인체 중이상피세포주에서 점막상피세포 특성의 보존

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1]
Gonda Department of Cell & Molecular Biology, House Ear Institute[2]
문성균[1] · 이진석[1] · 정연훈[1] · 박기현[1] · David J. Lim[2]

Conservation of Mucous Epithelial Characteristics in the Human Middle Ear Epithelial Cell Line

Sung-Kyun Moon, MD[1], Jinseok Lee, MD[1], Yun-Hoon Choung, MD[1], Keehyun Park, MD[1] and David J. Lim[2]

[1]Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea; and
[2]Gonda Department of Cell & Molecular Biology, House Ear Institute, LA, USA

ABSTRACT

Background and Objectives : The stable cell line system of middle ear epithelial cells is essential for studying molecular pathogenesis of otitis media. Recently, we succeeded in establishing the human middle ear epithelial cell line (HMEEC) using a retrovirus. The cell line retains many of the phenotypic and morphological properties of the non-transformed, parental cultures such as the expression of cytokeratin and tight junctions. We aimed to show the conservation of mucosal characteristics and subcellular mechanisms of transcriptional regulation in this cell line. **Materials and Method** : RT-PCR was performed using mucin gene specific primers and total RNA extracted from HMEEC. The luciferase-expressing vector containing 5' flanking region of human beta defensin 2 (hBD-2), an inducible antimicrobial peptide, was transfected to HMEEC. After starvation of serum, HMEEC was treated with interleukin 1 alpha (IL-1 α) and subsequently harvested 10 hrs later. Luciferase activity was measured using luminometer after the corresponding substrate was supplemented to the cell lysate. **Results** : Expression of mucin genes (MUC1, 2 and 5B) in HMEEC was demonstrated by RT-PCR. Luciferase assay showed that IL-1 α up-regulates the promoter activity of hBD-2 more than 10 fold. This transcriptional regulatory mechanism was also demonstrated in the well-established reference cell lines, HeLa cells and A549 cells. **Conclusion** : We demonstrated the conservation of mucin gene expression and transcriptional regulatory mechanism of hBD-2 in HMEEC. The proposed cell line can serve as a useful experimental model for elucidating the pathogenesis of middle ear mucosa-related diseases. **(Korean J Otolaryngol 2004;47:299-303)**

KEY WORDS : Defensins · Middle ear · Cell line.

서 론

중이염의 분자생물학적 병인 연구에는 중이점막 상피세포에서 기원한 안정된 세포주가 필수적이다. 인체의 중이점막 조직을 충분하게 얻는 것이 어렵기 때문에 현재까지는 실험 동물에서만 세포주가 개발되어 연구에 이용되고 있다.[1-3] 저자들은 무혈장배양액으로 일차 배양된 인체 중이점막 상피세포에서 점액 유전자가 발현되는 것을 보고하였으며,[4] 최근에 human papilloma virus type 16의 E6/E7 유전자를 가지고 있는 retrovirus를 이용하여 인체 중이점막 상피세포(HMEEC-1)를 불사화(immortalization) 하는데 성공하였다.[5] 또한, HMEEC-1에서 cytokeratin이나 tight junction이 발현되는 것을 확인하여 상피세포의 형태학적 특성이 유지되어 있는 것을 확인할 수 있었다. HMEEC-1가 중이염의 분자생물학적 병인을 설명할 수 있는 실험모델으로 이용되려면, mucin 발현과 같은 점막상피세포의 특성이나 유전자 발현 조절기전과 같은 세포 내 기능이 바이러스 유전자에 의하여 파괴되지 않고 보존되어 있는 것에 대한 실험적 증거가 필요하다.

