KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2005;48:577-81

인체 중이점막 상피세포에서 Interleukin-1에 의한 베타 디펜신-2 발현증가에 관여하는 유전자 조절 부위에 관한 연구

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
김현준 · 배준호 · 정연훈 · 박기현 · 문성균

Gene Regulatory Regions Required for β Defensin-2 Up-Regulation by Interleukin-1α in the Human Middle Ear Epithelial Cell Line

Hyun Jun Kim, MD, Jun Ho Bae, MD, Yun-Hoon Choung, DDS, MD, Keehyun Park, MD and Sung-Kyun Moon, MD
Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Innate immunity is important in the middle ear because of the lack of immune cells in the region. Among innate immunities beta-defensin-2 is known to play an important role in the immune function of the middle ear. But we still do not understand well about the signal transduction pathway and gene regulatory region of beta-defensin-2 (hBD-2). **Materials and Method** : The expression of beta-defensin-2 (hBD-2) by IL-1α in HMEEC was detected by RT-PCR. The luciferase-expressing vector containing diverse lengths of the hBD-2 5' flanking region made by the progressive unidirectional deletion was transferred to HEEMC (Human Middle Ear Cell). We analyzed the function of 5' flanking region by luciferase activity measured using a luminometer after supplementing corresponding substrates to the cell lysate. **Results** : hBD-2 was upregulated by IL-1α in HMEEC-1. The treatment of IL-1α up-regulated the activity of promoter by 7.60±1.45 (average± standard deviation) folds in 2.7 kpb sized 5' flanking region, 3.81±0.78 folds in 1.1 kbp, and 4.00±0.73 folds in 500 bp. **Conclusion** : These results indicate there are two effective gene regions that regulate the hBD-2 expression by IL-1α between 2.7 kbp and 1.1 kbp, and at 500 bp upstream of the translation starting point of hBD-2 in HMEEC-1. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:577-81)**

KEY WORDS : Defensin · Gene expression regulation · Interleukin-1 · Middle ear · Immunity.

서 론

7세 이전의 소아 대부분이 1회 이상의 병력을 갖게 되는[1] 급성 중이염은 가장 흔한 어린이 감염 질환 중 하나로서 이관을 통해 비인강의 병원체가 중이강 내로 침입하여 숙주의 방어 시스템을 극복하고 염증을 유발시켜 발생한다.[2] 중이강은 다른 기관과 달리 면역세포가 많이 분포하지 않기 때문에 병원체가 침입한 초기 단계에는 적응 면역계(adaptive immunity)보다는 자연 면역계(innate immunity)가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.[3] 점막섬모계와 같은 물리적 요소(physical element)와 대식세포와 같은 세포 요소(cellular element) 및 보체(complement) 나 항균펩타이드와 같은 작용 요소(effector element)로 구성되어 있는 자연면역계는 적응면역계가 활성화되기 전 감염의 초기단계에서 병원균을 억제하고 제거하는 기능을 한다. 특히, 작용 요소에는 능동적으로 병원균을 인지하고 항균펩타이드의 생산을 증가시키는 시스템이 있다.[4]

Defensin은 항균펩타이드의 하나로서 특유의 양전위로 병원균의 세포막을 파괴하여 항균효과를 나타낸다. Alpha defensin은 주로 호중구(neutrophil)에서 분비되는 반면, β defensin은 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으

논문접수일 : 2004년 6월 10일 / 심사완료일 : 2004년 12월 27일
교신저자 : 문성균, 443 - 721 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (031) 219 - 5265 · 전송 : (031) 219 - 5264
E - mail : smoon@ajou.ac.kr

며 특히, β defensin - 2는 병원균이나 cytokine과 같은 염증 자극에 의하여 그 발현이 크게 증가한다.[5] Defensin의 발현 조절에 대해서는 NF - Kb가 관여함이 보고되었고,[6] translation 상위 500 bp이내에 조절 부위가 존재함이 보고되었다.[7] 최근, 저자들은 인체 중이점막 상피세포주(HMEEC)에서 interleukin - 1α에 의하여 인체 β defensin - 2(hBD - 2)의 발현이 증가되는 것과 이 현상에 Src - dependent Raf - MEK1/2 - ERK 신호전달경로가 관여하는 것을 보고하였다.[8]

이에 저자들은 인체 중이 점막 상피세포주에서 IL - 1α에 의하여 hBD - 2의 발현이 증가할 때 관여하는 유전자 조절부위를 조사하여 향후 상위 신호전달물질과의 연계를 연구하는데 발판을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

