에서 세포내 칼슘치($[Ca^{2+}]_i$)를 측정하는 방법은 이미 보고된 방법을 변형하여 시행하였다.[12] 세포를 3 μM Fura-2-AM을 함유한 배양액에 넣고 30분간 배양하여 Fura-2를 주입하였다. Fura-2와 함께 배양된 상피세포가 붙어있는 막을 도립현미경에 연결된 miniature Ussing chamber(AKI Institue, U. of Copenhagen, Denmark)에 올려놓고 측정하였다. 막은 두개의 half chamber 사이에 놓여져 막을 기준으로 chamber는 상부의 관내강 분획과 하부의 기저강분획으로 나뉘어진다. 투명한 얇은 덮개가 관류 chamber의 바닥에 놓여져 2 mm이상의 초점거리를 가진 대물렌즈를 이용하여 염색액이 주입된 단층세포로부터 형광물질을 측정하였다. 관내강측과 기저외측 관류액은 37℃로, 중력에 의해 분당 3~5 ml의 속도로 chamber로 이동시켰다. Fura-2 발색은 350 nm와 380 nm의 excitation wave length에서 기록되었고(PTI Delta Ram, Photon Technology International, NJ), 세포들의 관내강측을 다양한 퓨린성 촉진제들과 억제제들이 들어있는 용액에 노출함으로써 각각의 350/380 발색비를 계산하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

퓨린성 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$)의 존재를 확인하기 위해 세포들이 합류를 이룬 후 7일 뒤 전체 RNA를 추출한 뒤 cDNA로 역전사하였다. 실험에 사용된 퓨린성 수용체에 대한 oligonucleotide primers는 Table 1과 같다. *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC8*의 mRNA를 탐지하

Table I. PCR primers for P2Y receptor

Name (accession No.)	Sequence	Site	Size (bp)
$P2Y_1$ (NM002563)	F : CCCTGGGCCGGCTCAAAAAGAAGAATG	613 - 639	389
	R : CAAGCCGGGCCCTCAAGTTCATCATTTTC	1002 - 974	
$P2Y_2$ (NM002564)	F : GCTACAGGTGCCGCTTCAACGAGGACTTC	310 - 338	428
	R : GGCAGGCCAGCACCAACACCCACAC	738 - 714	
$P2Y_4$ (X91852)	F : CCACCTGGCATTGTCAGACACC	405 - 426	424
	R : GAGTGACCAGGCAGGGCACGC	820 - 809	
$P2Y_6$ (U52464)	F : CCCTGCTGGCCTGCTACTGTCTCCTG	823 - 848	455
	R : CTAATTCTCCGCATGGTTTGGGGTTGG	1278 - 1252	
$P2Y_{11}$ (AF030335)	F : CCCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCC	239 - 264	396
	R : CGCAGCCCAACCCCGCCAGCACCAG	635 - 611	

고 정량하기 위해 전체 RNA는 배양된 코점막 상피세포에 UTP와 ATPγS를 처치한 전, 후 일정한 시간이 지난 후에 채취하였으며, cDNA로 역전사시켰다. Oligonucleotide primer는 기존에 보고된 염기서열에 근거하여 제작하였다.[11] 증폭된 산물의 genomic DNA contamination 여부를 검증하기 위하여 RT 반응에서 reverse transcriptase를 제외시킨 후 증폭되는 산물들이 없음을 확인하였다. 양성 대조군으로는 $P2Y_{11}$에서는 사람 혈소판이 사용되었으며, 나머지 수용체들에서는 사람 뇌조직이 사용되었다. 증폭된 산물은 ethium bromide가 함유된 2% agarose gel(FMC Bioproducts, Rockland, ME)에서 분리되었으며, 각각의 밴드들은 CSC Chemiluminescense Detection Module(Raytest, Straubenhardt, Germany)를 사용하여 분석하였다.

