

□ 원 저 □

만성기도질환의 객담세포분석과 mucin의 측정

울지외과대학교 내과학교실, 순천향대학교의과대학 내과학교실*, 서울대학교 약학대학*

김기업, 김양기#, 신찬영*, 김도진#,
어수택#, 김용훈#, 고광호*, 박춘식#

= Abstract =

Cellular Analysis and Measurement of Mucin in Sputum of Chronic Airway Disease

Ki Up Kim, M.D., Yang Ki Kim, M.D.†, Chan Young Shin, Ph. D.†,
Do Jin Kim, M.D.†, Soo Taek Uh, M.D.†, Yong Hoon Kim, M.D.†,
Kwang Ho Ko, Ph.D.†, and Choon Sik Park, M.D.†

Department of Internal Medicine, Eulji University, Daejeon,
Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University†, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul, Korea*

Background : In chronic airway disease, mucus secretion is increased, but extraction of mucin, which is the main component of mucus secretion, is a very complicated and limited in clinical use. Recently, monoclonal antibody for mucin was developed for possible clinical use. In this study, cellular analysis and quantification of respiratory mucin in sputum of patients with chronic airway diseases were performed.

Method : Sputum was collected from patients with asthma(n=33), bronchiectasis(n=8) or chronic bronchitis (n=13) by spontaneous expectoration or by hypertonic saline induction. Collected sputums was treated by 0.1 % dithiotreitol to dissociate the disulfide bond of the mucus and filtered through a nylon gauze. Total cell count, viability and differential count were measured. For detection of mucin, collected samples were treated with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then with monoclonal antibody(HMO2), as the pri-

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

Address for correspondence :

Choon Sik Park, M.D.

Department of Allergy and Respiratory, Dept. of Internal medicine, Soonchunhyang University Hospital
657 Hannam-Dong, Yongsan-Ku, Seoul, Korea, 140-743.

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

mary antibody, and PAS stain. The amount of mucin was measured with ELISA by HMO2. Correlation with clinical information, cellular analysis, and amount of measured mucin were analyzed.

Results : Total cell counts of sputum were significantly increased in patients with bronchiectasis but viability remained the same. Eosinophils were significantly increased in patients with asthma, neutrophils in bronchiectasis chronic bronchitis, respectively ($p < 0.05$). The results of Western blotting and PAS staining confirmed the presence of glycoproteins and matched? with mucin. The amounts of mucin measured by ELISA were not significantly different among the disease groups. Significant correlation was identified between the amount of mucin and viability ($r = -0.482$, $p < 0.05$).

Conclusion : Inflammatory cells in the sputum of those with chronic airway disease were different for each disease type. Measurement of mucin by ELISA via monoclonal antibodies may be a simple method for the evaluation of chronic airway disease. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 82-92)

Key words : Chronic airway disease, Sputum, Mucin, ELISA.

서 론

기도는 호흡이외에 이물질로부터 인체를 방어하는 생물학적인 방어기전도 수행하고 있다¹. 이러한 방어기전에 중요한 역할을 하는 기도점액은 중요한 구성성분으로 mucin이 있으며 이 mucin은 매우 다양한 구조를 지니고 있는 거대분자로서 각종 유해자극들이나, 만성 기관지염, 천식 등의 질환에서 분비세포수가 증가하고, 분비량이 증가되며 증가된 점액은 객담의 형태로 배출된다^{2,3}. 기도 mucin에 대한 정량을 위해서는 단세포군항체(Monoclonal antibody)를 이용한 면역정량법이 매우 간편하며 또한 임상적인 이용의 어느 정도 현실화되고 있다^{4,5,6}. 이에 저자들은 만성기도 질환 환자의 객담을 채취하여 객담세포의 성상이 질환별 차이가 있는지를 알아보았고, 객담세포의 성상과 환자의 임상적 특성이 단세포항체를 이용한 mucin의 양과 연관이 있는지를 비교 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1998년 1월부터 1998년 12월까지 순천향대학병원

에 내원한 임상증상과 질환별 특이검사로서 확진된 기관지천식, 만성기관지염, 기관지확장증의 만성기도질환 환자 54명을 대상으로 하였다. 질환별 분포를 보면 기관지천식 33명, 기관지확장증 8명, 만성기관지염 13명이었다. 전체 54명의 환자의 나이의 중앙값이 58세로서 각 군간의 나이의 차이는 없었으며, 성별은 남자 26명 여자 28명이었다. 대상환자 중 현재 흡연자는 17명이었으며 흡연의 중앙값은 30 pack year (range : 4-70)로 각 군간의 흡연력의 차이는 없었다.

