

하이퍼로사이드가 기도 상피세포에서의 뮤신 유전자 발현 및 생성과 EGFR-p44/42-Sp1 신호전달 경로에 미치는 영향

이 현 재*

삼육대학교 스미스 학부대학 및 대학원 중독과학과

Effect of Hyperoside on the Gene Expression and Production of Mucin and EGFR-p44/42-Sp1 signaling Pathway in Airway Epithelial Cells

Hyun Jae Lee*

Smith Liberal Arts College and Department of Addiction Science

(Received December 29, 2021; Revised April 22, 2022; Accepted April 28, 2022)

Abstract Hyperoside is an anti-inflammatory natural product derived from a medicinal plant *Houttuynia cordata*, empirically used as remedies for controlling the pulmonary inflammatory diseases in folk medicine. In this study, hyperoside was investigated for its potential effect on the gene expression and production of airway mucin 5AC (MUC5AC). Human airway epithelial NCI-H292 cells were pretreated with hyperoside for 30 min and stimulated with epidermal growth factor (EGF) for the following 24 h. For the elucidation of the action mechanism of hyperoside, EGF-induced epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway was investigated. Hyperoside inhibited EGF-induced gene expression and production of MUC5AC mucin through regulating the phosphorylation of EGFR, phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (p44/42), and the nuclear expression of specificity protein-1 (Sp1). These results suggest hyperoside could regulate the gene expression and production of MUC5AC by modulating the EGFR signaling pathway in human airway epithelial cells.

Keywords Airway, MUC5AC mucin, Hyperoside

서 론(Introduction)

인체의 호흡기에 존재하는 점액(mucus)은 거대분자인 뮤신(mucin)과 박리된 상피세포들, 혈청 단백질 삼출물, 산화성 물질, 항산화성 물질, 내인성 항균물질, 세균, 수분, 단백질, 지질, 염류, 효소, 핵산, 히스타민 등의 혼합물로 이루어져 있다. 호흡기에 존재하는 이 점액은 점액성 섬모의 운반 및 청소(mucociliary clearance) 작용을 통하여 들숨(inhalation)으로 인체에 들어오는 병원성 미생물, 독성 화학물질, 유해 입자에 대항하는 중요한 방어층 역할을 수행한다. 뮤신은 호흡기 점액에 함유된 점액성 당단백질로서 점막하선 및 상피층의 배상세포에서 생성되며 점액 고유의 물리화학적 성질인 점탄성(viscoelasticity)을 나타내게 하는 주요한 생화학적 구성 요소로 알려져 있다.^{1,2)}

잘 알려진 바와 같이, 생리적 상태에서는 뮤신이 점탄성을 통하여 인체를 방어하는 역할을 수행하지만 천식, 만성 기관지염, 기관지 확장증, 폐기종, 낭포성 섬유증 등의 만성 호흡기 질환에서 관찰되는 뮤신의 양과 질의 이상은 병리적 요소로 작용하여 끈끈한 점액의 과다생성 혹은 과다분비로 인한 기관(trachea)의 폐쇄, 기류(air flow)의 진입 저해 등을 통한 호흡기 질환의 악화를 유발할 수 있다.^{3,4)}

이처럼 과다 생성 및 분비된 점액은 호흡기로부터 원활히 제거되어야 하는데, 이를 위해 두 가지 방법이 사용될 수 있다. 첫째, 물리적 방법에 의한 점액의 제거, 즉 점액의 점도를 낮춘 뒤 물리적으로 흡인해 내는 방법이고, 둘째는, 점액 생성 자체를 억제할 수 있는 약물을 투여하는 방법이다. 물리적 방법(흡인)은 기도 내부의 자극을 유발하고, 반사기전에 의해 점액 분비를 오히려 자극하게 된다. 마취 하에서 그런 방법이 시도된다고 해도, 점액의 제거는 feedback mechanism을 통해 점액의 생성과 분비를 더욱더 자극하게 된다.⁵⁾ 따라서, 점액에 점성을 부여하는 주 구성요소인 뮤신의 생성 자체를 조절하거나 혹은 분비를 조절하기 위한 약물학적 접근은 기도질환의 치료에 있어 중요한 전략이 될 수 있다.