뉴클레오타이드 처치 후 점액 분비의 정량

Time - control과 nucleotide 처치 표본들을 채취하기 전, phosphate - buffered saline으로 철저하게 세척을 하여 세포들의 첨단 부위의 축적된 분비물을 제거하였다. Time - control 표본들을 채취하기 위해, 세포들은 배지에 10분, 30분, 1시간, 2시간, 24시간 동안 각각 배양되었으며, 세포들의 첨단 분비물들을 채취하여 보관하였다. 같은 세포들을 각각 100 μM UTP 혹은 ATPγS가 함유된 배지에 노출시킨 후 세포 분비물들을 채취한 뒤 처치 표본으로 보관하였다. 처치 표본들의 배양 시간은 time - control 표본들의 배양 시간과 같았다. 세포내 칼슘이 제거된 상태의 실험을 위해 2 - bis(2 - aminophenoxy) ethane - N,N,N',N' - tetraacetic acid - acetoxymethyl ester(BAPTA - AM, 50 μM)를 UTP 혹은 ATPγS 처치하기 10분전에 첨가하여 총 40분을 처치하였다. 세포 잔해들을 제거하기 위하여, 2500 rpm으로 3분간 원심 분리하였고 dot - blotting방법으로 mucin을 정량하였다.[11] 순수 분리된 mucin(a gift from Dr. C.W. Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)이 표준으로 사용되었고, 점액에 대한 항체로는 단클론 항체인 H6C5(a gift from Dr. C.W. Davis, University of North Carolina, Chapel Hill, NC)를 사용하였다. 채취된 분비물들과 표준들을 일정한 비율로 희석하여 니트로셀룰로즈막에 이동 후 일차 항체와 반응시킨 후 이차 항체(horseradish peroxidase - conjugated goat anti - mouse 혹은 anti - rabbit IgG)에 반응시켰으며, chemiluminescene(ECL kit ; Amersham, Buckinghamshire, UK)과 발색시켰다. 표준 곡선을 선형회귀분석을 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 정량하였다. 분비물의 실험 결과는 평균±표준 편차로서 표시하였다.

결 과

정상 코점막 상피세포에서 P2Y subtype 수용체들의 mRNA 발현

정상 코점막 상피세포에서는 uracil 반응성 수용체인 $P2Y_2$와 $P2Y_4$, adenine 반응성 수용체인 $P2Y_1$, $P2Y_{11}$이 발현되었다. $P2Y_6$는 발현이 되지 않았다. 양성 대조군으로는 퓨린성 수용체가 확실하게 발현하는 사람 뇌조직과 혈소판을 이용하였다(Fig. 1).

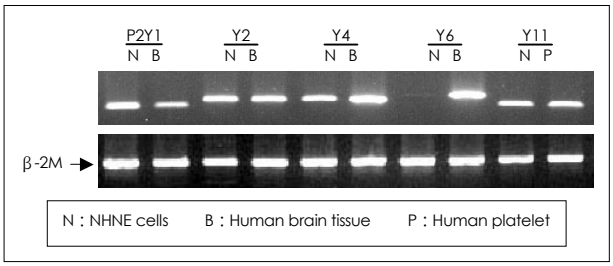

Fig. 1. RT-PCR analysis for P2Y receptor mRNA in cultured normal human nasal epithelial (NHNE) cells compared with a positive control (B, human brain tissue ; P, human platelet). Cultured NHNE cells expressed $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_{11}$ purinergic receptors mRNA. However, the $P2Y_6$ transcript was barely expressed in NHNE cells.

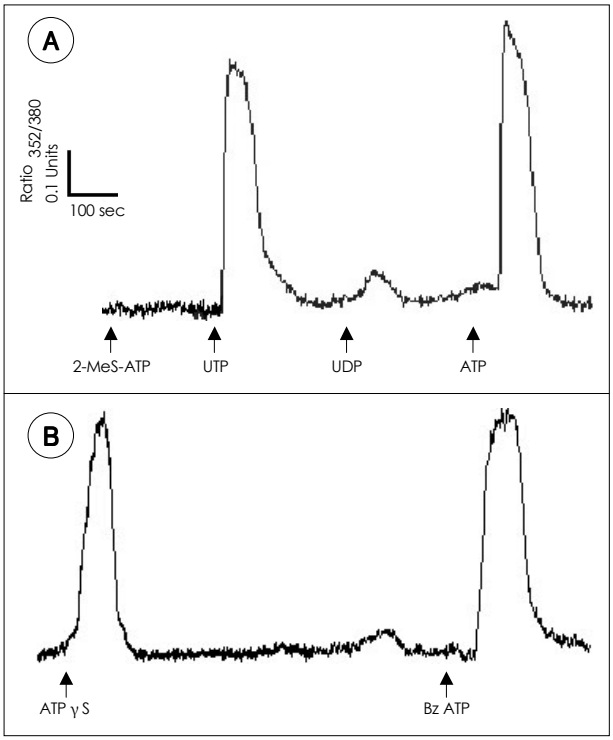

Fig. 2. Mobilization of $[Ca^{2+}]_i$ by uridine-sensitive P2Y agonists (A) and adenine sensitive P2Y agonists (B) in cultured normal human nasal epithelial cells.

