

만성 기도질환에서 흰쥐 뮤신에 대한 단 세포군 항체 (RTO3)를 이용한 뮤신 측정에 관한 연구

순천향 의과대학 내과학교실, 서울대학교 의과대학 약리학교실*

김도진, 김기업, 남궁은경, 어수택, 김용훈, 신찬영*, 고광호*, 박춘식

= Abstract =

Measurement of Mucin Amounts Using RTO3 in Patients with Chronic Airway Disease

Do-Jin Kim, M.D., Ki Up Kim, M.D., Eun kyeng Namgung, M.D.,
Soo-Taek Uh, M.D., Young Hoon Kim, M.D., Chan Young Shin, M.D.*,
Kwang Ho Ko, M.D.*, Choon Sik Park, M.D.

*Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University Hospital College of Pharmacology,
Seoul National University, Seoul, Korea*

Background : It has been anticipated that the amount and composition of mucin are changed in patients with chronic airway diseases. We evaluated whether RTO3 (mAb against rat tracheal mucins) could quantify the amount of mucin from the airway in the patients with chronic airway diseases.

Methods and results ; 1) RTO3 was bound to high molecular weight of mucin based on Western blot in sputum and BALF from patients with chronic airway diseases. 2) The goblet cells and submucosal glands in main bronchus from human were observed by PAS stain. And immunohistochemical stain with RTO3 showed immunoreactivity on some goblet cells. 3) The amount of mucin was more increased in patients with chronic airway diseases compared to those in normal subjects. 4) In the exacerbation of asthmatics, mucin amounts were more increased than stable asthmatics.

*본 연구는 1997년 선도기술 (G7) 의료공학 기술개발사업 연구 (연구과제 관리번호 HMP-97-G-2-36)의 일환으로 이루어 졌음.

Address for correspondence :

Choon Sik Park, M.D., Ph.D.

Department of Allergy and Respiratory, Dept. of Internal Medicine, Soonchunhyang Univ. Hosp.

657 Hannam-Dong, Yongsan-Ku, Seoul, 140-743

Phone : 02-709-9219 Fax : 02-798-5812 E-mail : schalr@hosp.sch.ac.kr

Conclusion : We suggested that secreted mucin in chronic airway diseases can be quantified by ELISA with RTO3. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 786-796)

Key words : Airway, MAbRTO3, Mucin.

서 론

점액(mucus)의 과분비 현상은 만성 기관지염, 기관지 천식과 만성 섬유화증에서 중요한 소견의 하나이다¹. 기관지 천식은 기도 내 염증세포의 침윤, 평활근의 수축, 점막의 부종과 점액 과분비가 기도폐쇄의 원인이 된다. 기관지 천식으로 사망한 환자의 기도는 과분비된 점액이 plug으로 되어 막혀있으며², 동시에 배상세포와 점막하 분비세포의 증식이 관찰된다³. 기관지 천식에서 기도 분비물의 증가는 배상세포와 점막하 분비세포의 과 분비, 기도내로의 transepithelial Cl의 과분비와 기도내로의 혈장 산물의 과도한 유출이 원인이 된다¹. 이렇게 분비된 점액은 단백질, 당단백, 수분, 전해질, 지질등으로 구성된다.

뮤신은 점막하 분비선과 상피세포층의 배상세포에서 분비된다. 염증세포의 침윤과 염증세포에서 분비되는 매개물질에 의해서 과분비가 이루어진다¹. 정상적인 점액은 수송역할과 흡인된 먼지의 입자, 조직파편, 노화된 세포와 세포 생성물 등을 제거하는 역할을 한다¹. 점액의 과분비는 세균감염의 원인이 되며 이는 점액의 청소술에 장애를 초래하고 반복 감염시는 만성적인 기도 점액의 과분비를 유발하고 기도의 변화와 파괴를 가져 올 수 있으며 심하면 기도의 폐쇄를 일으킨다¹. 그러나 기관지 분비물내의 뮤신의 양의 측정에는 여러가지 제한에 의하여 현재까지 활발히 시행되지는 못하고 있는 실정이다^{4,5}.

뮤신의 정량적 분석은 in vitro에서 세포배양이나 기도나 적출된 분비선에서의 분비되어지는 mucin glycoprotein의 측정으로 시작되었다. Mucin glycoprotein의 측정은 대부분 radiolabeled precursor를 이용하여 세포외로 분비되는 radioactive-labeled macromolecules를 측정하였다. 그러나 뮤신에 대한

단클론 항체의 제조 기술이 발달하여 이를 이용한 ELISA법이 개발 되었다. mucin glycoprotein에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 in vitro에서 분비되어지는 mucin glycoprotein을 측정하게 되었다. 뮤신에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 분비된 뮤신의 양을 측정하는 것은 여러 저자들에 의하여 밝혀진 바 있고^{1,6,7}, 기관지 천식에서 Claman 등⁸은 기관지 천식환자 24명을 대상으로 ELISA를 이용하여 객담내의 mucin like glycoprotein을 측정하였다. 또한 Fahy등⁹도 기관지 천식환자의 객담내의 mucin like glycoprotein을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 기도내 뮤신은 조직학적으로는 glycosylate의 차이에 의해서 중성과 산성 뮤신으로 나타날 수 있고¹⁰ gel electrophoresis에 의해서 산화된 기도내 뮤신을 증명할 수 있다. Sheehan 등²은 기관지 천식환자의 기도내 점액성 당단백을 gel-filtration chromatography와 Ion-exchange chromatography를 이용하여 기관지 천식환자의 뮤신은 정상인이나 다른 질환자의 뮤신과는 달리 산성뮤신이 감소되어 관찰 되었고 보고 한 바 있다.