Mucin은 호흡기와 소화기관의 표면을 덮고 있는 점막의 주요 구성 요소인 고분자 당 단백질이다. 중이점막에서 몇

논문접수일 : 2003년 9월 21일 / 심사완료일 : 2003년 11월 17일
교신저자 : 문성균, 442-721 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (031) 219-5265 · 전송 : (031) 219-5264
E-mail : smoon@ajou.ac.kr

가지의 mucin 유전자가 발현되는 것으로 알려져 있으며, 발현된 mucin은 중이삼출액의 점성과 관계가 있다.[6-9] 한편, β-defensin은 상피세포에서 분비되는 선천적 면역 물질로서[12)13)] 병원균의 세포막 투과성을 증가시켜 항균 작용을 하며, 후천적 면역계가 활성화되기 전 초기단계에 병원체로부터 중이점막을 보호하는데 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.[12)13)] 상피세포는 세포막의 수용체로 병원체를 인식하여 세포질 내 일련의 신호전달과정과 유전자 조절기전을 통하여 이러한 β-defensin의 발현을 증가시킨다.[14)15)]

이 연구의 목적은 HMEEC-1이 중이염의 분자생물학적 병인 모델로서 적합한지에 대한 실험적 증거를 마련하는데 있다. 즉, HMEEC-1에서 점막의 특성인 mucin 발현이 보존되어 있으며 β-defensin의 유전자 발현에 관여하는 세포 내 기능이 보존되어 있는지를 확인하고, 다른 안정된 세포주와 비교하고자 한다.

재료 및 방법

Cell culture

Human papilloma virus type 16의 E6/E7 유전자를 가지고 있는 retrovirus를 이용하여 불사화된 인체 중이점막 상피세포주(HMEEC-1)[5]를 다음과 같은 무혈장배양액으로 배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)과 Bronchial epithelial basal medium(Clonetics, Walkersville, MD, USA)를 1 : 1로 혼합하고 bovine pituitary extract(52 μg/ml), hydrocortisone(0.5 μg/ml), hEGF (0.5 ng/ml), epinephrine(0.5 μg/ml), transferring(10 μg/ml), insulin(5 μg/ml), triodothyronine(6.5 μg/ml), retinoic acid(0.1 μg/ml), gentamycin(50 μg/ml), amphotericin-B(50 μg/ml)를 첨가시켰다.

대조 세포주로 HeLa 세포주(인체 자궁경부암 세포주)와 A549 세포주(인체 폐암 세포주)를 이용하였다. HeLa cell은 5% fetal calf serum를 첨가한 DMEM으로 배양하였으며, 배양기 내 온도는 37℃, 대기 내 CO_2농도는 5%가 되도록 유지하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

인체 중이 점막과 HMEEC-1에서 total RNA를 추출하고 spectrophotography로 정량하였다. 추출된 1 μg의 total RNA를 random primer와 reverse transcriptase (Superscript II™, Life Technology)를 사용해서 cDNA로 전환하였고, cDNA를 Taq DNA polymerase(Qiagen, Valencia, CA, USA)와 specific primer(Table 1)를 사용하여 유전자의 특정부위를 증폭하였다. Human lung total RNA(Clontech Laboratories, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군을 위해 reverse transcriptase를 처리하지 않았다. PCR 시행 후 결과물을 50 ng/ml ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 전기영동하여 자외선 하에서 관찰하였다. hBD-2 유

Table 1. Specific primer sequences and amplification conditions

Gene (Accession no.)	Sequences	Product size (bp)	Annealing temperature (℃)	Cycle
*MUC*1 (M35093)	5'-CTCCTTTCTTCCTGCTGCTG 3'-CAGCTGAACCTGAAGCTGGT	256	58	35
*MUC*2 (L21998)	5'-TGCCTGGCCCTGTCTTG 3'-CAGCTCCAGCATGAGTGC	440	58	35
*MUC*5B (U95031)	5'-ATGAAACCTGGGTCAACAGC 3'-GGGCCTCTGCTGAGTACTTG	282	58	35
β2 *Microgloblin* (V00567)	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG 3'-GCTTACATGTCTCGATCCCACTTAA	355	56	28
hBD-2* (AH068861)	5'-ATTCCTGATGCCTCTTCCAG 3'-ACACCAGAGGGACCTTGTT	137	56	28
β-*actin* (AH009377)	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG 3'-CGTGAGAAGGTCGGAAGGAA	285	55	27
5' flanking region of *hBD*-2 (AF071216)	Forward primer with *Kpn*I tail 5'- GAGGTACCTCCATCCTTTACTGTGATGATGCC Reverse primer with *Hind*III tail 3'-ACCACTTCGAGGGTCGGTAGTCGGTTTCGAAAG	2642	68	30

*hBD : human β defensin

전자의 발현이 염증물질에 의하여 증가하는 것을 측정하기 위해 각 세포주(HMEEC-1, HeLa, A549)에 IL-1α (10 ng/ml, Sigma)를 처리하고 3시간 후에 total RNA를 추출하고 같은 방법으로 RT-PCR을 시행하였다.

