臨床耳鼻：第 26 卷　第 2 號　2015
J Clinical Otolaryngol 2015;26:236-242
□원　저□

인간성대 섬유아세포주에서 Acid와 Pepsin의 효과

부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실
박찬휘 · 신성찬 · 박희영 · 이병주

Effects by Acid and Pepsin Exposure in Human Vocal Fold Fibroblast

Chan-Hwi Park, MD, Sung-Chan Shin, MD, Hee-Young Park and Byung-Joo Lee, MD, PhD
Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, School of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

－ ABSTRACT －

Background and Objectives：Laryngopharyngeal reflux, the backflow of gastric contents into the pharynx and larynx, is among the most important factors behind the development of inflammatory disorders of the upper airway. Our objective was to clarify the effects of exposure of the acid and pepsin in the laryngopharyngeal reflux disease by carrying out research on gene changes in the human vocal fold fibroblast. **Material and Methods**：To make a cell culture solution of acidic conditions of pH4 and 5 by using a 0.01 M hydrochloric acid. Pepsin was prepared in 0.5 mg/mL concentration dissolved in 0.9% sodium chloride. Pepsin was added to the cell culture fluid of pH4 and pH5 acid. The prepared acidic cell culture solution for each condition was treated for 5 minutes on the fibroblasts of the vocal folds. Then to remove the acidic cell culture solution, the vocal fold fibroblast culture fluid was incubated for 6 hours. After the culture, real time PCR, MTT assay and LDH assay were carried out. **Results**：The human vocal fold fibroblast in the pH4 acidic cell culture medium containing pepsin has the highest cell damage form. We confirmed these results by using the MTT assay and LDH assay. After incubation for 6 hours, it was confirmed that the cell was returned in the normal form of a vocal fold fibroblast in all experimental groups compared to the control groups. There are no significant differences of gene expression after acid and/or pepsin treatment in human vocal fold fibroblast. **Conclusions**：The most critical effect on the damage to the vocal fold cells was the interaction of pH4 acidic environment and pepsin than acting alone or pH5 environment. **(J Clinical Otolaryngol 2015;26:236-242)**

KEY WORDS：Laryngopharyngeal reflux disease (LPRD) · Human vocal fold fibroblast · Acid · Pepsin · Gene expression.

서　론

인후두 역류증(laryngopharyngeal reflux, LPR)은 구역이나 구토 없이 위의 내용물이 인후두로 역류하는 현상으로 정의되며 인후두 역류질환(laryngopharyngeal reflux disease, LPRD)은 인후두 역류가 임상증상과 인후두의 형태학적인 변화 등의 합병증을 동반하는 경우를 말한다. 인후두 역류증은 과도한 위산 분비로 인해 위산의 식도 역류가 발생하여 식도의 자극과 염증으로 하부식도 괄약근의 기능저하가 초래되거나 역류된 위산이 식도에 머무르는 시간이 길어짐으로써 발생할 수 있다.[1-3] 인후두 역류질환에서는 위식도 역류 질환에서

논문접수일 : 2015년　9월 30일
논문수정일 : 2015년 10월 20일
심사완료일 : 2015년 11월 18일
교신저자 : 이병주, 49241 부산광역시 서구 구덕로 179
부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실
전화 : (051) 240-7536 · 전송 : (051) 240-7536
E-mail : voiceleebj@gmail.com

흔하게 발생하는 가슴 쓰림, 산 역류, 오심, 구토, 연하곤란 등의 증상이 없이 대개 인후통, 만성적인 헛기침, 애성, 인후두 이물감 등의 비특이적인 증상만을 보이며, 인두나 후두로의 소량의 위산 역류로도 다양한 후두 증상이 나타날 수 있다. 또한 기립시에도 증상이 나타나며 식도 운동장애나 식도 내 산 제거 지연 등이 잘 나타나지 않는 등 위식도 역류질환과는 많은 차이를 보여, 위식도 역류질환과는 다른 기전이 작용할 것으로 생각되고 있다.[4-6)]

