



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

*Staphylococcus aureus*의  
Lipoteichoic acid(LTA)에 의한  
사람의 정상 코 점막 상피세포에서의  
MMP와 TIMP의 발현

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

이 하 늘

*Staphylococcus aureus*의  
Lipoteichoic acid(LTA)에 의한  
사람의 정상 코 점막 상피세포에서의  
MMP와 TIMP의 발현

지도교수 김 현 준

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2009년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의생명과학과/분자의학전공

이 하 늘

이하늘의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 김 현 준 인

심사위원 박 기 현 인

심사위원 김 철 호 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2008년 12월 22일

*Staphylococcus aureus*의  
Lipoteichoic acid(LTA)에 의한  
사람의 정상 코 점막 상피세포에서의 MMP와 TIMP의 발현

호흡기가 bacteria에 감염 시, bacteria의 여러 구성 성분은 다양한 host factor를 분비하여 염증 반응이나 면역 반응, 장기의 기능 장애를 가져온다. 비부비동염이나 알레르기 천식 등의 호흡기 질환의 병인에서 Matrix metalloproteinases (MMPs)와 Tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)는 조직 재형성에 중요한 역할을 한다. 호흡기계 감염성 질환의 가장 흔한 병원균 중 하나인, *Staphylococcus aureus*의 Lipoteichoic acid(LTA)가 사람의 정상 코 점막 상피세포에서 MMPs와 TIMPs의 발현에 영향을 미치는 지를 Reverse transcriptase (RT)-PCR과 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Zymography를 통하여 확인하고, Mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway을 western blot으로 분석하였다. 고 순도로 정제된 LTA를 배양된 코 점막 상피세포에 처리하였을 때, LTA 농도 증가에 따라 MMP-9의 발현이 RT-PCR, ELISA, zymography 모두에서 증가하였다. 그러나 TIMP-1, -2의 발현은 변화가 없었다. LTA 처리 시 활성화 된 단백질은, MAPK pathway(ERK1/2, JNK, p38) 중 ERK1/2만이 활성화되었다. 또한 U0126을 처리하였을 때 MMP-9의 발현은 완벽히 억제되었다. 따라서 이 연구에서는 LTA가 MEK1/2-ERK1/2 pathway를 통하여 MMP-9의 발현을 유도하였으며 이는 조직 파괴나 재형성을 통하여 호흡기계 염증 반응에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

---

핵심어: LTA, MMP-9, TIMP, *Staphylococcus aureus*

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	ii
그림 차례 .....	iv
표 차례 .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
A. 사람의 정상 코 점막으로부터 분리한 상피세포 배양 .....	3
1. 사람 코 점막 상피세포의 Primary culture .....	3
2. Air Liquid Interface-culture(ALI-culture) .....	3
B. Lipoteichoic acid(LTA) 처리 .....	4
C. MTT assay .....	5
D. RNA 추출 및 cDNA 합성, PCR .....	5
E. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) .....	5
F. Gelatin zymography .....	6
1. Gelatinase B의 준비, 활성화 .....	6
2. Gelatinase B의 전기영동, 기질-효소 간 반응 .....	7
3. 발현된 band의 염색, 결과의 수치화 .....	7
G. Western blot .....	8
1. LTA 처리, 단백질 정량 .....	8
2. 단백질의 전기영동, Antibody 반응 .....	8
H. MEK1/2 inhibitor에 의한 MMP-9의 발현 억제 확인 .....	8
III. 결과 .....	10
A. LTA에 의한 코 점막 상피세포의 세포독성 확인 .....	10
B. MMP-9와 TIMP-1, -2 유전자의 발현 차이 .....	10
C. MMP-9와 TIMP-1, -2의 분비량 차이 .....	15

D. 분비 된 MMP-9(gelatinase B)의 활성 확인 .....	17
E. ERK1/2, STAT3의 발현 .....	18
F. ERK1/2를 매개로 MMP-9 발현 .....	19
IV. 고찰 .....	20
V. 결론 .....	24
참고문헌 .....	25
ABSTRACT .....	31

## 그림 차례

Fig. 1. Transwell for Air Liquid Interface-culture. ....	4
Fig. 2. Cytotoxicity of NHNE cells by LTA. ....	10
Fig. 3. mRNA expression of MMP-1, -2, -3, -7 and -9 by LTA in NHNE cells. ....	11
Fig. 4. mRNA expression of TIMP-1 and -2 by LTA in NHNE cells. ....	13
Fig. 5. Relative quantity of released MMP-9, TIMP-1 and -2 by LTA. ....	15
Fig. 6. Activity of released MMP-9(gelatinase B) by LTA. ....	17
Fig. 7. Phosphorylation of ERK1/2 and STAT3 by LTA. ....	18
Fig. 8. U0126 inhibited the mRNA expression of MMP-9 by LTA in NHNE cells. ....	19



## 표 차례

Table 1. Oligonucleotides and cycling conditions for detection of MMPs and TIMPs transcripts by RT-PCR .....	6
---	---

## I. 서 론

인체 호흡기계는 외부의 유해한 환경에 노출되어 있어, bacteria나 virus 감염 등의 위험성이 매우 높다. Bacteria 감염 시, bacteria의 여러 구성 성분은 숙주에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, platelet-activating factor(PAF)같은 pro-inflammatory cytokine을 분비하여 염증 반응이나 면역 반응을 일으키고, 장기의 기능 장애를 가져온다.(Cavaillon et al., 2003) Lipopolysaccharide(LPS)는 이런 반응을 일으키는 bacteria의 구성 성분 중 하나로 *Pseudomonas aeruginosa*나 *Hemophilus influenza*와 같은 그람 음성균의 세포벽을 이루는 주요 구성 성분으로, 여러 염증 반응에 관여 하는 내독소로 보고되고 있고, 그 신호 전달 과정에 대해서도 많은 연구가 있어 왔다.(Da Silva et al., 1997; Chen et al., 1999; Lukashova et al., 2001; Lukashova et al., 2003; Han et al., 2006)

인체의 피부, 호흡기에 많이 존재하고 있는, *Staphylococcus aureus*와 같은 그람 양성균의 Lipoteichoic acid(LTA)는 LPS와 유사한 물질로서, 생화학적, 생리학적 면에서 많은 공통점을 가진다. LTA는 LPS와 마찬가지로 양친매성(amphiphile)이며, LTA의 glycolipid anchor는 LPS의 lipid A와 유사한 역할로 작용하여 다양한 면역 기전을 활성화시키고 pro-inflammatory cytokine을 유도한다.(Morath et al., 2005) 그러나 상업화된 LTA는 종종 peptidoglycan이나 다른 세포벽 구성성분이 오염되어 있어(Gao et al., 2001), 그 역할에 대해 많은 논란이 있어왔으며, LPS에 비해 상대적으로 연구가 부족한 상태이다.

Matrix metalloproteinases(MMPs)와 Tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)는 다양한 염증반응에서 발견되어 염증세포를 조절한다.(Watelet et al., 2004) 기질 특이성에 따라 20개 이상으로 분류되어 있는 MMP는 Extra cellular matrix(ECM)의 여러 구성성분을 분해(Krane, 1994)하는 효소로서, 배형성, 상처 재생, 염증, 관절염, 심장혈관 질환, 폐질환, 암 형성 등 다양한 과정에 관여한다.(Chakraborti et al., 2003; Kuo et al., 2003; Watelet et al., 2004; Han et al., 2006) MMP의 작용은 다양한 방법으로 조절되며, 유전자

발현에서는, cytokine, growth factor, hormone 등 여러 요소들에 의해 조절 된다.(Mautino et al., 1997) TIMP는 MMP와 1:1로 결합을 하여 MMP의 catalytic site에 기질이 접근하지 못하도록 MMP의 작용을 억제하며(Brew et al., 2000), 조직 내에서 세포외 기질의 대사산물 균형을 유지한다.(D.E. Gomez et al., 1997) 그러나 MMP와 TIMP의 불균형은 matrix의 uncontrolled turnover와 관련된 질병인, 관절염, 암, 심장혈관 질환, 신장염, 신경상의 이상, 조직 궤양, 섬유증을 유발한다.(H. Nagase, 1996)

호흡기계 질환 중, 만성부비동염과 코 점막 용종에서는 MMP와 TIMP의 발현이 조직재형성 과정에서 차이를 보였으며(Watelet et al., 2004), 천식 환자에서 MMP-9의 증가는 염증발현과 호흡기계 재형성의 biomarker로서 역할을 하는 등, MMP와 TIMP는 호흡기계의 다양한 질환에서 중요한 역할을 한다고 보고되어 왔다.(Belleguic et al., 2002)

그러나 현재까지 호흡기계 감염성 질환의 가장 흔한 병원균 중 하나인, *Staphylococcus aureus*로부터 추출한 고 순도의(highly purified) LTA와 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 MMP와의 관계에 대한 연구는 매우 부족하다. 따라서 이 연구에서는 고 순도의 LTA를 사람의 정상 코 점막 상피세포에 처리했을 때, 여러 MMP의 발현 유무를 알아보고, 특정 MMP가 발현 될 때, TIMP의 발현이 정상적으로 나타나는지 알아보았다. 또한 MMP가 발현 될 때 어떠한 단백질을 매개로 신호전달이 이루어지는지 알아보았다.