또한 단 세포군 항체를 이용한 뮤신 측정의 유용성은 난소암^{11,12}, 유방암¹¹⁻¹³ 및 대장암^{11,12,14}에서 나타나 있고 80년대 후반에 와서 비소세포암에서 단 세포군 항체인 B72.3, Leu M1과 KP 16D3등을 이용하여 선암을 진단하고 중피종과의 구별도 하였다^{15,16}. 1990년대 초반에는 폐암에서 4B5를 이용하여 pulmonary carcinogenesis에 특이성과 민감도를 관찰 하였으며¹⁷ Gamble 등¹⁸은 뮤신에 대한 항체로 전이성 종양의 원발지를 관찰 하기도 하였다. 만성 기도질환에서의 악화나 사망의 원인중에 기도 분비물이 중요한 역할을 하고 있음은 알려진 바 있다^{2,19}.

이러한 결과에서 보듯이 현재까지 기도 분비물내 뮤

신의 정량분석에 이용될수 있도록 고안된 항체는 7가지 정도로 제한되어 있어 새로운 항체의 개발이 필요로 되어지고 있는 실정이며 현재도 개발 추진중이다. 최근 서울대학교 약학대학의 고평호 교수팀은 Sprague-dawley의 기도내 뮤신에 대한 단클론 항체 RTO3를 개발하였으며 IgM의 단클론 항체로 western blot에서 쥐의 기도분비액내 고분자량의 당단백과 반응하였고 면역조직화학염색법에서 기도 내강의 배상세포에 결합하는 것을 확인하였으며 흰쥐 뮤신의 정량에 우수한 결과를 발표한 바 있다²⁰. 국내에서는 아직 뮤신에 대한 양이 정량적으로 보고 된 적이 없으며 만성 기도 질환에서의 기도내 뮤신의 역할의 중요성에 대한 인식이 점차 증가하는 시점에서 RTO3 단 세포군 항체를 이용하여 사람의 기도 분비물내 뮤신 측정이 가능하다면 그 유용성이 매우 높을 것으로 추정된다. 저자들은 사람의 기도 분비물내 뮤신 측정에서 단세포군 항체인 RTO3의 유용성을 판단하고자 하였다.

대상 및 방법

한국 기관지 천식의 치료지침서의 기준에 의한²¹ 기관지 천식환자 26명으로 급성 발작 상태의 환자 12명, 천식증상이 없으면서 최대호기유속의 일중 변동이 없는 안정상태의 환자 14명, 급성 폐염 환자 9명과 정상인 12명을 대상으로 하여 자연 객담을 획득하였고 객담이 없는 환자는 고장성 생리식염수를 이용한 유도객담을 얻었으며 기관지 세척술을 시행한 폐암환자 15명(편평 8명, 소세포 2명, 선암 5명)과 정상인 7명에서는 기관지 세척액을 획득하였다.

1. 고장성 생리식염수를 이용한 유도객담과 기도 세척액의 획득

호흡기계의 질환이 없어 평소에 객담 배출이 없거나, 호흡기 질환이 있는 경우에도 자연객담이 없는 경우 고장성 생리식염수를 흡입하여 유도객담을 얻었다. Pin등의 방법을 인용하여 하였으며²² 방법을 약술하면

3%, 4%와 5%의 고장성 생리식염수를 단계적으로 7분간 흡입하여 큰 호흡을 하고 기침을 유도하여 기도하부의 분비물을 얻는다. 자연객담을 얻을 수 있는 기도 질환 환자는 구강을 깨끗하게 세척한 후 큰 기침을 하여 하부의 분비물을 얻는다. 객담을 얻은 동일한 환자에서 기관지 내시경을 이용하여 정상적인 부위와 병변이 있는 부위를 각각 10ml씩 2회 생리식염수를 넣고 음압으로 흡입하여 기도 분비물을 얻었다.

2. 기도 분비물의 처리

획득된 분비물의 처리방법은 Pizzichini등이 시행한 방법으로 하였으며²³ 약술하면 탈지면을 이용하여 대부분의 타액 성분과 수분을 제거하고 점액성분만을 검자를 이용하여 선택적으로 얻어낸 후 무게를 측정한다. 객담성분의 균등한 분포를 위하여 0.1% dithiothreitol(DTT)가 들어 있는 calcium and magnesium free phosphate buffered saline(PBS)를 전체 점액성분의 4배를 넣고 객담무게의 1/10의 단백분해효소 억제제(0.1M ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA))와 2mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 넣어 이를 약 10-15초간 vortex한 후 pipett으로 겔성분을 풀어 준다. 이로서 객담의 뮤신성분의 disulfide bond를 끊어 뮤신성분을 환원형으로 변화시킨다. 육안으로 객담의 고형성분이 완전히 풀어진 후 5배의 PBS를 넣어 객담성분의 10배 용량으로 만든다. 이렇게 함으로서 객담이 잘 풀어져 세포분별검사에 지장을 초래하지 않는다. 이 용액을 41 μ m 격자의 mesh에 걸러서 불순물을 제거하고 전체 세포수와 세포 생존율을 측정한다. 또한 5 \times 10⁵/ml의 세포를 60 μ l를 450rpm에서 6분간 cytopsin에서 회전시킨 후 Diff-Quick stain을 하여 분별검사를 실시하고 나머지 용액은 500xg에서 5분간 원심분리하여 상층액을 모아 면역 효소측정을 위한 검체의 처리를 한다.