인후두 역류질환의 진단을 위해서는 병력 청취를 통해서 특징적인 증상을 확인하는 것 이외에도 객관적으로 위산의 역류를 확인하기 위하여 후두경 검사, 위내시경 검사, 위식도 조영술, 이중 탐침 24시간 위산역류 검사 등의 검사를 시행할 수 있다. 최근 이중 탐침 24시간 위산역류 검사가 인후두 역류질환 진단의 중요한 도구가 되었으나 산성 성분에만 국한된 분석의 한계로 후두 이상소견 및 후두 증상과 일치하지 않는 결과를 보이며, 이는 후두 상피세포에 영향을 미치는 다른 인자를 고려해야 함을 의미한다.

인후두 역류질환은 그 병인이 아직 확실하게 밝혀지지 않았고 그 진단과 치료에는 아직 다양한 이견이 존재한다. 인후두 역류질환에서 후두 상피세포에 영향을 미치는 인자를 규명하려는 연구가 최근에는 산성 환경뿐만 아니라 펩신(pepsin), 분자생물학적 인자로 진행이 되고 있다. 본 연구는 인간성대 섬유아세포주를 이용하여 산성과 펩신의 노출 시 섬유아세포의 사이토카인(cytokine), 성장인자(growth factor), 세포외 기질(extracellular matrix)의 변화에 대한 연구를 시행하여 인후두 역류질환에서 산성과 펩신의 노출에 대한 영향을 분자생물학적으로 규명하는 하고자 한다.

대상 및 방법

인간 성대 섬유아세포 배양

미국 위스콘신 대학에 있는 Susan L. Theleault로부터 얻은 인간 성대 섬유아세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 현탁하여 37℃, 5% CO2 조건의 배양기에서 배양하였다. 0.02% Trysin-EDTA로 세포를 분리한 다음 24-well에 50,000개의 세포를 심은 후 80%가 될 때까지 배양하여 실험하였다.

산(Acid)와 펩신(pepsin) 처리

0.01 M 염산을 이용하여 pH4와 5의 산성조건의 세포배양액을 만들었다. 펩신은 0.9% 염화나트륨에 녹여 0.5 mg/mL 농도로 준비하였다. 펩신을 pH4와 pH5 산성 세포배양액에 첨가하여 각 pH조건에 펩신이 첨가된 세포배양액을 만들었다. 준비된 산성세포배양액을 세포에 처리하기 전 성대 섬유아세포 배양액을 제거한 다음 PBS로 세포를 세척하였다. 준비한 각 조건의 산성세포배양액을 성대 섬유아세포에 5분간 처리하였다. 그 후 산성세포배양액을 제거하고 성대 섬유 아세포 배양액을 넣은 후 6시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 채취하여 real-time PCR assay와 MTT assay를 실시하였다. 배양액은 LDH assay에 이용하였다. 각 실험은 3회 반복하였다.

세포증식 및 세포독성 측정

세포증식은 MTT assay로 측정하였다. 각 well에 MTT labeling reagent(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여(최종 농도는 0.5 mg/mL), 5% CO2, 37℃ 조건의 세포 배양기에서 4시간 반응시켰다. 반응액을 제거한 후, 안정액(DMSO : dimethylsulfoxide)을 각 well에 넣고 5분간 반응시켰고, 환원된 MTT를 완전히 용해시켜 scanning multiwell spectrophotometer(Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 세포 생존율은 LDH assay로 측정하였다.