본 실험에는 human papilloma virus type16의 oncogene인 E6/E7 gene을 포함하는 retrovirus를 이용하여 만든 정상 인체 중이점막 상피세포주(HMEEC - 1)를 이용하였다.[7] HMEEC - 1은 Bronchial Tracheal Epithelial Growth Medium(BEGM, Clonetics, Walkersville, MD, USA)과 Dulbeco 's modified Eagle 's medium(DMEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)을 1 : 1로 혼합하고 bovine pituitary extract(52 μg/ml), hydrocortisone(0.5 μg/ml), hEGF(0.5 ng/ml), epinephrine(0.5 μg/ml), transferrin(10 μg/ml), insulin(5 μg/ml), triodothyronine(6.5 μg/ml), retinoic acid(0.1 μg/ml), gentamicin(50 μg/ml), amphotericin - B(50 μg/ml)를 첨가한 무혈장 배지에서 배양하였다. 일주일에 2회 배양액을 교환하였으며, 37℃ 5% CO2 chamber에서 배양하였다.

Exonuclease Ⅲ를 이용한 단방향 유전자 절단법

hBD - 2 유전자의 5 'flanking 부위(2,626 bp from - 2,625 to +1)를 분리하고 그 양쪽 끝에 specific primer(KpnI tail : 5 ' - GAGGTACCTCCATCCTTTACTGTGATGATGCC - 3 '; HindIII tail : 5 ' - GAAAGCTTTGGCTGATGGCTGGGAGCTTCACCA - 3 ')를 이용한 PCR tailing법으로 Hind III와 Kpn I의 제한효소 작용부위를 첨가하였다. 중합효소반응 산물을 제한 효소와 ligase 반응을 통하여 pGL3 luciferase reporter plasmid(Promega, Madison, Wisconsin, USA)의 multiple cloning sites에 삽입하고를 염기서열을 확인하였다(Fig. 1). 단방향 유전자 절단법(unidirectional DNA deletion)을 간단히 기술하면, hBD - 2 5 ' flanking 부위가 subcloning된 luciferase expressing chimeric construct에 Kpn I과 BstZ1/7I를 처치하여 lucifease 유전자 쪽은 3 'overhang이, hBD - 2의 5 ' flanking쪽은 5 'overhang이 각각 생기도록 한 후, exonuclease III를 30초 간격으로 순차적 처치하여 5 ' overhang 끝 쪽부터 잘려나간 여러 크기의 5 ' flanking 부위를 갖는 vector construct를 만든 뒤, S1 nuclease를 이용하여 남아 있는 단일 가닥의 tail을 제거하고 ligation하였다(Fig. 2A). 전기영동과 염기서열분석을 통해 5 ' flanking 부위의 크기를 알아내었고(Fig. 2B) 필요한 vector construct를 충분히 확보하였다.

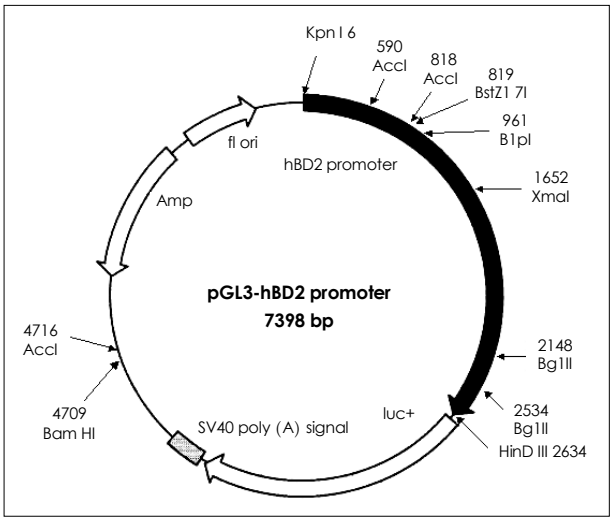

Fig. 1. Vector map expressing luciferase with hBD-2 5' flanking region. The 5' flanking region (from - 2625 to +1) of the hBD-2 gene was isolated and subcloned into the multiple cloning site of the pGL3 luciferase reporter plasmid.