퓨린성 수용체들에 의한 세포내 칼슘치의 조절

정상 코점막 상피세포를 $P2Y_1$의 촉진제인 100 μM 2-MeS-ATP로 처리하였을 경우 세포내 칼슘치는 변하지 않았으나, 100 μM의 ATP와 UTP는 비슷한 정도의 세포내 칼슘치 증가를 보였다(Fig. 2A). 이는 $P2Y_1$은 상피세포에서 발현은 되지만 세포내 칼슘치와는 무관함을 의미하고 $P2Y_2$가 세포내 칼슘 유입에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 또한, $P2Y_{11}$의 강력한 촉진제인 100 μM의 BzATP와 ATPγS를 처치하였을 경우에도 UTP나 ATP에서처럼 세포내 칼슘치의 증가를 보였다(Fig. 2B). 이러한 결과들은 $P2Y_2$와 $P2Y_{11}$ 수용체 모두가 세포내 칼슘 유입에 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 따라서, 다음 실험에서는 $P2Y_2$와 $P2Y_{11}$의 촉진제로 UTP와 ATPγS를 각각 사용하였다.

ATPγS와 UTP에 의한 칼슘이동

다음으로 $P2Y_2$와 $P2Y_{11}$ 수용체 촉진제에 의한 세포내 칼슘 유입을 조사하였다. 칼슘이 제거된 외부 용액에서 UTP와 ATPγS에 의해 유발된 세포내 칼슘치의 증가는 세포내 저장된 칼슘으로부터 유리된 것으로 추정된다(Fig. 3A and B). Inositol 1,4,5-triphophate(IP_3) 수용체의 억제제인 caffeine 30 mM을 촉진제를 주입 전 9분간 관류하였다. Caffeine은 UTP와 ATPγS에 의한 세포내 칼슘 유입을 의미있게 억제하였다(Fig. 3C and D).

배양된 정상 코점막상피세포에서 UTP와 ATPγS에 의한 점액분비

$P2Y_2$와 $P2Y_{11}$수용체를 각각 자극하기 위해 UTP와 ATPγS로 각각 처치한 후 점액을 정량하였다. 점액분비는 100 μM UTP로 처치한 후 대조군과 비교하여 10분 뒤 315.0±6.2%로 증가하였고 30분 뒤 387.1±5.2%로 최고조에 달했다가 점차로 감소하여 1시간 뒤에는 278.3±7.2%, 2시간 뒤에는 249.4±8.8%, 24시간 이후에는 113±5.8%의 수치를 보였다. ATPγS로 처치하였을 경우 UTP와 비슷한 양상을 보였으며 자극 효과도 시간에 따른 변화도 비슷하여, 처치 후 10분 뒤에는 370.0±6.9%로 증가하였고 30분 뒤 390.1±6.9%로 최고조에 달했다가 점차로 감소하여 1시간 뒤에는 258.1±6.6%, 2시간 뒤에는 255.8±7.9%, 24시간 이후에는 121.1±9.3%의 수치를 보였다. 각각 UTP와 ATPγS 처치군의 동일 시간에서의 점액량에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