Cloning and sequencing of the 5 ' flanking region of human beta defensin 2 gene

인체 β-defensin 2 gene(hBD-2) 유전자의 5 'flanking 부위(2,627 bp from -2,625 to +1)를 분리하고 그 양쪽 끝에 specific primer를 이용한 PCR tailing법으로 *Hind* III와 *Kpn* I의 제한효소 작용부위를 첨가하였다(Table 1). PCR 산물을 제한 효소와 ligase 반응을 통하여 pGL3 luciferase reporter plasmid(Promega, Madison, WI, USA)의 multiple cloning sites에 삽입하였다(Fig. 1). Chimeric construct를 염기서열분석으로 확인하였다.

Transfection and luciferase assay

Cationic lipoid(LT1, PanVera, Madison, WI, USA)를 이용하여 hBD-2의 5 'flanking region이 삽입된 luciferase 발현 construct를 HMEEC-1, HeLa, A549 세포에 각각 transfection시켰다. Transfection된 세포는 20시간 동안 기초 배양액으로 starvation시키고 IL-1α(10 ng/ml)를 처리하였다. IL-1α 처리 10시간 후에 채취된 세포 용해물에 luciferase substrate(Promega)를 처리한 후 luminomitor(Pharmingen, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 luciferase의 활성을 측정하였다. hBD-2의 promoter 활성을 negative control(null promoter)과 positive control (SV40 promoter)를 이용하여 비교하였으며 HMEEC-1 내의 hBD-2의 발현조절(transcriptional regulation)은 대조 세포주(A549, HeLa)와 비교하였다.

결 과

Expression of MUC genes

RT-PCR로 측정된 MUC 유전자의 발현에서 MUC1, MUC2, MUC5B 유전자가 인체 중이 점막과 같이 HMEEC-1에서도 발현되었다(Fig. 2). 인체 중이 점막과 HMEEC-1의 MUC1 유전자의 발현은 인체 폐 조직과 유사하였으나, MUC2 유전자와 MUC5B 유전자의 발현은 인체 폐 조직보다 감소된 양상을 보였다. HMEEC-1은 점막상피세포의 특성을 갖는 MUC1, MUC2, MUC5B 유전자를 발현하는 것으로 나타났다.

Expression of β-defensins and effect of IL-1α treatment

인체 중이 점막과 HMEEC-1에서 β-defensin 2(hBD-2) 유전자에 대한 RT-PCR 결과, hBD-2의 발현은 IL-1α의 처치로 증가되는 양상을 보였다. 대조 세포주인 A549와 HeLa 세포에서도 hBD-2가 IL-1α의 처치로 발현이 증가되는 양상을 보였다(Fig. 3).

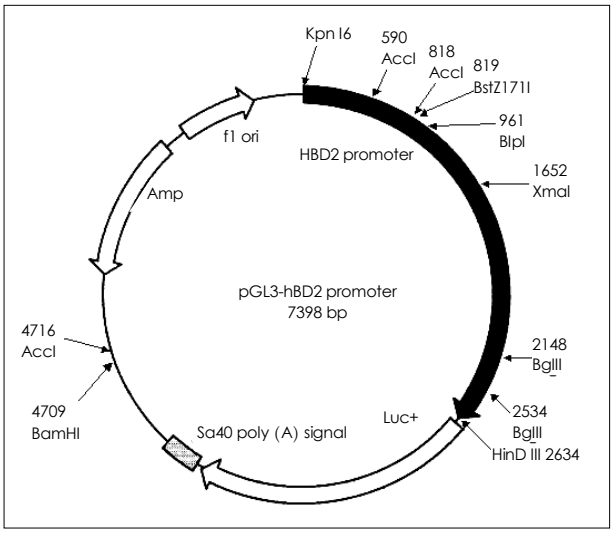

Fig. 1. The vector map shows the luciferase-expressing construct containing the *hBD*-2 gene regulatory region. 5' flanking region (2,627 bp) of *hBD*-2 was isolated by PCR amplification. The PCR product was subcloned into the multiple clining site of promoterless vector expressing luciferase using restriction enzymes (*Kpn* I and *Hind* III) and ligase.