뮤신 ELISA를 위한 검체의 처리는 생쥐의 뮤신 측정시와 같은 방법으로 처리하였으며²⁰, 전체 용액의 1

/10의 용량에 해당하는 0.5M sodium acetate와 20% sodium dodecyl sulfide(SDS)를 넣어 최종 농도가 50mM sodium acetate, 0.1% SDS가 되도록 하였다. 이것을 100°C에서 증탕으로 3분간 처리한 후 -70°C에 저장하였다. 또한 용액 중 100 μ 를 분리하여 증류수 900 μ 에 넣어 전체용량을 1ml로 하여 단백농도를 Lowry법으로 측정하였다.

3. 기도 세척액의 처리

기도질환이나 폐장내의 질환을 진단 시 기관지 내시경을 시행할 때 병변부위와 병변의 반대쪽 기관지에서 20ml의 생리 식염수를 주입한 후 음압을 이용하여 흡인하여 회수하였다. 기도 세척액은 약 12-15ml 정도 회수되었다. 객담의 처리와 마찬가지로 단백이나 기타 성분의 분해를 억제하기 위하여 연속적으로 시행하였다. 전체 용량의 1/100의 단백 분해억제제와 10%의 DTT를 넣어 최종 농도가 0.1%가 되도록 하였다. Vortex와 pipett으로 균등화 시킨 후 전체 세포수와 세포의 생존율을 측정하였다. 또한 5×10^5 /ml의 세포 60 μ 를 450rpm에서 6분간 cytospin에서 회전시킨 후 Diff-Quick stain을 하여 분별검사를 실시하였다. 나머지는 500 xg에서 5분간 원심분리하여 상층액을 모아 면역 효소측정을 위한 검체의 처리를 하였다. ELISA를 위한 검체의 처리는 객담의 그것과 동일한 방법으로 시행하였다.

4. RTO3을 이용한 기도 분비물내의 뮤신의 증명

단 클론 항체가 기도 분비물과 반응을 하는가를 western blot을 이용하여 측정하였다²⁰. 환자의 처리된 기도 검체에 $5 \times$ Laemli buffer(pH 6.8, 25mM Tris-Hcl, 2% SDS, 5% Glycerol, 0.003% bromophenol blue, 1% β -mercaptoethanol)를 넣고 95°C이상에서 5분간 가열한 후 8%의 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동(electrophoresis buffer : pH 8.2, 5mM Tris-base, 192mM glycine,

0.1% SDS)을 시행하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 transfer(pH 8.2, 5mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol, 0.15% SDS)를 하였다. 비 특이적 반응을 막기위하여 5% non-fat dry milk가 함유되어 있는 blocking buffer(pH7.5, 10mM Tris, 100mM NaCl, 0.1% Tween)로 4°C에서 밤새 처리하여 1 : 10의 농도로 희석한 RTO3를 1차 항체로 이용하여 실온에서 1시간 반응 시켰고 membrane을 TBS-Tween으로 세척후 1 : 3000의 농도로 희석한 2차 항체인 HRP-labeled goat anti-mouse IgG로 실온에서 1시간 반응 시켰다. 이어 TBS-Tween으로 세척하여 detection solution(enhanced chemiluminescence detection system : ECL)으로 처리 후 film에 감작시켜 autoradiogram을 얻었다.

5. 질환별 및 질환병기에 따른 뮤신의 정량적 분석

뮤신의 정량적 분석은 direct ELISA를 이용하여 측정하였다. Standard curve는 흰쥐에서 추출한 뮤신을 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 가 들어있지 않은 pH7.4의 PBS로 희석하여 0, 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10 ng/ml의 농도로 준비하였고 검체는 객담과 기관지 세척액을 100°C에서 3분간 증탕을 한 후 96 well의 plate에 각각 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 의 농도로 희석하여 50 μ l의 검체를 준비한 후 4°C에서 16시간을 고정시킨 후 세척용액으로 5회 세척하였다. 검체의 측정은 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 가 들어있지 않은 pH7.4의 PBS에 건조된 무지방 우유와 Tween을 넣어 최종농도가 5%, 0.3%가 되도록 하여 동량을 투여하고 30분간 실온에서 배양 후 세척하였다. RTO3를 10배 희석하여 같은 양을 넣어 32°C에서 1시간 배양하고 5회 세척하였다. Peroxidase labeled goat anti-mouse immunoglobulin을 1 : 5000으로 희석하여 동량을 넣어 32°C에서 1시간 배양하고 5회 세척하였다. TMB로 발색시킨 후 650nm에서 optical density를 분석하고 stop solution을 첨가한 후 450 nm에서 optical den-

sity를 측정하였고 이 값을 standard curve 값과 비교하여 검체의 뮤신양을 얻었다.

