creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

사람 코 상피세포에서 녹농균 감염에 의한 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비

연세대학교 대학원

의과학과

김 수 진

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

사람 코 상피세포에서 녹농균 감염에 의한 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비

지도교수 윤 주 헌

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

김 수 진

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

김수진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 윤 주 헌 인

심사위원 유 지 환 인

심사위원 이 경 원 인

연세대학교 대학원

2016년 12월

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

감사의 글

이 학위 논문이 만들어 지기까지 지도하고 조언해 주신 윤주헌 교수님, 유지환 교수님, 이경원 교수님께 깊은 감사를 전합니다. 학위 과정 동안 저의 부족한 것이 무엇인지 알게 되었고 교수님들의 아낌없는 지도 덕분에 연구자로써 한 걸음 더 나아갈 수 있었습니다. 실험실에 처음 들어왔을 때부터 항상 신경 써주신 김창훈 교수님, 실험에 익숙하지 않은 저를 직접 가르쳐 주시며 이끌어 주신 김현직 교수님, 그리고 오랜 경험을 통해 항상 저에게 해답을 찾아주시는 이상남 교수님과 평일, 주말 상관없이 항상 부대끼며 도움과 조언을 아끼지 않은 실험실 선생님들 모두 감사합니다. 2년의 학위 과정 동안 얻을 수 있었던 모든 결과물들은 여러 선생님들의 도움이 없었다면 절대 이룰 수 없었을 것들입니다.

2년이라는 짧지 않은 기간 동안 묵묵히 곁에서 지켜봐 주고 언제나 응원을 아끼지 않았던 가족들과 지치고 힘들 때 늘 위로해 주었던 친구들 덕분에 버틸 수 있었습니다.

여기까지 쉼 없이 달려오며 굉장히 긴 시간이라고 생각했지만 돌이켜 보니 힘들었던 일도, 즐거웠던 일 모두 저에게 값진 경험이었습니다.

저자 씀

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

차 례

국문요약 ····· 1

Ⅰ. 서론 ····· 3

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6

1. 재료 ····· 6

가. 세포 ····· 6

나. 균주 ····· 6

다. 항체와 시약 ····· 6

2. 방법 ····· 7

가. 세포 배양, 균 감염 및 억제제 처리 ····· 7

나. 세포독성 측정 ····· 8

다. Western blot ····· 8

라. 정량 PCR ····· 9

마. 효소면역분석법 ····· 11

바. 통계분석 ····· 11

Ⅲ. 결과 ····· 12

1. PA01 감염 후 9시간까지 증가하지 않는 세포사멸 ····· 12

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

2. 염증유발 사이토카인은 코 상피세포의 정단부로, 케모카인은 기저부로 주로 분비 ····· 14
3. 시간이 지남에 따라 증가하는 염증유발 사이토카인과 케모카인의 유전자 발현 ····· 16
4. 코 상피세포에 PA01을 감염시키면 증가하는 TLR2, TLR4, TLR7의 유전자 발현 ····· 18
5. 억제제 처리 후 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비의 변화 ····· 20
Ⅳ. 고찰 ····· 22
Ⅴ. 결론 ····· 26
참고문헌 ····· 27
Abstract ····· 33

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 차례

그림 1. PA01 감염 후 코 상피세포의 세포생존도 측정 ····· 13
그림 2. PA01 감염 후 정단 분비물과 기저측 분비물에서 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비량 측정 ····· 15
그림 3. PA01 감염 후 코 상피세포의 염증유발 사이토카인과 케모카인의 유전자 발현 측정 ···· 17
그림 4. PA01 감염 후 코 상피세포에서의 톨유사수용체 유전자 발현 측정 ····· 19
그림 5. 억제제 처리 후 PA01을 감염시켰을 때 염증유발 사이토카인과 케모카인 분비량 측정 ····· 21

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

표 차례

표 1. 정량 PCR에 사용한 프라이머 ····· 10

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

국문요약

사람 코 상피세포에서 녹농균 감염에 의한 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비

호흡기 점막은 최전방에서 체내로 침입하는 병원균에 대한 방어를 구축하고 있다. 섬모운동과 항균 물질 분비 같은 면역반응 때문에 보통 병원균이나 공생생물로 인한 특정 질병이 나타나지 않는다. 하지만, 면역이 저하되었거나 병원균 증식이 과다하게 되는 경우에는 호흡기 감염 질환이 일어날 수 있다. 가장 흔한 병원균 중 하나로, 그람 음성균인 녹농균은 많은 항생제에 대한 내성을 가지고 있고, 상피세포에서 분비하는 점액을 에너지원으로 삼을 수 있어, 중증 호흡기 질환을 유발한다. 일단 감염되면 호흡기 질환에 막대한 영향을 미치는 녹농균이 정상인 사람의 비강에서는 효과적으로 제거되어 면역 항상성을 유지하는 데에는 코 상피세포의 면역반응이 크게 기여하고 있다.

본 연구에서는 세포사멸이 발생하지 않는 범위 내에서, 녹농균의 야생형인 PA01을 air-liquid interface (ALI) 시스템에서 재분화 시킨 사람 코 상피세포에 감염시켰다. 염증유발 사이토카인과 코 상피세포에서 검출된 케모카인의 분비를 측정한 결과, 극성을 가진 코 상피세포가 병원균을

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

인지하면 그 역할과 목적에 따라서 염증유발 사이토카인은 비강과 면하고 있는 정단부로, 케모카인은 조직과 혈액에 있는 면역세포를 유도하기 위해 혈관과 가까운 기저부로 더 많이 분비되는 것을 알 수 있었다. 그리고 이러한 분비는 전사 단계에서부터 조절된 것을 알 수 있었다. 코 상피세포에서 면역반응 매개물질을 분비하기 위해선 세포막 혹은 세포질에 존재하는 수용체과 병원균의 접촉이 일어나야 하는데, 호흡기 상피세포에서 발현한다고 알려진 9개의 톨유사수용체(toll-like receptor, TLR) 중에서 TLR2, TLR4, TLR7이 의미 있게 증가하였다. 억제제 실험에서 억제된 기전에 따라 사이토카인의 반응이 달랐지만, 미토파지가 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

본 연구의 결과로, 향후 상피세포의 분비 실험에서는 염증유발 사이토카인은 정단 분비물에서, 케모카인은 기저측 분비물에서 측정해야 함을 보여주었고, 호흡기 상피세포에서 염증유발 사이토카인과 케모카인이 분비될 때 여러 기전과 복잡하게 연결되어 있음을 알 수 있었다.