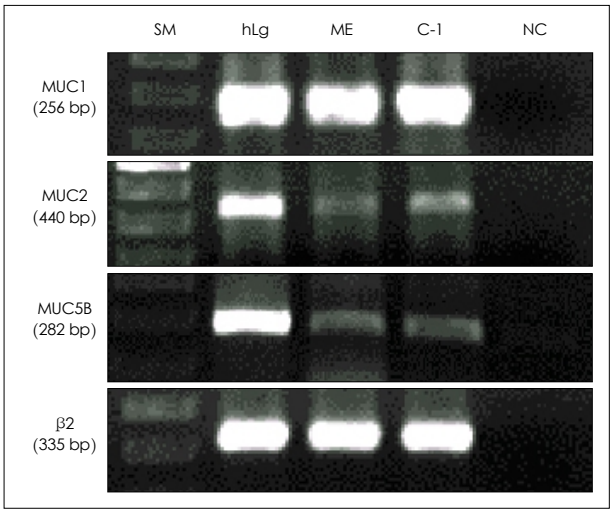

Fig. 2. The expression of mucin genes. RT-PCR was performed with the total RNA extracted from human middle ear mucosa and HMEEC-1 using specific primers to MUC genes. The expression of *MUC1*, *MUC2*, and *MUC5B* genes is noted in both human middle ear mucosa and HMEEC-1 with the similar pattern. SM : size Marker, hLg : human Lung tissue, ME : middle Ear Mucosa, C-1 : HMEEC-1, NC : negative control.

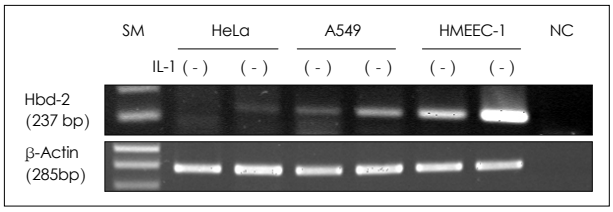

Fig. 3. Up-regulation of *hBD-2* gene expression by IL-1α. HMEEC-1, HeLa cells and A549 cells were treated with IL-1α after 24 hours starvation and harvested 3 hours later. Total RNA was extracted and converted to cDNA with random primers and reverse transcriptase. Segments of hBD-2 genes were amplified with *Taq* DNA polymerase specific primers. The expression of hBD-2 is up-regulated by the treatment of IL-1α.

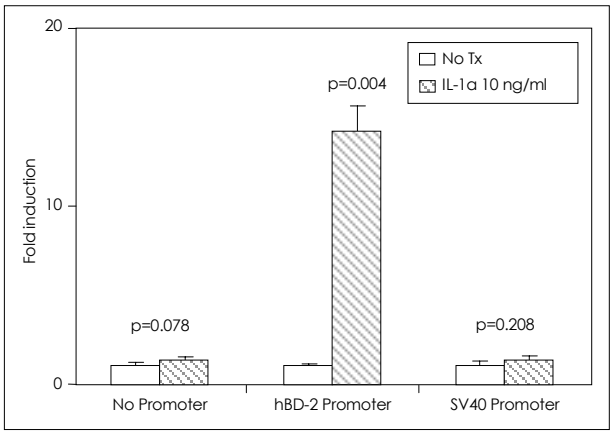

Fig. 4. The comparison of IL-1α effect on the promoter activity. The promoter construct was transfected to HMEEC-1. After starvation, IL-1α was treated and promoter activity was analyzed by luciferase assay. Null promoter and SV40 promoter, a positive control, show no activity change after IL-1α treatment. In contrast, the promoter activity of 5' flanking region of hBD-2 is up-regulated by IL-1α more than 10 times.