2. 방 법

1) 인체에서 얻은 검체의 처리

객담이 있는 만성 호흡기 질환환자는 구강을 깨끗한 물로 헹군 후 큰 기침을 하여 하루 기도의 분비물을 얻었다. 자연 객담 배출이 적어 객담을 얻기 힘든 환자와 호흡기계 질환이 없는 경우 객담을 얻는 방법으로서 고장성 생리식염수를 흡입하여 얻는 유도객담방법을 이용하였다⁷. 이는 3%, 4%, 5%의 고장성 생리식염수를 ultrasonic nebulizer를 사용하여 단계적으로 7분간 흡입하고 큰 호흡을 한 후 기침을 유도하여 하루 기도의 분비물을 얻는 방법을 사용하였다. 객담

에서 타액성분을 포함한 수분을 탈지면에 흡수시킨 후 점액성분만을 검자를 사용하여 선택적으로 얻어낸 후 무게를 측정하였다. 객담성분의 균등한 분포를 위하여 0.1% dithiothreitol(DTT)⁸ (Sigma, USA)가 들어 있는 calcium과 magnesium이 제거된 phosphate buffered saline(PBS) 4배를 넣고⁹ 객담 무게의 1/100의 단백분해효소억제제(0.1M ethylene diamine tetra acetic acid : EDTA)와 2 mg/ml phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)를 넣어¹⁰ 이를 약 10-15초 vortex한 후 pipett으로 겔 성분을 풀어주었다. 이때 DTT는 객담의 유신 성분의 disulfide bond를 끊어 유신 성분을 환원형으로 변화시켜준다고 알려져 있다¹¹. 육안적으로 보아 객담내의 고형 성분 즉 객담이 완전히 녹은 것을 확인한 후 검체 내의 DTT 성분을 희석시켜 없애기 위하여 5배의 PBS를 넣어, 객담을 10배 용량으로 희석하였다. 41 μ m 격자의 Nylon gauze (Fisher, USA)에 부어서 불순물을 제거하고 전체세포수(total cell count)와 Trypan blue exclusion method를 사용하여 세포의 생존률(viability)을 측정하였다. 또한 5×10^5 /ml 의 세포 60 μ l를 450 rpm, 6분간 cytopsin (Shandon, USA)에서 회전시켜 세포를 고정시킨 후 Diff-Quick 염색을 하여 전체 400개의 세포를 분별검사를 실시하였다. 이때 편평상피세포가 20% 이상이면 불충분한 검체로 판정하여 검사에서 제외하였다¹¹. 나머지 용액은 $500 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 모아 면역효소 측정을 위한 검체의 처리를 하였다.

Mucin의 면역효소측정을 위한 검체의 처리는 전체 용액의 1/10의 용량에 해당하는 0.5 M sodium acetate와 20% sodium dodecyl sulfide (SDS)를 넣어 최종 농도가 50 mM sodium cetate, 0.1% SDS가 되도록 하였다¹². 이것을 100 °C에서 중탕으로 3분간 처리한 후 용액 중 100 μ l를 분리하여 증류수 900 μ l에 넣어 전체 용량을 1 ml로 하여 단백질 농도를 Lowry 법으로 측정하고 남은 검체는 -70 °C에 저장하였다¹⁰.

2) 유신에 대한 단클론 항체를 이용한 기도 분비물내 유신의 증명¹³

단클론항체가 기도 분비물 내 mucin의 단백질과 반응하는 것을 Western blot을 이용하여 측정하였다. 환자의 처리된 기도 검체에 5 Laemli buffer (pH 6.8, 25 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% Glycerol, 0.003% bromophenol blue, 1% β -mecaptoethanol)를 넣고 95 °C 이상에서 5분간 가열한 후, 4%의 SDS-polyacrylamide gel을 stacking gel로, 8%의 SDS-polyacrylamide gel을 separating gel로 하여 전기영동(electrophoresis buffer : pH 8.2, 5 mM Tris-base, 192mM glycine, 0.1% SDS) 하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 transfer (pH 8.2, 5mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol, 0.1% SDS) 하였다. 비특이반응을 막기 위하여 5% non-fat dry milk가 함유되어 있는 blocking buffer (pH 7.5, 10mM Tris, 100mM NaCl, 0.1% Tween)로 4 °C에서 밤새 처리하여, 1 : 10의 농도로 희석한 사람의 mucin에 대한 단클론항체 HMO2를 1차 항체로 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 TBS-Tween으로 세척한 후, 1 : 3000의 농도로 희석한 2차 항체(HRP-labelled goat anti-mouse Immunoglobulin)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어 TBS-Tween으로 세척하여, detection solution(enhanced chemiluminescence detection system : ECL)으로 처리 후 film에 감작시켜 autoradiogram을 얻었다.

3) PAS염색에 의한 mucin의 증명

Western blot에서 얻은 membrane을 0.5% periodic acid solution에 5분간 산화시킨 후 흐르는 물에 15분간 씻고 곧바로 Schiff reagent에 10분간 염색하였다. 탈색용액(decolorizing solution)에 담가 탈색시키고 흐르는 물에 10분간 씻어 Harris Hematoxylin용액으로 2분간 노출시켜 핵 염색을 하였다. 흐르는 물에 씻고 1% acid alcohol에 2회 담근 후, 흐르는 물에 씻고 45 °C에서 2분간 노출시켰다.