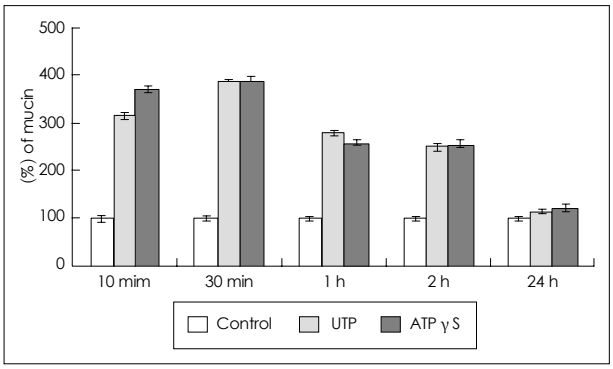

Fig. 4. Effect of UTP and ATPγS on mucin secretion in cultured normal human nasal epithelial (NHNE) cells. NHNE cells were exposed to 100 μM of UTP or ATPγS. Results are expressed as means±SD. Mucin release increased rapidly versus the 10 min control after treatment with 100 μM UTP, peaked at 30 min after treatment, and then gradually decreased (hatched bar). The stimulating effect of ATPγS (dark bar) had a similar pattern to that of UTP, and there was no significant difference between the stimulation effects of UTP and ATPγS at each stimulation time.

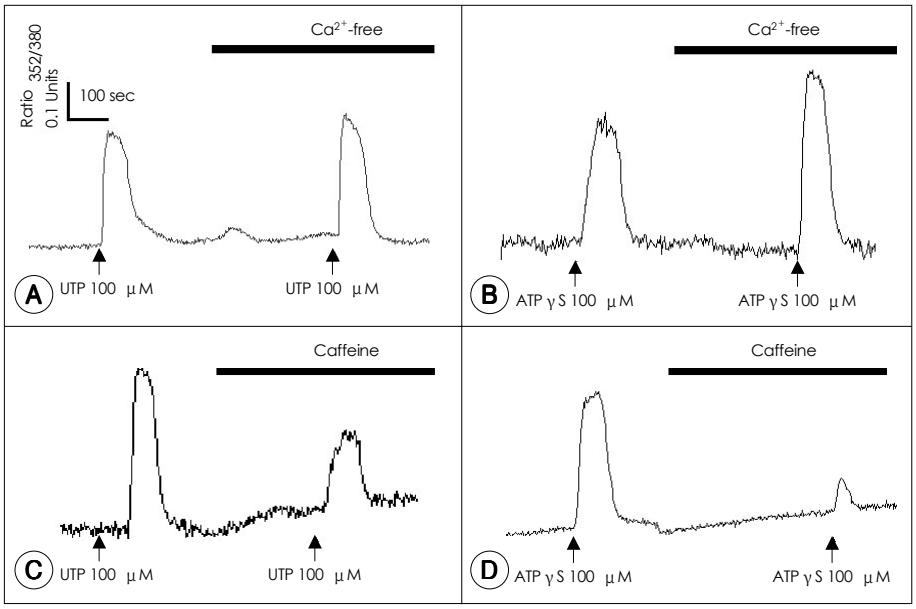

Fig. 3. Effect of Ca^{2+} -free solution (A) and caffeine (B) on UTP- and ATPγS-induced $[Ca^{2+}]_i$ in cultured normal human nasal epithelial cells.

UTP와 ATPγS 처치 후 시간에 따른 점액 mRNA 정도의 변화

정상 코점막 상피세포에서 UTP와 ATPγS를 다양한 시간으로 자극했을 경우 점액 유전자 발현을 조사하였다. 100 μM UTP와 ATPγS를 처치한 후 MUC5AC, MUC5B, MUC8 mRNA의 발현은 UTP와 ATPγS의 유무나 자극 시간에 따른 변화는 없었다(Fig. 5).

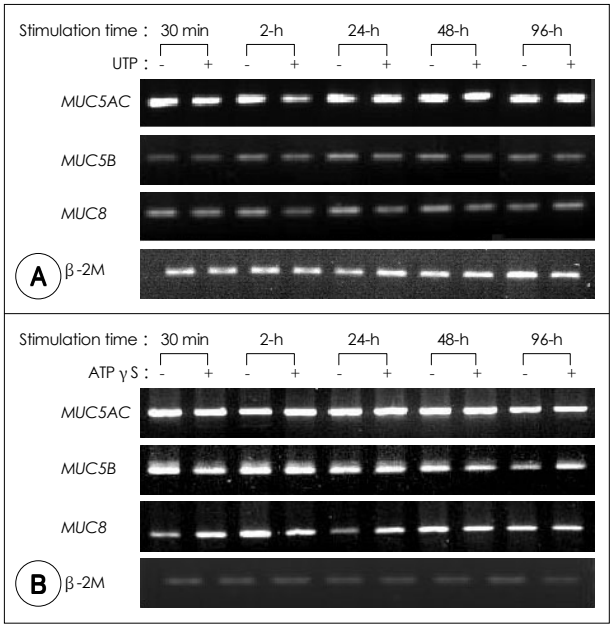

Fig. 5. Time-course study of the effects of UTP (A) and ATPγS (B) on *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC8* mRNA expression in cultured normal human nasal ear epithelial cells. RNAs were isolated at various times before and after nucleotides (100 μM) treatment. No significant difference was evident between the two groups. The expression levels of β-2M mRNA (PCR control gene) remained constant