Transcriptional regulation of hBD-2 by IL-1α

Luciferase assay로 subcloning된 hBD-2의 5 'flanking region의 promoter 활성을 null promoter와 SV40 promoter와 비교한 결과, null promoter와 SV40 promoter는 IL-1α 처리 후 의미 있는 활성의 변화가 나타나지 않았다(p>0.05). 반면, hBD-2 5 'flanking region의 promoter 활성은 IL-1α에 의해 14.1±1.5배(p=0.004) 이상 증가를 나타내었다(Fig. 4). 대조 세포주의 경우에는 IL-1α 처리 후 HMEEC-1에서 9.6±1.1배(p=0.005), A549에서 58.2±10.2배(p=0.001), HeLa에서 18.5±7.9배(p=0.019)의 hBD-2 유전자 promoter 활성의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

분자생물학적 연구에 있어서, primary cell의 특성을 보존하고 있는 안정된 세포주의 개발은 필수적이다. 저자들은

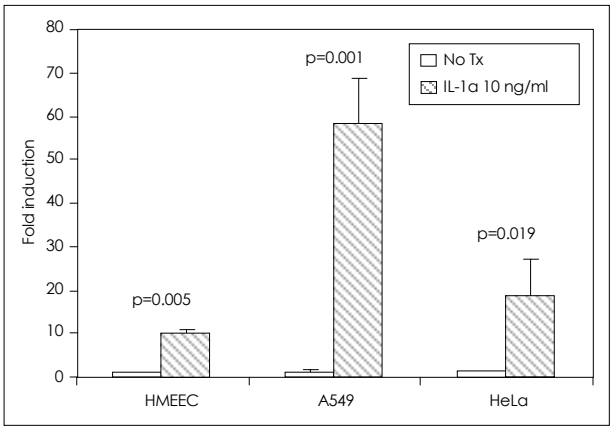

Fig. 5. The comparison of IL-1α effect on the promoter ancivity of hBD-2 in the different cell lines. IL-1α treatment induces the promoter activity of 5' flanking region of hBD-2 in HMEEC-1. This transcriptional regulatory mechanism is observed in the reference cell lines, A549 and HeLa cells.

무혈청배양을 사용한 인체 중이 점막 상피세포의 primary culture와 HPV 16의 oncoprotein인 E6와 E7을 발현하는 replication-defective retrovirus로 인체 중이점막 상피세포를 불사화한 것을 보고한 바 있다.[4)5)] HMEEC-1은 viral transfection에 의한 hypodiploid와 3, 9, 13, 15, 18 염색체 이상소견이 발견되었으나 상피세포의 구조 및 세포학적 특성이 보존되어 있었다. 저자들은 이번 연구에서 점액 유전자의 발현과 같은 점막세포의 특성과 β-defensin의 조절과 같은 세포 내 조절 기전이 보존되어 있는것을 확인할 수 있었다.

고분자량의 당단백인 점액은 중이점막은 물론 호흡기와 소화기의 점액섬모계의 주요 구성요소이다. 저자들은 HMEEC-1에서 MUC1, MUC2, MUC5B 등의 점액 유전자가 발현하는 것을 확인하였다. 아직까지 중이점막에 특징적인 점액은 밝혀지지 않았지만 쥐의 중이에서 MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC의 발현과 인체 중이에서 MUC5AC와 MUC5B가 발현되는 것이 알려져 있다.[4)7-9)] 또한, MUC5B와 MUC4 점액은 인체 중이의 점액섬모계에서 중요한 역할을 하며 특히, 중이강에서 중이 점막을 보존하고 방어하는 등 항상성에 기여하는 것으로 알려져 있다.[9)]

상피세포에서 분비되는 β-defensin은 독특한 cationic peptide 구조를 이용하여 병원균 세포막을 파괴하는 것으로 알려져 있다.[10)] Defensin은 disulfide bond의 위치에 따라 α와 β defensin subfamily로 구분된다. α-defensin은 호중구와 소장의 Paneth 세포에 의해 생성되며,[16)] β-defensin은 피부, 신장 및 기관의 상피세포에서 주로 분비되는 것으로 알려져 있다.[19)] β-defensin 1(BD-1)은 세균이나 proinflammatory cytokine과 같은 염증 자극에 의해

서 분비되지 않고 일정하게 발현되나 β - defensin 2(BD - 2)는 염증자극에 의해서 발현이 크게 증가된다.[18] 이과영역에서는 인체의 고막과 외이도 상피에서 BD - 1이 발현되는 것이 알려져 있고,[19] 중이진주종에서 BD - 2의 발현이 증가되어 있는 것이 보고되었다.[20]