6. 뮤신 분비의 주세포 규명

기도 질환자의 기도 수술 시나 기관지 내시경을 이용하여 조직을 적출하여 RTO3가 사람의 조직과 반응하는지를 면역조직 화학염색법을 이용하여 뮤신분비의 주세포를 규명하였다. 조직의 처리는 4% paraformaldehyde에 20분 고정하고 sucrose에 밤새 고정한 후 paraffin bloc을 만들었다. 4 μ m로 절단하여 xylene으로 paraffin을 제거하고 ethyl alcohol로 수화(hydration)시켰다. Endogenous peroxidase를 억제하기 위하여 0.3% H₂O₂가 함유된 methanol에 30분간 잠복시켰다. 이어 비 특이적 반응을 막기 위하여 1.5% normal horse serum(Vector, USA)으로 실온에서 30분간 반응시키고 RTO3를 1 : 10으로 희석하여 실온에서 60분간 반응을 시켰다. 2차 항체는 peroxidase labeled goat anti-mouse immunoglobulin(Pierce, USA)을 1 : 1000의 농도로 희석하여 실온에서 60분 반응 시켰다. 발색을 diaminobenzidine substrate solution을 이용하여 실온에서 시행하였다.

결 과

1. 기도 분비물내의 뮤신의 증명

RTO3가 사람의 기도분비물내 뮤신을 검출할수 있는가를 확인하기위한 일차적인 작업으로 2명의 기관지 천식환자의 객담을 처리하여 western blot을 이용하였다. 2명의 환자에서 모두 220KD이상의 고분자량의 범위에서 항체와 반응하는 두터운 층을 관찰하였다(Fig. 1). 이는 현재까지 알려진 기도 뮤신의 크기와 일치하는 것으로 RTO3가 기도 뮤신과 반응함을 증명할 수 있었다. 추가로 RTO3와 반응하는 뮤신의 양적

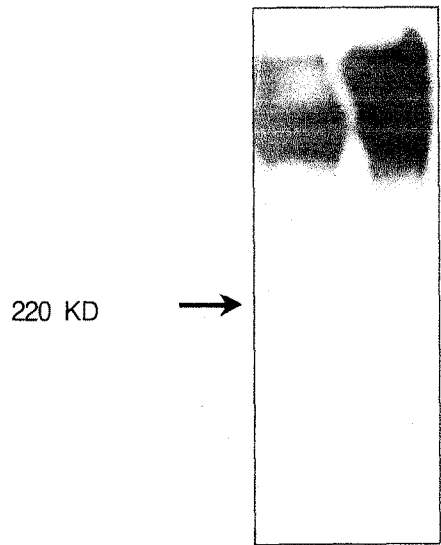


Fig. 1. RTO3 immunoblot of mucin in sputum from the patients with asthma.

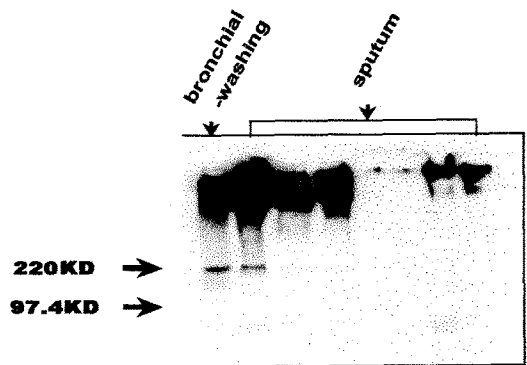


Fig. 2. RTO3 immunoblot of mucin in sputum and bronchial washing from patients with asthma.

차이가 있는가를 확인하기 위하여 5명의 기관지 천식환자의 객담과 한명의 천식환자의 기관지 세척액내에 RTO3와 반응하는 층을 고분자량의 위치에서 관찰할 수 있었으나 2명의 환자의 객담에서는 RTO3와 반응하는 층을 관찰 할 수 없어 RTO3와 반응하는 뮤신의 양이 환자마다 다름을 증명할 수 있었다(Fig. 2).

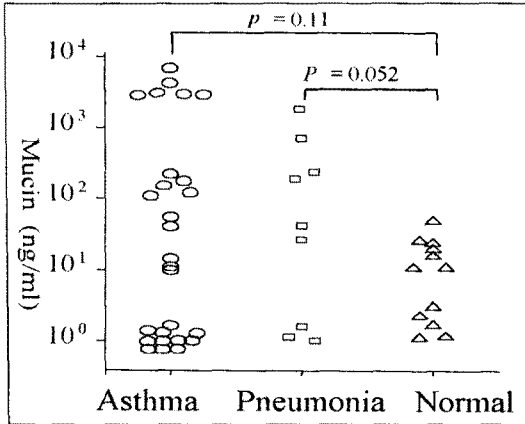


Fig. 3. Mucin amounts of sputum in patients with pulmonary diseases.