핵심되는 말 : 코 상피세포, 녹농균, 선천성 면역, 염증유발 사이토카인, 케모카인

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

사람 코 상피세포에서 녹농균 감염에 의한 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비

<지도교수 **윤 주 헌**>

연세대학교 대학원 의과학과

김 수 진

Ⅰ. 서 론

인간은 하루에 10,000 리터 이상의 공기호흡을 통해, 그 안에 포함되어 있는 각종 바이러스, 세균, 곰팡이와 대기 오염물질들을 흡입하게 된다. 호흡을 통해 체내로 유입된 미립자들이 가장 먼저 접촉하는 호흡기 상피세포는 감염에 대해 물리적 장벽을 형성하고 선천성 면역과 후천성 면역 방어시스템의 시발점이 된다. 호흡기 상피세포는 섬모세포, 분비세포, 기저세포로 이루어져 있다. 섬모세포는 대략 300 개의 섬모를 가지고 있으며 이 섬모들이 역동적으로 움직이는 섬모운동에 의해 외부에서 들어온 미립자들을 인두로 배출한다. 분비세포는 수많은 분비과립이 세포질에 존재하며 특히 점액성 당단백 물질인 뮤신을 분비하여 외부에서 흡입된 미립자들을 흡착하여 제거하는 역할을 한다. 또한, 보체 단백질, 사이토카인, 케모카인 등을 분비하여 선천성 면역과 후천성 면역을

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

활성화 시킨다. 이러한 특성 때문에 호흡기는 항상성을 유지하고 있다.[1]

녹농균은 그람 음성 막대균으로, 공기를 통해 호흡기로 유입되며 건강한 숙주에서는 선천성 면역반응에 의해 효과적으로 제거되어 감염이 거의 일어나지 않지만, 면역이 약화되면 급성·만성 호흡기 질환을 일으키고 심하면 목숨까지도 위협하는 치명적인 기회감염성 병원균 중 하나이다.[2] 다른 병원균들과 달리, 녹농균은 낭성 섬유증 환자의 점성이 매우 강한 객담을 에너지원으로 삼아 증식하면서 황색포도상알균, 폐렴알균 등 그람 양성균의 생장을 억제하는 물질을 만들어, 이미 존재하고 있는 미생물들 사이에서 높은 생존경쟁률을 보인다.[3] 폐렴, 만성 폐쇄성 폐질환, 낭성 섬유증, 부비동염 등의 다양한 호흡기 질환에서 주요 원인균인 녹농균을 [4-6] 이해하는 것은 질병 치료에 중요한 열쇠이기 때문에 호흡기 질환과 녹농균 사이에 어떤 연관이 있는지 밝히는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 호흡기 상피세포는 염증반응을 조절하여 녹농균처럼 외부에서 들어온 병원균으로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 하지만 만성 감염성 호흡기 질환이 있을 때는 병원균이 점막에서 영구적으로 군체를 형성하며 살아간다.[7] 최근 녹농균의 잠재적인 서식지로 비인두와 부비강 등 상기도가 포함이 된다는 연구 결과가 나왔고, 부비동염 환자에서 검출된 병원균과 폐에서 관찰되는 병원균 사이에 유사성이 있음이 밝혀졌다.[8] 상기도에서 발견되는 녹농균은 지속적인 만성 부비동염과 연관이 있는데, 녹농균의 여러 발병인자 중 하나인 엘라스타아제가 코 점막 상피세포의 protease-activated receptor (PAR)-2 의 발현을 일시적으로 억제시키고 그 영향으로 밀착연접 단백질인 오클루딘과 클라우딘-1 의 발현이 줄어든다. 만성 부비동염을 앓고 있는 동안 녹농균에 의해 밀착연접의 일시적 파괴가

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

반복적으로 발생하고 그로 인해 다른 세균의 2 차 감염이 발생할 수 있다.[9]

비강, 인두, 후두를 포함하는 상기도의 상피는 대부분 공생생물인 많은 수의 생물체에 노출되는데, 일반적으로 비공에서는 약 10^7 개, 비인두에서는 약 10^8 개의 생물체가 존재한다.[10] 상기도 점막과 생물체의 접촉이 일어나면 호흡기 상피세포에서 방어 작용으로 각종 염증성 매개물질을 분비하고 또한 각종 면역세포들을 유도하기 위해 케모카인을 분비하게 된다. 호흡으로 유입된 생물체들은 상피세포의 세포막 혹은 세포질에 존재하는 TLR, NOD-유사수용체(NLR), C 형 렉틴(CLR) 등에 결합하는데,[11] 상피세포에서 만들어 내는 점액의 주요 단백질 구성요소인 뮤신은 주로 TLR 신호 전달을 통해 유도된다. 코 상피세포에서는 TLR 신호 전달로 인해 항균 물질뿐만 아니라, 수용성 염증반응 매개물질의 생성을 촉진시킨다.[10] 코 상피세포에서 만들어 내는 염증반응 매개물질로는 염증유발 사이토카인인 종양괴사인자-α (TNF-α)와 인터류킨-1β (IL-1β)와 더불어, 대식세포와 호중구 같은 각종 면역세포들을 감염 부위로 유도하는 케모카인으로 CCL2/단구주화성 단백질(MCP)-1, CCL11/에오탁신-1, CCL5/regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), CCL20/대식세포 염증단백질(MIP)-3α, CXCL8/IL-8 등이 있다.[12]

이에 본 연구자는 사람 코 점막 상피세포가 녹농균에 노출되었을 때, 인체 방어와 관련된 염증유발 사이토카인과 케모카인이 세포의 정단부 혹은 기저부 중 어느 부위로 주로 분비되며, 이들의 분비가 어떤 기전을 통해 이루어지는지를 조사하고자 하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

가. 세포

수술 중 얻은 환자의 하비갑개와 비용종을 Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium/HAM`s F12K (DMEM/F12) 배양액 (Lonza, Walkersville, MD, USA)에 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA)이 포함된 전달 배양액에 보관하였다. 환자 조직이 담긴 15 ㎖ 튜브를 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 무균작업대 안에서 조심스럽게 상층액 제거 후 0.1% 프로나아제 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣고 4℃에서 18시간 동안 처치하여 상피세포를 채취하였다. 이 상피세포를 100 mm 배양접시에 평판하고, Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM)에 BEGM® SingleQuots® (Lonza)을 섞은 계대배양액을 사용하였다.

나. 균주

세포에 감염시키는 병원균으로는 녹농균의 야생형인 PA01을 사용했다. Luria-Bertani (LB) 액체 배지 2 ㎖에 PA01을 콜로니 접종하여 37℃, 200 rpm에서 12시간 전배양 하였다. LB 액체 배지 10 ㎖에 PA01 100 ㎕를 접종하여 균 수가 약 $1X10^9$ CFU/㎖이 될 때까지 배양하였다(600 nm에서의 흡광도 값이 0.1일 때 PA01의 수는 $1X10^8$ CFU/㎖이다).

다. 항체와 시약

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

본 실험에 사용하는 항체는 모두 항인체였다. PARP, caspase-3의 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서, β-actin의 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 모두 동봉된 매뉴얼에 있는 희석배수에 맞게 사용하였다. 억제제로 사용한 PS1145, 3-메틸아데닌, N-아세틸시스테인은 Sigma에서, Mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor-1)과 Mito-TEMPO는 Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였다. 세포독성을 측정하는 젖산탈수효소 분석은 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA)로 진행하였다.

2. 방법

가. 세포 배양, 균 감염 및 억제제 처리

Passage-1까지 배양한 코 상피세포를 Transwell 12 홈판 (Costar Co, Cambridge, MA, USA)으로 옮겨 배양하였다. 이때부터는 배양액을 달리하여, BEGM과 DMEM을 1:1로 섞은 후 BEGM® SingleQuots®를 더한 배양액을 사용하였다. 코 상피세포가 홈에 가득 차기 전까지 정단과 기저 부분 모두 배양액을 넣어주었고, 세포가 100% 합류를 이루면 더 이상 정단 부분에는 배양액을 넣지 않고 기저 부분에만 50 nM의 레티노산(Sigma)을 추가한 배양액을 넣어 ALI 시스템 상태에서 세포를 분화시켰다.

7일 간 분화시킨 코 상피세포의 정단 부분에 PA01을 감염다중도 0.1에 맞게 넣어준 뒤 37℃에서 1시간 동안

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

처치하여 균이 세포에 감염될 수 있는 시간을 주었다. 1시간 후 PA01을 제거하고 1X 인산완충식염수로 세포를 세척하였다. 그 후 지정된 시간에 따라 샘플을 채취하였다.