## II. 재료 및 방법

### A. 사람의 정상 코 점막으로부터 분리한 상피세포 배양

#### 1. 사람 코 점막 상피세포의 Primary culture

코 점막을 채취하기 전 3개월 이상 항생제를 투여 하지 않고, 천식이나 알레르기 반응이 없는 사람의 코 점막을 채취하여 상피 세포를 얻었다. 채취한 코 점막은 transfer medium(DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12; Gibco, Gand Island, NY, USA에 1% 10000Units/ml penicillin/10000 $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가)에 보관한 뒤, 혈액이나 점액 같은 이물질을 제거하기 위해 transfer medium으로 조직을 세척한다. 0.1% protease(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 넣은 transfer media에 코 점막을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 1시간 배양한다. 점막을 긁어 상피세포를 조직으로부터 떨어뜨리고, 원심분리(1000rpm, 3분)를 하여 상피세포를 모은다. RBC, fibroblast등을 제거하기 위해 washing medium(10% FBS를 첨가한 transfer medium)에 상피세포를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 1시간 배양한다. 그 후 상등 액을 걸어낸 뒤, 원심 분리하여 더 깨끗한 상피세포를 분리한다. 모아진 상피 세포는 BEGM medium(Bronchial Epithelial Growth Media: BEBM/BEGM SingleQuotes; Lonza, Walkersville, MD, USA)으로 배양하며, 약 70% cell confluence가 되면 passage 2(P2)로 계대배양하고 P2의 cell이 70-80% cell confluence 상태가 되었을 때, Air Liquid Interface-culture(ALI-culture)를 한다.

#### 2. Air Liquid Interface-culture(ALI-culture)

0.4 $\mu$ m pore크기의 membrane을 갖는 transwell(Corning, NY, USA)에 BEGM:DMEM=1:1 medium을 사용하여 코 점막 상피세포를 배양한다. 배양한 상피세포가 100% cell confluence를 이루었을 때, BEBM:DMEM=1:1 medium(BEBM: Bronchial Epithelial Basal Media, no growth factors; Lonza,

Walkersville, MD, USA)을 transwell membrane 밑에만 넣어, membrane 위에 붙어있는 상피세포를 24시간동안 공기에 노출 시킨다. 그 후 LTA를 상피세포에 처리한다.

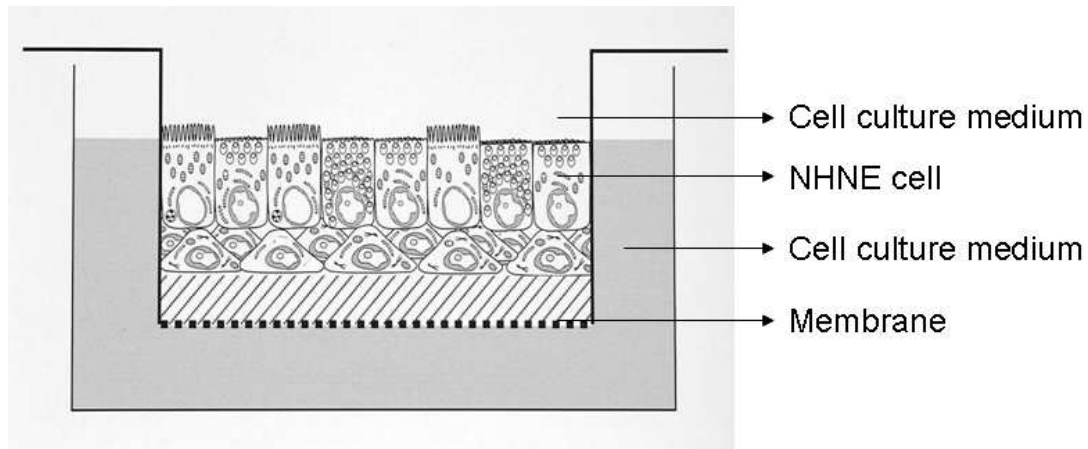


Fig. 1. Transwell including 0.4 $\mu$ m pore sized polyester membrane for Air Liquid Interface-culture(ALI-culture).

## B. Lipoteichoic acid(LTA) 처리

LTA(Lipoteichoic acid)는 상업화된 제품을 사용하지 않고, 서울대학교 치과대학 구강미생물학 교실로부터 제공받은 고 순도의 LTA를 사용하였다. 이 LTA는 *Staphylococcus aureus*에서 유기용매로 추출한 뒤, 다양한 chromatography 방법을 사용하여 분리하였고, 구조 분석과 순도 측정을 하였다. LTA을 처리할 때는 BEBM:DMEM=1:1 medium을 사용한다. 세포독성 확인 연구에서는 상피세포에 0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml LTA를 16시간 처리, mRNA 발현, ELISA, zymography 연구에서는 상피세포에 0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml LTA를 24시간 처리, 신호 전달 단백질을 확인하는 연구에서는 상피세포에 10 $\mu$ g/ml LTA를 5분, 15분, 30분, 1시간, 3시간동안 처리 하였다.

### C. MTT assay

$2 \times 10^3$  cells/well 개의 코 점막 상피세포를 96well plate(Corning, NY, USA)에서 이틀간 키운 뒤, LTA를 16시간 처리하였다. 상피세포가 있는 각 well에 5mg/ml MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 시약(Sigma, St. Louis, MO, USA)을  $40 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 4시간 배양한다. 상등 액을 버리고 살아있는 세포에서 환원된 formazan crystal을 DMSO로 녹인다. 그 후, 595nm에서 흡광도를 측정한다.

### D. RNA 추출 및 cDNA 합성, PCR

LTA를 처리한 코 점막 상피세포에 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Chloroform(Sigma, St. Louis, MO, USA), 2-Propanol(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 RNA를 추출한다. 추출한 RNA는 정량한 뒤, RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, Superscript III First Strand kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 하여 cDNA(complementary DNA)을 합성한다. 합성된 cDNA는 MMP-1, -2, -3, -7, -9와 TIMP-1, -2 유전자 발현을 확인하기 위한 PCR(polymerase chain reaction)의 주형으로서 사용된다. MMP와 TIMP의 primer sequence와 PCR 조건을 Table. 1에 명시하였다.

### E. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

0, 0.1, 1, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  LTA를 24시간 처리한 코 점막 상피세포의 상등 액을 이용하여, 분비된 MMP-9와 TIMP-1, -2의 상대적인 양을 측정하였다. 이 실험은 Immunoassay kit(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였다.

Table 1. Oligonucleotides and cycling conditions for detection of MMPs and TIMPs transcripts by RT-PCR

MMPs/ TIMPs	Oligonucleotides	temp./ time(sec)	Cycles
<b>MMP-1</b>	F: 5'-GGTGATGAAGCAGCCCAG-3' R: 5'-CAGTAGAATGGGAGAGTC-3'	60°C/30	35
<b>MMP-2</b>	F: 5'-ACCTGGATGCCGTCGTGGAC-3' R: 5'-TGTGGCAGCACCAGGGCAGC-3'	66°C/30	30
<b>MMP-3</b>	F: 5'-GATTACAGACATGGGTCCACG-3' R: 5'-GAATTCACATCACTGCCACC-3'	60°C/30	35
<b>MMP-7</b>	F: 5'-TGGCCTACCTATAACTGGAA-3' R: 5'-TCCCTAGACTGCTACCATCC-3'	55°C/30	28
<b>MMP-9</b>	F: 5'-GGGGAAGATGCTGTTCA-3' R: 5'-GGTCCCAGTGGGGATTTACA-3'	55°C/30	28
<b>TIMP-1</b>	F: 5'-GCTGGGTGGTAACTCTTTAT-3' R: 5'-CACCTTGCCTGCCTGCCTC-3'	61°C/55	45
<b>TIMP-2</b>	F: 5'-GGTCCTCGATGTCGAGAAAC-3' R: 5'-CTGGATGGACTGGGTCACAG-3'	61°C/55	45
<b>beta actin</b>	F: 5'-GACCTGACTGACTACCTCAT-3' R: 5'-TCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'	61°C/20	25

## F. Gelatin zymography

### 1. Gelatinase B의 준비, 활성화

0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml LTA를 24시간 처리한 코 점막 상피세포의 상등액을 이용하여 분리된 MMP-9(gelatinase B)의 활성 정도를 SDS-PAGE 상에서 측정하였다. gelatin zymography sample(gelatinase B)을 준비하기 위해, 상피

세포에서 걷어 낸 상등 액에 1mM APMA(4-Aminophenylmercuric acetate; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 뒤, 37°C에서 1시간동안 반응시켜 gelatinase B를 활성화시킨다.