#Corresponding author

Dr. Hyun Jae Lee, Department of Health Management and Smith Liberal Arts College, Sahmyook University, 815 Hwarang-ro, Nowon-gu, Seoul 01795, Korea
Tel: +82-10-2506-1297, Fax: +82-2-3399-1876
E-mail: hjy1213@syu.ac.kr

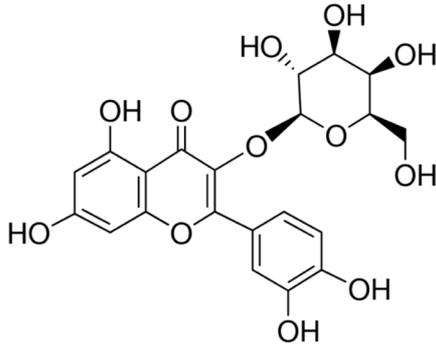


Fig. 1. Chemical structure of hyperoside

이러한 전략에 기반을 두어, 항염증 및 항산화 작용을 나타내는 것으로 알려진 천연물 중에서 염증성 호흡기 질환에서 관찰되는 기도 뮤신의 과다생성 및 분비를 조절할 가능성이 있는 후보약물의 탐색은 유망한 접근 방법 중 하나가 될 수 있을 것이다.

기존 전통의학 문헌과 다수의 선행 연구보고에 의하면, 어성초(*Houttuynia cordata*)는 경험적으로 인체에 발생하는 다양한 염증성 질환의 치료를 위해 사용되어 왔으며, 하이퍼로사이드(Fig. 1)를 포함한 어성초에 함유된 천연물들은 항염증, 항산화, 항암 등 다양한 생리활성을 발현함이 알려져 있다.⁶⁹⁾ 그러나, 현재까지 인간 기도 상피세포에서 상피세포 성장인자에 의한 뮤신 유전자의 발현 및 생성과 그에 관련된 신호전달 경로에 대한 하이퍼로사이드의 약리작용은 검증된 바가 없었다. 따라서, 본 연구에서는 기도 뮤신의 생성과 유전자 발현에 관계된 신호전달 경로의 연구에 가장 흔히 사용되는 NCI-H292 세포에서^{10,12)} EGF로 유발된 뮤신 유전자 발현 및 생성에 대한 하이퍼로사이드의 효과와 하이퍼로사이드가 기도 뮤신 생성 기전 중 주요한 조절성 신호전달 경로의 하나인 EGFR(epidermal growth factor receptor)경로에 어떤 작용을 나타내는지 검증함으로써 효과적인 기도점액 과다생성(분비) 조절 신약의 개발을 위한 기초과학적 정보를 제공하고자 하였다.

방 법(Methods)

세포주 및 시약

NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection사(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor cocktail은 Roche사(Indianapolis, IN, USA)에서, mouse anti-MUC5AC clone 45M1 및 HRP-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate은 NeoMarkers사(Fremont, CA, USA)에서, hyperoside (purity: 97.0 %), trypsin-EDTA, epidermal growth factor (EGF), Tween 20, bovine serum albumin (BSA), HEPES, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide solution (TMB), NP-40, EDTA, EGTA, ethidium bromide, diethylpyrocarbonate (DEPC) 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서, Easy-Blue RNA extraction kit는 INTRON biotechnology사(Kyunggi-do,

Korea)에서, Accuprep RT premix kit는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서, PCR Master Mix는 ABgene사(Rochester, NY, USA)에서, penicillin-G streptomycin, fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640은 GIBCO-BRL사(Grand Island, New York, USA)에서, Anti-specificity protein-1 (Sp1)과 anti-β-actin antibodies는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, Anti-nuclear matrix protein p84(ab-487)antibody는 abcam (Cambridge, MA, USA)에서, Anti-phospho-EGFR (Y1068), anti-EGFR, anti-MEK1/2, anti-phospho-mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK)1/2 (S221), anti-phospho-p38 MAPK (T180/Y182), anti-p38 MAPK, anti-phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204), anti-p44/42 MAPK antibodies는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서, Goat Anti-rabbit IgG 및 Goat Anti-mouse IgG는 Calbiochem (Carlsbad, CA, USA)에서, 기타 제반 시약들은 일급 시약 등급 이상의 것들을 구입하여 사용하였다.

