

비강 점막과 비즙에서의 Ecalectin 발현

대구가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
신 승 현 · 예 미 경

Expression of Ecalectin in Nasal Mucosa and Secretion

Seung-Heon Shin, MD and Mi-Kyung Ye, MD

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

—ABSTRACT—

Background : Eosinophilia is a characteristic feature of several chronic inflammatory airway disorders, such as allergic rhinitis, allergic asthma, and nasal polyposis. Ecalectin seems to play an important role in the accumulation of eosinophils. The aim of this study is to investigate the expression of ecalectin in sinonasal diseases. **Methods** : Nasal polyps, allergic inferior turbinates, and normal inferior turbinates were enrolled in this study. Tissue and nasal secretion ecalectin mRNA were detected with RT-PCR and tissues were immunohistochemically stained using antibody against ecalectin. **Results** : Non-allergic nasal polyps, allergic inferior turbinates expressed significantly large amount of ecalectin mRNA than normal inferior turbinates. But only the nasal secretion of allergic rhinitis patients contained ecalectin mRNA. Nasal tissues contained ecalectin immunoreactive cells in submucosal glandular cells. **Conclusions** : Although ecalectin is not the only eosinophil chemoattractant, in sinonasal diseases with eosinophilia may be influenced by the production of ecalectin. (*J Clinical Otolaryngol* 2009;20:219-223)

KEY WORDS : Eosinophil · Ecalectin · Chemokine · Nasal polyp · Allergic rhinitis.

서 론

호산구는 알레르기 질환의 대표적인 염증세포로 알려져 있으며, 비염을 동반한 만성 부비동염과 기생충 감염시에도 호산구의 증가가 동반된다. 만성 부비동염 환자의 약 40% 정도는 알레르기를 동반하고 있으나, 조직 호산구 증가의 정도는 알레르기 동반 유무와 무관한 것으로 알

려져 있다.¹⁾

Galectin은 칼슘-비의존적 lectin으로 β -galactoside와 친화성을 가지고 있으며, 세포응집, 유착, 분화 및 세포자살 등에 관여하는 생물학적 기능을 가지고 있어 알레르기 등의 염증반응을 조절한다.²⁾ 지금까지 12종의 galectin이 알려져 있으며, 각각의 기능에 대해서는 활발한 연구가 이루어지고 있다.³⁾ Ecalectin은 galectin-9으로 호치킨 림프종 조직에서 처음 클로닝되었으며 혈액과 조직내 호산구 증가에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.⁴⁾ Ecalectin은 간, 소장, 신장, 비장, 폐, 심근 등에 분포하며, 일반적으로 혈관내피세포, 섬유모세포, 정상세포 등에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.^{5,6)}

알레르기성 비염과 만성 부비동염은 비강 점막과 비즙의 호산구 증가를 특징으로하며, 다양한 화학매개물질이

논문접수일 : 2009년 8월 18일
논문수정일 : 2009년 9월 11일
심사완료일 : 2009년 9월 30일
교신저자 : 신승현, 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6 대구가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 650-4525 · 전송 : (053) 650-4533
E-mail : hsseung@cu.ac.kr

호산구의 증가에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 화학매개물질 중 비점막 ecalectin 존재에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 이에 저자들은 알레르기성 비염과 만성 부비동염 환자에서 ecalectin의 조직과 비점막 분포에 대한 연구를 시행하고자 하였다.

대상 및 방법

비강 점막은 알레르기를 동반하지 않는 비염을 가진 12명의 만성 부비동염환자에서 얻었으며, 6명의 알레르기성 비염 환자에서 하비갑개 절제술을 통해 하비갑개를 얻고, 정상 대조군으로 비중격만곡증 환자 중 알레르기를 동반하지 않는 8명의 하비갑개를 얻었다. 비염은 검사 대상자의 하비도와 중비도에서 부비동 흡입기(Xomed, minneapolis, MN)를 이용하여 채취하였다. 대상자들은 모두 15세 이상으로 조직 획득 전 4주 이상 항생제, 항히스타민제, 국소 및 경구용 스테로이드제제 등의 약물을 사용하지 않았으며, 상기도 감염이 없었던 경우로 하였다. 알레르기의 존재 여부는 피부단자검사, MAST 및 혈중 총 IgE를 측정하여 확인하였다.