Real-time PCR

Trizol reagent를 이용하여 세포에서 총 RNA를 분리하였다. RNA를 cDNA로 전환시키는 역전사 과정을 다음과 같이 실행하였다. 각각의 100 ng RNA와 100 pmole oligo dT primer를 섞어서 65℃에서 5분간 반응시킨 후, 얼음 위에서 식혔다. 반응액을 RT premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 넣고 최종부피 20 μL가 되도록 RNase가 포함되지 않은 물을 첨가한 뒤 잘 배합하여 42℃에

서 60분이 경과한 다음, 다시 94℃에서 5분간 반응시켰다. 역전사 반응을 마친 용액은 4℃에 보관하였다. Real-time PCR에 앞서 유전자의 발현을 확인하기 위하여 특수 표지자(primer)를 제작하였다(Table 1). 또한 각각의 유전자 표지는 모든 세포에 고루 발현되는 GAPDH 유전자로 표준화하였다. Real-time PCR은 역전사 과정으

Table 1. Sequences of primers

	Primers (5'-3')		Annealing temperature (℃)
	Forward	Reverse	
TGF beta-1	GGTTATCTTTTGATGTCACCG	GTTATGCTGGTTGTACAGGG	53
VEGF	CTACCTCCACCATGCCAAGT	TCTCTCCTATGTGCTGGCCT	55
MMP-1	CAACTTACATCGTGTTGCGG	ACCGGACTTCATCTCTGTCG	61
Decorin	GATGCAGCTAGCCTGAAAGG	TCACACCCGAATAAGAAGCC	55
Collagen type I	ATGCCTGGTGAACGTGGT	AGGAGAGCCATCAGCACCT	53
GADPH	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC	TTCTGCTTGAGAGGTGACTGA	58