## 2. Gelatinase B의 전기영동, 기질-효소 간 반응

Sample buffer는 일반적인 SDS-PAGE에서 사용하는 것과 동일하나, 단지  $\beta$ -mercaptoethanol을 넣지 않는다. 그리고 sample buffer를 넣고 단백질을 100°C에서 끓이지 않는다. 0.1% gelatin을 첨가한 8% SDS polyacrylamide gel에 gelatin zymography sample을 전기영동 하고, 이때 running buffer는 SDS-PAGE running buffer와 동일한 것을 사용한다. 전기영동 후, gel에 있는 SDS를 제거하기 위해 renaturation solution(2.7% Triton x-100 in distilled water)에 gel을 넣고 실온에서 1시간동안 흔들여 준 뒤, zymography developing buffer(Novex, Carlsbad, CA, USA)에 gel을 다시 넣어 실온에서 30분 동안 흔든다. 기질-효소 간 반응을 높이기 위해, 다시 developing buffer에 gel을 넣고 37°C에서 16-18시간 놓아둔다.

## 3. 발현된 band의 염색, 결과의 수치화

Staining solution(coomassie brilliant blue R-250; Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 gel을 염색하고 destaining solution(MeOH : H<sub>2</sub>O : Acetic acid=45 : 45 : 10)으로 활성화된 band를 확인한다. 활성화된 band가 확인되면 증류수로 gel을 세척하여 band를 고정하고 drying solution(20% MeOH, 2% glycerol in distilled water)과 셀로판지로 gel을 고정시켜 말린다. 말린 gel은 스캔을 한 뒤, FUJIFILM Multi Gauge V3.0을 이용하여 활성화된 band의 크기를 상대적인 수치로 나타내었다.



## G. Western blot

### 1. LTA 처리, 단백질 정량

코 점막 상피세포를 배양하여  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA를 0, 5분, 15분, 30분, 1시간, 3시간 처리 한 후, protease inhibitor cocktail(1 tablet/10ml RIPA; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 넣은 RIPA buffer(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 단백질을 추출한다. 추출한 단백질을 정량하여(Bio-Rad *Dc* protein assay; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)  $20\mu\text{g}$ 의 단백질로 준비하고, sample buffer를 넣어  $100^\circ\text{C}$ 에서 단백질을 끓인다.

### 2. 단백질의 전기영동, Antibody 반응

10% SDS polyacrylamide gel에 단백질을 전기영동 하고, PVDF membrane(Millipore, Badford, MA, USA)에 단백질을 transfer하였다. blocking solution(5% skim milk in PBST: PBS+0.1% Tween 20)으로 membrane을 2시간 동안 실온에서 배양시키고, 5% blocking solution에 희석한 rabbit polyclonal antibody(1st Antibody: ERK1/2, STAT3; Cell Signal Technology, Beverly, MA, USA)를  $4^\circ\text{C}$ 에서 12시간 이상 반응시켰다. 그 후, membrane을 PBST로 세척하고 5% blocking solution에 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit IgG(2nd Antibody: Cell Signal Technology, Beverly, MA, USA)에 membrane을 넣어 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤, PBST로 세척하였다. 발현된 단백질의 확인은 ECL kit(ECL advance western blotting detection kit - Lumigen<sup>TM</sup> TMA-6; Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 Luminescent Image Analyzer(영상 분석 장치)로 확인하였다.

## H. MEK1/2 inhibitor에 의한 MMP-9의 발현 억제 확인

발현된 세포질 내 신호 전달 단백질들이 MMP-9 유전자 발현에 직접적인 관계가 있는지 확인하였다. 코 점막 상피세포에 MEK1/2 inhibitor인 U0126

(Calbiochem, San Diego, CA, USA.)을 1시간 동안 전 처리 한 뒤,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA를 24시간 처리하였다. 그 후, 상피세포에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 PCR을 통해 MMP-9의 mRNA 발현 유무를 확인하였다.

### III. 결과

#### A. LTA에 의한 코 점막 상피세포의 세포독성 확인

LTA를 처리했을 때, LTA의 영향으로 코 점막 상피세포가 사멸 되는지 확인해보았다. 그 결과, LTA농도가 증가하여도 세포사멸은 보이지 않았다.(Fig. 2)

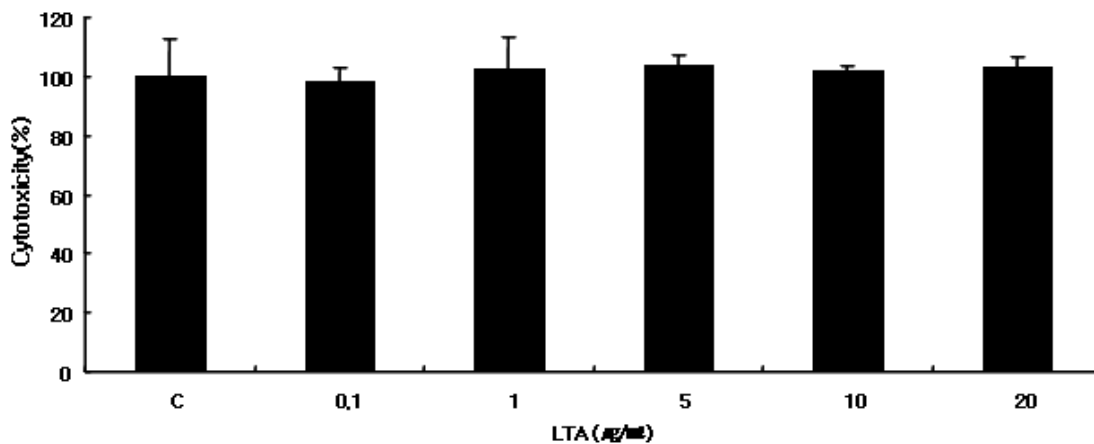


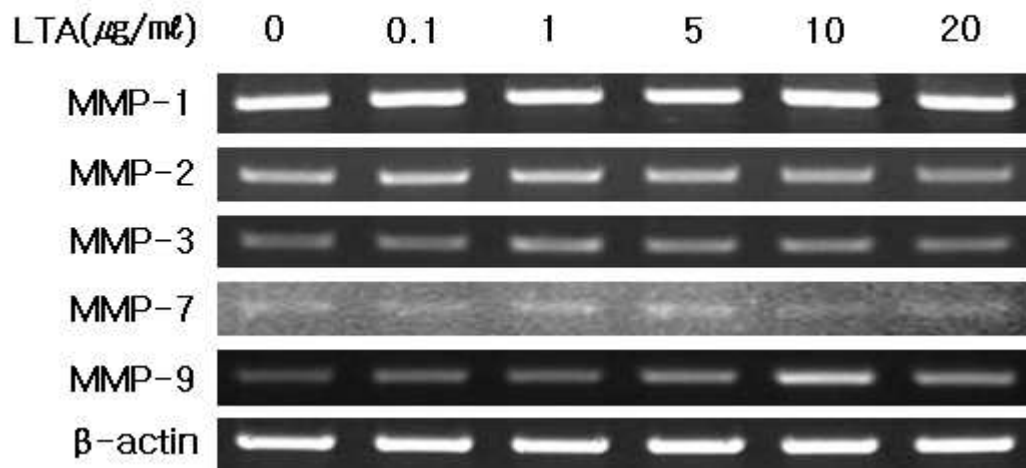
Fig. 2. Cytotoxicity of NHNE cells by LTA. The NHNE cells were stimulated with LTA(0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 16h. The cytotoxicity was analyzed by MTT assay.