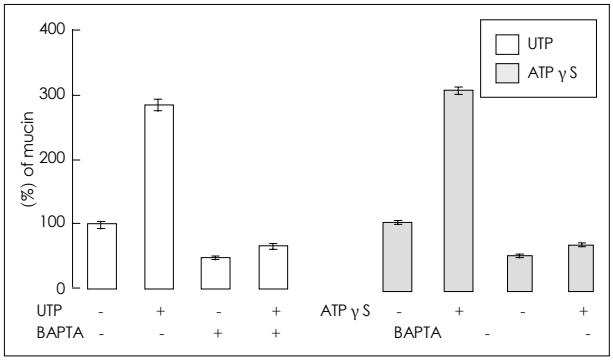

Fig. 6. Effect of intracellular calcium depletion on UTP-(hatched bar) and ATPγS-(dark bar) induced mucin release. We depleted intracellular Ca^{2+} with 50 μM of 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM). BAPTA-AM completely blocked UTP- and ATPγS-induced mucin release as well as constitutional mucin secretion.

세포내 칼슘이 점액 분비에 미치는 영향

세포내 칼슘이 점액 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 50 μM의 BAPTA-AM을 처치하여 세포내 칼슘을 고갈시켰다. 본 연구에서는 BAPTA-AM은 UTP와 ATPγS에 의한 점액 유리를 완벽하게 억제하였으며, 본질적인(constitutive) 점액 분비도 억제하였다(Fig. 6). 따라서 세포내 칼슘의 증가는 nucleotide에 의한 점액 유리뿐 아니라, 본질적인 점액 분비에도 필요할 것으로 생각한다.

고 찰

사람 정상 코점막 상피세포에서 P2Y수용체의 발현 양상은 현재까지 완전하게 알려져 있지는 않지만, uracil 반응성 P2Y수용체의 기능적 역할에 대한 일련의 증거들이 알려지고 있다.[8)9)] 우리의 결과에서는 사람 정상 코점막 상피 세포에서 $P2Y_2$ mRNA가 발현되었으며, 이는 이미 알려진 점액섬모청소기능에 관한 결과와 일치한다.[8)9)] ATP와 UTP가 세포내 칼슘 유입에 미치는 역할이 비슷하다는 것은 $P2Y_2$와 $P2Y_4$수용체가 코점막 상피세포에서 세포내 칼슘증가에 관여할 수 있다는 것을 의미한다. UDP는 코점막 상피세포에서 섬모 자극 작용을 일으키고, 세포내 칼슘을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[9)] 그러나, UDP 반응성 수용체인 $P2Y_6$의 mRNA는 본 연구에서는 발현되지 않았다. 이러한 차이는 사람 조직에서 얻은 세포들과 배양된 세포들과의 세포 분화도의 차이에 기인한 것으로 설명할 수 있다. 본 결과에서는 uridine 수용체외에 두개의 adenosine 수용체인 $P2Y_1$과 $P2Y_{11}$가 또한 발현되었다. $P2Y_{11}$의 강력한 촉진제인 ATPγS와 BzATP는 ATP와 UTP와 동등한 정도로 세포내 칼슘증가를 유발하였다. 이러한 사실은 $P2Y_{11}$이 코점막 상피세포에 존재한다는 가설을 뒷받침한다.