비강 조직 및 비점막의 Ecalectin mRNA 발현

비강 조직의 ecalectin mRNA는 정량적 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 측정하였다. 영하 70도에 보관하였던 조직을 1 mg에 5.38 µL의 비율로 SV total RNA 용해 완충액(Promega Co, Madison, WI) 1 mL을 넣고 분쇄기로 조직이 보이지 않을 때까지 분쇄한 후 원심분리하여 175 µL을 취하여 RNA를 추출하였다. 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 각각의 dNTP 1 mM, 0.5 U ribonuclease inhibitor, 20 U AMV reverse transcriptase, 0.5 µg oligo(dT)15 primer로 구성된 중합효소연쇄반응 시약에 RNA 9.5 µL를 넣고 DNA thermal cycle 480(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. Ecalectin와 G3PDH의 증폭을 위하여 사용한 시발체의 염기서열은 아래와 같다.

Ecalectin : sense : 5' TGG GGG TCT GAG GAG CGA AGT CTG 3'

antisense : 5' CTC CTC CCC TCT CCC TGG CTG TGC 3'

G3PDH : sense : GTC AAC GGA TTT GGT CGT ATT

antisense : AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT

증폭된 중합효소연쇄반응 산물의 정량화를 위하여, 먼저 결핵균핵산의 농도를 TKO 100 fluorometer(Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, CA)로 측정하여 10 pg, 1 pg, 500 fg, 250 fg, 125 fg, 62.5 fg, 31.3 fg 및 7.8 fg의 DNA 표준물질을 제조하였다.

이 핵산을 96 well 중합효소연쇄반응판에 G3PDH와 ecalectin 검체와 동일한 판에 넣은 뒤 동일한 중합효소연쇄반응조건으로 증폭하였다. PE5700(PE Applied Biosystem)에서 측정된 threshold cycle(C_T)치를 얻고 표준검량선을 작성한 뒤, 이 검량선의 수식을 기준으로 G3PDH와 ecalectin을 정량화하는 상대적 정량법을 사용하였다.

비점막에 존재하는 ecalectin mRNA는 RT-PCR하여 얻은 산물을 아가로즈젤에 전기영동하여 얻어진 띠의 농도를 multi Gauge v2.02(Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 G3PDH값에 대한 상대치를 얻었다.

Ecalectin의 면역조직화학적 검사

Ecalectin의 면역조직화학적 염색에 사용된 항-ecalectin 항체는 Mayo Clinic(Rochester, MN)의 Roji Matsumoto에게서 제공받았다. 면역조직화학적 염색 과정을 간단히 살펴보면 냉동보관된 조직을 6~8 µm의 절편으로 만들어 2시간 동안 건조시킨 후, 실온에서 acetone에 10분간 고정한 후 0.05 M Tris buffered saline으로 3번 세척하였다. 비특이적 단백질반응을 없애기 위해 1% bovine serum albumin을 pH 7.4의 phosphate-buffered saline으로 습윤 chamber에서 5분간 반응시켰다. Ecalectin 일차항체를 1 : 50으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 같은 농도의 horseradish peroxidase-labeled conjugate IgG로 30분간 반응시켰다. 발색제는 New Fuchsin (DACO, Carpinteria, CA)을 사용하였으며, 대조염색을 위해 2분간 hematoxylin과 반응시켰다. 대조 염색을 위해 Spodoptera frugiperda 세포를 사용하였다.