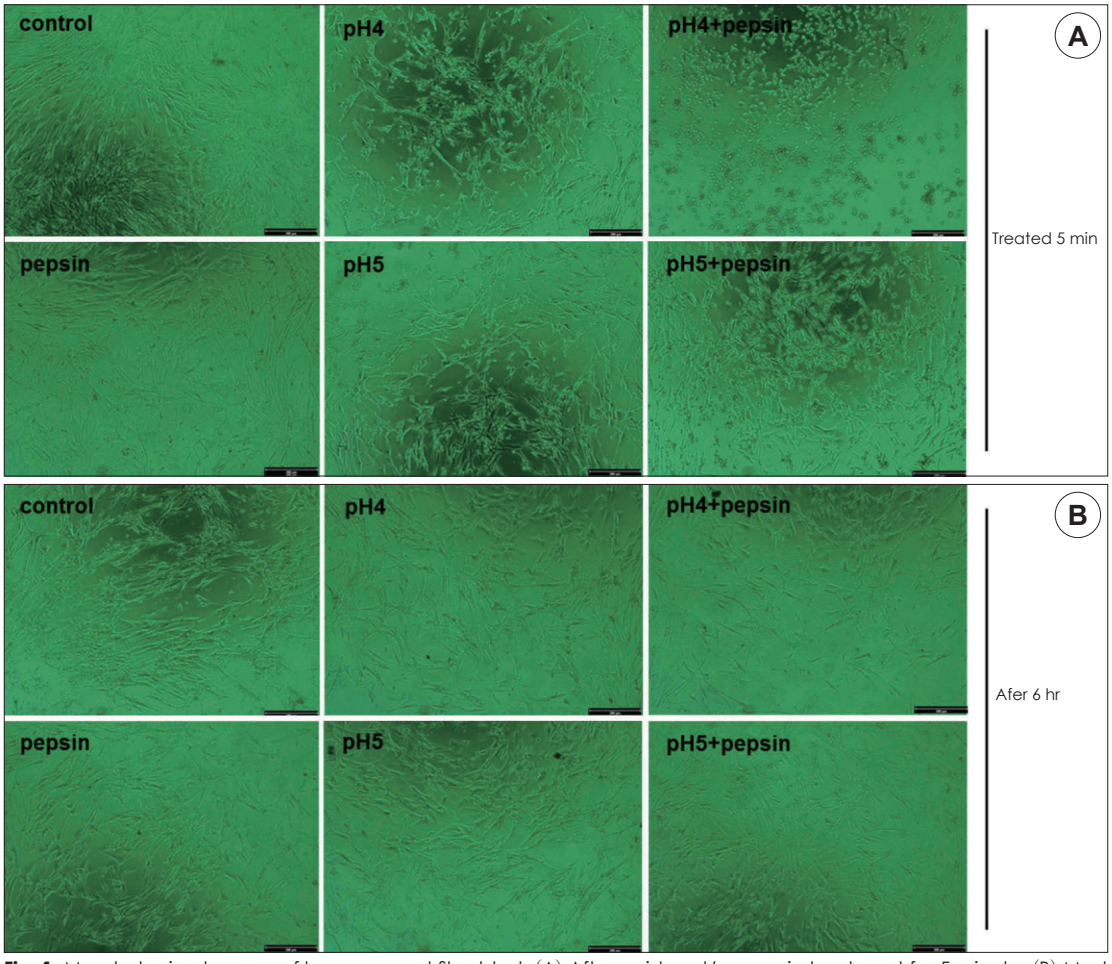

Fig. 1. Morphologic changes of human vocal fibroblast. (A) After acid and/or pepsin treatment for 5 minute, (B) Most of fibroblast was recovered after 6 hour.

로 통해 얻은 cDNA 10 ng과 SYBR Green, 각각의 표지자를 섞은 후 혼합된 용액을 Lightcycler capillary에 옮겨 담고, 다음과 같은 과정을 진행 하였다. 94℃에서 5분간 동안 반응 시킨 후, 94℃(30초)-55-60℃(1분)- 72℃(1분) 과정을 40번 반복하고, 72℃에서 5분간 반응을 완료하였다. 기기의 모니터에서 증폭되는 과정을 확인하였고, 증폭 양에 대한 자료를 얻었다.

결 과

형태학적 변화

인간 성대 섬유아세포에 산성세포배양액과 펩신이 들어있는 산성세포배양액을 5분간 처리하였을 때, 산성과 펩신을 처리하지 않은 대조군에 비교해 펩신만 처리한 군, pH5 산성세포배양액을 처리한 군, 펩신이 들어간 pH5산성세포배양액에서는 미세한 손상 정도를 받은 것을 확인하였다. pH4 산성세포 배양액을 처리한 군에서는 펩신이 들어간 pH4산성세포배양액보다 손상 정도는 적으나 거의 모든 세포에서 섬유아세포 형태 변형을 일의 키는 것을 확인하였고 펩신이 들어간 pH4산성세포배양액에서 세포손상도가 가장 높아 섬유 아세포 형태가 변형되고 일부 세포가 세포배양접시에서 떨어져나가는 것을 확인하였다(Fig. 1).

그러나 산성 세포배양액에 5분간 처리한 후 37℃, 5% CO2 조건의 배양기에서 6시간 동안 배양한 후 세포형태를 관찰한 결과에서는 대조군에 비교해 모든 실험군에서 세포가 성대 섬유아세포 형태로 돌아오는 것을 확인하였다(Fig. 1).

MTT assay LDH assay

인간 성대 섬유아세포에 산성과 펩신을 처리하였을 때 세포의 생존과 독성을 알기 위해 MTT assay와 LDH assay를 시행하였다. pH4 산성 세포배양액과 pH4 산성 세포배양액에 펩신을 포함된 경우에 세포의 독성이 가장 심하여 세포의 증식능이 35.8%로 감소하였다(Fig. 2). pH5 산성 세포배양액과 펩신을 같이 처리한 경우에는 17% 감소하였다. 이러한 소견은 세포의 형태학적 소견과 일치하였다.

LDH assay에서는 pH4 산성 세포배양액에 펩신이 포함된 경우 세포 괴사는 6.7% 증가하였고, pH5 산성 세포배양액에 펩신이 포함된 경우에는 세포 괴사는 3.74% 증가하였다. 이러한 세포독성의 증가는 의미있는 소견이었다.