Transfection and luciferase assay

HMEEC 세포를 1.5×10^5개씩 6 - well plate에 각각 배양하여 약 50% confluence를 이루었을 때 cationic lipid (LT1, PanVera, Madison, WI, USA)를 이용하여 다양한 크기의 vector consturct를 각각 transfection시켰고, 24시간 기초 배양액으로 starvation시킨 뒤 IL - 1α 10 ng/mL을 처치하였다. 8시간 incubation 후에 세포를 glycerol이 포함된 융해완충액으로 융해시킨 후, 세포융해물을 luciferase substrate(Promega)와 혼합한 후 luminometer(Pharmingen, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 luciferase의 활성도를 측정하여 5 ' flanking 부위의 유전자 조절 기능

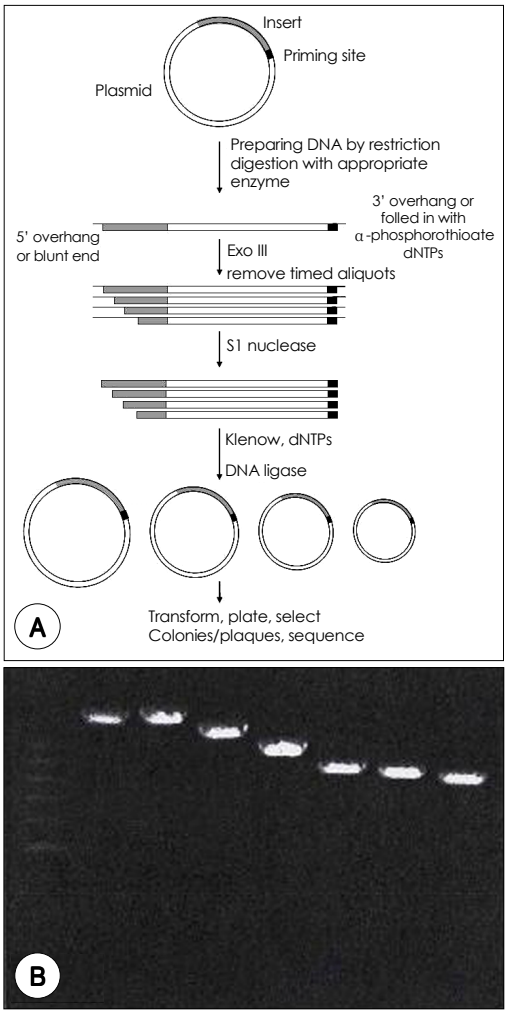

Fig. 2. A : Schematic diagram of the steps for the progressive unidirectional deletion using exonuclease III. Exonuclease III digests DNA from a 5' overhang or blunt end, not from a 3' overhang. B : Gel electrophoresis demonstrates diverse lengths of the hBD-2 5' flanking region made by the progressive unidirectional deletion.

을 분석하였다.

결 과

β defensin - 2의 발현증가에 관여하는 유전자 조절 부위

다양한 크기로 얻어진 hBD - 2 5 ' flanking 부위를 인체 중이점막 상피세포주에 형질 전환시키고 24시간의 starvation 후에 IL - 1α 10 ng/ml를 처치하였다. 8시간 후에 세포를 융해시키고 luciferase substrate를 첨가한 후 luciferase 활성도를 측정하였다. 2.7 kbp 크기의 hBD - 2 5 ' flanking 부위는 IL - 1α를 처치할 경우 luciferase의 발현을 평균 7.60±1.45(평균±표준편차)배 증가시킨 반면, 1.1 kbp와 0.5 kbp 크기의 hBD - 2 5 ' flanking 부위는

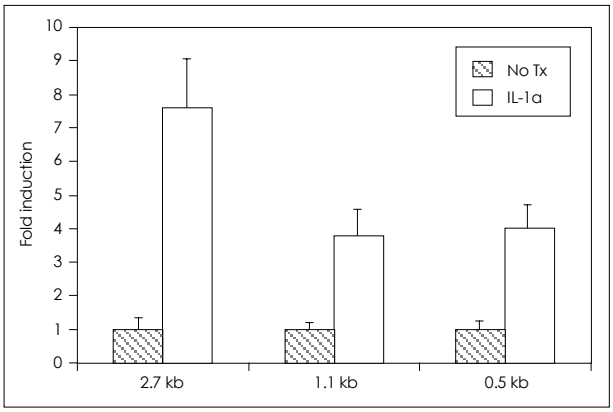

Fig. 3. The comparison of the promoter activities in those 2.7 kbp, 1.1 kbp and 500 bp sized 5' flanking regions of human β defensin-2 (hBD-2). The treatment of IL-1α up-regulates the activity of promoter 7.60±1.45 (average±standard deviation) folded in 2.7 kpb sized 5' flanking region, 3.81±0.78 folded in 1.1 kbp, and 4.00±0.73 folded in 500 bp, respectively. These results indicate there are two effective gene regulatory regions between 2.7 kbp and 1.1 kbp, and 500 bp upstream of the translation starting point of hBD-2.