4) 면역효소 측정법을 이용한 mucin의 측정

(1) Standard mucin의 준비

서울대학교 약학대학교실에서 제공한 인체 기도에서 추출한 mucin을 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어있지 않은 pH 7.4의 PBS로 희석하여 0, 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10 ng/ml의 농도로 준비하였다.

(2) 검체의 준비

전 처치된 객담을 100 °C에서 3분간 증탕으로 끓인 후 96 well의 plate에 각각 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 의 농도로 희석하여 50 μl 의 검체를 분주한 후 4 °C에서 16시간을 고정시킨 후 세척용액(washing solution)으로 5회 세척하였다.

(3) 검체의 측정

Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어있지 않은 pH 7.4의 PBS에 건조된 무지방 우유와 Tween®을 넣어 최종농도가 5%, 0.3%가 되도록 하여 검체와 동량을 투여하고 30분간 실온에서 배양한 후 세척 하였다. 단클론항체 HMO₂를 10배 희석하여 동량을 넣어 32 °C에서 1시간 배양하고 5회 세척하였다. Peroxidase labeled goat anti-mouse immunoglobulin을 1 : 5000으로 희석하여 동량을 넣어 32 °C에서 1시간 배양하고 5회 세척하였다. TMB (tetramethyl benzidine)로 발색시킨 후 650 nm에서 optical density를 분석하고 stop solution 투여 후 450 nm에서 optical density를 측정하였다. 이 값을 standard curve의 값과 비교하여 검체의 mucin 농도를 측정하였다.

3. 통계분석

통계적인 분석은 statistical package for the social sciences(SPSS)를 이용하여 ANOVA와 Mann-Whitney U test, Pearson Correlation를 이용하였으며 중앙값과 평균 및 표준오차로 표시하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

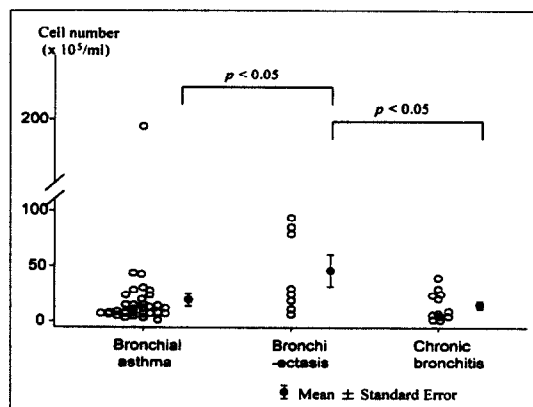


Fig. 1. Total cell number of sputum number of cells in the sputum of those with chronic airway disease.

결 과

1. 객담의 특징

기관지천식, 기관지확장증, 만성기관지염에서 얻은 객담을 점액성 객담, 점액과 농성이 혼재된 객담, 그리고 농성객담으로 분류하여 비교하였을 때, 질환별 차이를 발견할 수 없었다. 전체 54례 중 편평상피세포의 비가 20%를 초과하여 효과적인 객담이라고 인정하기 어려운 객담은 없었다. 질환별로 전체세포수의 비교는 기관지확장증에서 타 질환에 비하여 유의한 세포의 증가를 볼 수 있었으며($p=0.04$)(그림 1), 세포 생존률에서는 각 군간의 차이를 볼 수 없었다(그림 2). Cytospin으로 400개의 세포를 분별검사하여 세포의 분획을 비교하였을 때 기관지천식에서 호산구가 $16.86 \pm 3.99\%$ 로 유의하게 증가되어 있었으며($p=0.01$), 만성기관지염과 기관지확장증에서는 호중구의 증가가 유의하였다($p<0.05$)(그림 3).

2. 객담에서 mucin의 확인

객담 내 mucin을 확인하기 위하여 인체 기도 mucin에 대한 항체 HMO₂를 1차 항체로 하여 Western

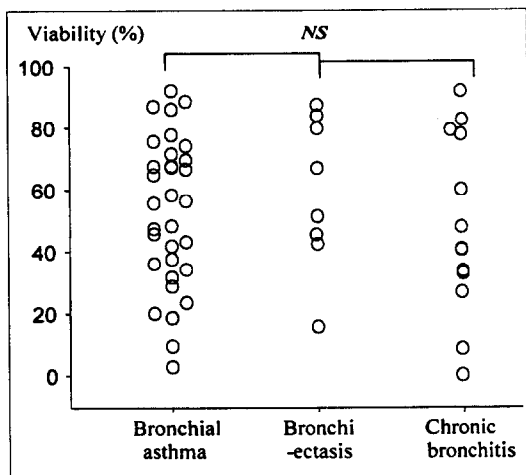


Fig. 2. Geullar Cellular viability of sputum in the sputum of those with a chronic airway disease.

blot으로 검증하였을 때 주로 stacking gel에서 진한 band를 보였으며 이는 반응하는 단백질의 분자량이 수십만 dalton임을 확인할 수 있었다(그림 4). 이 membrane을 탄수화물의 염색에 사용되는 PAS염색

을 하였을 때 western blot에서 보였던 부위와 같은 부위에서 붉게 염색됨을 확인하여 1차 항체 HMO₂에 반응하는 단백질과 탄수화물임을 확인할 수 있었다(그림 5).