연구자료 분석

세 그룹간의 ecalectin mRNA의 발현은 one way ANOVA를 이용하여 비교분석하였으며, 사후검정은 Scheffe 법을 사용하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

결핵균 DNA의 농도에 따른 C_T 치의 변화는 10,000 fg에서 10 fg까지 직진성을 잘 유지하였으며(Fig. 1), 이 계산식을 기준으로 하여 ecalectin mRNA의 발현을 정량 분석하였다. 정상 하비갑개의 경우 394.2 ± 166.4 fg, 알레르기성 비염 하비갑개의 경우는 736.9 ± 194.1 fg, 비알레르기성 비염의 경우는 641.8 ± 267.9 fg로 정상 하비갑개에 비해 알레르기성 비염과 비염 조직에서의 ecalectin mRNA의 발현이 유의하게 증가되었다(Fig. 2). 비즙의 경우는 알레르기성 비염 환자에서만 ecalectin mRNA의 발현이 있었다(Fig. 3).

면역조직화학적 검사에서는 양성대조군의 세포에는 강

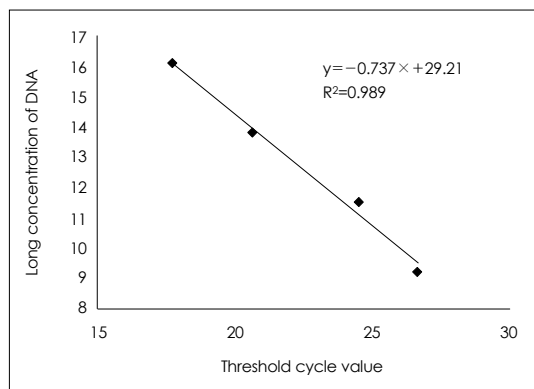


Fig. 1. Correlation between *Mycobacterium tuberculosis* DNA concentration and threshold cycle value.

하게 염색되었으나 연구 대상인 세균의 경우에는 매우 약하게 염색이 되었으며, 비염의 경우는 12례 중 5례, 알레르기성 비염의 경우 6례 중 4례, 정상 하비갑개의 경우는 8례 중 3례에서 양성 세포를 확인할 수 있었으며, 세 군 모두 점막하 선세포들이 양성으로 염색되었다(Fig. 4).

고 찰

알레르기성 비염과 비염성 만성 부비동염은 조직내 호산구 증가를 특징으로하는 만성 염증성 질환이다. 이들 염증반응에는 각종 화학매개물질에 의한 염증세포의 동원과 세포 상호간의 작용이 중요한 역할을 담당한다. 혈중 호산구의 조직내 동원을 위해서는 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), very late activation antigen-4 (VLA-4) 등에 의해 호산구가 운반되어 포획되고, 접착된 호산구가 화학주성물질에 의해 활성화되어 혈

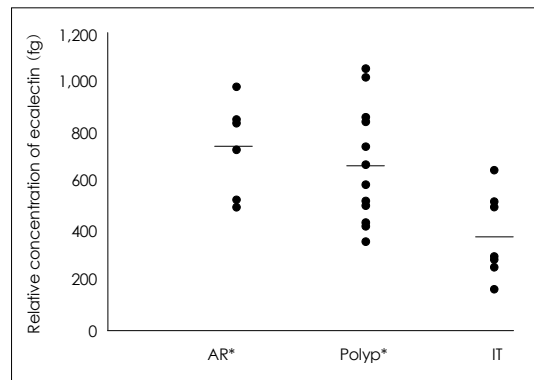


Fig. 2. Ecalectin mRNA expression in inferior turbinates of allergic rhinitis (AR), non-allergic nasal polyps (Polyp) and normal inferior turbinates (IT). Ecalectin mRNA expressions were significantly higher in AR and Polyp than IT ($p < 0.05$).