#### B. MMP-9와 TIMP-1, -2 유전자의 발현 차이

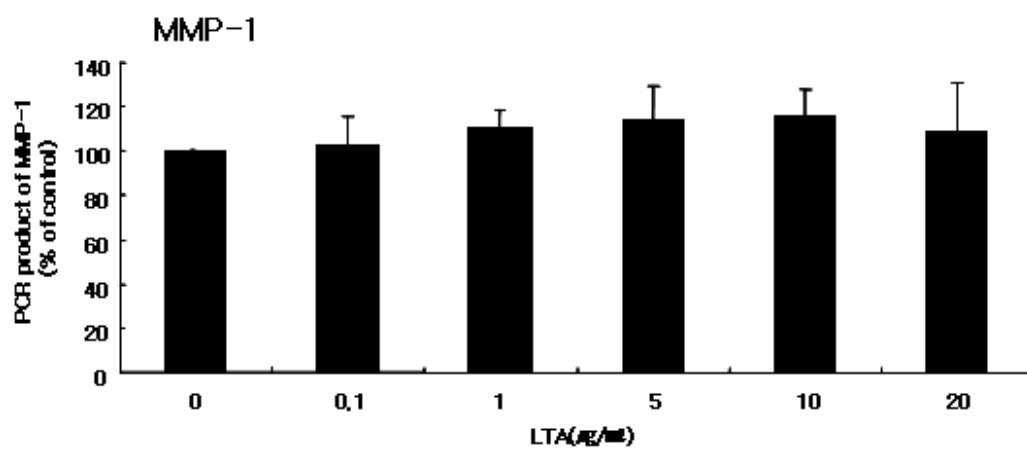
LTA와 같은 bacteria toxin에 의한 염증과 관련해, 어떠한 MMP 유전자가 발현 할 것인지 알아보았다. 합성한 cDNA로 PCR를 시행하여 MMP-1, -2, -3, -7, -9 유전자 발현 유무를 확인해 보았다.(Fig. 3) MMP-1, -2, -3, -7은 LTA 농도 증가에 따른 유전자 발현의 차이를 보이지 않았다. 그러나 MMP-9은 LTA 농도가 증가함에 따라 유전자 발현이 증가 하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA에서 control에 비

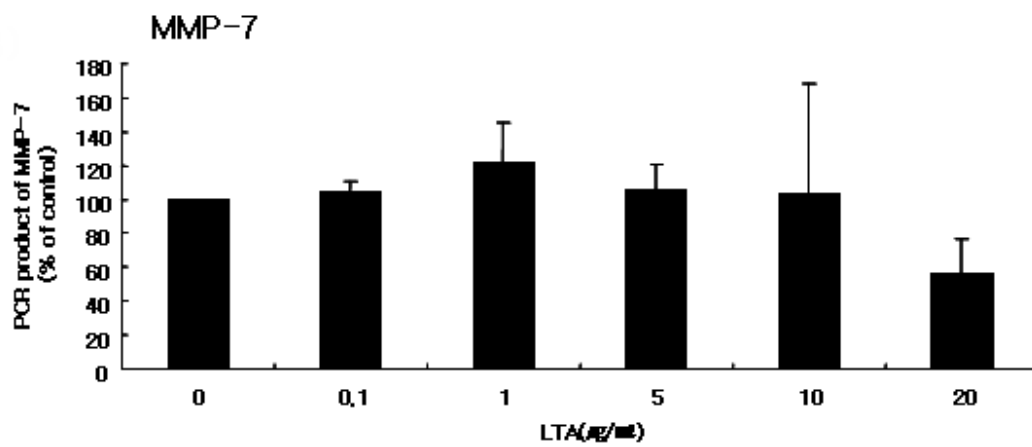
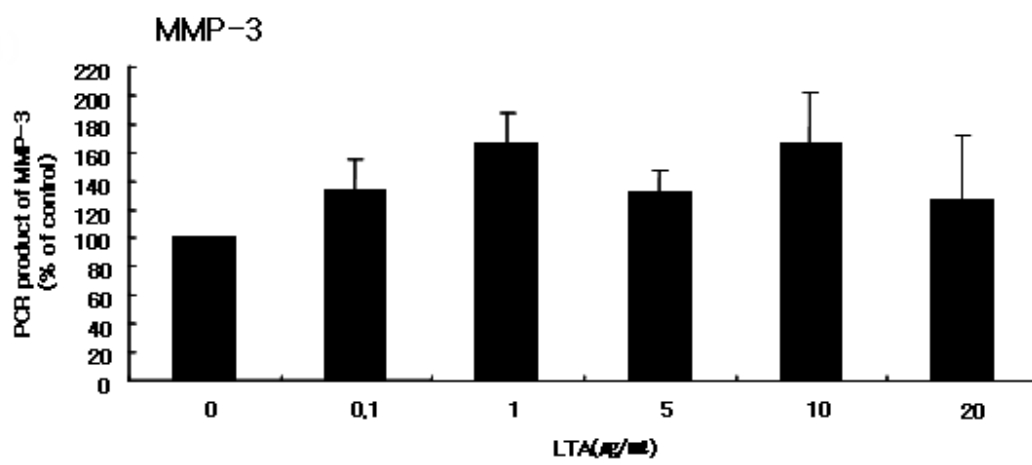
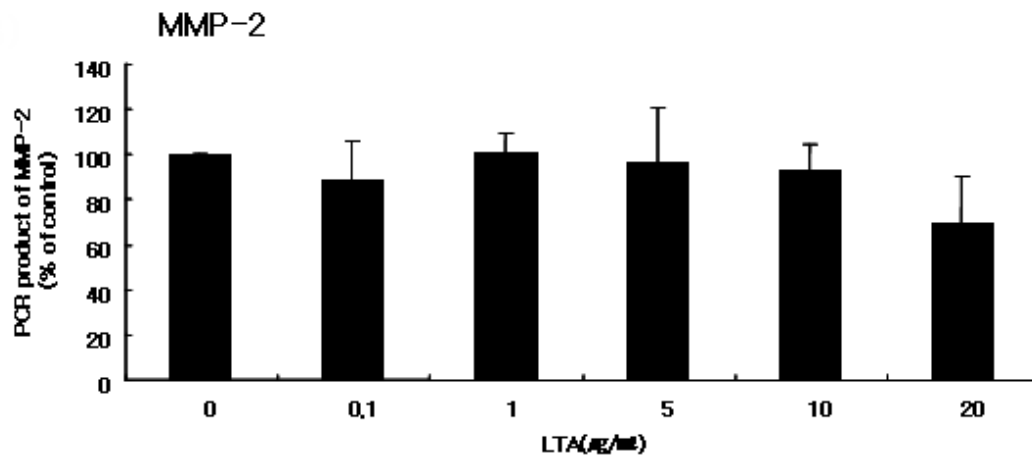
해 3배 이상의 발현 증가를 보였다.

(A)



(B)





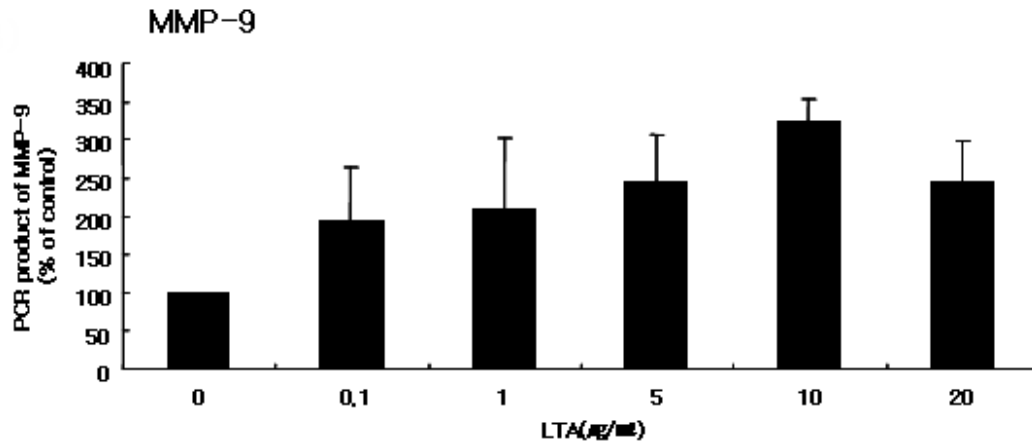
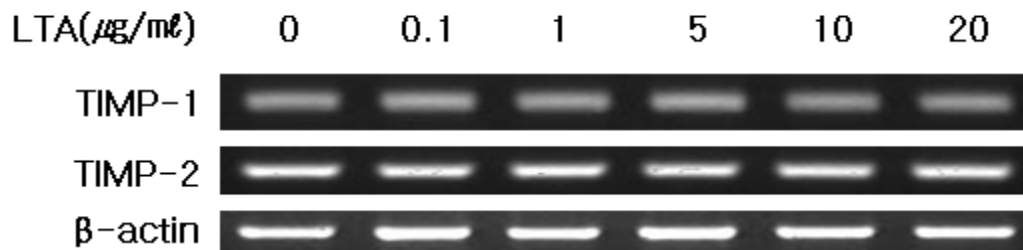


Fig. 3. (A) mRNA expression of MMP-1, -2, -3, -7 and -9 by LTA in NHNE cells. The normal human nasal epithelial cells were stimulated with LTA(0, 0.1, 1, 5, 10, 20µg/ml) for 24h. The mRNA expression of MMPs were analyzed by RT-PCR. (B) Relative transcripts levels of the MMP-1, -2, -3, -7 and -9 were measured by the Gel Doc 2000 and Quantity one, using 0µg/ml LTA as control.

MMP 유전자 발현과 함께 그것의 억제제인 TIMP의 유전자 발현 또한 확인해 보았다. MMP-9 유전자 발현 결과를 바탕으로, MMP-9 와 함께 발현 될 것으로 예상되는 TIMP-1, -2의 발현 정도를 알아보았다.(Fig. 4) PCR 결과, TIMP-1, -2의 유전자 발현은 LTA 농도 간의 차이를 보이지 않았다.