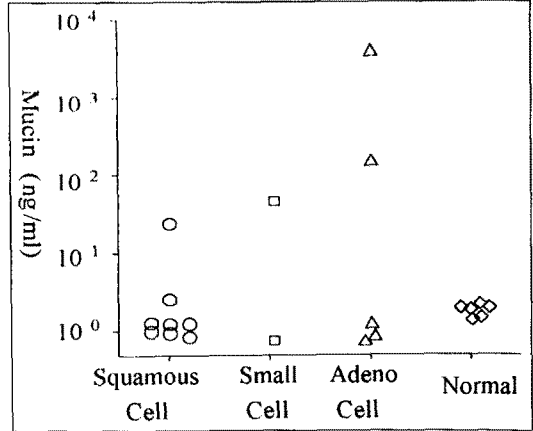


Fig. 5. Mucin amounts of bronchial washing in lung cancer.

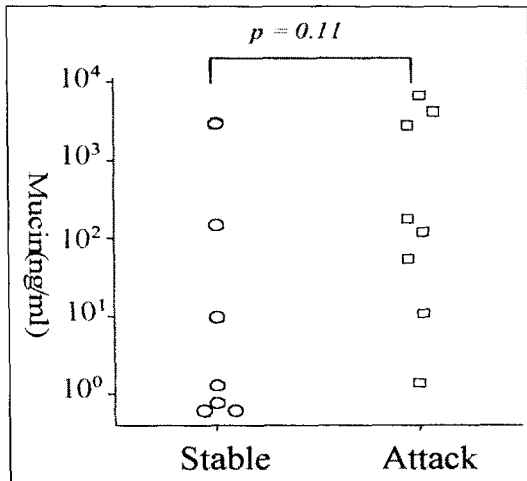


Fig. 4. Mucin amounts of sputum in patients with asthma according to severity.

2. 뮤신양의 정량적 분석

RTO3를 이용한 뮤신의 정량방법인 ELISA를 개발하기 위하여 colume chromatography로 순수 분리한 정상인의 기도 뮤신을 이용하여¹⁹ 여러 조건에서 실험을 하였다. ELISA는 direct method로 하였으며, 뮤신을 90 microwell plate에 붙인 후 RTO3를 결합시키고 Peroxidase labeled goat anti-mouse

immunoglobulin로 반응시키는 순서로 진행하였다. RTO3의 적정 반응농도를 구하기 위하여 희석을 1배, 3배, 10배, 30배로 하여 crisscross dilutional analysis를 한 결과 1배 희석에서 사람 뮤신에 농도의존성으로 반응함을 알 수 있었다. Immunoplate의 제형의 종류에 따른 차이를 알기 위하여 3개 회사의 96 plate를 이용하여 표준 뮤신을 흡착시킨후 RTO를 1배 희석하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Co-star(R), Immunol(R), Nunc(R)의 3개 회사의 제형간의 차이는 없었다. 뮤신 항원의 흡착에서 DTT처리에 의한 차이와 사용된 완충용액의 종류에 따라 PBS, Na acetate, sodium bicarbonate에 따른 차이는 없었다.

기관지 천식환자의 객담내에서 ELISA를 이용하여 측정된 뮤신의 양은 정상인의 객담 내 뮤신 48ng/ml보다 유의하게 증가되는 소견을 보였다. 이는 정상인의 객담내 뮤신의 양보다 증가된 경우가 44.5%이었으며 폐렴의 경우에서도 정상인에 비해서는 증가하는 소견을 보였다(Fig. 3). 또한 기관지 천식의 중증도에 따른 병기별로 구분하여 보았을 때 급성발작시의 환자의 객담내 뮤신의 양은 천식환자의 안정시 객담내 뮤신의 양보다 증가하는 경향을 관찰할 수 있었고(Fig. 4) 폐암환자의 기관지 세척액내의 뮤신의 양도

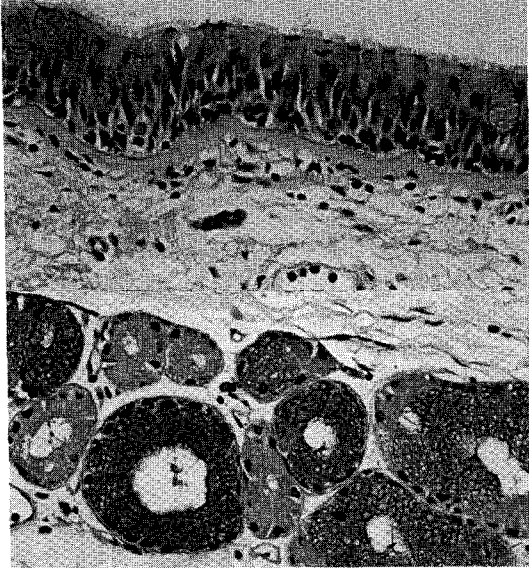


Fig. 6. Prominent GCH in the airway and positive stained submucosal secretory cells in the submucosal glands : PAS stain.

정상인의 기관지 세척액내의 뮤신양보다 상승되어 있었다. 이들 중에 조직형이 선암인 경우에서 다른 조직형보다 뮤신이 많이 분비되는 것을 관찰 하였다(Fig. 5).