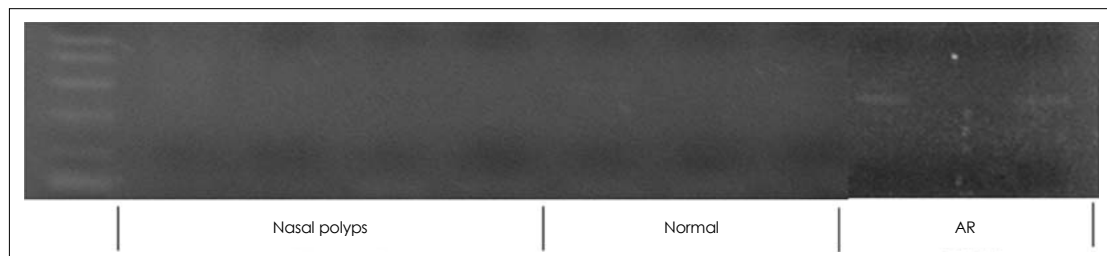


Fig. 3. RT-PCR analysis of mRNA expression encoding ecalectin by nasal secretion of non-allergic nasal polyps, normal inferior turbinates and allergic rhinitis. Only nasal secretion of allergic rhinitis expressed ecalectin mRNA.

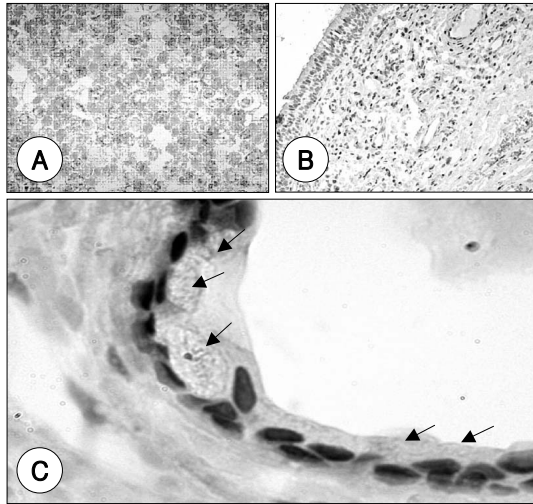


Fig. 4. Immunohistochemical staining of ecalectin. A) positive control staining with *Spodoptera frugiperda*. B) Epithelial and subepithelial cells didn't stained with ecalectin antibody ($\times 100$) but C) submucosal glandular cells (arrows indicate) were strongly stained with ecalectin antibody ($\times 400$).

관내피와의 결합성이 강해지면서 누출현상이 일어나고, CD31의 도움을 받아 조직 내로 이동하게 된다. 염증세포의 이동하기 위해서는 화학주성물질인 케모카인의 역할이 필요하며, 특히 호산구의 증가와 활성화를 위해서는 호산구에 특이적으로 작용하는 CC계 케모카인인 eotaxin과 RANTES 등의 화학매개물질이 필요하다.^{7,8)} 최근 T 림프구에서 만들어지는 호산구에 특이적으로 화학주성을 가지는 물질인 ecalectin이 발견되었으며, 이는 과거 galectin-9과 동일한 물질임이 밝혀졌고, 화학주성 능력은 RANTES와 유사하고 eotaxin의 50% 정도로 알려져 있다.⁹⁾ Ecalectin은 화학주성 외에도 호산구의 결합, 생존을 증가시키고, 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

염증성 비강 조직은 호산구의 이주와 활성화에 관여하는 eotaxin, RANTES, IL-5 등 다양한 화학매개물질이 존재하여 ecalectin이 주된 호산구 화학주성물질이라는 결론을 내릴 수는 없을 것이다. 2006년 Iino 등이 비강 조직의 ecalectin 발현에 대해 처음 보고하였으나 이 후 비강 질환에 대한 ecalectin의 역할이나 기능에 대한 보고는 거의 없는 상태이다.¹⁰⁾ 비강조직의 ecalectin은 점막하층 호산구가 많이 존재하는 영역의 섬유모세포, 대식세포와 혈관내피세포에 양성으로 염색되어 ecalectin이 호산구 증