(A)



(B)

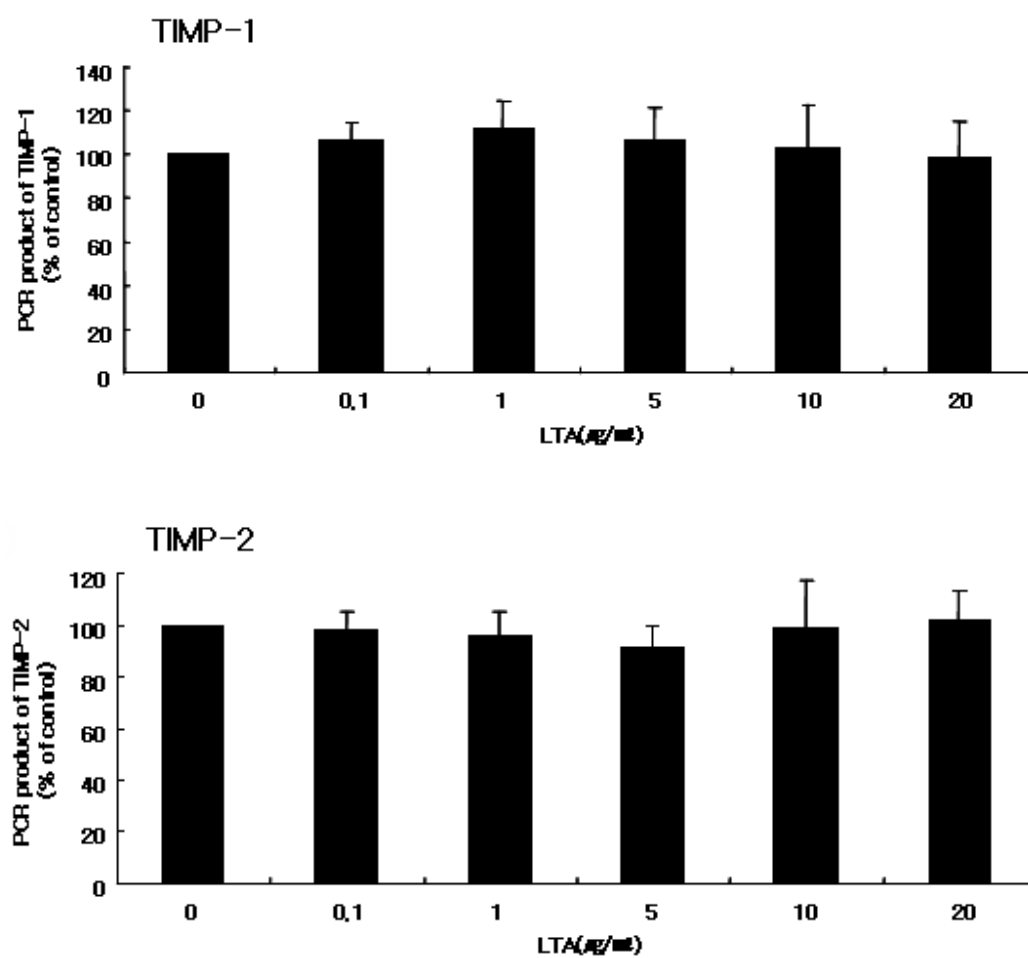
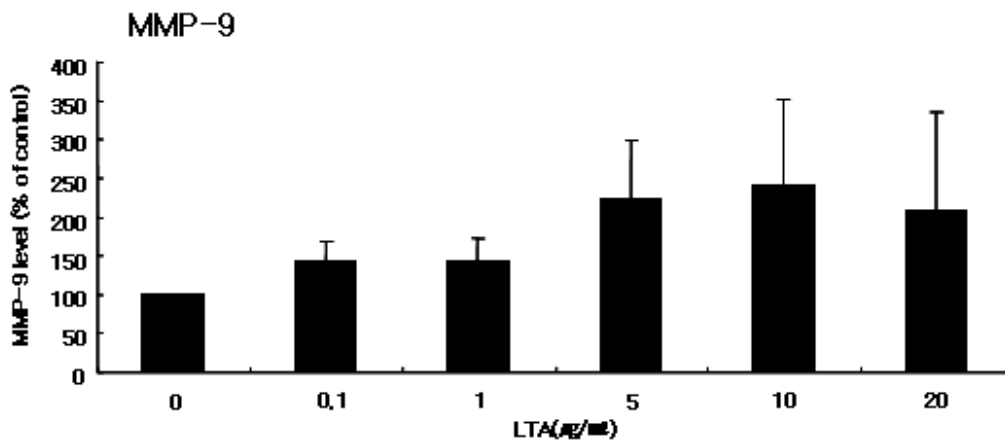


Fig. 4. (A) mRNA expression of TIMP-1 and -2 by LTA in NHNE cells. The NHNE cells were stimulated with LTA(0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24h. The mRNA expression of TIMPs were analyzed by RT-PCR. (B) Relative transcripts levels of the TIMP-1 and -2 were measured by the Gel Doc 2000 and Quantity one, using 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA as control.

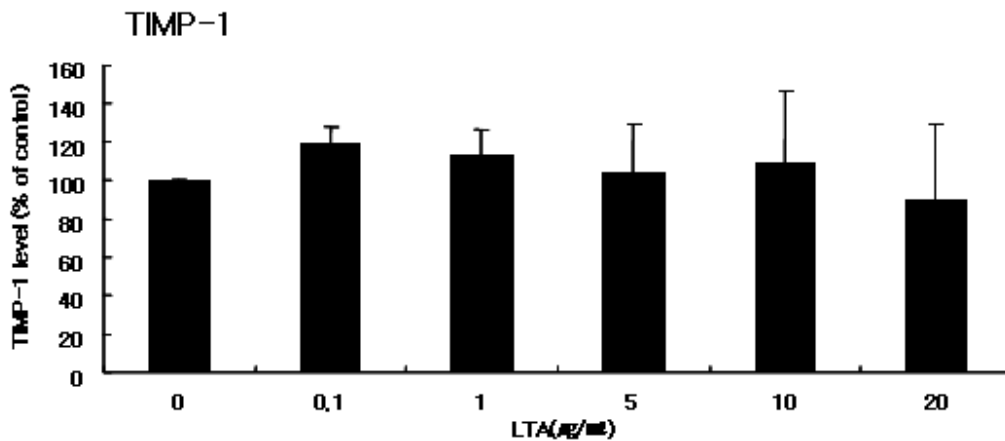
### C. MMP-9와 TIMP-1, -2의 분비량 차이

어떠한 자극에 의해서 MMP, TIMP가 발현 될 때, 그것들은 세포 밖으로 분비되는 효소로서 세포막에 붙어있거나 분비되어진 상태로 존재한다. MMP-9의 유전자가 발현되었기 때문에 분비되어진 MMP-9와 그것의 억제제인 TIMP-1, -2의 양이 어느 정도인지 확인해 보았다. LTA를 처리한 상피세포의 상등 액을 이용하여 ELISA를 시행하였으며(Fig. 5), MMP-9 분비량은 10 $\mu$ g/ml LTA 농도에서 최대치를 나타내었다. 그러나 TIMP-1, -2의 분비량은 LTA농도 간의 차이를 보이지 않았다.

(A)

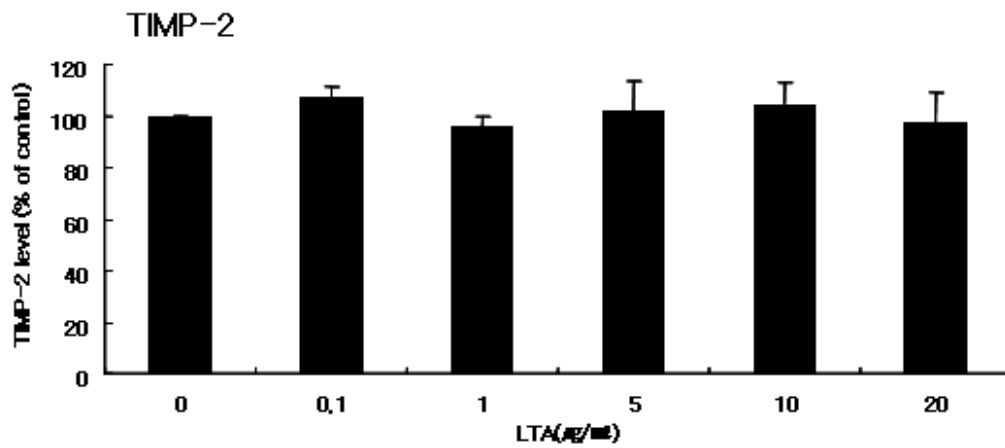


(B)





(C)

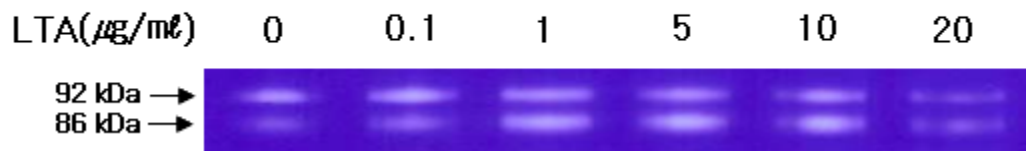


**Fig. 5. Relative quantity of released MMP-9, TIMP-1 and -2 by LTA.** The NHNE cells were stimulated with LTA(0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) for 24h and harvested the cell culture supernatants after 24h for the released MMP-9, TIMP-1 and -2 determination by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative data of the MMP-9(A), TIMP-1(B) and TIMP-2(C) levels presented as percentage of relative level by 0 $\mu\text{g/ml}$  LTA as control.