억제제 처리의 경우, 각각 정해진 농도에 맞게 배양액에 추가하여 정단과 기저 부분에 넣고, PS1145 (10 uM)는 3시간, 3-메틸아데닌 (5 mM), Mdivi-1 (50 uM), N-아세틸시스테인 (5 mM), Mito-TEMPO (0.1 mM)는 1시간 동안 37℃에서 전처치하였다. 이후 인산완충식염수로 세포를 세척하고 PA01으로 세포를 감염시켰다.

나. 세포독성 측정

각 샘플의 기저 부분의 배양액 50 ㎕와, 젖산탈수효소 분석 키트에 있는 용액을 혼합한 것을 동량으로 섞어준 뒤, 빛을 차단하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 30분 후 490 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

다. Western blot

RIPA 완충용액(Sigma)에 희석한 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)로 세포를 용해하였다. 4℃에서 13,200 rpm으로 20분 동안 원심분리 후 상층액만 새 이튜브에 옮겨 BCA 정량법(Thermo Fisher Scientific)으로 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포용해물로 SDS-PAGE를 한 후, 니트로섬유소막(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)으로 트랜스퍼 하였다. 니트로섬유소막은 1X TBST로 만든 5% 스킴 밀크로 블로킹 하고, 각각 알맞은 농도로 희석한

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

1차 항체를 4℃에서 16~18시간 동안 붙여주었다. Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)와 함께 상온에서 1시간 동안 정치한 후 Pierce™ ECL (Thermo Fisher Scientific)로 결과를 확인하였다.

라. 정량 PCR

한 홈 당 800 ㎕의 TRIzol 시약(QIAGEN, Hilden, Germany)을 넣어 코 상피세포의 총 RNA를 추출하였다. 1 ㎍의 RNA를 주형가닥으로 하여 역전사 과정을 거쳐 상보적 DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성한 cDNA는 3차 멸균증류수를 추가하여 희석시켜 냉동 보관하였다. 10 ㎕의 KAPA SYBR® Fast qPCR Kits (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)와 7 ㎕의 멸균 3차 증류수, 그리고 확인하고자 하는 유전자의 프라이머 한 쌍을 각각 0.5 ㎕씩 섞은 후 2 ㎕의 cDNA를 첨가하여 최종 부피가 20 ㎕가 되게 하였다. 실험에 사용한 프라이머의 최종 농도는 10 pmole/㎕이었다. 정량 PCR은 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기를 사용하였고, PCR 조건은 Stage 1 (50℃에서 2분), Stage 2 (95℃에서 20초), Stage 3 (95℃에서 3초, 60℃에서 30초, 40 cycles), Stage 4 (95℃에서 15초, 60℃에서 30초, 95℃에서 15초)로 하였다. 실험에 사용한 프라이머들은 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 합성 의뢰하였다(표 1).

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

표 1. 정량 PCR에 사용한 프라이머

종류		sequence
CCL2/MCP-1	F	5’ - CGCCTCCAGCATGAAAGTCT -3’
	R	5’ - ATGAAGGTGGCTGCTATG -3’
CCL20/MIP-3 α	F	5’ - CCAAGAGTTTGCTCCTGGCT -3’
	R	5’ - TGCTTGCTGCTTCTGATTCG -3’
CXCL8/IL-8	F	5’ - ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGCT -3’
	R	5’ - TCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTCTC -3’
TNF- α	F	5’ - CCCCAGGGACCTCTCTCTAATC -3’
	R	5’ - GGTTTGCTACAACATGGGCTACA -3’
IL-1 β	F	5’ - ATGGCAGAAGTACCTAAGCTCGC -3’
	R	5’ - ACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGTT -3’
TLR1	F	5’ - ACGGTCTCATCCACGTTCCTAAAGA -3’
	R	5’ - CGCCAGAATACTTAGGAAGTAAGAAC -3’
TLR2	F	5’ - GTCTTGTGACCGCAATGGTATCTGC -3’
	R	5’ - CTCGCAGTTCCAAACATTCCACG -3’
TLR3	F	5’ - ATTGGGCAAGAACTCACAGG -3’
	R	5’ - AGCATCAGTCGTTGAAGGCT -3’
TLR4	F	5’ - AAGCCGAAAGGTGATTGTTG -3’
	R	5’ - CTGAGCAGGGTCTTCTCCAC -3’
TLR5	F	5’ - GTGCTCATGGCCGGTCCTGTGTTTG -3’
	R	5’ - CTCTGCTATACAAGCTATTAGCTGCG -3’
TLR6	F	5’ - GCTTCCATTTTGTTTGCCTTATGATC -3’
	R	5’ - GTATTAACTGATATGTTCACTTGGA -3’
TLR7	F	5’ - TGCTCTGCTCTCTTCAACCA -3’
	R	5’ - CCAAGGAGTTTGGAAATTAGGA -3’
TLR8	F	5’ - TGCTGCAAGTTACGGAATGA -3’
	R	5’ - CGCATAACTCACAGGAACCA -3’
TLR9	F	5’ - TCCTTCCCTGTAGCTGCTGT -3’
	R	5’ - GTAGGAAGGCAGGCAAGGTA -3’
GAPDH	F	5’ - CAAGGTCATCCATGACAACTTTG -3’
	R	5’ - GGGCCATCCACAGTCTTCT -3’

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

마. 효소면역분석법

한 홈 당 세포를 500 ㎕의 1X 인산완충식염수로 두 번 세척하여 얻은 정단 분비물 1 ㎖과 기저측 분비물이 함유된 배양액을 이용하여 분비된 사이토카인의 양을 측정하였다. 사람 TNF-α, IL-1β, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin-1, CCL20/MIP-3α, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10의 분비량 측정은 DuoSet® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하였고, 각 키트에 동봉된 매뉴얼에 따라 실험을 진행하였다.

바. 통계분석

모든 실험은 최소 3명 이상의 정상 환자에게서 분리하여 배양한 코 상피세포로 반복 실험을 하였고, 각 실험은 중복으로 진행하였다. 실험에서 얻은 결과들은 평균값 ±표준편차로 표시하였고, 통계학적 분석은 GraphPad Prism (v5.01)을 이용하여 일원배치 분산분석으로 진행하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Ⅲ. 결과

1. PA01 감염 후 9시간까지 증가하지 않는 세포사멸

본 연구에서 사이토카인의 분비량을 측정할 때 세포사멸에 의해 분비되는 Damage-associated molecular pattern에 의한 영향[13]을 배제하기 위하여 세포사멸이 일어나는 시기를 확인하기 위해 세포독성을 측정하고(그림 1A), 세포사멸의 지표가 되는 단백질을 western blot (그림 1B)으로 확인하였다. 우선 세포독성을 측정하는 젖산탈수효소 분석에서 감염 후 9시간까지 흡광도 값이 증가하지 않았고, 12시간에서 그 값이 약 8배 증가하는 것으로 보아, PA01 감염 후 9시간까지는 코 상피세포가 사멸하지 않고 12시간 이후에는 세포사멸이 일어나기 시작함을 알 수 있었다(그림 1A). 이에 더해, 감염 후 9시간까지 세포사멸이 증가하지 않는지 세포사멸의 지표로 사용되는 단백질을 western blot으로 확인하였다. PARP와 caspase-3 모두 total form이 증가하지 않은 채 일정하였고, 두 단백질의 cleaved form 또한 일정한 것으로 보아 세포사멸이 증가하지 않았다 (그림 1B). 따라서, PA01 감염 후 9시간까지 코 상피세포가 큰 손상 없이 유지된다는 점을 참고하여 그 이상의 시간은 제외하고 0시간, 3시간, 6시간, 9시간을 사이토카인 분비 측정 시점으로 고정한 뒤 다음 실험을 진행하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