유전자에 대한 RT-PCR

pH 4, 5의 산성 세포배양액과 펩신을 처리한 후 MMP-1, TGF-beta, IL-6, IL-8, VEGF, Decorin, Collagen 등의 유전자 변화를 측정하였지만, 의미있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

인후두 역류증과 연관된 후두 점막의 형태 변화에 대한 연구는 식도 점막에서의 연구에 비해 늦게 시작되어

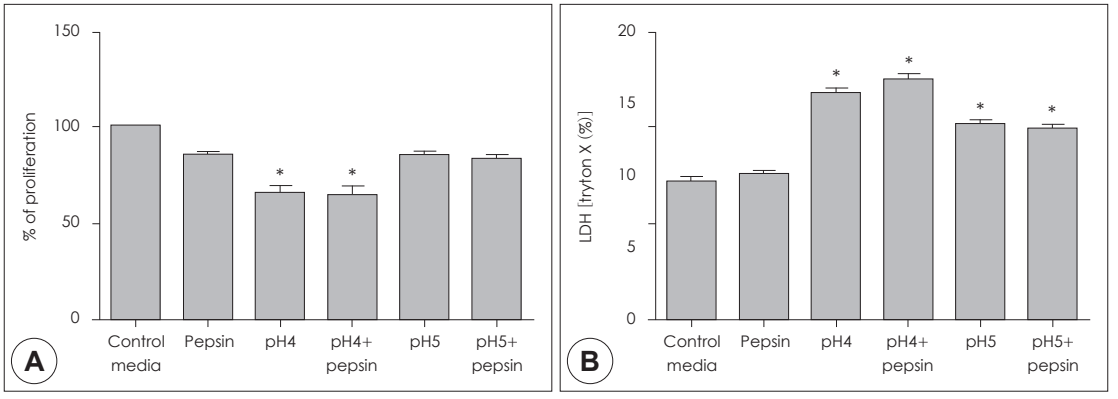

Fig. 2. MTT assay (A) and LDH assay (B). The most severe fibroblast damage occurred during pH 4 acid and pepsin treatment.