#### D. 분비된 MMP-9(Gelatinase B)의 활성 확인

Gelatin zymography를 이용하여 분비된 MMP-9(gelatinase B)의 활성 정도를 측정하였다. LTA 농도 증가에 따라 gelatinase B의 활성이 증가하여, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA 농도에서 최대 활성을 보였다.(Fig. 6)

(A)



(B)

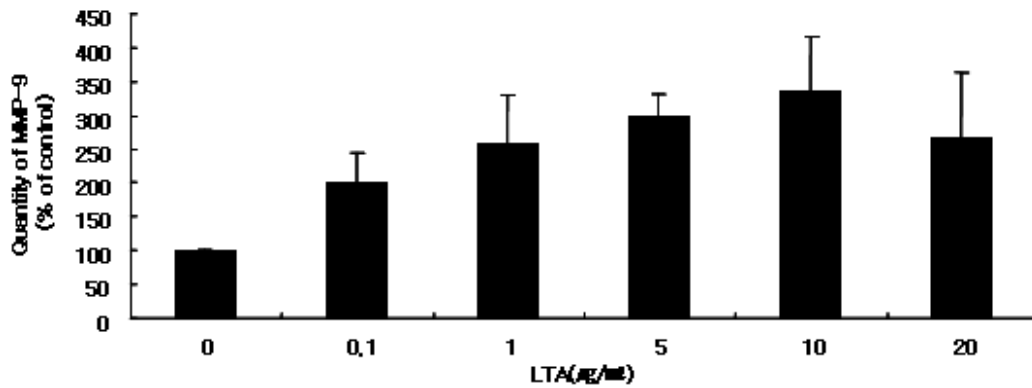


Fig. 6. (A) Activity of released MMP-9(gelatinase B) by LTA. The NHNE cells were stimulated with LTA(0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24h and harvested the cell culture supernatants after 24h for activity determination of the gelatinase B by gelatin zymography. (B) Relative quantity of the gelatinase B was measured by the FUJIFILM Multi Gauge V3.0 with scanned zymography gel, using 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LTA as control.

## E. ERK1/2, STAT3의 발현

LTA를 코 점막 상피세포에 처리 시, 어떠한 신호 전달 단백질이 활성화 되는지 western blot을 통해 알아보았다. MMP-9는  $10\mu\text{g/ml}$  LTA 농도에서 최대 발현을 나타내었다. 따라서  $10\mu\text{g/ml}$  LTA를 상피세포에 처리 한 후, 시간에 따라 활성화 되는 신호 전달 단백질들을 알아보았다.(Fig. 7) MAPK(mitogen-activated protein kinase) pathway중 ERK1/2(Thr202/Tyr204)만이 처리시간 5분에 최대 활성을 보였다. 따라서 ERK1/2와 연결된 up, downstream의 pathway에 대해 확인해보았다.

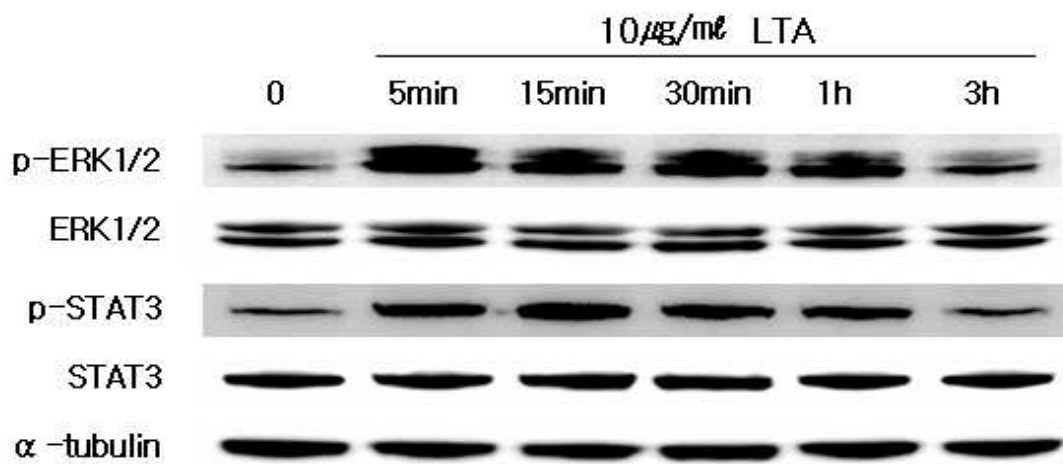


Fig. 7. Phosphorylation of ERK1/2 and STAT3 by LTA. The NHNE cells were stimulated with  $10\mu\text{g/ml}$  LTA for 5min-3h. The signal pathway were analyzed by western blot.

## F. ERK1/2를 매개로 MMP-9 발현

코 점막 상피세포에 LTA 처리 시, ERK1/2가 활성화 된 것을 확인하였다. 활성화 된 ERK1/2가 MMP-9 발현에 직접적인 영향을 미치는지 알아보기 위해, MEK1/2 inhibitor인 U0126을 LTA와 함께 상피세포에 처리하였다. 그 결과, MMP-9 유전자 발현이 억제되었다.(Fig. 8)

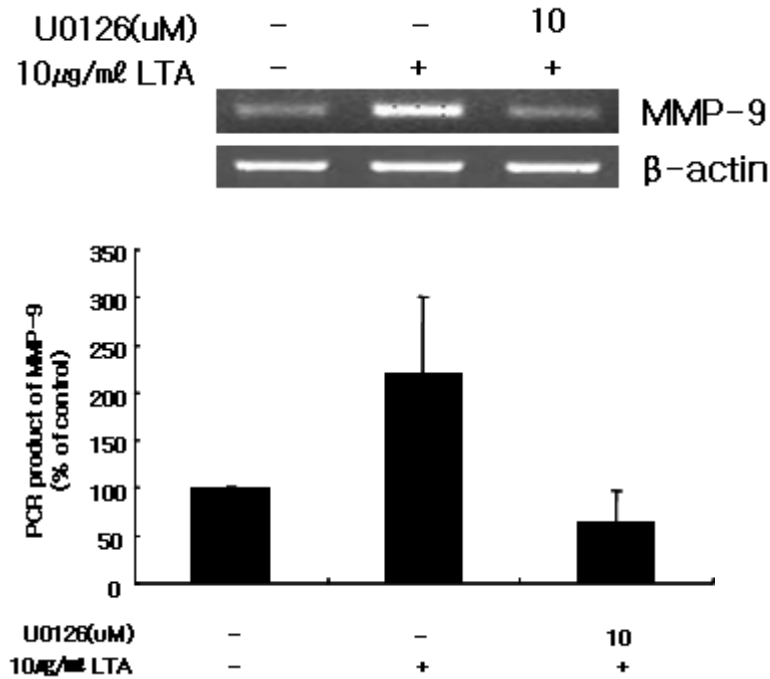


Fig. 8. U0126(MEK1/2 inhibitor) inhibited the mRNA expression of MMP-9 by LTA in NHNE cells. The NHNE cells were stimulated with 10 μg/ml LTA for 24h. The mRNA expression of MMP-9 was analyzed by RT-PCR.

## IV. 고찰

공기 중에 존재하는 bacteria나 virus, 유해 물질 등은 호흡기 점막에 독성 성분과 감염물질을 전달하여 숙주의 방어 작용이 기능을 상실시키고, 세포의 손상과 조직 파괴 등으로 염증 반응을 일으켜서 비부비동염, 후두염, 폐렴 등의 다양한 질환을 초래한다.(Smolin et al, 1977; Arp et al., 1987; Mondino 1988; Young et al., 2000; You et al., 2002; Radi et al., 2004) 과거 여러 연구에서, 비부비동염 등의 호흡기 질환의 주요 원인균주로서, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* 등이 보고되었으며 이 중에서 *Staphylococcus aureus*는 bacterial rhinosinusitis의 주된 병원균으로 보고되고 있다.(Payne et al., 2007) 세균은 다양한 독소와 cytokine 등을 분비하여 숙주에 여러 면역 반응을 일으키는데, *S. aureus*와 같은 그람 양성균의 주요 독소는 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan과 LTA이다. 과거 연구에서, 상업화된 LTA는 LPS등의 다른 세포벽 구성성분이 오염되어, 순도의 문제나 역가가 떨어지는 등의 문제로 다양하고 부정확한 결과를 보여주었으며, 상대적으로 LTA에 대한 연구나 자료가 매우 부족한 편이다. 따라서 본 연구에서는 *Staphylococcus aureus*부터 추출한 고 순도(highly purified)의 LTA를 사용하였다.