이번 연구에서 HMEEC - 1에서 hBD - 2는 IL - 1α에 의해서 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, hBD - 2의 발현증가는 대조 세포주인 A549와 HeLa 세포주에서도 관찰되었다. 이러한 발현증가는 세포막의 수용체, 세포질의 신호전달 체계 및 핵 내 유전자 조절 물질과 같은 세포 내 요소가 필요한 transcriptional regulation으로서 HMEEC - 1에서 IL - 1α에 의한 hBD - 2의 발현증가에 관여하는 세포 내 요소들이 바이러스 감염에 영향을 받지 않고 보존되어 있는 것으로 추정된다.

이번 연구에서 HMEEC - 1에서 MUC 유전자의 발현과 hBD - 2의 유전자 조절기능이 보존된다는 것을 알 수 있었다. 앞으로 HMEEC - 1가 인체 중이점막 상피세포의 특성을 보존하고 있는 것에 대한 추가적인 연구가 필요하며, 이러한 실험적 증거가 충분히 확보되면 향후 이 세포주가 중이점막 질환의 병인을 설명할 수 있는 실험모델로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

중심 단어 : 중이점막 · 세포주 · Defensins.

본 연구에 사용된 통계는 SPSS for windows(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)의 independent samples T test를 사용하였습니다.

본 연구는 한국학술진흥재단 2002년도 신진교수연구과제 연구사업(KRF - 2002 - 003 - E00109)의 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

1) Herman P, Cassigena R, Friedlander G, Soler P, Grodet A, Tran Ba Huy P, *et al. Middle ear cell line that maintains vectorial electrolyte transport. J Cell Physiol 1993;154:615-22.*
2) Jin S, Gu XX, Rhim JS, Lim DJ. *Immortalization of chinchilla middle ear epithelial cells by adenovirus 12-simian virus 40 hybrid virus. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999;108:934-43.*
3) Ueyama S, Jin S, Rhim JS, Ueyama T, Lim DJ. *Immortalization of rat middle ear epithelial cells by adeno 12-SV40 hybrid virus. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001;110:132-41.*
4) Moon SK, Lim DJ, Lee HK, Kim HN, Yoo JH. *Mucin gene expression in cultured human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol 2000;120:933-9.*
5) 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.*
6) Carrie S, Hutton DA, Birchall JP, Green GG, Pearson JP. *Otitis media with effusion: Components which contribute to the viscous properties. Acta Otolaryngol 1992;112:504-11.*
7) Hutton DA, Fogg FJ, Kubba H, Birchall JP, Pearson JP. *Heterogeneity in the protein cores of mucins isolated from human middle ear effusions: Evidence for expression of different mucin gene products. Glycoconj J 1998;15:283-91.*
8) Chen YP, Tong HH, James, Demaria TF. *Detection of mucin gene expression in normal rat middle ear mucosa by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Acta Otolaryngol 2001;121:45-51.*
9) Lin J, Tsuprun V, Kawano H, Paparella MM, Zhang Z, Anway R, *et al. Characterization of mucins in human middle ear and Eustachian tube. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;280:L1157-67.*
10) Ganz T, Lehrer RI. *Defensins. Pharmacol Ther 1995;66:191-205.*
11) Lehrer RI, Ganz T. *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr Opin Immunol 1999;11:23-7.*
12) Lim DJ, DeMaria TF. *Immunobarriers of the tubotympanum. Acta Otolaryngol 1987;103:355-62.*
13) 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 Suppl 1:S17-25.*
14) Aderem A, Ulevitch RJ. *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature 2000;406:782-7.*
15) Medzhitov R, Janeway C Jr. *Innate immunity. N Engl J Med 2000;343:338-44.*
16) Jones DE, Bevins CL. *Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. J Biol Chem 1992;267:23216-25.*
17) Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T. *A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. Gene 1999;233:205-11.*
18) Moon SK, Lim DJ. *Expression of β defensins in the human middle ear mucosa. Korean J Otolaryngol. In press.*
19) 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.*
20) Park K, Moon SK, Choung YH, Choi HS. *Expression of b-defensins in human middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol 2003;123:236-40.*