인간 기도상피 세포(NCI-H292) 배양 및 약물 처리

세포는 습도가 충분히 유지되며 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는 37°C 배양기 내에서 HEPES (25 mM), penicillin G (100 U/mL), streptomycin (100 μg/mL), FBS (10%, V/V) 등이 첨가된 RPMI 1640 배양액에서 배양하였는데, 1주에 2회 빈도로 subculture 하였고 배양액은 2일마다 1회씩 교체하여 주었다. 뮤신 생성 및 그 유전자 발현에 대한 약물의 작용을 검증하기 위하여, 뮤신 생성량 검증을 위해서는 24 well culture plate를 기준으로, well당 2.0×10⁴ cells/well의 밀도로, 뮤신 유전자 발현 정도의 검증을 위해서는 6 well culture plate를 기준으로, well당 5.0×10⁴ cells/well의 밀도로 각각 세포를 도포하고 배양하였다. 세포가 각 well의 70-80% 정도를 차지할 정도로 자라면, FBS의 농도를 0.2%로 감소시킨 배양액을 주고 24시간 동안 배양하고, serum을 첨가하지 않은 배양액(serum-free medium)으로 세포를 세척한 후 약물 1, 5, 10, 20 μM을 함유하는 배양액 200 μL (24 well plate 기준)를 well마다 가하였다. 30분이 경과한 후 PMA (10 ng/mL)혹은 EGF (25 ng/mL)을 세포에 투여한 후 37°C에서 추가로 24시간 동안 배양하였다.^{10,12)}

MUC5AC 뮤신 생성량 측정

각 약물의 처리 기간이 종료된 후, 배양세포 내 생성되어 저장되어 있는 뮤신을 정량하기 위하여, 세포 용해용 완충액(20 mM Tris, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail)을 가하여 세포 내에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 추출하였다. 즉시로, 효소연계 면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 뮤신의 생성량을 다음과 같이 측정하였다. 뮤신을 함유하고 있는 배양 상층액 및 수거된 cell lysate를 각각 PBS로 1/10배 희석하고, 희석된 각 sample을 ELISA 전용의 96-well plate에 각각 100 μ씩 분포시킨 후 42°C에서 완전히 건조시켰다. 그 후 PBS-Tween 20

(0.05%, PBS-T)용액 200 μ L/well을 이용, 각 well 당 3회씩 세척하였다. 세척 후 PBS-T에 용해된 2% BSA 용액 200 μ L를 각 well당 가하고 다시 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T 200 μ L로 3회 세척하고 MUC5AC에 대한 monoclonal antibody인 mouse anti-MUC5AC clone 45M1을 2% BSA에 1:200의 비율로 희석한 후에, 각 well당 100 μ L씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. 1시간 후 PBS-T로 3회 세척하고 2차 항체인 Horse radish peroxidase (HRP)-Goat Anti-Mouse IgG Conjugate를 2% BSA에 1:3,000의 비율로 희석한 후, 각 well당 100 μ L씩 첨가하고 1시간 동안 incubation하였다. PBS-T로 다시 3회 세척 후 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine peroxide (TMB)용액 100 μ L를 각 well에 첨가하고 5분 후 1 N H₂SO₄ 50 μ L를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정함으로써 대조군과 약물 처리군에 존재하는 MUC5AC 뮤신을 정량하였다.^{10,12)}

Total RNA의 분리

24시간 동안 약물을 처리한 세포를 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 용기 바닥으로부터 분리하고, 세포들의 혼합물을 1.5 mL 용량의 microtube에 옮겨 원심 분리함으로써 세포들만 수거하였다. 이어서, total RNA를 분리하고자 INTRON biotechnology사의 Easy-Blue RNA extraction kit (total RNA isolation reagent)를 이용해(0.5 mL/4 \times 10⁵ cells) 세포를 lysis 시키고, 상온에서 5분간 방치하였다. 5분 후 즉시, microtube에 chloroform을 첨가, 15초간 vortexing 하고 상온에 2-3분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm (Hanil centrifuge MICRO 17 R, Seoul, Korea)에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 400 μ L를 새 microtube에 옮겼다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 이 침전물에 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 함유된 75% ethanol을 가하고 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리함으로써 세척하였다. 수거된 RNA 침전물을 5분간 대기 중에서 건조시킨 후, 20 μ L의 RNase-free water로 부유시키고, spectrophotometer (Beckman-Coulter, DU-650, Brea, CA, USA)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 RNA의 농도를 측정 후 실험에 사용하였다.¹³⁾

PCR (Polymerase Chain Reaction)을 위한 primer 제조

PCR에 사용된 primer는 전문 제조회사인 Genotec(주)(Daejeon, Korea)에 주문, 합성하였다. NCI-H292 세포에서의 human MUC5AC 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer의 염기서열은 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3', antisense primer의 염기서열은 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'이었다. 정량적 대조 유전자로 사용된 Rig/S15 유전자 primer의 염기서열은 (sense primer) 5'-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C-3' 및 (antisense primer) 5'-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG-3'이었다.