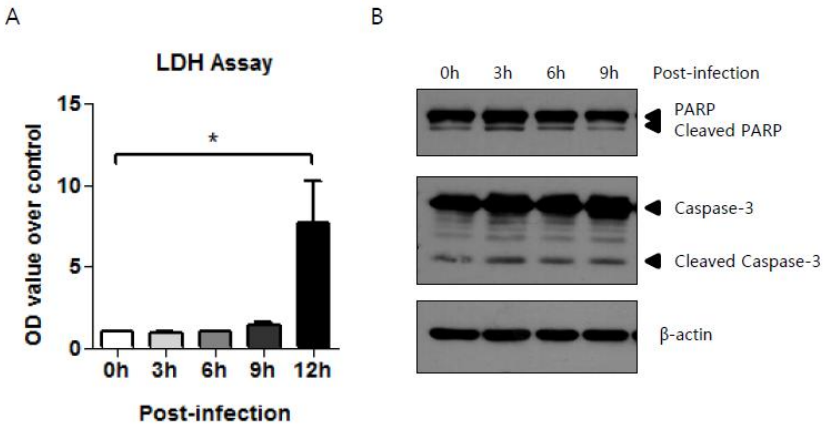

그림 1. PA01 감염 후 코 상피세포의 세포생존도 측정. ALI 시스템 상에서 7일 간 분화시킨 코 상피세포에 PA01 (MOI 0.1)을 감염시킨 후 지정된 시간에서 basal 배양액을 얻고 단백질을 추출하였다. (A) 기저부 배양액으로 젖산탈수효소 분석을 통해 흡광도로 세포독성을 측정하였고, (B) 모든 샘플에서 동일하게 30 μg의 단백질을 추출하여 western blot으로 PARP, cleaved PARP, caspase-3, cleaved caspase-3을 확인하였다. 최소 3명의 환자에게서 얻은 조직에서 분리하여 배양한 코 상피세포로 반복실험을 하였고, 평균값±표준편차로 표시하였다. *, p 값 <0.05.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

2. 염증유발 사이토카인은 상피세포의 정단부로, 케모카인은 기저부로 주로 분비

상피세포는 극성을 띄기 때문에 그 역할 혹은 세포 주변의 자극에 따라 정단부와 기저부로 이동하는 단백질의 종류가 달라진다.[14] Transwell의 반투과성 막에 부착하여 ALI 시스템 상에서 재분화 시킨 코 상피세포 또한 마찬가지로 극성을 가지고 있고, 반투과성 막을 중심으로 정단과 기저 부분으로 나뉘어져 있어 정단부와 기저부로 생성·분비되는 물질들의 차이를 분석할 수 있다.[15,16] 따라서 본 연구에서도 사이토카인이 종류와 역할에 따라 상피세포의 어느 방향으로 분비되는지를 확인하기 위해 정점 분비와 기저측 분비를 함유하는 배양액을 각각 얻어 효소면역분석법으로 사이토카인의 양을 측정하였다. TNF-α는 감염 후 6시간에서 50배(그림 2A), IL-1β는 감염 후 9시간에서 2배(그림 2B) 더 정점 분비물에서 측정되는 양이 많았고, 감염 후 9시간에서 CCL2/MCP-1은 25배(그림 2C), CCL20/MIP-3α는 2배(그림 2D), CXCL8/IL-8은 4배 더 기저측 분비물에서 측정되는 양이 많았다. 즉, 염증유발 사이토카인인 TNF-α와 IL-1β는 정단부 쪽으로, 케모카인인 CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3α, CXCL8/IL-8은 기저부 쪽으로 더 많이 분비되는 양상을 보였다. 이 실험을 통해, 다음으로 진행될 실험에서 염증유발 사이토카인은 정단 분비물로, 케모카인은 기저측 분비물로 분비량을 측정하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

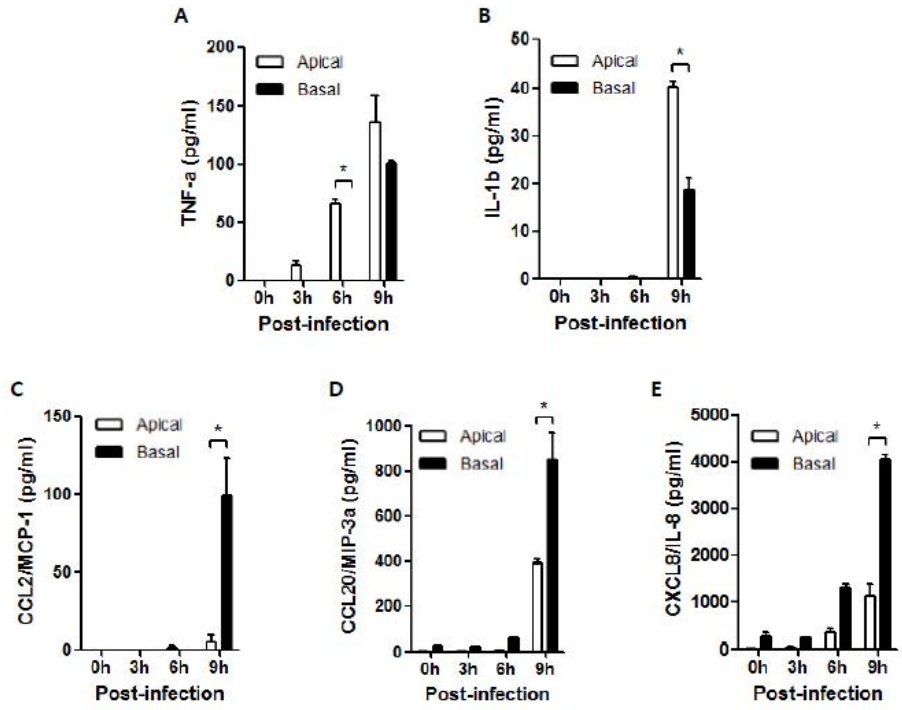

그림 2. PA01 감염 후 정단 분비물과 기저측 분비물에서 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비량 측정. 7일 간 분화시킨 코 상피세포에 PA01 (MOI 0.1)을 감염시킨 후 지정된 시간에서 정점 분비물과 기저측 분비물을 함유하는 배양액을 사용하여, 분비된 염증유발 사이토카인인 (A) TNF-α, (B) IL-1β와 케모카인인 (C) CCL2/MCP-1, (D) CCL20/MIP-3α, (E) CXCL8/IL-8의 양을 효소면역분석법으로 측정하였다. 최소 3명의 환자에게서 얻은 조직에서 분리하여 배양한 코 상피세포로 반복실험을 하였고, 평균값 ±표준편차로 표시하였다. *, p 값 <0.05.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