$P2Y_2$와 $P2Y_{11}$수용체 촉진제인 UTP과 ATPγS로 각각 자극 후 점액 분비를 측정하였다. 저자들의 실험에서는 UTP는 즉각적이고 뚜렷한 점액 분비 증가를 보였으며 UTP에 의한 $P2Y_2$ 경로를 통한 점액 분비의 증가는 코[13)]나 기도상피세포[6)]에서의 기존의 연구들과 일치하였다. ATPγS를 코점막 상피세포에 처치하였을 때도 UTP와 유사한 정도의 점액 증가를 보였다. 세포내 칼슘의 증가와 함께 생각할 때, 이러한 결과들은 $P2Y_{11}$ 수용체가 정상 코 점막 상피세포에서 점액 분비에 어느 정도 관여할 것으로 생각된다. P2Y 수용체 subtype들에 대한 특이적인 촉진제와 억제제가 개발된다면 $P2Y_{11}$ 수용체의 정확한 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 흥미롭게도 UTP와 ATPγS 처

치군과 대조군에서 처치 24시간 후에는 점액 분비양은 비슷한 정도를 보였다. 이는 아마도 분비된 점액에 의한 세포내 mRNA 번역에 억제 되먹임작용(negative feedback)으로 인한 것으로 생각된다.

호흡기 점막에서 뉴클레오타이드들에 의한 점액단백질 분비와 비교하여 점액 유전자 발현에 대한 연구는 매우 미흡한 수준이다. 뉴클레오타이드에 의한 점액 분비가 점액유전자 발현에 영향을 미치는지를 밝히기 위해, UTP와 ATPγS 처치 전후의 점액 유전자 mRNAs를 측정하였다. *MUC5AC*와 *MUC5B* 점액은 호흡기에서 점액층을 구성하는 주요 점액이고,[14] 저자들의 이전 연구에서 *MUC8*는 정상 코점막 상피세포와 비용에서 증가되어 있어,[15] 저자들은 *MUC5AC, MUC5B, MUC8* 점액 유전자에 중점을 두었다.

본 결과에서 나타난 대로 UTP와 ATPγS는 96시간까지 점액 유전자 발현에 영향을 미치지 않았다. Chen 등[16]은 UTP가 각각 다른 신호 전달 체계를 경유하여 처치 96시간 이후에 *MUC5AC* 발현을 증가시키고, 6시간 이후에 *MUC5B*를 증가시키는 결과를 보고하였는데 우리의 결과와는 일치하지 않았는데, 이러한 차이는 다음과 같은 이유에 기인한 것으로 생각할 수 있다. 첫째, 상기도와 하기도 즉 장기의 차이에 기인한 것으로 UTP에 의해 점액 유전자 발현 증가를 조절하는 수용체가 정상 코 점막 상피세포에서는 발현하지 않을 수도 있기 때문이다. 둘째, 배양 방법의 차이도 원인 중의 하나로 추정할 수 있다. 저자들은 세포 배양시 collagen matrix를 사용하지 않았기 때문에 콜라젠을 사용하였던 Chen 등의 실험과는 차이가 있을 수 있다고 생각한다. 또한 저자들은 배양된 중이 상피 세포들에서 UTP에 의한 점액 분비가 유전자 발현을 증가시키지 않는 것을 보고한 바 있다.[17] 이러한 결과들은 UTP와 ATPγS가 배양 시스템에서 유전자 발현을 증가시키지 않으면서, 세포질내에 저장된 점액분비를 자극하는 분비촉진제로 작용한다는 것을 의미한다.

본 실험에서 UTP와 ATPγS는 caffeine 민감성 경로를 통한 세포내 칼슘을 증가시켰다. 저자들은 세포내 칼슘증가가 점액 분비에 필수적인가를 조사하였다. 칼슘에 의한 점액의 세포외 배출(exocytosis)은 잘 알려진 사실이지만, 뉴클레오타이드에 의한 점액 분비에서 세포내 칼슘의 역할에는 논란이 있다. Scott 등[18]은 SPOC1 cell에서 뉴클레오타이드에 의해 유도되는 점액 과립의 세포외 분비에 칼슘의존성과 칼슘비의존성의 두 가지 경로가 있음을 밝혔다. Dray - Charier 등[19]은 사람 담낭에서 ATP에 의해 유도되는 점액 분비가 주로 칼슘 의존성 경로에 의해 조절됨을 보여 주었다. 이와는 반대로 Ko 등[20]은 햄스터의 기도 상피에서 BAPTA - AM에 의한 세포내 칼슘의 고갈이 ATP에 의해 유도되는 점액 분비를 억제하지 못한다고 하였다. 본 연구에서는 BAPTA - AM에 의한 세포내 칼슘의 제거가 UTP와 ATPγS에 의해 유도되는 점액 분비를 완벽하게 억제하였고, 심지어는 세포의 본질적인 점액 분비도 억제하였다. 이것은 UTP와 ATPγS에 의해 유도되는 점액 분비가 칼슘의존성임을 암시한다. 이러한 차이에 대한 설명으로는, 첫째, 퓨린 수용체들의 subtype들 간에는 서로 다른 칼슘이동 경로가 있을 수 있으며, 둘째, 뉴클레오타이드에 대한 반응은 종이나 조직에 따라 다를 수 있다고 생각한다.