3. 뮤신분비의 주세포의 규명

RTO3 항체가 기도내 뮤신 분비세포중 상피 배상세포와 점막하 분비선중 어떤세포에서 분비되는 뮤신을 검출하는 가를 확인하기 위하여 기도조직에 RTO3를 이용한 면역효소염색을 시행하였다. 기관지 천식 환자의 기관지 내시경을 통한 점막조직과 폐암 환자의 수술시 적출한 조직을 처리하여 paraffin bloc을 만들어 시행한 PAS 염색법에서 기관지나 기관지의 상피 세포층 내에 배상세포와 점막하층의 점막하 점액선의 분비세포들이 붉은 색으로 PAS 염색법에 양성소견을 보였다(Fig. 6). 하지만 RTO3를 항체로 사용하여 시행한 면역조직 화학염색법에서는 기도내 뮤신과 반응하여 양성소견을 나타내는 소견은 드물게 관찰할 수

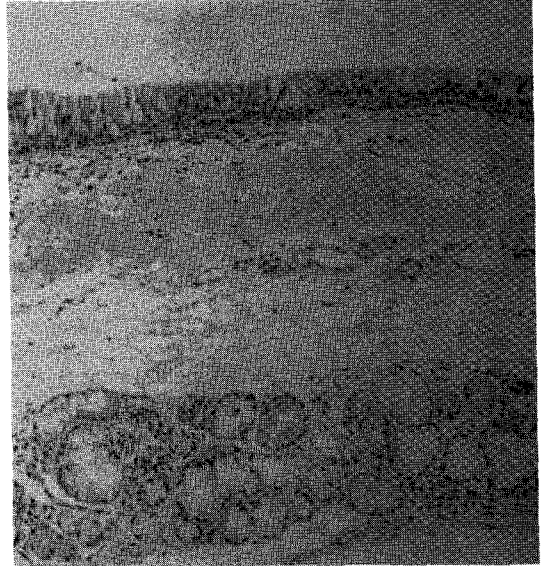


Fig. 7. Immunohistochemistry in human airway using RTO3.

있었다(Fig. 7). 상기 결과는 RTO3의 조직내 뮤신 측정의 예민도는 감소되어 있음을 알 수 있었다.

고 찰

객담은 호흡기 질환의 가장 흔한 증상중의 하나이며 따라서 객담을 주증상으로 하는 만성 기도염증에서의 객담분석은 중요한 의미를 갖는다. 정상인에서도 기도 분비물은 외부로부터 흡인되는 이물질로부터 기도를 보호하는 역할을 하지만 만성 기관지염이나 기관지 천식 환자에서는 급성 발작이나 염증이 동반된 경우에는 기도 분비물이 유발요인 내지는 악화요인으로 작용할 것이라고 추측하고 있다.

기도 분비물은 기도 점막 세포중 배상세포와 점막하층의 점막하 점액선에서 분비하는 것으로 알려져 있고 이들은 주로 기관과 기관지에 분포되어있다. 이들 중 점막하 점액선의 점액세포와 배상세포가 주세포가 되며 일부 ciliated epithelial cell에서도 분비가 되기도 한다. 기도 분비물의 약 95%는 수분으로 구성되어 있고 나머지 5%중 뮤신이 약 2-3%를 차지하고 있

으며 뮤신은 고분자량의 단백질(20000-30000kDa)로서 길이는 200-4000nm로 다양하며²⁴ 점액성분의 접착성, 탄력성과 점도를 결정한다.

천식환자에서 기도폐쇄를 일으키는 요인들은 점막의 부종, 평활근의 비후, 기도염증반응과 뮤신의 분비가 원인이 될 수 있다. 심한 급성 천식발작으로 사망하는 환자, 가벼운 증상의 환자나 완전 관해된 천식환자의 기도 내에서 증상의 심한 정도에 관계없이 mucus plug가 관찰된다¹⁹. 이러한 mucus plug는 bronchial cast로 진행되는데 bronchial cast는 제1형 염증성 cast로 호산구성 염증침윤으로 구성되어 있어 흡입 steroid에 반응을 잘하고 제2형은 세포성분이 없으면서 주로 뮤신만으로 구성되어 있어 치료에 잘 반응하지 않고 치료의 지침이 없는 형편이다¹⁹. 또한 천식환자의 뮤신은 보통 정상인보다 단단하며 mucus내의 뮤신의 양도 4배에서 많게는 50배 이상 증가되어 관찰된다. 이러한 뮤신의 존재여부를 확인하고자 저자들은 western blot으로 RTO3가 기관지 천식환자의 객담과 기관지 세척액 내의 뮤신과 반응함을 고 분자량의 범위에서 관찰할 수 있었고 또한 이런 기도 질환에 중요한 역할을 하는 뮤신의 분비가 어디에서 이루어지는지를 확인하기 위해서 기관지 천식환자의 기관지 점막과 폐암환자의 수술시 적출된 조직에서 PAS 염색법을 시행하여 두 군에서 모두 기도 상피 세포층 내의 배상세포와 점막하층의 점액분비선에서 뮤신의 분비가 이루어짐을 확인하고 RTO3를 이용하여 사람의 뮤신과 반응하는지를 immunohistochemistry로 확인 하려했으나 RTO3와 반응하는 기도내 뮤신 분비 세포는 거의 관찰할 수 없었으나 이는 이미 분비가 이루어진 뮤신의 양과 저장되어 있는 뮤신의 양에 차이가 있을 수 있으며 따라서 RTO3는 분비된 뮤신에 반응을 잘하며, 저장된 뮤신을 증명하는 데에는 예민도가 감소됨을 알 수 있었다.