3. Mucin과 환자의 임상적 특징 및 세포분획과의 비교

환자의 임상적인 특성과 면역효소측정으로 얻어진 mucin과의 상관관계를 비교하였을 때, 환자의 나이, 흡연, 성별, 그리고 객담내의 단백질과의 비교에서 유의한 상관관계를 발견할 수 없었고(그림 6), 또한 객담이 점액성과 농성으로 분류한 비교에서도 상관관계를 발견할 수 없었다. 이는 임상적인 특성이 기도 내 mucin의 분비에 영향을 주지 않는다는 의미한다. 전체 대상환자에서 각 질환별 mucin의 양을 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이는 없었다(그림 7). 환자에서 채취한 객담을 분석하여 얻은 전체 세포수와 생존률이 mucin분비에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 비교하였을 때 생존률이 측정된 뮤신과 역상관관

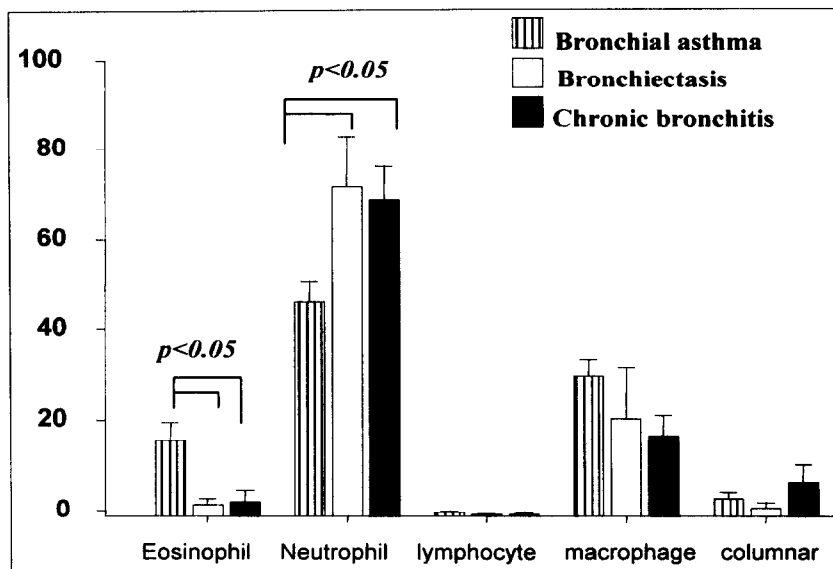


Fig. 3. Differential cell counts of sputum of those with chronic airway diseases.

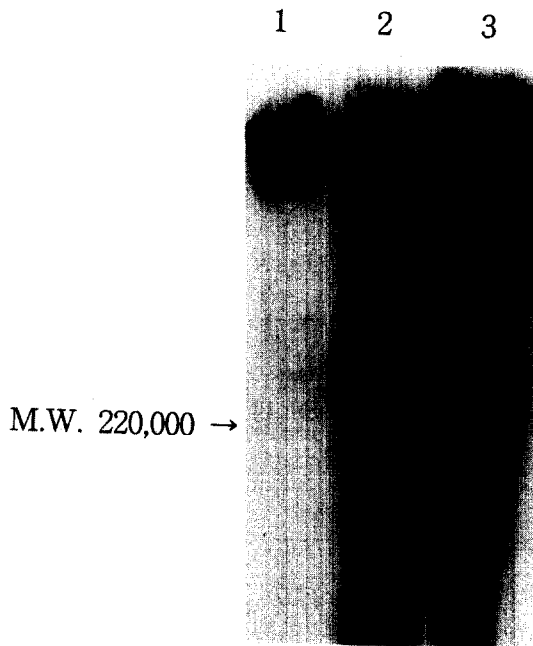


Fig. 4. Mucin detection by Western blot in Chronic airway disease. Detected mucin is darkish and has a diffuse band.
1. Bronchial asthma, 2. Bronchiectasis, 3. Chronic bronchitis.

계를 보여주었다(그림 8). 이는 살아있는 세포보다는 죽은 세포에서 뮤신의 분비에 영향을 주는 것으로 추정할 수 있다.

분별검사를 하여 얻은 백혈구 분획과 기도내의 상피세포가 mucin에 영향을 주는지 알아보려고 상관관계를 비교하였을 때 특정 백혈구나 상피세포가 mucin의 분비에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 즉 백혈구 비, 전체세포와 백혈구 분획을 곱하여 얻은 세포수, 그리고 전체세포수 \times 생존률 \times 백혈구 분획을 계산하여 얻은 수치와도 상관관계를 발견할 수 없었다.