3. 시간이 지남에 따라 증가하는 염증유발 사이토카인과 케모카인의 유전자 발현

염증유발 사이토카인과 케모카인이 분비되는 과정 중 전사 단계에서는 시간에 따라 어떻게 변화하는지 확인하기 위해 mRNA를 추출하여 cDNA 합성 후 정량 PCR를 진행하였다. 감염 후 시간이 지나면서 각 사이토카인의 유전자 발현이 점차적으로 증가하여 감염 9시간 후에는 TNF-α는 55배, IL-1β는 370배, CCL2/MCP-1은 32배, CCL20/MIP-3α는 470배, CXCL8/IL-8은 120배까지 증가하였다. 코 상피세포를 PA01에 감염시키면 5개 사이토카인의 유전자 발현(그림 3)과 단백질(그림 2)이 동시에 증가되는 것으로 보아, 모두 전사 조절됨을 알 수 있었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

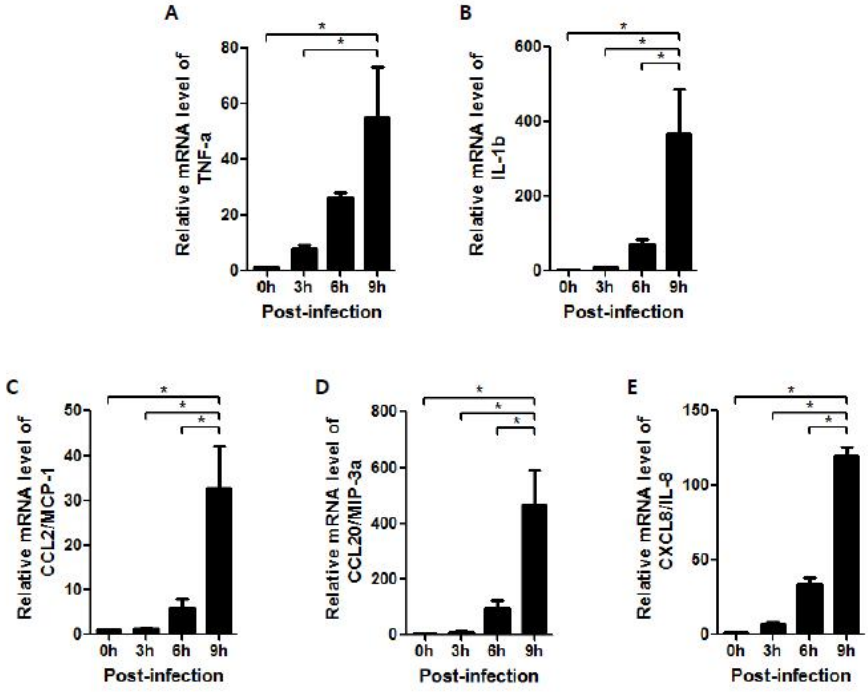

그림 3. PA01 감염 후 코 상피세포의 염증유발 사이토카인과 케모카인의 유전자 발현 측정. 7일 간 분화시킨 코 상피세포에 PA01 (MOI 0.1)을 감염시킨 후 총 RNA를 추출하여 cDNA를 합성해서 정량 PCR로 (A) TNF-α, (B) IL-1β, (C) CCL2/MCP-1, (D) CCL20/MIP-3α, (E) CXCL8/IL-8 유전자의 발현양을 측정하였다. 값은 GAPDH의 유전자 발현양으로 표준화하였고, 0시간(대조군) 값을 기준으로 삼아서 유전자 발현을 비교하였다. 최소 3명의 환자에게서 얻은 조직에서 분리하여 배양한 코 상피세포로 반복실험을 하였고, 평균값±표준편차로 표시하였다. *, *P* 값 <0.05.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

4. 코 상피세포에 PA01을 감염시키면 증가하는 TLR2, TLR4, TLR7의 유전자 발현

공기에 섞여 유입된 각종 병원균에서 공통적으로 나타나는 패턴(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)을 인지하는 TLR, NLR, CLR, RIG-I-유사수용체(RLR) 등의 패턴인지수용체(PRR)가 활성화되면, 세포 내로 신호가 전달되어 면역반응에 필요한 유전자들이 발현한다.[11] 코 상피세포에 녹농균을 감염시킨 후, 세포질에 존재하는 병원균 단백질을 인지하는 NLR,[17] 세포질에 존재하는 이중가닥 DNA를 인지하는 RLR,[18] 수지상 세포, 대식세포, 호중구에 존재하는 CLR[11]을 제외하고, 세포밖에 있는 PAMP를 인지하는 TLR 중에서 호흡기 상피세포에서 발현한다고[10] 알려진 9개의 TLR 유전자의 발현을 조사하였다. TLR1, TLR3, TLR5, TLR6, TLR8, TLR9은 변화가 없었고, 리포단백질, 펩티도글리칸 등과 결합하는[19] TLR2 유전자는 7.5배, 지질다당류와 결합하는[11] TLR4 유전자는 2배, 그리고 흥미롭게도 단일가닥 RNA와 반응하는[20] TLR7 유전자가 3.6배 증가하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

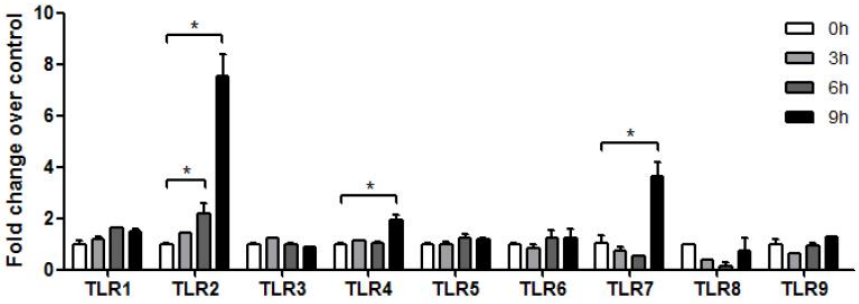

그림 4. PA01 감염 후 코 상피세포에서의 TLR 유전자 발현 측정. 7일간 분화시킨 코 상피세포에 PA01 (MOI 0.1)을 감염시킨 후 지정된 시간에 총 RNA를 추출하여 cDNA를 합성해서 정량 PCR로 9개의 TLR 유전자의 발현양을 측정하였다. 값은 GAPDH의 유전자 발현양으로 표준화하였고, 0시간(대조군) 값을 기준으로 삼아서 유전자 발현을 비교하였다. 최소 3명의 환자에게서 얻은 조직에서 분리하여 배양한 상피세포로 반복실험을 하였고, 평균값±표준편차로 표시하였다. *, p 값 <0.05.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