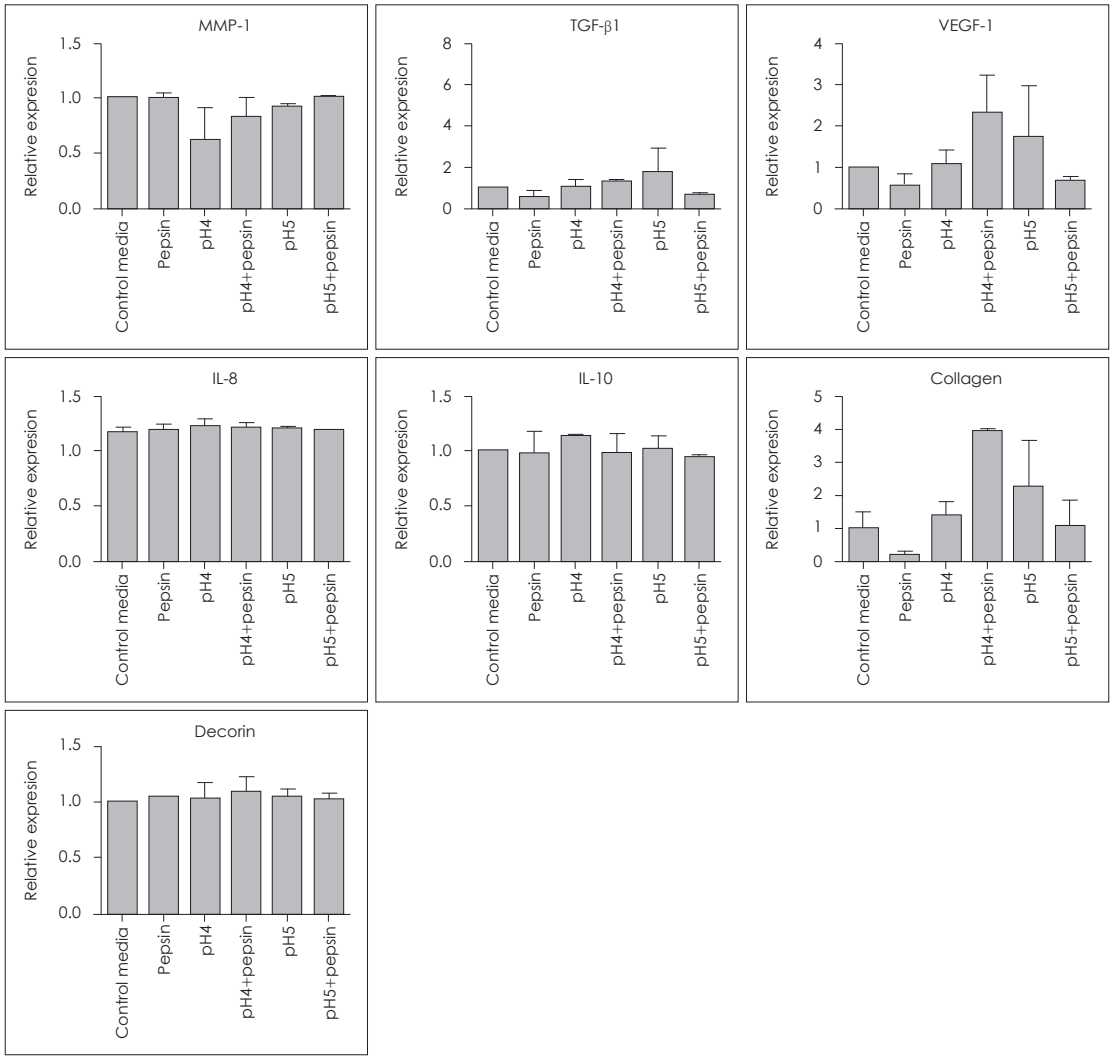

Fig. 3. Changes of gene by Real-time PCR after acid and/or pepsin treatment. There are no significant differences of gene expression after acid and/or pepsin treatment in human vocal fold fibroblast.

그 결과가 아직 잘 알려져 있지 않다. 위식도 역류 질환과 인후두 역류증은 위산과 펩신에 반복적인 노출로 인한 방어기전의 파괴가 발병 원인으로 생각되고 있으나 그 병태 생리와 분자 수준에서의 기전은 밝혀져 있지 않다.

역류에 대한 방어 작용의 실패는 역류된 위 내용물에 의한 노출의 증가가 선행 인자로 생각되고 있다. 역류된 위액의 성분이 그로 인한 합병증의 발생에 매우 중요한데,[7] 위산 단독으로는 정상적인 상태에서 큰 손상을 일으키지는 않으나 펩신이 함께 존재하는 경우에는 점막 손상의 빈도가 증가하게 된다.[8] 식도에서 역류성 위산과 펩신이 세포간 결합 형태를 변화시켜 상피 세포의 방어 기능을 무력화함은 이미 많은 연구들을 통하여 잘 알려져 있다.

펩신은 위 점막의 주세포(chief cells)에서 분비되는 단백질 분해효소로, 미주신경 자극이나 위 팽창에 의하여 효소전구체(zymogen)인 펩시노젠(pepsinogen)으로 분비된 후 위산에 의하여 분해되어 활성화된다.[9,10] 인후두 역류질환에서 이중 탐침 24시간 위산 역류검사는 후두 이상소견 및 후두 증상과 항상 일치하지는 않으며,

많은 연구에서 양자펌프 억제제의 경험적 사용을 통한 증상의 호전으로 인후두 역류질환을 진단하는 방법이 다른 검사방법들에 비하여 경제적, 임상적으로 유용하다고 보고하고 있지만,[11] 또 다른 다수의 연구들에서는 양자펌프 억제제의 효과에 대한 부정적인 결과들을 보고하고 있다.[12] 이러한 사실들은 인후두 역류질환이 산성 환경 이외의 인자에 대해서도 고려해야 함을 시사하며, 펩신이 그 중요한 인자로 고려되어지는 이유이다. 또한 펩신은 위에서만 생성이 되기 때문에 인후두 부위에서 검출이 될 경우 인후두 역류의 증거를 뒷받침해 주는 인자로 활용이 될 수도 있다.[13,21]

