



Peroxiredoxin 2 Inhibits Lipopolysaccharide Induced Mucin Expression and Reactive Oxygen Species Production in Human Airway Epithelial Cells

Joon-Hee Kim¹, Sooyeon Jo¹, Sangjae Lee¹, Gi Moon Yoo¹, Hyung Gyun Na¹, Yoon Seok Choi¹, Chang Hoon Bae¹, Si-Youn Song¹, and Yong-Dae Kim^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; and

²Regional Center for Respiratory Diseases, Yeungnam University Medical Center, Daegu, Korea

사람 호흡기 상피세포에서 Peroxiredoxin 2에 의한 Lipopolysaccharide에 유도된 점액 발현과 Reactive Oxygen Species 생성의 억제

김준희¹ · 조수연¹ · 이상재¹ · 유기문¹ · 나형균¹ · 최윤석¹ · 배창훈¹ · 송시연¹ · 김용대^{1,2}

¹영남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, ²영남대학교병원 권역 호흡기 전문질환센터

Received March 11, 2021

Revised April 26, 2021

Accepted May 11, 2021

Address for correspondence

Yong-Dae Kim, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-

Head and Neck Surgery,

College of Medicine,

Yeungnam University,

170 Hyeonchung-ro, Nam-gu,

Daegu 42415, Korea

Tel +82-53-620-3781

Fax +82-53-628-7884

E-mail ydkim@med.yu.ac.kr

Background and Objectives Peroxiredoxin (Prx) is an antioxidant enzyme involved in signaling pathway. Prx2 is the most abundant in mammalian gray matter neurons and has protective role under oxidative stress. MUC5AC and MUC5B are typical mucin genes in human airway epithelial cells. Even if free radicals play a key role in chronic respiratory inflammatory diseases, the effects of the Prx2 on mucin expression and oxidative stress are not clearly known. The purpose of this study is to investigate the effect of Prx2 on lipopolysaccharide (LPS)-induced MUC5AC/5B expression and reactive oxygen species (ROS) in human airway epithelial cells.

Subjects and Method In NCI-H292 cells and human nasal epithelial cells, the effects of Prx2 on LPS-induced MUC5AC/5B expression and ROS production were investigated using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry analysis.

Results MUC5AC, MUC5B mRNA expression and protein production were increased by LPS. ROS production was also increased by LPS. Prx2 suppressed the LPS-induced MUC5AC mRNA expression and protein production as well as ROS production. However, Prx2 did not inhibit MUC5B mRNA expression and protein production. N-acetylcysteine, diphenyleneiodonium, and apocynin also inhibited LPS-induced ROS production.

Conclusion These results may show that Prx2 suppresses LPS-induced MUC5AC expression via ROS in human airway epithelial cells.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2021;64(12):887-95

Keywords Human airway epithelial cells; Mucin; MUC5AC; Peroxiredoxin 2; Reactive oxygen species.

서론

Peroxiredoxin (Prx)는 항산화 효소로, 사이토카인에 의해

발생하는 과산화물의 농도를 조절함으로써 세포 내에서의 신호전달 과정에 관여하며, Prx1, Prx2, Prx3, Prx4, Prx5, Prx6의 6종류가 알려져 있다. Prx는 설펜산(sulfenic acid)을

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

싸이올(thiol)로 다시 환원시키는 방법에 따라 전형적 2-Cys Prxs, 비전형적 2-Cys Prxs, 그리고 1-Cys Prxs의 세 가지 종류로 분류된다. 전형적 2-Cys Prxs에 포함되는 Prx2는 포유동물의 회백질 뉴런에 가장 풍부하게 분포하며 산화 스트레스로부터 뉴런의 손상을 최소화하는 역할을 하며, apoptosis signal-regulating kinase 1을 억제하고 natural killer cell의 활동을 증가시키는 역할을 한다.^{1,2)}

점액단백(mucin)은 고분자 당단백으로 점액(mucus)의 겔(gel)과 같은 성상에 영향을 미친다. 점액은 수분, 이온, 지질, 단백질, 당단백으로 이루어져 있으며, 호흡기 상피세포에서 분비되어 물리적인 보호기능과 윤활작용을 한다. 그리고 부착된 외부 물질을 섬모운동을 통해 배출시키며, 적절한 습도를 유지하도록 도와준다. 현재까지 점액유전자는 약 20여개가 발견되었고, MUC5AC와 MUC5B가 대표적인 호흡기 분비형 점소이다.³⁾

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성세균의 세포외막에 위치하는 물질로, 대식세포를 자극하여 활성산소(reactive oxygen species, ROS), 사이토카인, 염증성 매개물질 등을 유도한다. 만성 폐쇄성 폐질환, 천식 등의 만성 호흡기 염증성 질환에서 활성산소, 사이토카인, 염증성 매개물질 등에 의하여 MUC5AC와 MUC5B 점액유전자 발현이 증가하고, 점액의 성상이 변하거나 점액의 과분비가 일어나 병의 경과를 악화시킬 수 있다.^{4,5)} MUC5AC와 MUC5B 점액유전자 발현 증가에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있으나 항산화 효소와의 관계에 대한 연구는 미비한 실정이다.^{6,7)}

만성 호흡기 염증성 질환에서 LPS에 의해 유도된 활성산소가 호흡기 분비형 점소인 MUC5AC와 MUC5B의 발현과 단백질 생성에 중요한 역할을 하지만, 이와 관련된 항산화 효소인 Prx2가 점액유전자에 미치는 영향에 대해서는 명확히 알려져 있지 않은 상태이다. 이에 본 연구에서는 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포와 사람 코점막 상피세포에서 Prx2가 MUC5AC/5B의 점액 발현과 활성산소 생성에 미치는 영향을 살펴보았다.