얻어진 결과를 바탕으로 다량의 mucin이 분비되는 환자군과 소량의 mucin이 분비되는 환자군으로 분류하여 임상적 특성과 객담의 특성을 비교하였으나 차이를 얻지 못하였다.

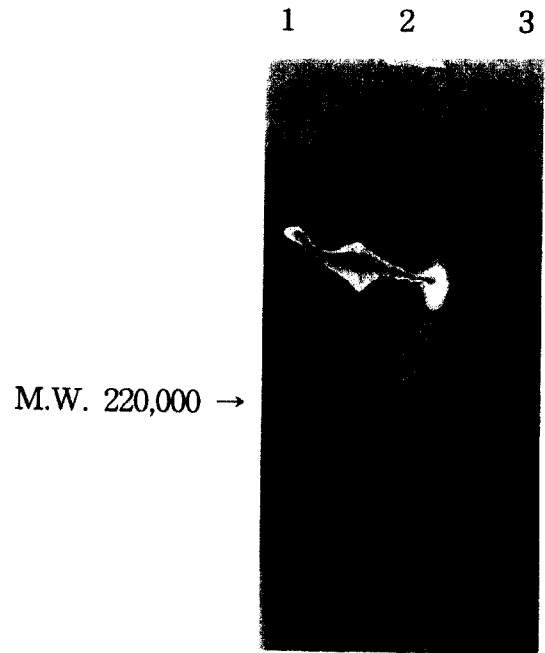


Fig. 5. Mucin detection of in the sputum by PAS stain in Chronic airway disease. Reddish discoloration is carbohydrate in mucin above size marker. 1. Bronchial asthma, 2. Bronchiectasis, 3. Chronic bronchitis.

고 찰

객담은 하기도에서 분비된 검출물로 정의할 수 있는 호흡기계의 분비물로서 질환에 따라 분비 또는 성분의 변화가 있지만 현재까지 효과적인 기도 내 채취와 정량적인 분석이 어려워 임상적인 이용에 어려움이 많았다. 최근에 자발적으로 배출된 객담과 고장성 생리식염수를 이용한 유도객담의 검출물을 이용한 세포분석과 생화학적 성분을 분석하여 기도 질환에 대한 염증의 지표로서 사용되고 있으며, 이는 기도질환에 대한 이해와 치료에 도움을 주고 있다¹⁴. 또한 객담이 배출되면서 발생하는 타액의 오염을 줄일 수 있는 방법이 고안되어 현재 객담분석의 유용성이 증가되고 있다¹⁵.