5. 억제제 처리 후 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비의 변화

PA01에 감염된 세포가 사이토카인을 분비할 때 어떤 기전이 관여하는지 알아보기 위해 NF-κB 신호 전달 억제제인 PS1145, 오토파지 억제제인 3-메틸아데닌, 미토파지 억제제인 Mdivi-1, 활성산소를 제거하는 N-아세틸시스테인, 미토콘드리아 활성산소를 특이적으로 제거하는 Mito-TEMPO를 사용하여 PA01 감염 후 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비가 변화하는지를 조사하였다. TNF-α는 PS1145 처리 시 ½배, 3-메틸아데닌 처리 시 ⅓배 감소하였고, 이와 반대로 Mdivi-1 처리 시 2배, N-아세틸시스테인 처리 시 1.5배 증가하였다(그림 5A). IL-1β는 PS1145 처리 시 2배, 3-메틸아데닌 처리 시 1.5배, Mdivi-1 처리 시 4.4배, N-아세틸시스테인 처리 시 3배, Mito-TEMPO 처리 시 3.5배, 즉 사용한 5개의 억제제 처리 후 모두 증가하였다(그림 5B). CCL2/MCP-1은 PS1145 처리 시 거의 완전히 억제되었고, 3-메틸아데닌 처리 시 $^{1}/_{50}$배 감소하였고, 다른 억제제를 처리했을 때는 유의한 변화가 없었다(그림 5C). CCL20/MIP-3α와 CXCL8/IL-8은 Mdivi-1 처리 시 각각 2.2배, 1.4배 증가하였고, Mito-TEMPO 처리 시 각각 2배, 1.2배 증가하였다(그림 5D, 5E). TNF-α와 IL-1β는 미토파지와 활성산소를 억제하였을 때 모두 증가한 반면, TNF-α는 NF-κB 신호 전달과 오토파지를 억제하였을 때는 감소하였고, IL-1β는 증가하는 상반된 결과를 보였다. 케모카인의 경우, CCL2/MCP-1은 NF-κB와 오토파지 억제제에 의해 거의 완전히 분비가 감소되었고, CCL20/MIP-3α와 CXCL8/IL-8는 NF-κB, 오토파지 및 활성산소 억제로 인한 영향이 없었으나, 미토파지와 미토콘드리아 활성산소 억제에 의해 분비량이 증가하였다. CCL2/MCP-1을 제외한, TNF-α와 IL-1β, CCL20/MIP-3α 및 CXCL8/IL-8는 미토파지와 관련하여 유의한 변화를 보였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

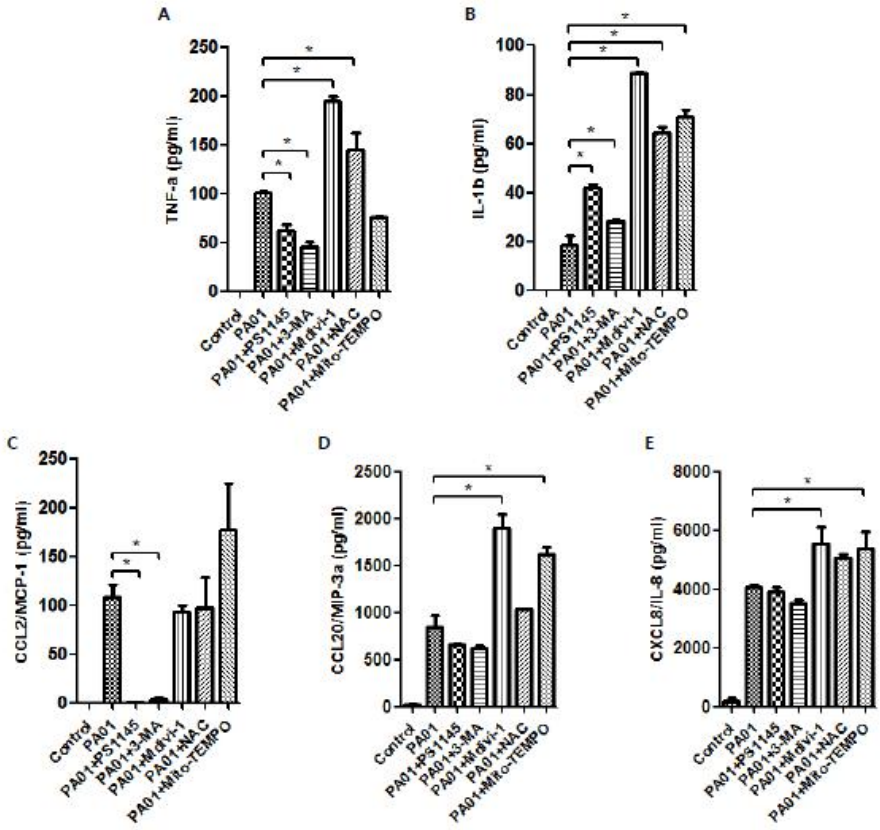

그림 5. 억제제 처리 후 PA01을 감염시켰을 때 염증유발 사이토카인과 케모카인 분비량의 측정. 7일 분화시킨 코 상피세포의 정단과 기저 부분에 PS1145 (10 uM)은 3시간, 3-메틸아데닌 (5 mM), Mdivi-1 (50 uM), N-아세틸시스테인 (5 mM), Mito-TEMPO (0.1 mM)는 1시간 동안 전처치하였다. 그 다음 PA01 (MOI 0.1)을 감염시키고 9시간 후에 정점 분비물과 기저측 분비물을 함유하는 배양액을 채취하여 (A) TNF-α, (B) IL-1β, (C) CCL2/MCP-1, (D) CCL20/MIP-3α, (E) CXCL8/IL-8의 분비량을 측정하였다. 최소 3명의 환자에게서 얻은 조직에서 분비 배양한 코 상피세포로 반복실험을 하였고, 평균값±표준편차로 표시하였다. *, p 값 <0.05.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Ⅳ. 고찰

호흡기 상피세포는 밀착연접, 접착연접, 데스모솜 단백질을 발현해서 물리적 장벽으로써의 역할을 하고, 기도 표면 액체의 양 유지, 섬모운동, 손상된 상피조직 복구 등 다양한 역할을 수행하고 있다. 게다가 세포막과 세포질에 존재하는 PRR, PAR처럼 외부 물질을 인지하는 수용체들을 통해 면역 매개물을 분비한다.[21] 질병과 관련하여 호흡기 상피세포의 물리적 방어막 역할도 중요하나, 최근 연구에서는 병원균에 대한 호흡기 상피세포의 사이토카인과 항균 펩타이드 분비, 면역세포 유도 등 선천성 면역반응과 후천성 면역반응을 조절하여 면역 항상성을 유지하는 역할에 집중하고 있다.[22]

먼저, 세포독성을 측정해 실험 조건에서 PA01 감염 후 세포사멸로 인한 이차적인 자극을 배제하였다. 호흡기 상피세포에서 면역세포 유도를 위해 분비되는 케모카인인 CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin-1, CCL20/MIP-3α, CXCL8/IL-8, CXCL10/IFNγ-induced protein 10 (IP-10) 등을[12] 검사하였을 때 단핵구를 유도하는 CCL2/MCP-1, 수지상 세포를 유도하는 CCL20/MIP-3α, 호중구를 유도하는 CXCL8/IL-8이 검출되었다. 상피세포에서 처음 병원균의 존재가 인식되면 가장 먼저 호중구가 유도되고 수지상 세포, 단핵구가 차례로 감염 부위로 유도되어 식세포 작용으로 병원균을 제거하면서 추가적인 면역반응을 이끌 수 있는 것이 감염 초기에 이러한 상피세포의 케모카인의 분비 때문으로 생각된다.