RNA의 역전사 반응 및 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)

수거된 total RNA를 이용, 역전사 반응(Reverse Transcription)으로 cDNA를 만들고, 이를 증합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 즉, 얻어진 total RNA 1 μ g을 75°C에서 5분간 가열함으로써 denaturation 시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 RT premix kit의 사용자 설명서에 따라 역전사 반응을 진행시켰다. MUC5AC 유전자에 대한 PCR은, 각각의 역전사 반응에서 얻은 cDNA 산물 2 μ L를 PCR premix kit의 사용자 설명서에 따라 진행시켰다. 증폭반응을 위하여, PCR을 40회 실시(PCR thermal cycler, Takara MP-300, Japan)하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초간 각각 시행하였다.

전기영동에 의한 증합효소 연쇄반응 산물의 확인

RNA의 역전사 반응 및 증합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물들을 전기영동으로 분리함으로써 MUC5AC 유전자 발현 변동 여부를 관찰하였다. 즉, 증폭된 PCR 산물 10 μ L를 10 \times gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 혼합한 다음, Tris-acetate-EDTA buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)용액 및 1 μ g/mL의 ethidium bromide가 함유된 1.0% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상에서 이동된 각각의 DNA band는 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하고, 사진 촬영하였다.

세포 추출물(whole cell extract)의 준비

150 mm culture dish에 배양하여 70-80% 정도 증식된 NCI-H292 cells에, 37°C에서 15분 또는 24시간 동안 20 μ M의 하이퍼로사이드를 전 처리하고 제시된 시간대 별로 EGF (25 ng/mL)를 처리하였다. 처리가 종료된 후, 세포는 ice-cold PBS로 2회간 세척하고 3 \times trypsin-EDTA solution을 처리한 후 세포만 조심스럽게 긁어모아 3 mL PBS를 함유하는 15 mL 시험관에 옮겨 두었다. 이 세포 현탁액을 3,000 rpm, 4°C (Hanil centrifuge, MICRO 17 R, Seoul, Korea)조건에서 5분간 원심분리한 후, 상등액은 제거하고 침전물(cell pellet)에 RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 30분 동안 처리하였다. 얻어진 세포 추출물을 14,000 rpm, 4°C (Hanil centrifuge, MICRO 17 R, Seoul, Korea) 조건에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 즉시 후속 실험에 사용하거나 -80°C 조건에서 보관하였고, 후속 실험에 사용하기 전에 각 분획 중의 총 단백질량은 Bradford method를 이용하여 측정되었다.

핵 분획과 세포질 분획의 준비

150 mm culture dish에 배양하여 70-80% 정도 증식된 NCI-H292 cells에, 37°C에서 24시간 동안 20 μ M의 하이퍼로사이드를 전 처리하고 제시된 시간대 별로 EGF (25 ng/mL)를 처리하였다. 처리가 종료된 후, 세포는 ice-cold PBS로 2회간 세척하고 3 \times trypsin-EDTA solution을 처리한 후 세포만 조심스럽게 수거하여

3 mL PBS를 함유하는 15 mL 시험관에 옮겨 두었다. 이 세포 현탁액을 1,200 rpm, 4°C (Hanil centrifuge, MICRO 17 R, Seoul, Korea)조건에서 3분간 원심분리한 후, 상등액은 제거하고 침전물(cell pellet)에 PBS를 가하고 부드럽게 피펫팅하여 세포를 재현탁시켰다. 이후 NE-PER® nuclear and cytoplasmic extraction reagent (Thermo-Pierce Scientific, Waltham, MA, USA)를 제조사의 지시에 따라 적용함으로써 세포질 분획과 핵 분획을 분리 수거하였다. 각 분획은 -20°C 조건에서 보관되었고, 다음 단계의 실험에 사용되기 전에 각 분획 중의 총 단백질량은 Bradford method를 이용하여 측정되었다.