천식환자의 기도 폐쇄 내지는 급성 발작시 사망의 원인이 되는 뮤신을 분석하여 환자의 진단, 치료방침과 예후에 병명의 분류 및 질환의 병기에 따라 차이가 있을것으로 예상할 수 있다. 저자들의 연구에서도 정

상인에 비해 기관지 천식환자에서 객담내 뮤신의 양은 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 또한 천식환자의 급성 발작시는 환자가 안정된 상태와 비교해서 객담의 성상, 뮤신의 양이나 성격에 차이가 있을 것으로 예상되나 아직까지 확실히 밝혀진 바는 없다. 저자들이 천식의 병기에 따라 객담내의 뮤신양을 분석한 결과에서도 급성 발작시 거의 대부분의 환자에서 뮤신의 양이 증가하는 경향을 보였으나 일부 환자에서는 객담배출이 거의 되지를 않아서 뮤신의 양을 측정하지 못하였다.

이외 다른 폐질환에 있어서도 정상에 비해 기도 분비물내의 뮤신양이나 조직내의 뮤신 분비 세포의 과형성을 동물실험에서 증명된 바 있다²⁵. 저자들의 연구에서도 폐렴, 폐암과 기관지 확장증등에서도 객담내의 뮤신의 증가와 뮤신 분비세포인 배상세포의 과형성과 점액 분비선의 팽대와 비후됨을 관찰할 수 있었다. 폐암환자에서도 종양의 종류에 따라서 객담의 양에 차이가 나는 경우를 관찰할 수 있는데 이런 경우에도 단세포균 항체와 반응하는 정도가 종양의 조직학적 차이를 추측할 수 있다. Battifora H. 등²⁶은 monoclonal antibody 43-9F를 이용하여 편평상피세포폐암에 강하게 반응한 환자에서 예후가 좋은 것을 관찰하였고, Pence등¹⁷도 monoclonal antibody 4B5가 비소세포암에서 64% 이상 반응하는 민감도와 특이도를 관찰하였다. 저자들의 연구에서도 RTO3가 폐암에 반응하여 정상인에 비해 증가하는 경향을 보였으나 폐암의 조직학적 특징에 따라서는 뮤신과의 반응의 차이를 관찰할 수 없었다.

저자들의 경우에서는 기관지 확장증과 폐렴의 경우는 정상인이나 다른 폐질환에 비해서 증가되는 경향을 보였고 이런 환자군에서는 임상적으로 많은 양의 객담이 관찰되었다. 하지만 객담양의 차이가 뮤신의 양에 어떠한 영향을 미치는지는 아직 밝혀진 바 없다.

이러한 실험의 결과로 RTO3가 사람의 객담이나 기관지 세척액내의 뮤신과 반응함은 western blot으로 관찰할 수 있었으나 뮤신분비 주분비 세포의 확인을 위한 immunohistochemistry에서는 반응하는 것을

관찰할 수 없어서 ELISA를 이용한 뮤신양의 측정과 상관성이 떨어진다고 판단하여 흰쥐에서 추출한 단 세포군 항체는 사람의 기도 질환자에서 뮤신의 양이나 성격을 특정 짓는데는 무리가 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 향후 사람의 뮤신을 특이적으로 구분할 수 있는 단 세포군 항체와 이를 이용한 질환별 특이도를 높일 수 있는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

배 경 :

만성 기도 질환자에서 뮤신 양의 증가와 생화학적 변화가 예상된다. 기도 질환자에서의 기도내 뮤신의 정량적 측정에 흰쥐 뮤신에 대한 단 세포군 항체 (RTO3)의 임상적 유용성을 알아보려고 하였다.

방 법 :

기도 질환자와 정상인에서 채취한 객담과 기관지 세척액으로부터 얻은 뮤신과 RTO3와의 교차반응을 확인하기 위하여 western blotting을 이용하였고 단 세포군 항체가 생체내의 기도 뮤신과의 특이적인 반응을 하는지를 면역조직화학적으로 검색 하였다. ELISA를 이용하여 정상인과 기도 질환자의 뮤신 양을 비교하여 보았고 또한 기도 질환에 따른 뮤신양의 변화도 관찰 하였다.

결 과 :

1) Western blot으로 두명의 기관지 천식환자에서 220kDa이상에서 면역적으로 반응하는 뮤신을 관찰하였고 2) 사람의 주 기관지에서 상피 세포층의 배상 세포와 점막하층의 분비선에서 뮤신이 분비됨을 PAS 염색법으로 확인 하였지만 RTO3를 이용한 면역조직 화학 염색에서는 양성 소견을 보이는 세포의 빈도가 적었다. 3) 뮤신의 양은 정상인에서는 평균 48ng/ml이하로 분비 되지만 기도 질환자에서는 정상인에 비해 뮤신 양의 분비가 증가됨을 알 수 있었다. 4) 기도 질환의 병기에 따른 뮤신 양의 변화는 기관지 천식환자에서 심한 발작시에 뮤신의 분비가 안정한 천식상태에서 보다 증가 됨을 알 수 있었다. 5) 폐암 환자의

기도 세척액에서 얻은 뮤신의 양도 정상인 보다 증가되어 있었다.