사람 조직에서 유래한 상피세포를 ALI 시스템에서 재분화를 시키면 실제 상피세포와 유사한 형태·생리학적 반응을 얻을 수 있는데,[23,24] 분비되는 단백질의 방향이 달라지는 극성을 띈 상피세포의 특성을[14]

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

고려해, 본 연구에서는 Transwell의 반투과성 막을 기준으로 정점 분비와 기저측 분비를 비교하였다. 흥미롭게도, 코 상피세포에 PAO1을 감염시켰을 때 염증유발 사이토카인은 정단부로, 케모카인은 기저부로 더 많이 분비되었다. 이러한 결과는 주변 세포들을 자극해 면역반응을 일으키는 염증유발 사이토카인은 비강을 향해 있는 정단부로 분비되어 주변 상피세포에 자가분비 및 곁분비 사이토카인으로 작용하고, 케모카인은 혈액 혹은 2차 림프조직에 있는 면역세포들을 감염부위로 유도하기 위해 혈관과 가까운 기저부로 분비된다는 것을 의미하였다.[14] 이러한 반응은 자극제나 세포의 종류마다 다르다. 기관지 상피세포인 16HBE14o- 세포가 양이온 단백질인 폴리-L-아르기닌에 의해 손상되면 IL-6와 IL-8이 기저부보다 정단부로 더 많이 분비되었고,[25] 나팔관, 자궁, 자궁경부 등 여성 생식기관에서 분리하여 배양한 상피세포는 과립구 대식세포 집락 자극인자, TNF-α, MIP-1β 등 사이토카인과 IL-8, IL-6, 과립구 집락 자극인자, MCP-1 등 케모카인 모두 정단부로 더 많이 분비되었듯이,[26] 호흡기 상피세포여도 자극에 따라 다르고, 상피세포를 분리해 낸 장기의 종류에 따라 다를 수 있다. 그러므로, 앞으로 ALI 시스템에서 분화시킨 코 상피세포를 이용한 실험에서는 염증유발 사이토카인은 정단 분비물로, 케모카인은 기저측 분비물로 측정하여 실험을 진행해야 할 것으로 사료되었다.

단백질이 생성되기까지의 과정은 DNA에서 RNA로의 전사 단계부터 전사 후 단백질의 변형까지 어느 단계에서든 조절될 수 있다. 사이토카인과 케모카인 역시 전사 단계[27] 혹은 전사 후 단계[28,29]에서 조절되어 염증반응의 시작과 종결에 중요한 역할을 한다. 코 상피세포가 녹농균에 감염되면 면역반응을 일으키기 위해 염증유발 사이토카인과 케모카인을 분비할 때 유전자와 단백질 분비가 동시에

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

증가한 것으로 보아, 분비가 전사 단계에서 조절되었다는 것을 의미하였다.

9개의 TLR 중 TLR2와 TLR4가 유의하게 증가하였는데, 이는 하기도 상피세포에서 녹농균[30]과 또 다른 그람 음성균인 폐렴 막대균이[31,32] TLR2, TLR4, TLR5와 반응하여 면역반응을 일으킨다는 이전의 연구들과 일치하는 결과를 보여, 상기도와 하기도 상피세포는 발생학적으로 서로 다름에도 불구하고 녹농균에 의해 동일한 반응을 보여주고 있다. 한편, TLR7은 세포질에 있는 단일가닥 RNA를 인지하는 수용체로 바이러스와 결합하여 면역반응을 유발하고,[20] 인위적으로 삽입한 작은 간섭 RNA나 마이크로 RNA도 TLR7을 활성화 시켜 자기와 비자기 물질을 구별한다.[33] 병원균과 TLR7 사이의 상호작용은 병원균이 유입되었을 때 수지상 세포의 식세포 작용으로 TLR7이 세포질에 존재하는 세균의 RNA를 인지하며 이루어짐으로써 사이토카인을 분비하고,[34,35] 호흡기에서는 TLR7를 활성화 시키는 합성 물질이 마우스 알레르기성 천식 모델에서 호흡기 반응성과 염증 반응을 완화시켜 예방 효과를 나타낸다.[36] 하지만 그 외에 호흡기 상피세포에서 세균과 TLR7의 상호작용에 관련해서는 밝혀진 바가 없다. 녹농균의 단일가닥 RNA나 다른 구성 물질이 직접적으로 TLR7을 증가시켰거나,[37] 녹농균 감염으로 인해 코 상피세포에서 분비된 염증성 물질이 간접적으로 TLR7의 발현을 촉진시켰을 것으로 생각한다. 이 실험의 결과를 토대로 향후 어떠한 기전으로 녹농균의 자극에 의해 TLR7의 발현이 증가했는지 확인해보는 연구가 수행될 필요가 있다.

분비 기전을 조사하기 위한 억제제 실험에서 우선, TNF-α와 CCL2/MCP-1은 NF-κB 신호 전달과 오토파지가 분비에 영향을 미치는 것을 보였다. PRR의 활성으로 NF-κB 신호 전달을 통해 염증유발

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

사이토카인과 케모카인이 분비되는데, NF-κB 신호 전달 경로 중 NF-κB를 억제하는 단백질이 오토파지에 의해 분해되어 신호 전달이 촉진되었다고 추측할 수 있었다.[38] 오토파지와 NF-κB 신호 전달의 관계는 세포에 따라 오토파지가 분해하는 NF-κB 신호 전달 관련 단백질의 종류가 달라질 수 있다.[39] 미토파지를 억제하였을 때 거의 모든 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비가 증가하는 것을 보여주었다. 미토콘드리아 활성산소는 염증유발 사이토카인의 분비를 증가시키는데,[40,41] 미토파지를 억제하면 미토콘드리아에서 생성되는 활성산소가 늘어나 염증유발 사이토카인과 케모카인의 분비가 증가하였다. 하지만 역설적이게도, 미토콘드리아 활성산소를 제거하였을 때에도 IL-β, CCL20/MIP-3α, 그리고 CXCL8/IL-8이 증가하였다. 활성산소와 무관하게 IL-1β 인플라마솜이 활성화 되었을 수도 있고,[42] 미토콘드리아 활성산소를 포함한 세포 내 활성산소의 제거로 인해 코 상피세포에 이차적인 손상이 생겨 그 결과로 사이토카인의 분비가 늘어났을 것이라고 추측하였다. 억제제 실험에서, 염증유발 사이토카인 사이에서 동일한 억제에도 상반되는 반응을 보였고, 케모카인도 억제되는 기전에 따라 보이는 반응이 달랐다.

본 연구의 결과를 통해, 녹농균 감염 후 코 상피세포에서 염증유발 사이토카인은 정단 분비물로, 케모카인은 기저측 분비물로 측정해야 함을 보여주었으며, TLR2, TLR4, TLR7의 유전자 발현이 증가한 것을 확인하였다. 염증유발 사이토카인과 케모카인 각각의 단백질들이 각종 억제제에 의해 서로 다른 반응을 보이는 것으로 보아, 서로 다른 복잡한 기전으로 분비되고 있음을 알 수 있었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Ⅴ. 결론

호흡기 상피세포는 섬모운동과 점액 분비 등 병원균에 대한 방어를 구축하고 있다. 하지만 면역이 약화된 상태에서 병원균에 한 번 감염되면 제거가 쉽지 않아 치료가 어려워지는 만큼 건강한 상태에서 호흡기 상피세포의 면역반응이 중요하다. 본 연구에서는 호흡기 질환에서 가장 많이 발견되는 녹농균을 사용하여 코 상피세포에서 일어나는 면역반응 중에서 면역세포 유도 역할에 초점을 맞추었다. 그 결과, 목적에 따라서 염증유발 사이토카인과 케모카인이 분비되는 방향이 달라질 수 있다는 것을 증명하여 앞으로의 실험에서 염증유발 사이토카인은 정단 분비물에서, 케모카인은 기저측 분비물에서 확인해야 한다는 것을 보여주었다. 녹농균에 감염된 코 상피세포에서는 TLR2와 TLR4가 증가하는 한편, RNA를 인지하여 주로 바이러스와 관련이 깊은 TLR7의 발현이 증가하였다. 또한 코 상피세포에서 염증유발 사이토카인과 케모카인 분비에 미토파지가 관여할 가능성을 제시하였고, 앞으로의 실험에서 좀더 자세한 기전을 밝힐 필요가 있다. 호흡기 상피세포가 어떻게 면역반응을 조절하여 항상성을 유지하는지 이해하고 호흡기 질환의 발병 기전을 규명하면 새로운 진단과 치료법 개발에 기여할 수 있을 것이다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