대상 및 방법

세포 배양 및 처치

6-well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 사람 호흡기 상피세포의 점액상피양 암 세포주(human pulmonary mucocarcinoma cell line)인 NCI-H292 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 접종한 후 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), 100 µg/mL streptomycin, 2 mM

L-glutamine과 100 U/mL penicillin이 들어간 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 5%의 이산화탄소와 95%의 산소를 완전 습윤 환기된 배양기에서 37°C를 유지하여 배양하였다. 75%가량 배양한 세포를 0.5% fetal calf serum이 포함된 RPMI 1640 배지로 바꿔 24시간 배양하고, 이후 FBS가 포함되지 않은 세척된 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

알레르기 질환이나 당뇨병의 기저질환과 가족력이 없으며, 다중 알레르기항원검사(multiple allergen simultaneous test)와 피부단자시험(skin prick test)에서 음성반응이 나온 10명을 대상으로 하여 응비술 중에 발생한 하비갑개 적출물 조직에서 사람 코점막 상피세포를 채취했다. 하비갑개 점막조직을 일차배양 하기 위해 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하여, dispase (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)에 90분 동안 침전시켰다. 외과용 수술칼로 하비갑개 점막의 표면을 벗겨낸 후, 1% PBS를 추가하여 mesh에 여과하였다. 하비갑개 점막 상피세포들을 24-well (2.5×10^5 cells/well) plate에 접종하여, keratinocyte growth supplement (5/500 mL of medium; Cascade Biologics, Portland, OR, USA)와 EpiLife medium (Cascade Biologics)에서 배양하였다.

Prx2가 LPS에 의해 유도된 점액유전자 발현과 점액단백의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양 NCI-H292 세포와 코점막 배양세포에서 각각 다른 농도(0.01, 0.1 µg/mL)의 Prx2 (Novus NBC1-25855, Centennial, CO, USA)를 전처치한 1시간 후에 100 ng/mL 농도의 LPS (from *Pseudomonas aeruginosa* 10, L8643; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 투여하였다. 점액유전자 분석을 위해 LPS 처치 후 8시간째 모든 RNA를 동정하였고, 점액단백을 분석하기 위해서는 LPS 처치 24시간 후에 단백질질을 분리하였다.

처리 약제의 NCI-H292세포와 코점막 상피세포에 대한 세포독성은 WST-1 분석(EZ-CYTOX; Daeil Lab, Seoul, Korea)과 현미경으로 세포 형태 변화 유무를 관찰하여 확인하였다. 본 연구에서 시행된 모든 실험은 3개의 독립된 세포배지에서 3회 이상 반복된 실험을 통해 얻은 결과로 분석하였으며, 본원 임상 시험 심사 위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받아 본 연구를 시행하였다(YUMC 2020-09-058).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

RT-PCR kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)로 모든 RNA를 동정하였고, GeneAmp RNA PCR cored kit (Roche Applied Science)로 모든 RNA를 cDNA로

역전사 하였다. 실험에 사용된 primer의 염기서열은 이전 연구에 사용된 염기서열을 이용하였다(Table 1).

중합효소연쇄반응 과정을 각각 간단히 살펴보면, 2% bovine serum albumin을 함유한 PBS로 배양 세포를 3회 세척 후 Trizol[®] (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)로 총 mRNA를 추출하였다. MUC5AC mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성과정을 거쳐 60°C에서 60초간 결합반응, 72°C에서 60초간 연장반응을 33회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 실시하였다. MUC5B mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성과정을 거쳐 72°C에서 60초간 결합반응, 72°C에서 60초간 연장반응을 33회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 실시하였다. SYBR green이 함유된 1% agarose gel에 전기영동을 시행하여 증폭된 중합효소연쇄반응 산물을 관찰하였다. Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA)를 사용하여 띠(band)의 세기를 반정량적으로 분석하였으며, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 대조군의 세기와 비교하여 MUC5AC 점액유전자와 MUC5B 점액유전자 각각 상대적인 값으로 나타내었다.

Real-time PCR 분석

합성된 cDNA 0.5 µL에 GeneAmp RNA core kit, iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, US)로 real-time PCR을 시행하였다. Real-time PCR은 최종량이 10 µL가 되며, 2.5 mM의 MgCl₂와 그 최종 농도가 0.5 µM이 되도록 primer를 투여 후, 25 ng의 RNA 1 µL를 이용하여 시행하였다. 정량적 PCR은 CFX96 real-time PCR system C1000 thermal cycler (Bio-Rad)로 95°C에서 10초간 변성(denaturation)을 거쳐 60°C에서 5초간 결합(annealing)반응을 시킨 후, 72°C에서 10초간 연장(extension)반응 하였고, 동일 과정을 45회 반복하였다. 각 실험에서 증폭된 cDNA를 확인하기 위하여 GAPDH를 대조 유전자(internal control)로 사용하였다.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 분석

ELISA법을 이용하여 MUC5AC와 MUC5B의 점액단백의 함량을 측정하였다. 배양 세포에 시료를 처리 후 lysis buffer (50 mM Tris·Cl [pH 7.5], 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton X-100, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 단백을 분리하여 정량하였다. 96-well plate에 추출한 단백 100 µg을 담고 40°C에서 건조될 때까지 기다린 후 plate를 PBS로 3회 세척하였다. 2% bovine serum albumin으로 실온에서 1시간 동안 차단하여 비특이적 결합을 방지하였으며, PBS로 3회 세척한 다음 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:200으로 희석된 MUC5AC, MUC5B 점액단백 일차항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 이차항체(Santa Cruz Biotechnology)를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1:5000으로 희석하여 각 well에 첨가하였고, 1시간 후에 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine 용액으로 발색한 후, 2N-H₂SO₄로 중단시켰다. 450 nm에서 ELISA reader (EL800[®]; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 측정 후, 표준곡선으로 단백질의 양을 정량하였다.