결 론 :

만성 기도질환자의 뮤신 정량적 측정에 표식자로 단 세포군 항체 RTO3를 이용한 ELISA의 사용 가능성을 보여 주었다.

참 고 문 헌

1. Jens D. Lundgren, James H. Shelhamer. Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:399-417.
2. John K. Sheehan, Paul S. Richardson, Denis C. K. Fung, Marjorie Howard, and David J. Thornton. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma : A detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:748-56.
3. Lynne M. Reid. The presence or absence of bronchial mucus in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80(3):415-6.
4. David J. Thornton, Ingemar Carlstedt, Marj Howard, Peter L. Devine, Michael R. Prices, and John K. Sheehan. Respiratory mucins : identification of core proteins and glycoforms, *Biochem J* 1998;318:967-75.
5. Takashi Aikawa, Sanae Shimura, Hidetada Sasaki, Tamotsu Takishima, Hiroshi Yaegashi, and Tohru Takahashi. Morphometric analysis of intraluminal mucus in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:477-82.
6. P. K. Jeffery, A. J. Wardlaw, Fiona C. Nelson, J. V. Collins, and A. B. Kay. Bronchial biopsies in asthma ; An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1745-53.

7. Finkbeiner WE, Basbaum CB. Monoclonal antibodies directed against human airway secretions. Localization and characterization of antigens. *Am J Pathol* 1988;131:290-7.
8. David M. Claman, Homer A. Boushey, Jane Liu, Hofer Wong, and John V. Fahy. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:861-9.
9. J.V. Fahy, H.A. Boushey. Effect of low-dose beclomethasone dipropionate on asthma control and airway inflammation. *Eur Respir J* 1998;11:1240-47.
10. Spicer SS, Schulte BA, Chakrin LW. Ultrastructural and histochemical observations of respiratory epithelium and gland. *Exp lung Res* 1983;4:137-56 (Abstract).
11. Devine PL, Birrell GW, Quin RJ, Shield PW. Monoclonal antibodies recognising sialyl-Tn : production and application to immunochemistry. *Dis Markers* 1995;12(3):175-86.
12. Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Graff A, Riede E, Hanski ML, Borchard F et al. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast, and ovary. *J Pathol* 1997;182(4):385-91.
13. Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997;89(9):3385-95.
14. Goetz DJ, Ding H, Atkinson WJ, Vachino G, Camphausen RT, Cumming DA et al. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol* 1996;149(5):1661-73.
15. Warnock ML, Stoloff A, Thor A. Differentiation of adenocarcinoma of the lung from mesothelioma. Periodic acid-Schiff, monoclonal antibodies B72.3 and Leu M1. *Am J Pathol* 1988;133(1):30-8.
16. Suehiro T, Maeda K, Sueishi K. Immunohistochemical study of lung adenocarcinoma using monoclonal antibody for 60-kilodalton antigen in type II pneumocytes and nonciliated bronchiolar epithelial cells. Comparison with two ant surfactant apoprotein antibodies. *Am J Clin Pathol* 1989;92(2):150-8.
17. Pence JC, Deutsch MA, Kerris BJ, Huper G, Jordan LK 3d. Sensitive and specific detection of the 4B5 antigen in bronchial lavage specimens from patients with primary bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1992;70(5):1115-23.
18. Gamble AR, Bell JA, Ronam JE, Pearson D, Ellis IO. Use of tumor marker immunoreactivity to identify primary site of metastatic cancer. *BMJ* 1993;306(6873):295-8.
19. M. Seear, H. Hui, F. Magee, D. Bohn, E. Cutz. Bronchial casts in children : A proposed classification based on nine cases and a review of the literature. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:364-70.
20. C. Y. Shin, E. Y. Choi, K. C. Kim, K. H. Ko. Production and characterization of monoclonal antibodies against rat tracheal mucins. *Hybridoma* 1998;17(3):257-66.
21. 김규언, 김능수, 김유영, 문희범, 박춘식 등 : 한국의 기관지천식 치료 지침서. 대한 알레르기 학회. 천식 및 알레르기 1998.
22. Pin I, P. G. Gibson, R. Kolendowicz, J. A. Denburg, F. E. Hargreave, J. Dolovich. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-9.

23. Pizzichini E., M. M. M. Pizzichini, A. Efthimiadis, S. Evans, M. M. Morris, D. Squillace et al. Inducers of airway inflammation in induced sputum : reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Criti Care Med* 1996;154:808-17.
24. Sheehan JK, Oates K, Carlstedt I. Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem J* 1986;239:147-53.
25. David S, Jon H, Lalit B, Jack H, and Carol B. Concurrent increase in the storage and release of mucin-like molecules by rat airway epithelial cells in response to bacterial endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:307-14.
26. Battifora H, Sorensen HR, Mehta P, Ahn C, Niland J, and Olsson L. Tumor-associated antigen 43-9F is of prognostic value in squamous cell carcinoma of the lung. A retrospective immunohistochemical study. *Cancer* 1992;70(7): 1867-72.