결 론

본 연구에서 $P2Y_2$와 $P2Y_{11}$는 정상 코 점막상피 세포에서 발현하였고, 이들의 촉진제인 UTP와 ATPγS는 칼슘의존성 경로에 의한 점액 분비에서 분비촉진제로 작용하였다.

중심 단어 : 뉴클레오타이드 · 코점막 · 퓨린성 수용체 · 카페인.

이 논문은 2001년도 김명선 기념 재단 연구비에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Ralevic V, Burnstock G. *Receptors for Purines and Pyrimidines. Pharmacol Rev 1998;50:413-92.*
2) Von Kugelgen I, Wetter A. *Naunyn Schmiedebergs. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Arch Pharmacol 2000;362:310-23.*
3) Williams M, Jarvis MF. *Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. Biochem Pharmacol 2000;15:59:1173-85.*
4) Communi D, Paindavoine P, Place GA, Parmentier M, Boeynaems JM. *Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. Br J Pharmacol 1999;127:562-8.*
5) Evans JH, Sanderson MJ. *Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. Cell Calcium 1999; 26:103-10.*
6) Kim KC, Park HR, Shin CY, Akiyama T, Ko KH. *Nucleotide-induced mucin release from primary hamster tracheal surface epithelial cells involves the P2u purinoceptor. Eur Respir J 1996;9:542-8.*
7) Mason SJ, Paladiso AM, Bouch RC. *Regulation of transepithelial ion transport and intercellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. Br J Pharmacol 1991; 103:1649-56.*
8) Clarke LL, Boucher RC. *Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. Am J Physio 1992;263:348-56.*
9) Lazarowski EA, Paradiso AM, Watt WC, Harden TK, Boucher RC. *UDP activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the P2Y2 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997;18:94:2599-603.*
10) Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. *Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. J Biol Chem 1997;272:31969-73.*
11) 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.

12) Ko WH, Law VWY, Wong HY, Wilson SM. *The simultaneous measurement of epithelial ion transport and intracellular free Ca^{2+} in cultured equine sweat gland secretory epithelium. J Membr Biol 1999; 170:205-11.*

13) Lethem MI, Dowell ML, Van Scott M, Yankaskas JR, Egan T, Boucher RC, *et al. Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;9:315-22.*

14) Thoronton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucin. J Biol Chem 1997;272:9561-6.*

15) Seong JK, Koo JS, Lee WJ, Kim HN, Park IY, Song KS, *et al. Upregulation of MUC8 and downregulation of MUC5AC by inflammatory mediators in human nasal polyps and cultured nasal epithelium. Acta Otolaryngol. 2002;122:401-7.*

16) Chen Y, Zhao YH, Wu R. *Differential regulation of airway mucin gene expression and mucin secretion by extracellular nucleotide triphosphates. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;25:409-17.*

17) Choi JY, Cho KN, Yoon JH. *Effect of uridine 5'-triphosphate on mucin and lysozyme expression in human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh) in press.*

18) Scott CE, Abdullah LH, Davis CW. *SPOC1 cells possess Ca^{2+}-insensitive, PKC-dependent, and Ca2+-dependent PKC-potentiated pathways for mucin granule exocytosis. Am J Physiol 1998;275:C285-92.*

19) Dray-Charier N, Paul A, Combettes L, Bouin M, Mergey M, Balladur P, *et al. Regulation of mucin secretion in human gallbladder epithelial cells: predominant role of calcium and protein kinase C. Gastroenterology 1997;112:978-90.*

20) Ko KH, Jo M, McCracken K, Kim KC. *ATP-induced mucin release from cultured airway goblet cells involves, in part, activation of protein kinase C. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:194-8.*