Flow cytometry 분석

발생한 활성산소 함량 측정을 위해 flow cytometry법을 사용하였다. 대상 세포에 50 µM의 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate와 aredox-sensitive fluorescent dye를 40분 동안 처리한 후 PBS로 3회 세척하였다. Flow cytometry를 시작하기 전 0°C의 1 mL PBS suspension에서 세포를 유리하였다. Accuri[™] C6 Plus (BD Biosciences, Franklin lake, NJ, USA)에서 488 nm excitation beam을 이용하여 flow cytometry를 시행하였다. 신호는 530 nm 투과 밴드를 이용하여 추출하였으며, 5000개 세포에서 측정한 형광강도 평균을 기준으로 삼았다. Prx2와 여러가지 항산화 물질이 LPS에 의해 유도되는 ROS 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양 NCI-H292 세포와 코점막 배양세포에서 각각 다른 농도(0.01, 0.1 µg/mL)의 Prx2와 50 mM의 N-acetyl-

Table 1. Primer used for polymerase chain reaction amplification

Gene	Primary sequence	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
MUC5AC	F: 5'-TCA ACG GAG ACT GCG AGT ACA C-3' R: 5'-CTT GAT GGC CTT GGA GCA-3'	60	130
MUC5B	F: 5'-CAC ATC CAC CCT TCC AAC-3' R: 5'-GGC TCA TTG TCG TCT CTG-3'	60	245
GAPDH	F: 5'-CCTCCAAGGAGTAAGACCCC-3' R: 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'	60	145

cysteine (NAC), 100 nM의 dephenyleneiodonium (DPI), 30 μM의 apocynin을 전처리한 1시간 후에 100 ng/mL 농도의 LPS를 투여하였다. LPS 처치 30분 후에 flow cytometry를 시행하여 ROS를 측정하였다.

통 계

통계 처리는 Windows용 SPSS version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 *p*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 정하여 Student t-test를 이용하였다.

결 과

NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B 발현에 Prx2가 미치는 영향

NCI-292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B 발현에 Prx2가 미치는 영향을 RT-PCR, real-time PCR과 ELISA를 통하여 분석하였다. NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 Prx2를 전처리한 군에서는 통계학적으로 유의미하게 감소하였다 (Fig. 1A and B). 하지만 NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 Prx2를 전처리한 군에서 통계학적으로 의미 있는 변화가 없었다(Fig. 1C and D).