Extra Cellular Matrix(ECM)는 조직의 항상성과 종양 침윤, 상처 치유, 염증성 질환 및 섬유형성 질환과 같은 병적 상태에 관여하며, 코 점막 조직에서 ECM의 중요한 성분인 collagen은 조직의 골격을 이루고 상처나 염증 반응 후에 조직의 재형성 과정에 중요하게 작용한다.(O'Connor et al., 1994) 그러나 어떠한 자극에 의해 발현된 MMP는 collagen을 분해하여 염증 같은 병적상태를 더욱 악화시키거나 조직을 변형시킬 수 있다. MMP-9는 천식, 급성 폐질환, 폐암을 가진 환자의 호흡기(Dahlen et al., 1999; Gibbs et al., 1999; Cox et al., 2000), nasal polyp내의 상피세포, 내피세포, 염증세포 등에서 발현되며(Lechapt-Zalcman et al., 2001), gelatin과 collagen을 분해하여 염증 반응 시 염증 세포의 이동과 침윤을 촉진 시킨다.(Nakagawa et al., 1994) 과거 여러 연구를 보면

nasal polyp과 만성 부비동염 환자의 조직에서 immunohistochemistry, ELISA를 시행한 결과, MMP-9의 농도가 증가하였고(Watelet et al., 2004), nasal polyposis 환자의 조직에서는 MMP-2, -9의 발현이 증가하였다. 또한 만성 부비동염 환자의 조직에서는 MMP-9를 비롯해 MMP-2, -7의 발현이 증가하였으나 TIMP-1의 발현은 증가하지 않았다.(Can et al., 2008) 천식 환자의 경우, 혈장에서 MMP-9가 증가하여, collagen 침전, smooth muscle 비대, 호흡기 염증세포의 침윤에 의해 lamina reticularis의 두께가 두꺼워지면서 기관지의 구조변화가 일어났다.(Belleguic et al., 2002) 이와 반대로 만성 폐쇄성호흡기 질환의 경우, MMP-9보다 TIMP-1이 과 발현되기도 하였다.(Matsumoto et al., 2005) 이처럼 세균의 독소와 MMP는 호흡기계 염증 반응에서 중요한 역할을 하며 여러 연구에서 그 상호 연관성에 대해 보고되었다.

그람 음성균인 *Prevotella intermedia*는 human periodontal ligament cell에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다.(Guan et al., 2008) 또한 ras/myc-transformed serum-free mouse embryo cell에 LPS, LPS/IFN- $\gamma$  을 처리 했을 때 MMP-9의 발현이 증가하였으나, TIMP-1의 발현은 control과 차이가 없었다.(Kidachi et al., 2007) 과거 그람 양성균의 독소에 관한 연구에서, *Staphylococcus aureus*로부터 추출한 peptidoglycan은 인체 neutrophil에서 ERK pathway를 통하여 MMP-9의 분비를 증가시켰으며, *Staphylococcus aureus*로부터 추출한 상업화된 LTA는 RAW 264.7 macrophage에서 MMP-9를 증가시켰다는 보고가 있었다.(Wang et al., 2005; Souza et al., 2008) 이렇게 LTA와 MMP의 관계에 대한 많은 연구가 있어 왔지만, 인체 호흡기 점막 상피세포에서 고 순도의 LTA와 MMP의 관계에 대한 연구는 없었다.

이 연구에서, 인체 코 점막상피세포에 고 순도의 LTA를 자극 시, 10 $\mu$ g/ml LTA농도에서 MMP-9 유전자 발현과 분비량이 최대치를 나타냈으며, TIMP-1, -2의 발현과 분비량에는 변화가 없었다. 흥미롭게도 MMP-9만이 LTA 농도 증가에 따라 발현 증가를 보여, 과거 호흡기계 염증질환에서 MMP-9가 증가하는 것과 같은 결과를 보였다. MMP 유전자 발현과 함께 TIMP의 유전자 발현 또한

확인 하였다. 본 연구에서는 MMP-9가 발현되어, 대부분의 MMP를 억제하며, MMP-9의 proenzyme을 억제하는 TIMP-1과, MMP-2의 latent enzyme을 억제하는 TIMP-2의(Murphy et al., 1992; Herbst et al., 1997) 유전자 발현을 확인하였으나, TIMP-1, -2 모두 변화를 보이지 않았다.

MMP-9 ELISA 결과, 유전자 발현 정도보다 분비된 정도가 낮긴 하지만, LTA 농도 증가에 따라 MMP-9 분비량이 증가하여 10 $\mu$ g/ml LTA 농도에서 최대 분비를 나타내었다. 그에 반해, TIMP-1, -2의 분비량은 LTA 농도 증가에 따른 변화를 보이지 않았다. 결국, ELISA 결과는 유전자 발현 결과와 똑같이, LTA 자극에 의해 분비된 MMP-9의 발현이 증가하지만 TIMP-1, -2의 발현에는 변화가 없어, 두 단백질의 불균형 발현을 보여주었다. 본 연구 결과처럼 인체 호흡기에서도 MMP와 TIMP의 불균형으로 MMP의 활성이 증가하여 염증 등의 병적인 상태를 유발할 수 있을 것이다.

분비된 MMP-9의 활성은 gelatin zymography 방법을 통해 다시 한 번 확인하였다. type IV collagenase(Gelatinase)는 MMP-2(Gelatinase A)와 MMP-9(Gelatinase B)의로, 두 효소가 동시에 활성화 된다면 gelatin zymography 시 MMP-2의 72, 62kDa와 MMP-9의 92, 86kDa 크기의 단백질 발현을 확인 할 수 있다. 이 연구에서는 LTA 자극 시 MMP-9만이 발현하여 92, 86kDa 크기의 단백질을 확인하였다.

이 연구에서, LTA의 영향을 받은 코 점막 상피 세포는 MMP-9를 발현시켰고, MMP-9 발현에 관여하는 신호 전달 단백질을 세포질에서 확인하였다. 이전 연구에서 LTA는 다양한 세포에서 ERK1/2와 p38의 신호 전달 경로를 통하여 면역 반응을 일으킨다고 보고되었다.(Schroder et al., 2001; Lin et al., 2002; Kinsner et al., 2006) ERK1/2는 성장인자, cytokine, virus 감염, G protein의 ligand와 연관된 receptor, transforming agent, 발암물질과 같은 다양한 자극에 의해 활성화된다.(Johnson et al., 2002) 따라서 세포에서는 LTA에 의해 cytokine 뿐만 아니라 다양한 물질을 유도하여 ERK1/2를 활성화 시키고, ERK1/2를 매개로 MMP-9가 발현했을 가능성이 있다. SAPK/JNK는 inflammatory cytokine에

의해 활성화되기도 하지만, 염증세포보다 programmed cell death나 apoptosis에서 더욱더 활성화 된다.(Tournier et al., 2000) p38은 inflammatory cytokine에 의해 면역세포에서 활성화되며, 면역 반응 활성화에 중요한 역할을 한다. 또한 inflammatory cytokine 발현의 중요한 인자이기 때문에 천식, 자가 면역과 같은 질병에 연관되어 나타난다.(Johnson et al., 2002) 따라서 이 연구에서는 MAPK pathway중 ERK1/2와 p38이 활성화 될 것이라고 기대하였다. 그러나 이 연구에서의 LTA는 이전 연구결과와 달리, p38을 활성화시키지 않았으며, MEK1/2-ERK1/2를 통한 신호전달 경로를 보여주었다.