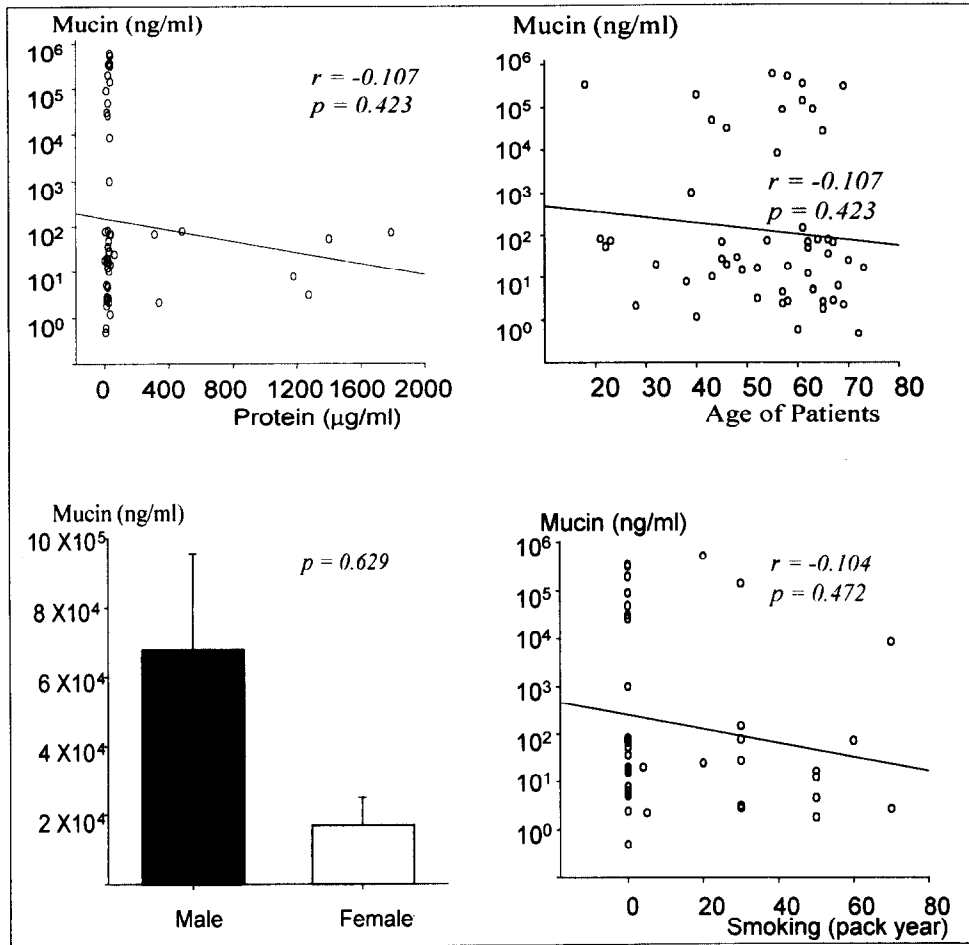


Fig. 6. Correlation between measurements of mucin and clinical manifestations of patients.

객담의 분석에 사용되는 DTT는 1964년 Cleland¹⁶에 의하여 당단백질의 disulfide bond를 끊어 환원형으로 변화시켜주는 것이 알려진 후 1978년에는 객담의 염중세포 측정에 처음 도입되었고 이는 세포분석시에 세포를 균등하게 분포시켜주는 것으로 알려져 왔다.

객담에서 주로 연구되는 분야는 천식이며 만성기관지염이나 기관지확장증에서 객담을 분석한 보고는 아직 많지 않다. 본 연구에서 만성기도질환의 전체세포의 수를 비교하였을 때 기관지확장증에서 유의한 증가를 확인하였는데 이는 세균감염에 의한 것으로 추정되

었다. 세포분별검사에서 천식에서 호산구가 타 질환에 비하여 유의하게 증가하였고 이는 기존의 보고들과 일치하는 소견이었으며 만성기관지염과 기관지확장증에서는 천식에 비하여 호중구가 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 일부 연구에서는 천식의 급성 발작시 객담분석을 하였을 때 호중구가 증가한다고 보고되었는데¹⁸, 본 연구에서도 호산구 보다는 호중구의 급격한 증가를 보인 예가 있었다.

최근 기도질환 연구에서 기도내의 mucin의 연구가 대두되고있고 이는 폐 선암¹⁹과 천식²⁰을 비롯한 만성 기도질환에 대한 또 다른 이해를 돕고 있다. 기도내의

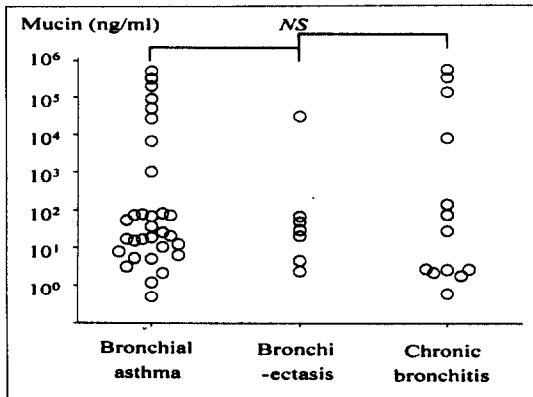


Fig. 7. Comparison comparison of measured mucin in chronic airway disease.

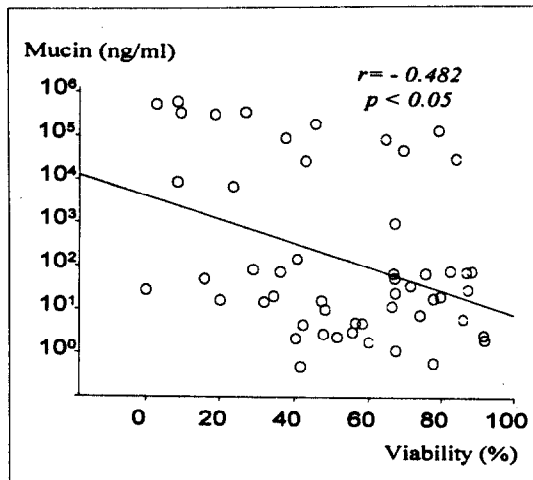


Fig. 8. Correlation between measured mucin and cellular viability in chronic airway disease.

점액성분은 다량의 수분, 염분, 단백질 그리고 고분자의 당 화합물로 구성되어있다. 이중 점액성 당단백을 mucin이라 하는데 다량의 점액성분이 분비되는 경우에는 주된 성분으로 보고되고 있으며 일부 보고에서 호흡기계 무중상인에서는 기도 내 mucin이 분비되지 않는다는 보고가 있었으나 최근의 보고에서 mucin이 분비됨을 확인되었으며²¹, 이는 호흡기계에서 mucin

의 역할이 중요함을 재확인하는 계기가 되었다.

Mucin은 고분자의 당단백질로 복잡한 선형구조이며 분자량이 $5-30 \times 10^6$ dalton이고 환원형으로 변하면서 $2-3 \times 10^6$ dalton의 단량체로 변환된다¹⁰.