기존 연구에서 문제점 중 하나인, pH 4 미만인 경우에만 역류로 진단되는 제한적 기준으로 인해 산도가 약한 (pH 4~7) 위산의 역류도 식도나 인후두의 점막에 손상 가능성이 인식되어 왔으나 이에 대한 연구는 미흡하거나 이루어지지 않고 있다.[14] 위산과 펩신에 의해 유도된 후두 염증의 시간 경과에 따른 생체 외 연구에 의하면 connective tissue growth factor(cTGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), matrix metalloprotease (MMP)-2, fibroblast growth factor(FGF), activating transcription factor(AFT) 등의 유전자 발현이 이미 pH 5부터 시작되어서 약산성의 환경도 펩신과 함께 세포 염증 반응을 유발시키는데 충분할 것으로 생각되었다.[15,16] 언급된 단백질 인자들은 상처회복, 염증과정, 혈관생성, 종양성장과 치료 반응에 있어 중요한 매개체로서의 의미가 있다.[17-19]

본 연구에서는 위산 역류에 의한 성대 손상 기전에 대한 연구를 위해 인간성대 섬유아세포주를 이용하여 산성 (pH 4, pH 5)과 펩신을 단독 또는 함께 노출시켰을 때 섬유아세포의 사이토카인, 성장인자, 세포외 물질 변화들에 대해 분자생물학적 표지자를 이용하여 규명하려 하였다. 세포증식과 세포독성은 각각 MTT assay와 LDH assay를 통하여 이루어졌으며, 세포손상 과정에서 나타나는 각종 사이토카인과 성장인자의 변화에 대해 유전자 발현율을 통해 살펴보았다.

우선 MTT assay와 LDH assay를 통해 pH4 산성세포배양액과 펩신이 함께 처리된 세포배양액에서 다른 군에 비해 섬유아세포의 세포 손상이 많음을 확인할 수 있었다. 그런나 섬유아세포의 유전자 중 MMP-1, IlL-8, IL-10, TGF-β1, VEGF-1, Collagen, Decorin 등의 유전자에는 의미있는 변화는 관찰되지 않았다.

이러한 결과들을 종합해 보면 인후두 역류질환에서 pH4 산성 환경과 펩신의 상호작용이 단독으로 작용했을 때와 pH5인 환경에 비해 성대세포의 손상에 가장 결정적인 작용을 하는 것으로 결론 지을 수 있다. 이는 Ylitalo 등의 연구를 통해 염증의 생성에 산성과 펩신의 작용을 떼어 놓기 어려우며, 펩신은 산성 환경에서 활성화 되기 때문에 둘의 상호작용은 인후두 역류질환에서 함께 고려되어야 할 인자임이 분명해 보인다는 결과와 일치한다.[20]

하지만, 이번 연구는 산성 환경과 펩신의 작용이 인후두 역류질환에서 인간성대 세포에 미치는 영향에 대해 분자 생물학적으로 살펴본 것으로 이 결과만으로 인후두 역류질환의 병태생리를 모두 설명할 수 있는 것은 아니다. 개체 내에 선행된 인후두 점막의 방어 인자 감소 혹은 결핍 등의 유전적인 요인에 대한 개체 측면에서의 연구도 필요하며, 아직은 임상적으로 통용되는 가능한 측정법이 없는, 위 내용물 중 비산성 물질들인 담즙과 이자액이 후두 병변의 발생에 어떤 역할을 담당하는지에 대한 역류된 내용물의 측면도 고려되어야 한다. 또한 중이염, 부비동염, 인후두의 양성 혹은 악성 질환 등의 주변부 질환과의 연관성에 대한 명확하고 객관적인 인과관계 또한 규명되어야 할 과제이다. 뿐만 아니라 환자의 성향과 기호, 직업, 음성 사용의 특성 및 습관 등의 요인들도 파악이 되어야 할 부분이다.[16]

향후 이러한 다인자에 대한 명확한 인과 관계 규명과 분자생물학적 연구를 통해 위산 분비를 억제하는데 그쳐있는 인후두 역류질환의 치료법을 개선하고 효과적인 진단과 치료법을 정립하는데 지속적인 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

중심 단어 : 인후두 역류증 · 인간성대 섬유아세포 · 산성 · 펩신 · 유전자 발현.