EGFR, MEK, MAPK 등의 인산화 단계에 미치는 약물의 영향 검증

EGFR, MEK, MAPK 단백질을 함유하는 세포 추출물(50 µg as protein)을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. Gel 상에서 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 전기적으로 흡착시켰고 0.05% Tween 20을 함유하는 5% skim milk in PBS로 blocking한 후, 각 인산화 단백질들에 대한 primary antibody를 첨가하고 반응을 진행시켰다. 0.05% tween 20을 함유하는 PBS로 세척한 후 horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 첨가하고 반응을 진행시켰다. 결과로 생성되는 immunoreaction band는 enhanced chemiluminescence kit (Pierce ECL western blotting substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 제조사의 설명에 따라 적용함으로써 가시적으로 검출해 내고 대조군, EGF 단독군, 하이퍼로사이드 처리군 별로 상호 비교하여 하이퍼로사이드가 EGFR, MEK, MAPK 단백질의 인산화 단계에 미치는 경시적 영향을 검증하였다.

Sp1의 핵으로의 이동 단계에 미치는 약물의 영향 검증

Sp1 단백질을 함유하는 핵 분획(50 µg as protein)을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. Gel 상에서 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 전기적으로 흡착시켰고 0.05% Tween 20을 함유하는 5% skim milk in PBS로 blocking한 후, primary antibody against Sp1을 첨가하고 반응을 진행시켰다. 0.05% tween 20을 함유하는 PBS로 세척한 후 horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 첨가하고 반응을 진행시켰다. 결과로 생성되는 immunoreaction band는 enhanced chemiluminescence kit (Pierce ECL western blotting substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 제조사의 설명에 따라 적용함으로써 가시적으로 검출해 내고 대조군, EGF 단독군, 하이퍼로사이드 처리군 별로 상호 비교하여 하이퍼로사이드가 Sp1 단백질의 핵으로의 이동 단계에 미치는 경시적 영향을 검증하였다.

통계처리

모든 측정 결과는 Mean±SEM으로 환산한 후, 약물 처리군의

측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 one-way ANOVA 및 post-hoc test 로서 Holm-Sidak test를 이용하였으며 p<0.05인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰(Results and Discussion)

천식 및 만성 폐쇄성 폐질환 등의 각종 염증성 호흡기 질환에서 관찰되는 염증 반응의 조절은, 이러한 질환군의 예후를 양호하게 만들기 위해 필수적인 치료적 접근 방법으로 볼 수 있다. 현재, 강력한 항염증 및 면역억제 작용을 발현하는 당질 코르티코이드(소위 부신피질 호르몬제)가 이러한 호흡기 염증을 조절하기 위해 사용되고 있지만, 당뇨병 및 고혈압, 골다공증 유발 등 현저한 전신 부작용으로 인해 임상적 사용에 제한점이 있기에 효과적이면서도 안전한 신약후보물질의 개발이 절실한 실정이다. 펩티드로 구성된 골격과 탄수화물 분자로 구성된 고분자량의 당단백질(glycoprotein)인 뮤신의 펩티드 골격을 코딩하는 유전자를 ‘MUC’로 약칭한다. 이러한 MUC 유전자는, 현재까지 20여 종이 발견되었는데, 그 중에서 MUC5AC와 MUC5B 유전자의 산물인 MUC5AC와 MUC5B 뮤신이 인간의 호흡기에서 발견되는 겔 형성 뮤신(gel-forming mucin)을 이루고 있다.¹⁴⁾

한편, EGF는 호흡기에서 MUC5AC 유전자를 조절할 수 있는데, 특정한 리간드가 EGF 수용체에 결합하고 이어서 MAPK (mitogen-activated protein kinase)경로가 활성화함에 따라 MUC5AC mRNA의 발현이 증가될 가능성이 선행연구에 의해 제시되어 있다.¹⁵⁾

이러한 선행연구를 참고하여, 본 연구에서는 호흡기 뮤신의 생성 및 유전자 발현 조절과 관련된 연구모델로 가장 보편적으로 사용되는 인간 기도 상피세포인 NCI-H292 세포에 대해, 하이퍼로사이드가 EGF에 의해 유발된 기도 뮤신의 생성(production)과 뮤신의 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 먼저 검증하고자 하였다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼, 하이퍼로사이드는 NCI-H292 세포에서 EGF 로 유발된 MUC5AC 뮤신 당단백질의 생성을 10 µM 및 20 µM의 처리 농도에서 유의하게 억제하였다. 각 처리 농도 별 시료 내 뮤신의 양은 각각 100±10% (control), 258±9% (25 ng/mL of EGF alone), 241±11% (EGF plus hyperoside 1 µM), 231±11% (EGF plus hyperoside 5 µM), 121±7% (EGF plus hyperoside 10 µM) and 94±3% (EGF plus hyperoside 20 µM)이었다(Fig. 2). 동시에, 하이퍼로사이드는 EGF 로 유발된 MUC5AC mucin mRNA의 발현도 억제하는 경향을 보여주었다(Fig. 3). 이러한 결과는 하이퍼로사이드가 기도 상피세포에 직접 작용하여 뮤신 생성과 유전자 발현을 조절할 가능성이 있음을 시사하고 있는 것이다.