각각 3.81±0.78 및 4.00±0.73배 증가시켜 hBD - 2 5 ' flanking의 크기 별로 유전자 조절 활성도를 비교할 수 있었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 hBD - 2의 translation 시작부위보다 상위 2.7 kbp와 1.1 kbp 사이 및 상위 0.5 kbp 이내 두 곳에 중요한 유전자 조절 부위가 존재함을 의미하였다.

고 찰

급성 중이염은 이관을 통하여 병원균이 역류하여 중이강에 침입한 후 숙주의 방어막을 극복하고 증식할 때 발생한다. 중이강은 상대적으로 면역세포가 적게 분포하기 때문에 병원균의 침입 초기에는 적응면역계 보다 자연면역계가 중요한 역할을 한다.[3] 자연 면역계(innate immunity)에는 점막과 같은 물리적 방어막과 대식세포와 같은 세포 및 보체나 defensin처럼 직접 세균을 공격하는 단백질로 구성되어 있다. defensin은 대표적 항균 단백질의 하나로서 강한 양전위를 갖는 10 kDa 이하의 작은 펩타이드로 특유의 양전위로 인하여 병원균 세포막의 투과성을 증가시킴으로써 항균 작용을 하며 단백질 구조의 차이에 의해 alpha와 beta defensin으로 구분된다. 알파 디펜신은 호중구와 소장의 paneth 세포에서, β defensin은 피부나 호흡기관의 상피세포에서 분비된다. 이비인후과 영역에서는 고막과 외이도,[10] 중이,[8] 비점막[9)11)12)] 등의 상피세포에서 defensin의 발현이 보고되었다. 특히 β defensin - 2는 β defensin - 1보다 수십 배 강력하며 그람 음성균에 보다 선택적으로

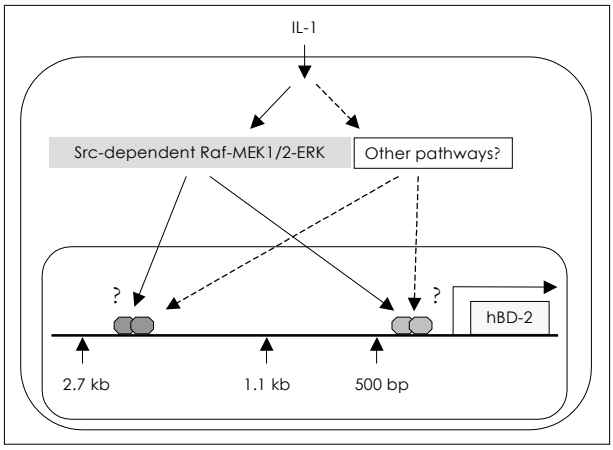

Fig. 4. The schematic diagram showing possible enhancers and signal pathways involved in hBD-2 up-regulation by IL-1α.

작용한다.[13] 또한 β defensin-1은 염증성 자극에 별 영향을 받지 않고 일정하게 발현되는 반면, β defensin-2는 평소에 최소량이 분비되다가 염증성 자극에 의하여 발현이 크게 증가하여 효과적으로 병원균의 침입에 대처할 수 있다.[14-16] 즉, defensin을 생성하는 세포의 세포막에는 병원균 특유의 물질(pathogen associated molecular pattern)을 인식하는 수용체(pathogen pattern recognition receptor)가 존재하기 때문에 병원균이 수용체에 결합하면 그 하위의 신호전달시스템이 활성화되어 defensin 유전자의 발현을 증가시킨다.[17] 본 연구를 통하여 인체 중이점막 상피세포에서 IL-1α에 의한 β defensin-2의 발현증가에 관여하는 유전자 조절부위가 두 곳에 존재하며 그 중 한 부위는 translation 시작부위의 상위 2.7 kbp와 1.1 kbp 사이에 위치하며 다른 한 부위는 translation 시작부위의 상위 0.5 kbp 이내에 위치하는 것을 알 수 있었다. 상위 0.5 kbp 이내에 위치한 유전자 조절 부위는 기존의 연구와 유사한 결과이다.[18] Translation 시작부위 상위 324 bp와 294 bp 사이에 bovine β defensin(TAP : tracheal antimicrobial peptide)의 유전자 조절부위가 위치하며 이 부위에 nuclear factor interleukin-6(NF-IL6) 전사인자가 결합하는 염기서열이 존재하며 이 부위를 제거할 경우 lipopolysaccharide에 의한 β defensin의 발현증가 현상이 사라진다. 인체 β defensin-2 유전자의 경우 TAP 유전자 보다 70 bp 하위(downstream)에 NF-IL6 결합부위가 동일하게 존재하기 때문에 TAP 유전자의 경우처럼 유전자 조절기전에 기여할 것으로 생각된다.