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2012R1A1A4A01009912).

REFERENCES

1) Schreiber S, Garten D, Sudhoff H. *Pathophysiological*

mechanisms of extraesophageal reflux in otolaryngeal disorders. Eur Arch Otorhinolaryngol 2009;266(1):17-24.

2) Shin KS, Tae K, Jeong JH, Jeong SW, Kim KR, Park CW, *et al. The role of psychological distress in laryngopharyngeal reflux patients: a prospective questionnaire study. Clin Otolaryngol 2010;35(1):25-30.*
3) Lee YJ, Kwak MK, Eom JH, Ji YB, Song CM, Tae K. *Optimal regimen and period for the treatment of patients with laryngopharyngeal reflux disease. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2014;57(10):698-702.*
4) Kim YM. *The management of laryngopharyngeal reflux disease. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2002; 45(9):835-8.*
5) Chung MK, Min JY, Oh JW, Jeong HS, Baek CH, Son YI. *The efficacy of 4-week short term theraphy with proton pump inhibitor as an initial treatment regimen for the patients with laryngopharyngeal reflux. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2005;48(6):796-800.*
6) Lee SH, Huh SH. *Recent trends of laryngopharyngeal reflux disease. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:519-25.*
7) Lanas A, Royo Y, Ortego J, Molina M, Sainz R. *Experimental esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits mimicking human reflux esophagitis. Gastroenterology 1999;116(1):97-107.*
8) Tobey NA, Hoseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. *The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. Am J Gastroenterol 2001;96(11): 3062-70.*
9) Foltmann B. *Gastric proteinases-structure, function, evolution and mechanism of action. Essay Biochem 1981;17: 52-84.*
10) Kageyama T. *Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. Cell Mol Life Sci 2002;59(2):288-306.*
11) Vaezi MF. *Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. Clin Cornerstone 2003;5(4):32-8; discussion 39-40.*
12) Qadeer MA, Phillips CO, Lopez AR, Steward DL, Noordzij JP, Wo JM, *et al. Proton pump inhibitor theraphy for suspected GERD-related chronic laryngitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Gastroenterol 2006; 101(11):2646-54.*
13) Lee SH, Jin SM, Nikki Johnston. *The role of pepsin in laryngopharyngeal reflux. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2015;58(8):529-33.*
14) Sifrim D. *Acid, weakly acidic and non-acid gastro-oesophageal reflux: Differences, prevalence and clinical relevance. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16(9):823-30.*
15) Ylitalo R, Thibeault SL. *Relationship between time of exposure of laryngopharyngeal reflux and gene expression in laryngeal fibroblasts. Ann Otol Rhinol Laryngol 2006;115 (10):775-83.*
16) Woo JS. *Ultra-structural and molecular aspects of laryngopharyngeal reflux. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:394-400.*
17) Hom DB. *Growth factors and wound healing in otolaryngology. Otolaryngol Head Neck Surg 1994;110:560-4.*
18) Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T. *Increased expression of epidermal growth factor receptors in basal cell hyperplasia of the oesophagus after acid reflux oesophagitis in rats. Aliment Pharmacol Ther 2002;16(suppl 2):52-8.*
19) Lord RVN, Park JM, Wickramasinghe K. *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression in esophageal adenocarcinoma and Barret esophagus. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;125:246-53.*
20) Ylitalo R, Baugh A, Li W, Thibeault S. *Effect of acid and pepsin on gene expression in laryngeal fibroblasts. Ann Otol Rhinol Laryngol 2004;113:866-71.*
21) Chu HR. *Pathophysiology of laryngopharyngeal reflux disease. J Clinical Otolaryngol 2009;20(1):3-8.*