가에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 일반적으로 ecalectin이 림프구에서 생성된다는 보고와는 다른 결론이었다. 본 연구에서도 기존의 연구와는 달리 점막하 선세포에서 ecalectin 양성으로 염색되는 소견을 보여, ecalectin이 비강조직에서 비강으로 분비될 것이라는 가능성을 알 수 있었으며, 알레르기성 비염 환자의 비침에서 ecalectin mRNA를 확인할 수 있었다. 만성 부비동염환자의 비침에서는 ecalectin mRNA의 발현을 확인할 수 없었는데 이는 연구 대상자가 알레르기를 동반하지 않는 부비동염환자로 만성 부비동염보다 알레르기 질환에서 ecalectin과 호산구의 역할이 보다 더 중요한 것에 기인할 것이다.

비강조직에서의 ecalectin mRNA의 발현은 알레르기를 동반하지 않는 하비갑개에 비해 알레르기성 비염을 동반한 하비갑개와 알레르기를 동반하지 않는 비염에서 유의하게 증가하였다. 이들 두 질환 모두 조직 호산구 증가를 특징으로하여 이들 질환에서 ecalectin이 호산구 증가에 영향을 미침을 간접적으로 알 수 있었다. 본 연구에서 비알레르기성 비염을 연구 대상으로 하였는데 이는 비염의 경우 알레르기 동반 여부와 무관하게 조직내 호산구 증가 소견을 보이며, 화학매개물질의 구성도 Interleukin-5를 제외한 대부분이 유사하여, 알레르기성 비염의 영향을 배제하기 위하여 알레르기를 동반한 비염을 연구대상에서 제외하였다.¹¹⁾

이상의 결과를 종합해 보면 정상 하비갑개에 비해 알레르기성 비염과 비염 조직에서 ecalectin mRNA의 발현이 증가하였고, 비침의 경우는 알레르기성 비염 환자에서만 ecalectin의 발현이 있었다. 면역조직학적 검사에서는 점막하 선세포에서 ecalectin이 발현되어 기존의 연구결과와 차이를 보였다. 지금까지 비과학 영역에서 ecalectin의 역할과 기능에 대한 연구는 매우 미비하여 결과 분석에 어려움이 있었다. 향후 ecalectin에 대한 보다 많은 연구가 이루어진다면 비강 질환에서의 호산구 이주와 조직내 증가 기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

중심 단어 : Ecalectin · 호산구 · 케모카인 · 비염중 · 알레르기성 비염.

■ **감사문**

본 연구의 ecalectin 항체와 양성 대조염색을 위한 세포를 제공해 주신 Mayo Clinic Immunology Lab.의 Roji Matsumoto에게 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- 1) Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus non-allergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96 (4):537-44.
- 2) Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994;269 (33):20807-10.
- 3) Dunphy JL, Balic A, Barcham GJ, Horvath AJ, Nash AD, Meeusen EN. Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *J Biol Chem* 2000;275 (11):32106-13.
- 4) Tureci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* 1997;272 (10):6416-22.
- 5) Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner EI, Kanwar YS. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of Galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J Clin Invest* 1997;99 (10):2452-61.
- 6) Matsumoto R, Hirashima M, Kita H, Gleich GJ. Biologic activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor. *J Immunol* 2002;168 (4):1961-7.
- 7) Ebisawa M, Yamada T, Bickel C, Klunk D, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. Effect of chemokine RANTES. *J Immunol* 1994;153 (5):2153-60.
- 8) Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose JP, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182 (4):1169-74.
- 9) Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998;273 (27):16976-84.
- 10) Iino Y, Miyazawa T, Kakizaki K, Saigusa H, Katano H, Shiga J, et al. Expression of ecalectin, a novel eosinophil chemoattractant, in nasal polyp. *Acta Otolaryngol* 2006;126 (1):43-50.
- 11) Hamilos DL. Chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106 (2):213-27.