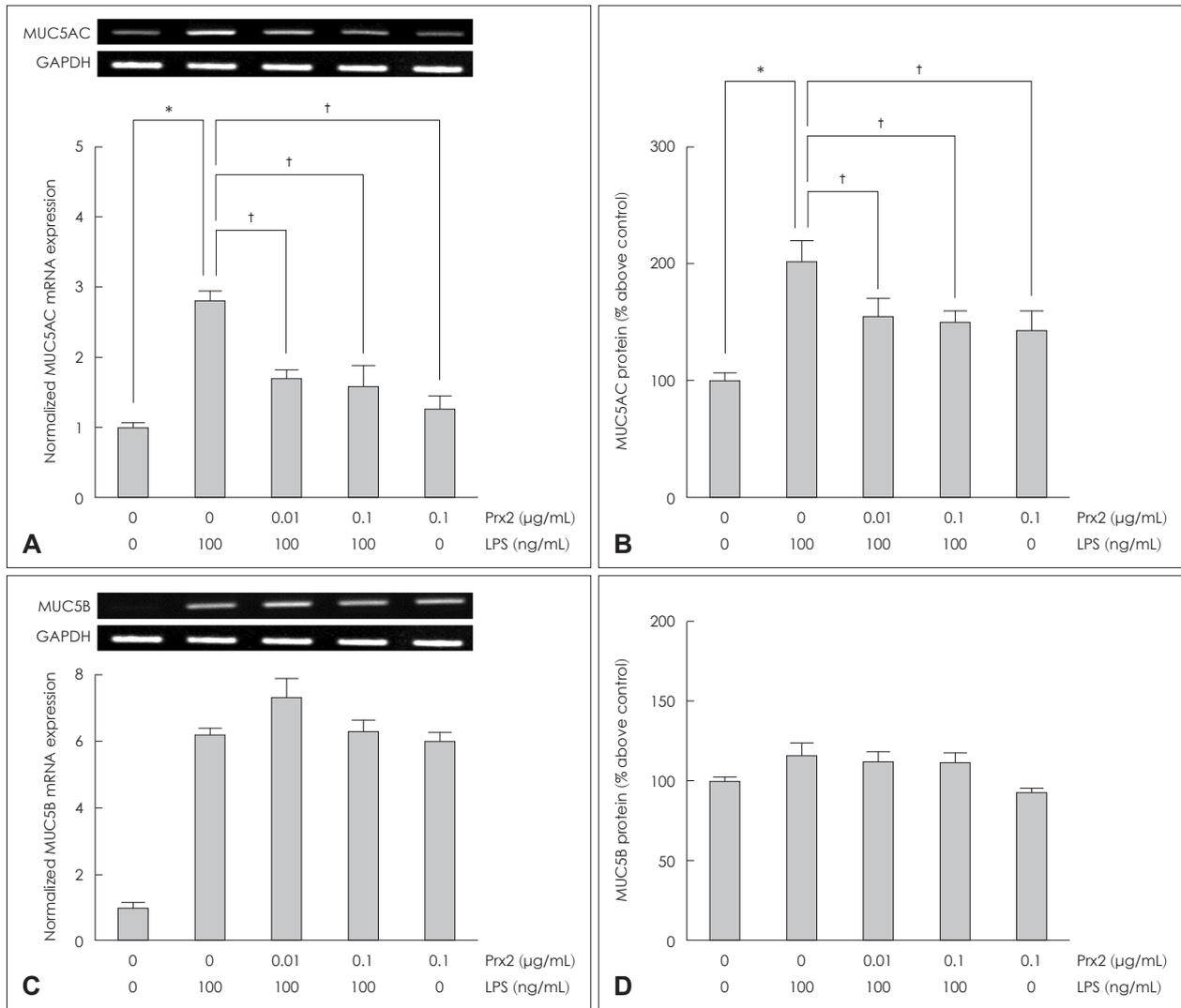


Fig. 1. The effects of Prx2 on LPS-induced MUC5AC and MUC5B expression in human NCI-H292 cells. Prx2 significantly decreased LPS-induced MUC5AC mRNA expression in reverse transcription-PCR, real-time PCR (A) and glycoprotein level in enzyme-linked immunosorbent assay (B). However, Prx2 did not have an effect on LPS-induced MUC5B mRNA expression (C) and glycoprotein production (D). Bars indicate the mean±standard deviation. **p*<0.05 compared with zero value; †*p*<0.05 compared with LPS (100 ng/mL). Prx2, peroxiredoxin 2; LPS, lipopolysaccharide; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 활성산소 생성에 Prx2가 미치는 영향

NCI-292 세포에서 Prx2의 농도에 따른 활성산소 생성을 알아보기 위하여 flow cytometry를 통하여 분석하였다. Prx2를 전처리하였을 때 LPS에 의해 유도된 활성산소 생성은 통계학적으로 유의미하게 감소하였으나, Prx2의 농도에 따른 활성산소 생성의 차이는 없었다. Prx2와 다른 항산화 물질의 항산화 효과를 비교하기 위하여 NCI-H292 세포에 Prx2와 NAC, DPI, apocynin을 전처리한 후 flow cytometry를 통하여 활성산소의 생성을 분석하였다. Prx2와 NAC, DPI, apocynin을 전처리한 모든 경우에서 LPS로 유도된 활성산소 생성이 통계학적으로 유의미 있게 감소하였으며, 활성산소

의 감소 효과는 서로 비슷하였다(Fig. 2).

사람 코점막 상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B 발현에 Prx2가 미치는 영향

사람 코점막 상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC와 MUC5B 발현에 Prx2가 미치는 영향을 RT-PCR, real-time PCR과 ELISA를 통하여 분석하였다. 사람 코점막 상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 Prx2를 전처리한 군에서는 통계학적으로 유의미하게 감소하였다(Fig. 3A and B). 하지만 사람 코점막 상피세포에서 LPS로 유도된 MUC5B의 mRNA 발현과 점액단백의 생성은 Prx2를 전처리한 군에서 통계학적으로 의미 있는 변화