Mucin의 분리방법에는 guanidinium chloride (GnCl)와 cesium chloride (CsCl)를 이용한 density gradient ultrafiltration과 high performance liquid chromatography (HPLC)가 사용되고있으나 이는 분리과정이 복잡하여 임상적으로 널리 사용되지 못하고 있다²⁴. 그러므로 mucin에 대한 단클론항체를 사용한다면 객담내의 mucin에 대한 검사가 간편하고 빠른 결과를 얻을 수 있음이 최근에 여러 연구에서 발표되고 있다²⁵⁻³⁰. 본 연구에서 이용한 단클론항체 HMO₂는 서울대학교 약학대학³¹에서 제공된 사람의 객담의 mucin에 대한 항체로 향후 임상적 이용의 가능성이 높다. 기도 내 mucin 단백질과 반응하는지를 검증하는 과정으로서 HMO₂를 1차 항체로 반응시켜 western blot과 PAS 염색으로 확인하였을 때, 4%의 stacking gel에서 주로 반응함을 알 수 있었으며 이는 표식자로 사용된 220,000 dalton의 띠보다 상부에 위치하여 HMO₂가 고분자의 단백질과 반응함을 확인할 수 있었고, 또한 탄수화물이 부착되어있는 당단백 여부를 확인하기 위하여 PAS염색을 하였을 때 stacking gel과 separating gel 모두에서 반응하였으나 그 중 stacking gel에서 진한 염색을 확인하여 이는 HMO₂와 반응하는 epitope가 단백질과 당이 포함된 물질, mucin임을 알 수 있었다.

환자의 흡연력, 나이, 객담의 성상, 객담내의 단백질 농도를 포함한 임상적 특성이 측정된 mucin의 양과 상관관계를 비교하였으나 발견할 수 없었다. 또한 측정된 mucin의 양이 각각의 질환별로 차이가 있는지 비교하였으나 발견할 수 없었다. 기존의 발표된 문헌에 의하면 mucin의 양이 호중구와 상관관계가 있다고 알려져 있었으나¹⁸ 본 연구에서는 발견할 수 없었으며 기타 객담내의 전체세포수, 호산구 및 기관지 내에서 탈피된 입방상피세포와도 상관관계를 발견할 수 없었다. 타 연구와 비교되는 것은 세포의 생존율을

측정하였는데 세포의 생존률이 감소될수록 객담에서 측정된 mucin이 증가하는 역상관관계를 관찰할 수 있었다. 이는 세포가 자연사하면서 mucin 분비를 촉진하거나, mucin이 증가하면서 세포의 자연사를 유도할 것이라는 가설을 가능하게 한다.

이러한 실험의 결과로 볼 때 만성기도질환에서 분비되는 객담의 세포검사가 질환별 분류에 도움을 줄 것으로 판단되며, mucin의 분비는 임상적인 특성이나 객담세포의 분획이 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었으며 세포의 생존률에 의하여 영향을 받는 것으로 판단된다. 향후 세포의 자연사에서 분비되는 매개체와 mucin의 분비에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

만성기도질환에서 객담내 세포의 성상이 변화가 있다는 것은 이미 알려져 있으며 mucin의 분비가 증가한다는 것은 잘 알려진 사실이나 임상적인 이용이 제한되어 왔다. 만성기도질환 환자의 객담내 세포성상과 임상적 특성을 단클론항체(HMO₂)를 이용하여 측정된 mucin이 상관관계가 있는지를 알아보하고자 하였다.

방 법 :

최근 개발된 mucin에 대한 단클론항체를 사용하여 만성기도질환환자를 대상으로 객담의 세포분석과 mucin의 양을 측정하였다. 자발적 배출된 객담과 고장성 생리식염수를 이용한 유도객담으로 얻은 검체를 처리하여 전체 세포수와 생존률을 측정하였으며 분별검사를 하였다. 단클론항체 HMO₂가 객담내의 당단백인 mucin과 반응함을 확인하기 위하여 Western blot과 PAS염색으로 검증하였다. 검증된 단클론항체를 이용하여 면역효소측정으로 mucin을 정량하였다. 또한 연구결과와 환자의 임상적인 특성과 상관관계를 규명하였다.

결 과 :

기관지확장증에서 전체세포수가 천식과 만성기관지염

에 비하여 유의한 증가를 보였으며 분별검사에서 천식 환자에서는 호산구의 증가를, 기관지확장증과 만성기관지염 환자에서는 호중구의 증가를 확인하였다. 환자의 임상적인 특징과 객담에서 측정된 전체 세포수와 생존률 그리고 세포분획과 비교에서 상관관계를 발견할 수 없었다. 측정된 mucin은 질환별 차이는 발견할 수 없었으며 세포의 생존률과 mucin의 양과의 역상관관계를 확인할 수 있었으나, 그 밖의 다른 지표사이의 관련은 없었다.