또한 LTA는 ERK1/2의 downstream인 STAT3을 활성화 시켰다. STAT3의 활성화는 IL-6 계열의 cytokine인, IL-6, IL-11, OSM(Oncostatin M), CNFN, LIF(Leukemia inhibitory factor), CT-1이 gp130(Glycoprotein 130)에 의해 신호전달을 하여 세포질에서 Jak, STAT3을 활성화(Leonard et al., 1998) 시키고 STAT3이 핵 내로 translocation되어 transcription factor로 작용한다고 볼 수 있다. 그러나 이 pathway는 ERK의 발현을 억제하기 때문에, ERK1/2가 발현된 이 연구결과와는 일치하지 않는 pathway이다. 또 다른 gp130 활성화 신호전달은, IL-6계열 cytokine이 gp130을 통해 Jak-Ras-Raf-MEK-ERK-STAT3 순으로 신호전달을 하는 것이다. 이 연구에서, LTA 자극에 의해 먼저 ERK1/2가 발현된 뒤, STAT3이 발현되었다. 이 결과, type I IFN(IFN $\alpha/\beta$ ) receptor의 IFNAR (interferon- $\alpha/\beta$  receptor)- I 에 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)가 결합함으로써 STAT3이 활성화되는 pathway를 생각할 수 있다.(Pfeffer et al., 1997) 이것은 LTA 자극으로 RTK(Receptor tyrosine kinase) receptor가 외부 신호를 받아, Ras-PI3K-c-Raf-MEK1/2-ERK1/2-STAT3 순으로 신호전달이 되어 MMP-9가 발현됐다고 볼 수 있다.



## V. 결론

*Staphylococcus aureus*의 LTA는 사람의 정상 코 점막 상피세포에서 ERK1/2 pathway를 통해 MMP-9의 발현을 증가시켰으나 TIMP-1, -2의 발현에는 차이가 없었다. 이러한 결과가 신체 내에서 일어나게 된다면, 분비된 MMP-9의 증가로 인해 조직의 파괴와 재형성이 일어날 수 있으며, pro-inflammatory cytokine의 과 분비에 의해 염증반응을 초래하거나 더욱 악화시킬 수 있다.

## 참고 문헌

1. Arp, L. H., and J. A. Fagerland, Ultrastructural pathology of *Bordetella avium* infection in turkeys. *Vet. Pathol* 24:411-418, 1987
2. Belleguic C, Corbel M, Germain N, Léna H, Boichot E, Delaval PH, Lagente V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 32:168-171, 2002
3. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases : evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283, 2000
4. Can IH, Ceylan K, Caydere M, Samim EE, Ustun H, Karasoy DS. The expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 139:211-215, 2008
5. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 35:535-544, 2003
6. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253:269-285, 2003
7. Chen C. C. and Wang J. J. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol* 55:481-488, 1999
8. Cox G, Jones L, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6:2349-2355, 2000

9. Dahlen B, Shute J, Howarth P., Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax* 54:590-596, 1999
10. Da Silva J., Pierrat B., Mary J. L. and Lesslauer W. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J. Biol. Chem* 272:28373-28380, 1997
11. D.E. Gomez, D.F. Alonso, H. Yoshiji, U.P. Thorgeirsson, Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol* 74:111-122, 1997
12. Gao J. J., Xue Q., Zuvanich E. G., Haghi K. R. and Morrison D. C. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect. Immun* 69:751-757, 2001
13. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ., Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1145-1154, 1999
14. Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. Prevotella intermedia induces matrix metalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett* 283:47-53, 2008
15. Han SH, Kim JH, Seo HS, Martin MH, Chung GH, Michalek SM, Nahm MH. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol* 176:573-579, 2006

16. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150:1647-1659, 1997
17. H. Nagase, in: Zinc Metalloproteases in Health and Disease. N.M. Hooper ed. London, Taylor and Francis, pp.153-204, 1996
18. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912, 2002
19. Kidachi Y, Yamaguchi H, Umetsu H, Ryoyama K. Interferon-gamma and lipopolysaccharide stimulation increases matrix metalloproteinase-9 expression and enhances invasion activity in ras/myc-transformed serum-free mouse embryo cells. *Cell Biol Int* 31:1511-1517, 2007
20. Kinsner A, Boveri M, Hareng L, Brown GC, Coecke S, Hartung T, Bal-Price A. Highly purified lipoteichoic acid induced pro-inflammatory signalling in primary culture of rat microglia through Toll-like receptor 2: selective potentiation of nitric oxide production by muramyl dipeptide. *J Neurochem* 99:596-607, 2006
21. Krane SM. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 732:1-10, 1994
22. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SO, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice. *Cancer Lett* 189:103-112, 2003
23. Lechapt-Zalcman E, Coste A, d'Ortho MP, Frisdal E, Harf A, Lafuma C, Escudier E. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. *J Pathol* 193:233-241, 2001

24. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322, 1998
25. Lin C. H., Kuan I. H., Wang C. H., Lee H. M., Lee W. S., Sheu J. R., Hsiao G., Wu C. H. and Kuo H. P. Lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression requires activations of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways. *Eur. J. Pharmacol* 450:1-9, 2002
26. Lukashova, V., C. Asselin, J. J. Krolewski, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J. Biol. Chem* 276:24113-24121, 2001
27. Lukashova, V., Z. Chen, R. J. Duhe, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. Janus kinase 2 activation by the platelet-activating factor receptor (PAFR): roles of Tyk2 and PAFR C terminus. *J. Immunol* 171:3794-3800, 2003
28. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Minakuchi M, Tabuena R, Chin K, Mio T, Ito Y, Muro S, Hirai T, Morita S, Fukuhara S, Mishima M. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax* 60:277-281, 2005
29. Mautino G, Oliver N, Chanez P, Bousquet J, Capony F. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:583-591, 1997
30. Mondino BJ. Inflammatory diseases of the peripheral cornea. *Ophthalmology* 95:463-472, 1988
31. Morath S, von Aulock S, Hartung T. Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *Journal of Endotoxin Research* 11:348-356, 2005

32. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:120-125, 1992
33. Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg* 81:69-77, 1994
34. O'Connor CM, FitzGerald MX. Matrix metalloproteases and lung disease. *Thorax* 49:602-609, 1994
35. Payne SC, Benninger MS. *Staphylococcus aureus* is a major pathogen in acute bacterial rhinosinusitis: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 45:121-127, 2007
36. Pfeffer LM, Mullersman JE, Pfeffer SR, Murti A, Shi W, Yang CH. STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* 276:1418, 1997
37. Radi ZA, Ackermann MR. Growth of differentiated ovine tracheal epithelial cells in vitro. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 51:167-170, 2004
38. Schroder N. W., Pfeil D., Opitz B., Michelsen K. S., Amberger J., Zahringer U., Gobel U. B. and Schumann R. R. Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, 38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema lipoteichoic acid*. *J. Biol. Chem* 276:9713-9719, 2001
39. Smolin G, Okumoto M. Staphylococcal blepharitis. *Arch Ophthalmol* 95:812-816, 1997
40. Souza LF, Jardim FR, Sauter IP, Souza MM, Barreto F, Margis R, Bernard EA. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* increases matrix metalloproteinase 9 expression in RAW 264.7 macrophages: Modulation by A2A and A2B adenosine receptors. *Mol Immunol* 2008

41. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874, 2000
42. Wang YY, Myhre AE, Pettersen SJ, Dahle MK, Foster SJ, Thiemermann C, Bjørnland K, Aasen AO, Wang JE. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* induces enhanced levels of matrix metalloproteinase-9 in human blood originating from neutrophils. *Shock* 24:214-218, 2005
43. Watelet JB, Bachert C, Claeys C, Van Cauwenberge P. Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy* 59:54-60, 2004
44. You L, Kruse FE, Bacher S, Schmitz ML. Lipoteichoic acid selectively induces the ERK signaling pathway in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2272-2277, 2002
45. Young, T. F., E. L. Thacker, B. Z. Erickson, and R. F. Ross, A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet. Microbiol* 71:269-279, 2000

**Expression of MMPs and TIMPs  
by Lipoteichoic acid(LTA) from *Staphylococcus aureus*  
in Normal Human Nasal Epithelial(NHNE) cell**

Ha Neul Lee

Department of Biomedical Science  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Hyun Jun Kim)

**Background** During bacterial infection to respiratory system, bacterial constituents induce the production of various host factors, cause inflammation, immune response and multiorgan dysfunction. Matrix metalloproteinases (MMPs) and Tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs) play a key role that induced tissue remodelling in respiratory disease such as chronic sinusitis and asthma.

**Objective** To investigate the expression of MMP and TIMP in normal human nasal epithelial(NHNE) cell by lipoteichoic acid(LTA) of *Staphylococcus aureus*, common pathogen related to infectious disease in airway.

**Method** The determination of MMPs and TIMPs level using RT-PCR, Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and zymogram, and of activated proteins of Mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway using western blot.



**Result** In this study, the MMP-9 level was increased by highly purified LTA in dose-dependent manner, while no difference was found for TIMP-1 and TIMP-2 level by LTA in NHNE cell. The only ERK1/2 of MAPK pathway was activated by LTA. And the MEK1/2 inhibitor(U0126) prevented expression of MMP-9 by LTA

**Conclusion** This study has suggested that LTA induce the expression of MMP-9 through the MEK1/2-ERK1/2 pathway and the MMP-9 plays a key role in respiratory inflammation as induce tissue remodelling.

---

Key words: LTA, MMP-9, TIMP, *Staphylococcus aureus*