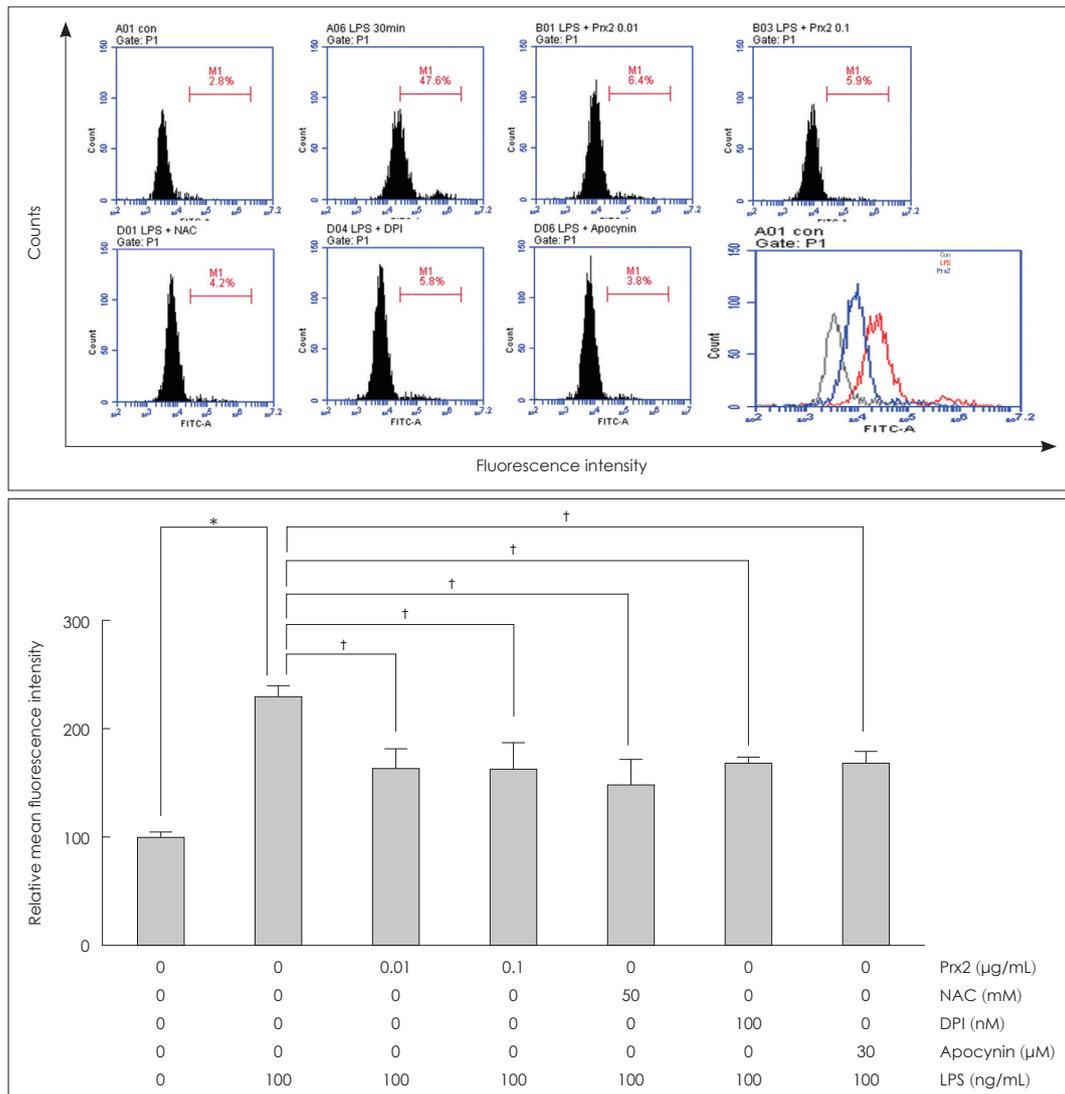


Fig. 2. The effects of Prx2, NAC, DPI, and apocynin on LPS-induced ROS production in human NCI-H202 cells. Prx2, NAC, DPI, apocynin significantly decreased LPS-induced ROS production in flow cytometry. * $p < 0.05$ compared with zero value; † $p < 0.05$ compared with LPS (100 ng/mL). Prx2, peroxiredoxin 2; NAC, N-acetylcysteine; DPI, diphenyleneiodonium; LPS, lipopolysaccharide; ROS, reactive oxygen species.

가 없었다(Fig. 3C and D).

사람 코점막 상피세포에서 LPS로 유도된 활성산소 생성에 Prx2가 미치는 영향

사람 코점막 상피세포에서 Prx2의 농도에 따른 활성산소 생성을 알아보기 위하여 flow cytometry를 통하여 분석하였다. Prx2를 전처리하였을 때 LPS에 의해 유도된 활성산소 생성은 통계학적으로 유의미하게 감소하였으나, Prx2의 농도에 따른 활성산소 생성의 차이는 없었다. Prx2와 다른 항산화 물질의 항산화 효과를 비교하기 위하여 사람 코점막 상피세포에서 Prx2와 NAC, DPI, apocynin을 전처리한 후 flow cy-

tometry를 통하여 활성산소의 생성을 분석하였다. Prx2와 NAC, DPI, apocynin을 전처리한 모든 경우에서 LPS로 유도된 활성산소 생성이 통계학적으로 유의미하게 감소하였으며, 활성산소의 감소 효과는 서로 비슷하였다(Fig. 4).

고찰

Prx2는 적혈구에서 세 번째로 풍부한 단백질로 과산화수소와 반응하여 이황화 이합체를 형성하지만 쉽게 과산화되지 않는 성질을 가지고 있으며, 적혈구 세포막 단백질에서 항상성을 유지하여 보호하며 세포 내의 산화, 환원 균형을 조절