앞에서 언급한 바와 같이 EGF는 EGF receptor 신호전달 경로를 경유하여 MUC5AC 뮤신의 유전자 발현 및 생성을 자극하며, 천식 환자의 기도에서 EGF 수용체의 발현량이 증가되어 있음도 보고되어 있다. 인체 내에서 EGF 수용체는 상피세포 기능의 일차적 조절인자로 중요한 역할을 수행하고 있으며, 수용체 자극 인자를 통한 세포 외부신호를 세포 내 신호전달 체계인

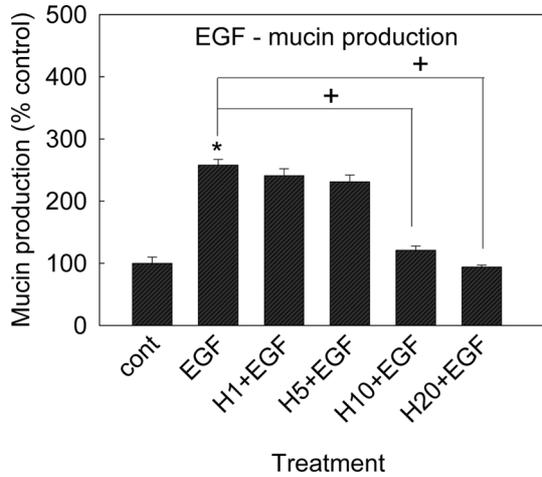


Fig. 2. Effect of hyperoside on EGF-induced MUC5AC mucin production from NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were pretreated with varying concentrations of hyperoside for 30 min and then stimulated with EGF (25 ng/mL), for 24 h. Cell lysates were collected for measurement of MUC5AC mucin production by ELISA. Each bar represents a mean±SEM of 3 culture wells compared to the control set at 100%. Three independent experiments were performed, and the representative data were shown. * Significantly different from control ($p < 0.05$). + Significantly different from EGF alone ($p < 0.05$). cont: control, H: hyperoside, H1: hyperoside 1 μ M, H5: hyperoside 5 μ M, H10: hyperoside 10 μ M, H20: hyperoside 20 μ M, concentration unit is μ M.

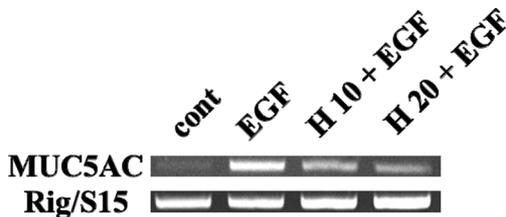


Fig. 3. Effect of hyperoside on EGF-induced MUC5AC mucin gene expression from NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were pretreated with varying concentrations of hyperoside for 30 min and then stimulated with EGF (25 ng/mL), for 24 h. Cell lysates were collected for measurement of MUC5AC gene expression using RT-PCR. Three independent experiments were performed, and the representative data were shown. cont: control, H: hyperoside, H10: hyperoside 10 μ M, H20: hyperoside 20 μ M, concentration unit is μ M.

MEK-MAPK cascade 로 전달하게 된다. 활성화된 MAPK(p44/42(ERK) 등)는 전사인자인 Sp1의 활성화를 유발하고 최종적으로 MUC5AC 유전자 발현이 증가하는 경로를 거치는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

본 연구에서는 이러한 연구정보에 기반을 두고, 하이퍼로사이드의 분자적 작용 기전을 규명하고자 NCI-H292 세포에서 EGF-유발 EGFR 신호전달 경로에 대한 하이퍼로사이드의 영향을 검증하였다. 먼저, Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 하이퍼로사이드 (20 μ M)는 EGF에 의하여 유발된 EGF 수용체의 인산화를 억제함으로써 후속 신호전달의 과정을 억제할 가능성을 나타내었다.