현재까지 인체 중이점막 상피세포주에서 IL-1α에 의하여 β defensin-2의 발현에 대한 연구로는 O'Neil 등은 유전자 조절 인자 중 NF-Kb가 관여함을 보고하였고,[6] Tsutsumi-Ishii 등은 translation 상위 500 bp이내에 조절 부위가 존재함을 보고하였다.[7] 이 부위 이외에 상위 1.1 kbp 이상 멀리 떨어진 부위에 강력한 유전자 조절부위가 존재한다는 것은 흥미로운 결과이다. IL-1α가 세포의 수용체에 결합하면 src-dependent Raf-MEK1/2-ERK 신호전달경로 단독으로 혹은 다른 신호전달경로와 함께 translation 시작부위의 상위 2.7 kbp와 1.1 kbp 사이 및 상위 500 bp에 존재하는 유전자 조절부위를 각각 또는 동시에 활성화시켜 β defensin-2의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다(Fig. 4). 향후 src-dependent Raf-MEK1/2-ERK 신호전달경로와 연계된 전사인자의 규명과 전사인자가 결합되는 염기서열의 동정을 통하여 defensin의 생성을 촉진하여 감염성 질환을 치료하는 약제개발의 기초를 마련할 수 있을 것으로 기대한다.

결 론

인체 중이점막 상피세포에서 IL-1α에 의한 인체 β defensin-2(hBD-2)의 발현증가에 관여하는 유전자 조절부위가 5' flanking 부위에 두 곳이 존재하는 것을 알 수 있었다. 향후 보다 세밀한 분석을 통하여 정확한 유전자 조절 부위의 규명과 유전자 결합 단백질의 동정을 통하여 hBD-2의 합성을 증가시키는 약제 개발과 나아가 감염성 질환 치료법의 새로운 방법을 고안할 수 있을 것으로 기대한다.

중심 단어 : Defensin · 유전자 발현 조절 · Interleukin-1 · 중이 · 면역.

본 연구는 2003년도 지역대학우수과학자 지원연구비(R05-2003-000-11147-0)에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Teele DW, Klein JO, Rosner B. *Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: A prospective, cohort study. J Infect Dis 1989;160:83-94.*
2) Berman S. *Otitis media in children. N Engl J Med 1995;332:1560-5.*
3) Lim DJ, Chun YM, Lee HY, Moon SK, Chang KH, Li JD, *et al. Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media - a review. Vaccine 2000;19:S17-25.*
4) Medzhitov R, Janeway CA Jr. *Innate immunity. N Engl J Med 2000; 343:338-44.*
5) Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, *et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;22:714-21.*
6) O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann LL, Ganz T, *et al. Expression and regulation of the human β-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J Immunol 1999;163:*

6718-24.

7) Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. *Modulation of human β-defensins-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. J Immunol 2003;170:4226-36.*
8) Moon SK, Lee HY, Li JD, Nagura M, Kang SH, Chun YM, *et al. Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1alpha-induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. Biochim Biophys Acta 2002;1590:41-51.*
9) Chun YM, Moon SK, Lee HY, Webster P, Brackmann DE, Rhim JS, *et al. Immortalization of normal adult human middle ear epithelial cells using a retrovirus containing the E6/E7 genes of human papillomavirus type 16 Ann Otol Rhinol Laryngol 2002;111:507-17.*
10) Boe R, Silvola J, Yang J, Moens U, McCray PB Jr, Stenfors LE, *et al. Human beta-defensin-1 mRNA is transcribed in tympanic membrane and adjacent auditory canal epithelium. Infect Immun 1999;67:4843-6.*
11) Lee SH, Kim JE, Lim HH, Lee HM, Choi JO. *Antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. Ann Otol Rhinol Laryngol 2002;111:135-41.*
12) Kim JE, Jeong JY, Kim JJ, Yoo CK, Lee HM, Lee SH. *Expression of antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. Korean J Otolaryngol 2000;43:1202-7.*
13) Schroder JM, Harder J. *Human beta-defensin-2. Int J Biochem Cell Biol 1999;31:645-51.*
14) O'Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, *et al. Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1. Infect Immun 2000;68:5412-5.*
15) Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. *Inducible expression of human beta-defensin 2 by Fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: Multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. Infect Immun 2000;68:2907-15.*
16) Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. *CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. J Biol Chem 2000;275:29731-6.*
17) Janeway CA Jr, Medzhitov R. *Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002;20:197-216.*
18) Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL. *Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. Infect Immun 2000;68:113-9.*