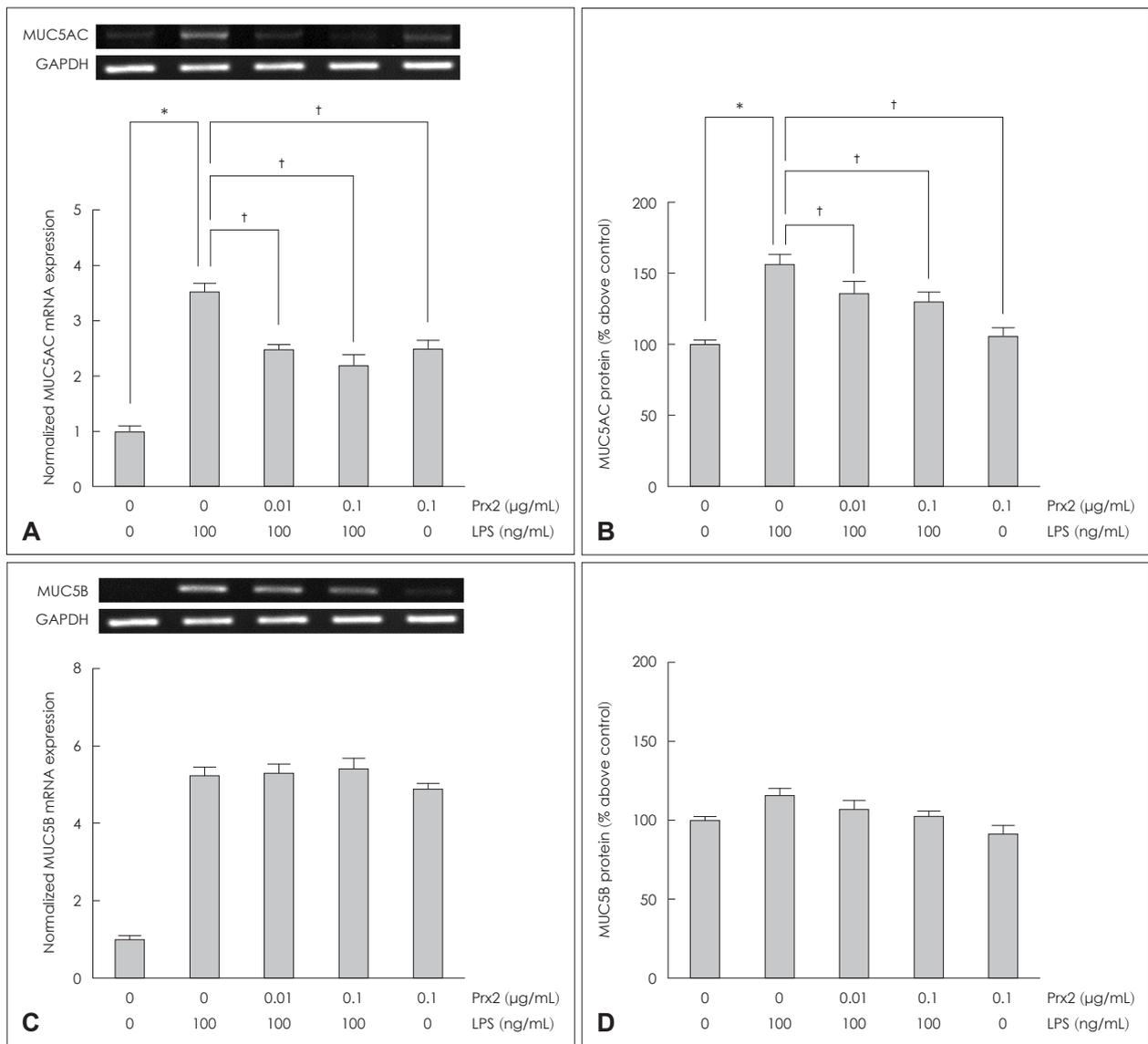


Fig. 3. The effects of Prx2 on LPS-induced MUC5AC and MUC5B expression in human nasal epithelial cells. Prx2 significantly decreased LPS-induced MUC5AC mRNA expression in reverse transcription-PCR, real-time PCR (A) and glycoprotein level in enzyme-linked immunosorbent assay (B). However, Prx2 did not have an effect on LPS-induced MUC5B mRNA expression (C) and glycoprotein production (D). Bars indicate the mean±standard deviation. **p*<0.05 compared with zero value; †*p*<0.05 compared with LPS (100 ng/mL). Prx2, peroxiredoxin 2; LPS, lipopolysaccharide; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

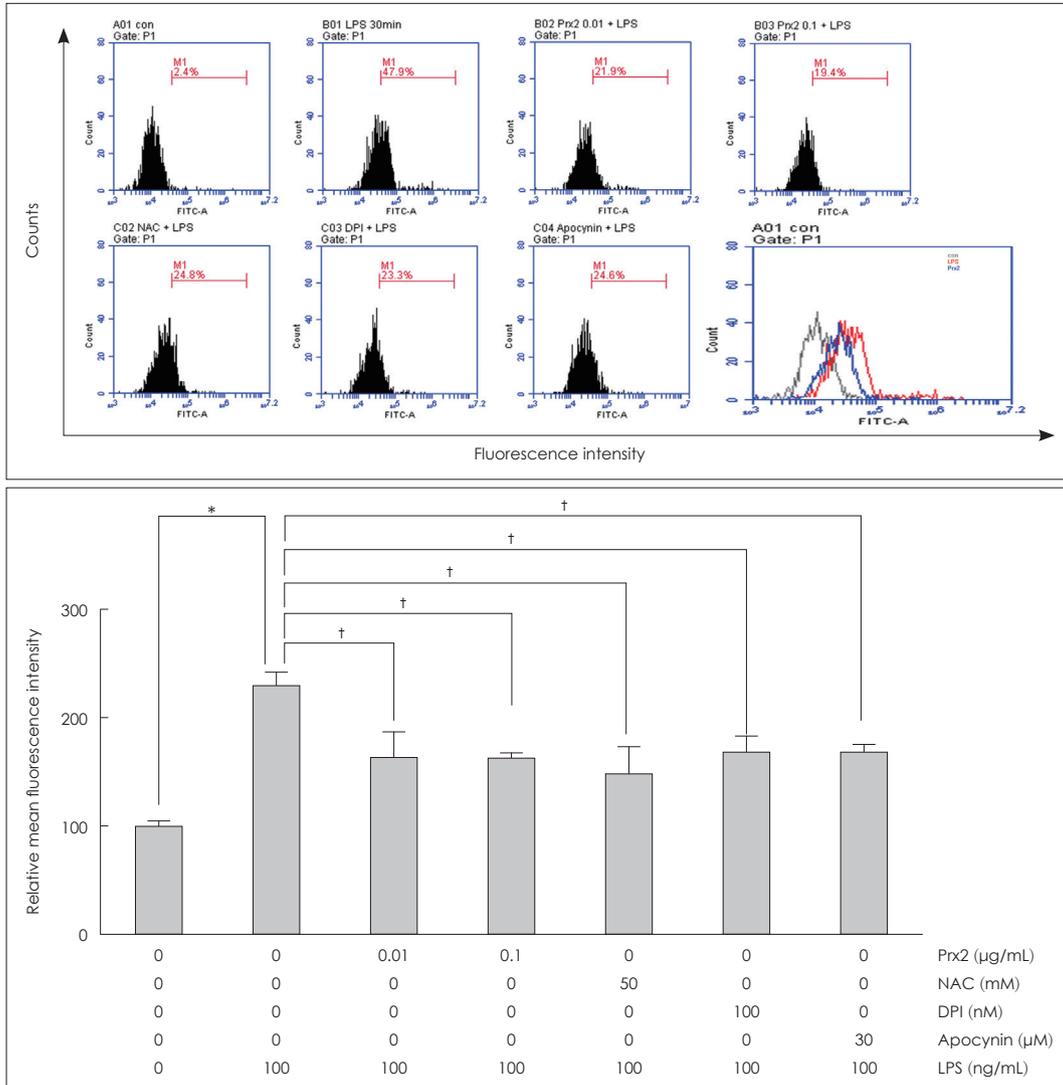


Fig. 4. The effects of Prx2, NAC, DPI, and apocynin on LPS-induced ROS production human nasal epithelial cells. Prx2, NAC, DPI, apocynin significantly decreased LPS-induced ROS production in flow cytometry. **p*<0.05 compared with zero value; †*p*<0.05 compared with LPS (100 ng/mL). Prx2, peroxiredoxin 2; NAC, N-acetylcysteine; DPI, diphenyleneiodonium; LPS, lipopolysaccharide; ROS, reactive oxygen species.

하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} 또한 사람 위암세포에서 Prx2 억제제를 통해 Wnt/beta-catenin 신호전달을 감소시켜 항암효과를 나타내기도 하였다.¹⁰⁾ Prx2가 호흡기 질환에 미치는 영향에 대한 최근 연구에 따르면, formaldehyde에 노출된 사람 폐 상피세포에서 p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)를 통해 Prx2가 감소하여 세포사멸이 유도되었으나, Prx2를 과발현시킨 세포에서는 formaldehyde로 인한 세포사멸이 억제되었다는 보고가 있었다. 또한 쥐의 비장 세포와 복강대식세포에서는 Prx2가 B-cell activating factor의 발현을 감소시키고 toll-like receptor 4의 발현을 증가시켜 ROS의 생성을 억제하였으며, 이로 인하여 ovalbumin 유도 천식의 경과를 호전시켰다는 보고도 있었다.^{11,12)} Prx2는 체내에 풍부하게 분포하는 단백질로 수 많은 질환에 영향을 미치

며, 본 연구에서도 Prx2가 LPS에 의해 유도되는 MUC5AC 점액유전자와 단백질 생성을 감소시키는 것을 확인하였다.