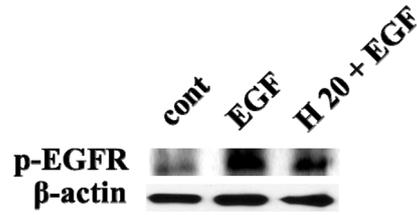


Fig. 4. Effect of hyperoside on the phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR). NCI-H292 cells were pretreated with hyperoside (20 μ M) for 15 min and then stimulated with epidermal growth factor (EGF) (25 ng/mL) for 24 h. Whole cell extract was collected and western blot analysis of the cellular proteins with anti-phospho-EGFR (Tyr1068) antibodies was conducted. Three independent experiments were performed and the representative data were shown. cont: control, H: hyperoside, EGF: EGF receptor, H20: hyperoside 20 μ M, concentration unit is μ M.

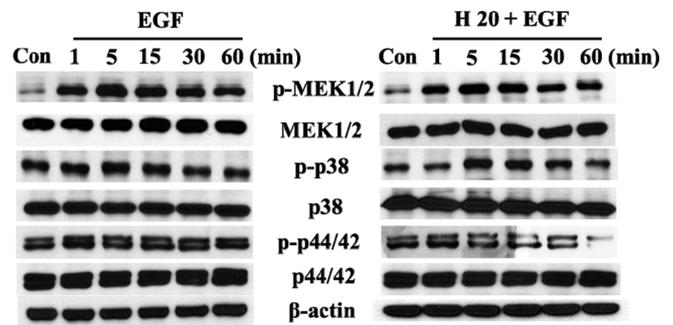


Fig. 5. Effect of hyperoside on the phosphorylation of MEK1/2, p38, and p44/42 in NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were pretreated with hyperoside (20 μ M) for 24 h and then stimulated with epidermal growth factor (EGF) (25 ng/mL) for the indicated periods. Whole cell extract was collected and western blot analysis of the cellular proteins with anti-phospho-MEK 1/2 (Ser221), anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) antibodies was conducted. Three independent experiments were performed and the representative data were shown. cont: control, H: hyperoside, MAPK: mitogen-activated protein kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, MEK: MAP kinase kinase, H20: hyperoside 20 μ M, concentration unit is μ M.

다음으로, Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 EGF에 의해 MEK1/2, p38-MAPK 및 p44/42(ERK-MAPK)의 인산화가 유발되었는데, 하이퍼로사이드는 MEK1/2의 인산화 및 p38-MAPK의 인산화에는 현저한 영향을 나타내지 못하였으나, p44/42의 인산화에는 약물 처리 후 60분 시점에 억제적 영향을 나타내었다. 이어서, Fig. 6에 나타난 바와 같이 EGF는 MUC5AC 유전자 발현을 촉발하는 전사인자인 Sp1의 핵 내로의 이동 및 발현을 자극하였으나, 하이퍼로사이드는 Sp1의 핵 내로의 이동 및 발현을 억제할 가능성을 보여주었다. Fig. 6은, 핵 단백질인 Sp1의 핵 내 존재량을 측정된 결과를 나타내기 때문에, 핵 내에서 항상 일정하게 발현하는 것으로(house-keeping) 이미 잘 알려진 핵 단백질인 p84를 정량한 결과를 첨부하여 Sp1 함량 측정의 적정성을 제시하였다. 이러한 신호전달 경로에서의 각 분자들에 대한 하이퍼로사이드의 작용은 최종적으로 MUC5AC 유전자의 생성을 억

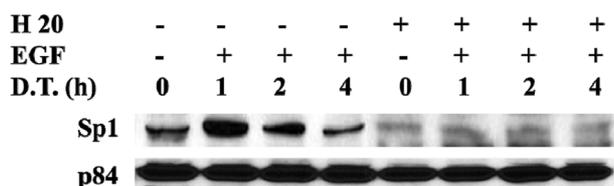


Fig. 6. Effect of hyperoside on the nuclear translocation of Sp1 in NCI-H292 cells. NCI-H292 cells were pretreated with hyperoside (20 μM) for 24 h and then stimulated with epidermal growth factor (EGF) (25 ng/mL) for the indicated periods. Nuclear protein extracts were prepared and subjected to western blot analysis using antibody against Sp1. The result shown is a representative of three independent experiments. As a loading control, p84 levels were analyzed. cont: control, H: hyperoside, H20: hyperoside 20 μM, Sp1: specificity protein-1, D.T.: duration of treatment, concentration unit is μM.

제하는 결과로 이어지는 것으로 판단된다.