참고문헌

1. Gellatly SL, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis 2013;67:159-73.
2. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense Pseudomonas aeruginosa infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. Infect Immun 2005;73:7151-60.
3. Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M. Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of Pseudomonas aeruginosa physiology. J Bacteriol 2005;187:5267-77.
4. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol 2012;10:841-51.
5. Chalermwatanachai T, Zhang N, Holtappels G, Bachert C. Association of Mucosal Organisms with Patterns of Inflammation in Chronic Rhinosinusitis. PLoS One 2015;10:e0136068.
6. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. Trends Microbiol 2013;21:73-81.
7. Wu Q, Lu Z, Verghese MW, Randell SH. Airway epithelial cell tolerance to Pseudomonas aeruginosa. Respir Res 2005;6:26.
8. Fothergill JL, Neill DR, Loman N, Winstanley C, Kadioglu A.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Pseudomonas aeruginosa adaptation in the nasopharyngeal reservoir leads to migration and persistence in the lungs. Nat Commun 2014;5:4780.

9. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K-i, et al. Pseudomonas aeruginosa elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. Respiratory Research 2014;15:1-13.

10. McClure R, Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. Frontiers in Immunology 2014;5:386.

11. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. Annual Review of Immunology 2015;33:257-90.

12. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. Clin Microbiol Rev 2011;24:210-29.

13. Cullen Sean P, Henry Conor M, Kearney Conor J, Logue Susan E, Feoktistova M, Tynan Graham A, et al. Fas/CD95-Induced Chemokines Can Serve as "Find-Me" Signals for Apoptotic Cells. Molecular Cell 2013;49:1034-48.

14. Coopman P, Djiane A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. Cellular and Molecular Life Sciences 2016;73:3535-53.

15. Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of culture

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

respiratory tract epithelial cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology 1988;24:420-8.

16. Fang X, Song Y, Zemans R, Hirsch J, Matthay MA. Fluid transport across cultured rat alveolar epithelial cells: a novel in vitro system. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 2004;287:L104.

17. Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. Physiological Reviews 2014;95:149.

18. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Frontiers in Immunology 2014;5:342.

19. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. Frontiers in Immunology 2012;3:79.

20. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:5598-603.

21. Gandhi VD, Vliagoftis H. Airway Epithelium Interactions with Aeroallergens: Role of Secreted Cytokines and Chemokines in Innate Immunity. Frontiers in Immunology 2015;6:147.

22. Hallstrand TS, Hackett TL, Altemeier WA, Matute-Bello G, Hansbro PM, Knight DA. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. Clin Immunol 2014;151:1-15.

23. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE,

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Harvey BG, et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011;300:L25-31.

24. Bukowy Z, Zietkiewicz E, Witt M. In vitro culturing of ciliary respiratory cells--a model for studies of genetic diseases. J Appl Genet 2011;52:39-51.

25. Chow AW, Liang JF, Wong JS, Fu Y, Tang NL, Ko WH. Polarized secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 by human airway epithelia 16HBE14o- cells in response to cationic polypeptide challenge. PLoS One 2010;5:e12091.

26. Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. Hum Reprod 2005;20:1439-46.

27. Singha B, Gatla HR, Vancurova I. Transcriptional Regulation of Chemokine Expression in Ovarian Cancer. Biomolecules 2015;5:223-43.

28. Vlasova-St. Louis I, Bohjanen PR. Post-Transcriptional Regulation of Cytokine Signaling by AU-Rich and GU-Rich Elements. Journal of Interferon & Cytokine Research 2014;34:233-41.

29. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. Pharmacology & Therapeutics 2008;120:197-217.

30. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R,

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Chignard M. Pseudomonas aeruginosa LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. PLoS ONE 2009;4:e7259.

31. Kovach MA, Standiford TJ. TOLL LIKE RECEPTORS IN DISEASES OF THE LUNG. International immunopharmacology 2011;11:1399-406.

32. March C, Moranta D, Regueiro V, Llobet E, Tomás A, Garmendia J, et al. Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Protein A Is Required to Prevent the Activation of Airway Epithelial Cells. Journal of Biological Chemistry 2011;286:9956-67.

33. Lebold KM, Jacoby DB, Drake MG. Toll-Like Receptor 7-Targeted Therapy in Respiratory Disease. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2016;43:114-9.

34. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. Nat Immunol 2009;10:587-94.

35. Eberle F, Sirin M, Binder M, Dalpke AH. Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. Eur J Immunol 2009;39:2537-47.

36. Nadeem A, Siddiqui N, Al-Harbi NO, Al-Harbi MM, Ahmad SF. TLR-7 agonist attenuates airway reactivity and inflammation through Nrf2-mediated antioxidant protection in a murine model of allergic asthma. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2016;73:53-62.

37. Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A,

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

et al. Internalization of Pseudomonas aeruginosa strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. MBio 2015;6:e00712-15.

38. Kanayama M, Inoue M, Danzaki K, Hammer G, He YW, Shinohara ML. Autophagy enhances NFkappaB activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. Nat Commun 2015;6:5779.

39. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF-kappa B signaling pathways in cancer cells. American Journal of Cancer Research 2011;1:629-49.

40. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. J Exp Med 2011;208:417-20.

41. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. Nat Rev Immunol 2011;11:389-402.

42. van de Veerdonk FL, Smeekens SP, Joosten LA, Kullberg BJ, Dinarello CA, van der Meer JW, et al. Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1beta inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:3030-3.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Abstract

The effects on pro-inflammatory cytokines and chemokines by *Pseudomonas aeruginosa* in primary human nasal epithelial cells

Su Jin Kim

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Joo-Heon Yoon**)

The airway epithelium is the first line of host defense against inhaled particles including pathogens. Although the epithelium always contacts infectious agents and commensal organisms, efficient immune responses such as mucociliary transport and antimicrobial protein secretion remain host healthy. However, airway diseases can be occurred on the occasion of the immune-compromised state or pathogenic bacterial overgrowth. The gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is one of critical infectious pathogens found in chronic airway diseases because it is congenitally resistant to many antibiotics and can survive on mucus secreted from epithelial cells as source of energy. Nasal epithelial cells (NECs) contribute to maintain the immune homeostasis due to efficient elimination of the fatal pathogen by the innate immune responses.

At ALI 7-day, re-differentiated human NECs were infected by *P. aeruginosa* wild type PA01, excluding the influence of cell death. This study found that when polarized NECs recognized the pathogen, NECs

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

secreted more pro-inflammatory cytokines toward apical surface which faces the nasal cavity, and more chemokines toward basal surface which is close to blood vessels. Interaction between pathogens and receptors in plasma membrane or cytosol activates NECs to secrete immune response mediators. In this study, I examined toll-like receptor (TLR) subfamily TLR1 to TLR9; then, the gene expression of TLR 2, 4, 7 significantly increased following PA01 infection. According to inhibitor tests, mitophagy had an influence on the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines despite there were different responses depending on other inhibitors.

As a result, this study has shown that pro-inflammatory cytokines should be measured in apical secretion and chemokines be measured in basal secretion henceforth, and represented that the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines from airway epithelial cells intricately connected with many mechanisms.

Key Words : nasal epithelial cell, *Pseudomonas aeruginosa*, innate immune, pro-inflammatory cytokine, chemokine