ROS는 미토콘드리아의 주요 역할인 adenosine triphosphate 생산 과정 중 전자전달계에서 생성되며, 신호전달 역할을 하지만 반응성이 높아 농도가 상승하면 세포에 손상을 일으키며, 호흡기 상피세포에서 점액유전자를 과발현시켜 만성 폐쇄성 폐질환, 천식 등의 만성 호흡기 염증성 질환에서 경과를 악화시킬 수 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 최근 연구에 의하면, 녹농균 LPS가 protein kinase C-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 신호전달 체계를 통하여 ROS를 증가시키고, 증가된 ROS는 transforming growth factor- α 를 방출하여 MUC5AC 발현을 증가시킨다.¹⁶⁾ 다른 연구에서는 녹농균의 pyocyanin에 노출된 호흡기 상피세포에서 ROS를

매개로 한 염증성 사이토카인과 성장인자의 방출이 epidermal growth factor receptor (EGFR) 경로를 활성화시켜 점액의 분비를 증가시켰다.¹⁷⁾

MUC5AC와 MUC5B는 점액의 점도를 조절하는 점액단백으로, 호흡기 점막의 물리적인 보호기능과 윤활기능을 유지하는 역할을 한다. 점액단백의 생성을 증가시키는 물질은 LPS, interleukin 등이 있으며 여러 가지 신호전달 체계에 의해 조절된다.^{18,19)} 점액단백과 항산화 효소의 관련에 대한 연구에 따르면, Prx6가 호흡기 상피세포에서 LPS에 의해 유도된 MUC5AC 과발현을 H₂O₂-EGFR-MAPK 신호전달 체계를 통해 억제하였다.²⁰⁾ 본 연구에서는 사람 하기도 호흡기 상피세포뿐만 아니라 사람 코점막 상피세포에서 Prx2가 LPS로 유도된 MUC5AC 점액유전자, 단백질 생성 및 ROS를 유의미하게 억제함을 확인하여 Prx2가 ROS 억제작용을 통해 점액 발현을 억제하는 것으로 사료된다. 따라서 염증반응에 의한 MUC5AC 발현을 Prx2가 억제함을 확인하였다. 하지만 Prx2는 사람 호흡기 상피세포와 사람 코점막 상피세포 모두에서 LPS로 유도된 MUC5B 점액유전자와 단백질 생성은 저하시키지 못 하였다. 이미 알려진 바와 같이 MUC5AC와 MUC5B는 사람 호흡기 상피세포에서 주로 발현되며 호흡기 보호에 중요한 역할을 담당한다. MUC5AC와 MUC5B는 구조적으로 점액의 거대분자를 이루는 점소의 당단백질 유전자이지만, 둘의 기원은 서로 다르다. MUC5AC는 배상세포에서 주로 분비되고 MUC5B는 점막하 분비샘에서 주로 분비된다.²¹⁾ 최근 연구에서 두 유전자의 이질적인 효과에 대한 보고들이 있다. MUC5AC는 천식을 포함한 호흡기 질환을 가지고 있는 환자에서 증가하지만 MUC5B는 감소하였으며, MUC5B는 건강한 분비물에서 우세한 점액단백질로 확인되었다.²²⁾ 또한 MUC5AC가 풍부한 점액세포의 세포외 도메인(extracellular domain)은 상피세포의 점액세포와 밀접한 연관성이 있으며, 특히 점액섬모수송을 현저하게 손상시킨다. 하지만 MUC5B의 경우 호흡기 세포에서 점액의 과축적을 방지하며 세포 사멸성 대식세포의 축적을 막고 식균작용을 하여, 만성 호흡기 폐질환을 일으키는 만성 감염을 막아주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{23,24)} 이와 같이 MUC5AC와 MUC5B는 호흡기에서 방어 및 보호작용에 필수적인 점액유전자로 알려져 있으나 그 세부적인 역할 및 기능은 다르다. 이에 본 연구에서도 Prx2에 대한 MUC5AC와 MUC5B 점액유전자 및 단백질 생성의 차이점을 살펴보았다. 추후 추가적인 연구를 통해 호흡기 상피세포에서 두 유전자의 상호작용 및 역할의 재조명이 필요할 것으로 사료된다.

세포 내 시스테인과 글루타티온의 합성 전구체인 NAC는 항산화제로 최근 연구에 널리 사용되며, DPI와 apocynin은

활성산소가 생성되는 것을 억제하는 NADPH 산화효소 저해제이다.^{25,26)} Prx2와 활성산소의 관련성을 확인하기 위하여 NAC와 DPI, apocynin을 사용해 연구를 시행하였다. 사람 호흡기 상피세포와 사람 코점막 상피세포에서 NAC, DPI, apocynin을 전처리한 경우에 LPS에 의해 유도되는 활성산소의 생성량이 유의하게 감소하였으며, Prx2를 전처리하였을 때도 같은 결과를 보였다(Figs. 2 and 4). 이를 통해 활성산소와 관련된 신호전달 체계가 Prx2에 의한 MUC5AC 점액유전자와 단백질 생성의 억제에 관여하는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 호흡기 상피세포에서 Prx2가 활성산소의 생성을 억제하여 MUC5AC 과분비 조절에 관여하는 것으로 생각되며, Prx2의 MUC5AC 발현 억제에 대한 정확한 기전을 확인하기 위해서는 다른 여러 점액유전자와 신호 전달체계를 확인할 수 있는 다양한 연구가 더 시행되어야 할 것으로 보인다. 만성 호흡기 염증성 질환에 Prx2가 미치는 영향에 대한 추가적 연구를 통하여 질환을 조절하는 데 큰 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This research was supported by Yuhan Corporation.