이상의 연구결과를 요약하면, 하이퍼로사이드의 기도 뮤신 생성과 유전자 발현에 대한 억제작용은, EGF-EGFR-p44/42 MAPK-Sp1 신호전달 체계에 영향을 미침으로써 나타날 수 있음을 시사한다. 비록 제한점이 있지만 본 연구에서 얻어진 이러한 지견들은, 민간에서 어성초를 다양한 염증성 질환의 조절을 위해 경험적으로 사용해 왔던 기초과학적 근거를 일부 제시하고 있다. 후속 연구를 통하여 하이퍼로사이드를 호흡기 점액의 과다생성 및 분비를 보이는 천식, 만성 기관지염 등 다양한 호흡기 염증성 질환의 진행 과정에서 기도 뮤신의 과다한 생성 및 분비 억제에 초점을 둔, 점액 조절용 신약후보물질로 개발할 가능성을 높여야 할 것으로 판단된다.

결 론(Conclusion)

어성초에 함유된 주요 성분인 하이퍼로사이드는 상피세포 성장인자에 의해 유발된 기도 뮤신의 유전자 발현 및 생성을 억제하는데, EGF-EGFR-p44/42 MAPK-Sp1으로 이어지는 신호전달 체계를 저해함으로써 최종적으로 MUC5AC 뮤신의 생성을 조절할 가능성을 보여주었다.

Conflict of Interest

모든 저자는 이해 상충을 가지고 있지 않음을 선언한다.

References

- Rogers DF, Barnes PJ (2006) Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann Med* 38(2): 116-125.
- Voynow JA, Rubin BK (2009) Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135(2): 505-512.

- Kim KD, Lee HJ, Lim SP, Sikder MA, Lee SY, Lee CJ (2012) Silibinin regulates gene expression, production and secretion of mucin from cultured airway epithelial cells. *Phytother Res* 26(9): 1301-1307.
- Ko KH, Lee CJ, Shin CY, Jo M-J, Kim KC (1999) Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am J Physiol* 277(21): L811-L815.
- Mutschler E, Derendorf H (1995) Drug actions. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida: p 410-411.
- Shingnaisui K, Dey T, Manna P, Kalita J (2018) Therapeutic potentials of *Houttuynia cordata* Thunb. against inflammation and oxidative stress: A review. *J Ethnopharmacol* 220: 35-43.
- Wei Y, Luo QL, Sun J, Chen MX, Liu F, Dong JC (2015) Bu-Shen-Yi-Qi formulae suppress chronic airway inflammation and regulate Th17/Treg imbalance in the murine ovalbumin asthma model. *J Ethnopharmacol* 164: 368-377.
- Xiao R, Xiang AL, Pang HB, Liu KQ (2017) Hyperoside protects against hypoxia/reoxygenation induced injury in cardiomyocytes by suppressing the Bnip3 expression. *Gene* 629: 86-91.
- Ye P, Yang XL, Chen X, Shi C (2017) Hyperoside attenuates OVA-induced allergic airway inflammation by activating Nrf2. *Int Immunopharmacol* 44: 168-173.
- Shao MX, Ueki IF, Nadel JA (2003) TNF-alpha converting enzyme mediated MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(20): 11618-11623.
- Heo HJ, Lee HJ, Kim YS, Kang SS, Son KH, Seok JH, Seo UK, Lee CJ (2007) Effects of baicalin and wogonin on mucin release from cultured airway epithelial cells. *Phytother Res* 21(12): 1130-1134.
- Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH (2003) IL-1beta and TNF-alpha induced MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinase-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 278(26): 23243-23250.
- Karlinsky J, Stamatoyannopoulos G, Enver T (1989) Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal Biochem* 180(2): 303-306.
- Li X, Jin F, Lee HJ, Lee CJ (2020) Recent Advances in the Development of Novel Drug Candidates for Regulating the Secretion of Pulmonary Mucus. *Biomol Ther* 28: 293-301.
- Takeyama K, Dabbagh K, Shim JJ, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA (2000) Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 164: 1546-1552.
- Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL (2004) PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol* 344(3): 683-695.
- Takeyama K, Dabbagh K, Lee H, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, Grattan KM, Nadel JA (1999) Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6: 3081-3086.
- Wu DY, Wu R, Reddy SP, Lee YC, Chang MM (2007) Distinctive epidermal growth factor receptor/extracellular regulated kinase-independent and -dependent signaling pathways in the induction of airway mucin 5B and mucin 5AC expression by phorbol 12-myristate 13-Acetate. *Am J Pathol* 170: 20-32.

Authors' Positions

Hyun Jae Lee : Assistant Professor