결 론 :

만성기도질환의 객담의 분석은 객관적인 질환별 감별 평가에 이용될 수 있는 가능성을 보여주고 있으며 객담내 mucin의 분비는 세포의 생존률이 영향을 주는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Netter FH. The Ciba Collection of Medical Illustration. 2nd ed. West Caldwell : CIBA-GEIGY Corporation;1979
2. Rogers DF. Airway goblet cells : responsive and adaptable front line defenders. Eur Resp J 1994; 7:1690-706.
3. Rose MC. Mucins : Structure, function, and role in pulmonary diseases. Am J Physiol 1992;263: L413-L429.
4. St.George JA, Cranz DL, Zicker S, Etchison JR, Dungworth DL and Plopper. An immunohistochemical characterization of rhesus monkey respiratory secretions using monoclonal antibodies. Am Rev Resp Dis 1985;132:556-63.
5. Li C, Cheng PW, and Adler KB. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Guinea Pig Tracheal mucins. Hybridoma. 1994;13:281-7.
6. Rieves RD, Goff J, Wu T, Larivee P, Logum C, Shelhamer JH. Airway epithelial mucin re-

- lease : Immunologic quantitation and response to platelet activating factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:158-167.
7. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-9.
8. Efthimiadis A, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Dolovich J, Hargreave FE. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation : comparison of treatment with dithiotreitol vs phosphate buffered saline. *Eur Respir J*. 1997; 10:1336-40.
9. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, Hargreave FE. Sputum in severe exacerbation of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997;155:1501-8.
10. Thornton DJ, Carlstedt I, Howard M Devine PL, Price MR, Sheehan JK. Respiratory mucin: Identification of core proteins and glycoforms. *Biochem J* 1996;316:967-75.
11. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum : reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154: 308-17.
12. Siddiki B, Ho JJJ, Huang J. Monoclonal antibody directed against colon cancer mucin has high specificity for malignancy. *Int J Cancer* 1993;54: 467-74.
13. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
14. O'Byrne PM, Hargreave FE. Noninvasive monitoring of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S100-102.
15. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996;9:1174-80.
16. Clelland WW. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. *Biochemistry* 1964;3:480-2.
17. Wooton OJ, Dulfano MJ. Improved homogenization techniques for sputum cytology counts. *Ann Allergy* 1978;41:150-4.
18. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:843-52.
19. Maeshima A, Myagi A, Hirai T, Nakajima T. Mucin-producing adenocarcinoma of lung, with special reference to goblet cell type adenocarcinoma : Immunohistochemical observation and K-ras gene mutation. *Pathology international* 1997; 47:454-60.
20. Sheehan JK, Richardson PS, Fung DCK, Howard M, Thornton DJ. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma : A detailed study from patient who died in status asthmaticus. *Am J Cell Mol Biol* 1995;13:748-56
21. Davies JR, Hobenberg HW, Linden CJ, Howard R, Richardson PS, Sheehan JK, Carlstedt I. Mucin in airway secretions from healthy and chronic bronchitic subjects. *Biochem J* 1996;313: 431-9.
22. Spicer SS, Mochizuki I, Setser ME, Martinez JR. Complex carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally. *Am J Anat* 1980;158:93-109.
23. Plopper CG, St. George JA, Nishio SJ, Ethison JR, Nettekheim P. Carbohydrate cytochemistry of

- tracheobronchial airway epithelium of rabbit. *J Histochem Cytochem* 1984;32:209-18.
24. Thorton DJ, Devine PJ, Hanski C, Howard M, Sheehan JK. Identification of two major populations of mucins in respiratory secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:823-32.
25. Finkbeiner WE, Basbaum CB. Monoclonal antibodies directed against human airway secretions. *Am J Pathol* 1988;131:290-7.
26. Logun C, Mullol J, Rieves D, Hoffman A, Johnson C, Miller R, Goff J, Kaliner M, Shelhamer J. Use of monoclonal antibody enzyme linked immunosorbant assay to measure human respiratory glycoprotein production in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5:71-9.
27. Lin H, Carlson DM, St. George JA, Plopper CG, Wu R. An ELISA method for the quantitation of tracheal mucins from human and nonhuman primates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1988;1:41-8.
28. Basbaum CB, Chow A, Macher BA, Finkbeiner WE, Veissiere D, Forsberg LS. Tracheal carbohydrate antigens identified by monoclonal antibodies. *Arch Biochem Biophys* 1986;249:363-73.
29. Steiger DJ, Fahy JV, Gallup M, Finkbeiner WE, Boushey HA, Basbaum CB. ELISA and polymerase chain reaction-based methods for semiquantitative detection of mucin and mucin mRNA in vivo in human airways. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:A618.
30. Fahy JV, Steiger DJ, Liu J, Basbaum CB, Finkbeiner WE, Boushey HA. Marker of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1132-7.
31. Shin CY, Lee WJ, Kim DJ, Park CS, Park SH, Ko KK. Production and characterization of monoclonal antibodies against human airway mucins. *Hybridoma* 1999;18:457-63.
-