Author Contribution

Conceptualization: all authors. Data curation: Joon-Hee Kim, Sooyeon Jo, Sangjae Lee, Gi Moon Yoo, Hyung Gyun Na, Yoon Seok Choi, Chang Hoon Bae, Yong-Dae Kim. Formal analysis: Joon-Hee Kim, Hyung Gyun Na, Si-Youn Song, Yong-Dae Kim. Funding acquisition: Joon-Hee Kim, Hyung Gyun Na, Chang Hoon Bae, Yong-Dae Kim. Investigation: Joon-Hee Kim, Sangjae Lee, Gi Moon Yoo, Yoon Seok Choi, Si-Youn Song. Methodology: Joon-Hee Kim, Sooyeon Jo, Hyung Gyun Na. Project administration: Joon-Hee Kim, Hyung Gyun Na, Yong-Dae Kim. Resources: Joon-Hee Kim, Sangjae Lee, Gi Moon Yoo, Chang Hoon Bae. Software: Joon-Hee Kim, Sooyeon Jo, Sangjae Lee, Gi Moon Yoo, Yoon Seok Choi, Chang Hoon Bae. Supervision: Si-Youn Song, Yong-Dae Kim. Validation: Joon-Hee Kim, Hyung Gyun Na, Chang Hoon Bae. Visualization: Joon-Hee Kim, Sooyeon Jo, Yoon Seok Choi, Chang Hoon Bae. Writing—original draft: Joon-Hee Kim. Writing—review & editing: Hyung Gyun Na, Si-Youn Song, Yong-Dae Kim.

ORCID

Yong-Dae Kim <https://orcid.org/0000-0003-0501-966X>

REFERENCES

- 1) Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* 2012;50(2):91-105.
- 2) Jin MH, Lee YH, Kim JM, Sun HN, Moon EY, Shong MH, et al. Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. *Neurosci Lett* 2005;381(3):252-7.
- 3) Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: A review. *Laryngoscope* 2007;117(5):932-8.
- 4) Fischer BM, Voynow JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(4):

- 447-52.
- 5) Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF- α , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol* 2004;344(3):683-95.
 - 6) Ahn JH, Kim HG, Seo BH, Choi YS, Song SY, Bae CH, et al. Effect of multi-walled carbon nanotubes on MUC5AC and MUC5B expression in airway epithelial cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2015;58(8):552-7.
 - 7) Lee YH, Kim YD, Song YS, Bae CH, Choi YS, Shin KC, et al. High concentration of glucose induces MUC5B expression via reactive oxygen species in human airway epithelial cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2017;60(8):369-403.
 - 8) Ishida YI, Ichinowatari Y, Nishimoto S, Koike S, Ishii K, Ogasawara Y. Differential oxidation processes of peroxiredoxin 2 dependent on the reaction with several peroxides in human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;518(4):685-90.
 - 9) Matté A, Pantaleo A, Ferru E, Turrini F, Bertoldi M, Lupo F, et al. The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence. *Free Radic Biol Med* 2014;76:80-8.
 - 10) Lee TH, Jin JO, Yu KJ, Kim HS, Lee PC. Inhibition of peroxiredoxin 2 suppresses Wnt/ β -catenin signaling in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;512(2):250-5.
 - 11) Lim SK, Kim JC, Moon CJ, Kim GY, Han HJ, Park SH. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology* 2010;271(3):100-6.
 - 12) Moon EY, Kang JS, Han SH, Yang KH, Pyo S, Lee MY, et al. Differential role of peroxiredoxin II (PrxII) on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) and B-cell activating factor (BAFF) in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Int Immunopharmacol* 2008;8(6):935-44.
 - 13) Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417(1):1-13.
 - 14) Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136(3):769-80.
 - 15) Na HG, Kim YD, Choi YS, Bae CH, Song SY. Allethrin and prallethrin stimulates MUC5AC expression through oxidative stress in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503(1):316-22.
 - 16) Yan F, Li W, Jono H, Li Q, Zhang S, Li JD, et al. Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF- α signaling pathways in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366(2):513-9.
 - 17) Rada B, Gardina P, Myers TG, Leto TL. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas pyocyanin*. *Mucosal Immunol* 2011;4(2):158-71.
 - 18) Smirnova MG, Guo L, Birchall JP, Pearson JP. LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* 2003;221(1):42-9.
 - 19) Hsu HY, Wen MH. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem* 2002;277(25):22131-9.
 - 20) Yang D, Jin M, Bai C, Zhou J, Shen Y. Peroxiredoxin 6 suppresses Muc5ac overproduction in LPS-induced airway inflammation through H₂O₂-EGFR-MAPK signaling pathway. *Respir Physiol Neurobiol* 2017;236:84-90.
 - 21) Bonser LR, Erle DJ. Airway mucus and asthma: The role of MUC5AC and MUC5B. *J Clin Med* 2017;6(12):112.
 - 22) Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Dunican EM, Yu M, Carrington SD, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194(10):1296-9.
 - 23) Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014;505(7483):412-6.
 - 24) Ridley C, Thornton DJ. Mucins: The frontline defence of the lung. *Biochem Soc Trans* 2018;46(5):1099-106.
 - 25) Petrônio MS, Zeraik ML, Fonseca LM, Ximenes VF. Apocynin: Chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules* 2013;18(3):2821-39.
 - 26) Kim SK, Rho SJ, Kim SH, Kim SY, Song SH, Yoo JY, et al. Protective effects of diphenyleneiodonium, an NADPH oxidase inhibitor, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019;46(2):153-62.