

Mucin 분비에 영향을 미치는 Metalloproteinase

울산대학교 ¹의과대학 서울아산병원 호흡기내과, ²아산생명과학연구소

오연목¹, 최희진², 심태선¹, 이상도¹, 김우성¹, 김동순¹

=Abstract=

Metalloproteinase Plays a Role in Mucin Secretion

Yeon-Mok Oh, M.D.¹, Hee Jin Choi, M.Sc.², Tae Sun Shim, M.D.¹,
Sang Do Lee, M.D.¹, Woo Sung Kim, M.D.¹, Dong-Soon Kim, M.D.¹

¹Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, College of Medicine,
and ²Asan Institute for Life Sciences, University of Ulsan, Seoul, Korea

Background : Mucus hypersecretion in the patients with airway diseases represents poor prognosis as well as discomfort. However, there is no known therapy for its effective control. One important component of mucus is mucin, a glycosylated protein, which endows mucus with viscosity. We studied whether a proteinase has a role in mucin secretion and if so, which.

Methods :

(1) Inhibition of mucin secretion

Group-specific proteinase inhibitors were tested to evaluate whether a proteinase belonging to a group of proteinases plays a role in mucin secretion. Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF, a serine proteinase inhibitor), E-64(a cysteine proteinase inhibitor), Pepstatin(an aspartic proteinase inhibitor) and 1, 10-Phenanthroline(a metalloproteinase inhibitor) were treated into the Calu-3 cell line for 24 hours. The enzyme linked immunoabsorbant assay(ELISA) for MUC5AC was performed to evaluate the amount of mucin secretion and to compare with a control.

(2) Stimulation of mucin secretion

Matrix metalloproteinase-9(MMP-9), MMP-12 and TACE(TNF-alpha converting enzyme), which are known to be related with airway diseases, were used to be treated into Calu-3 for 24 hours. ELISA for MUC5AC was performed to evaluate the amount of mucin secretion and to compare with the controls.

본 연구는 아산생명과학연구소 신진과제 (과제번호 2003-306) 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address of correspondence:

Yeon-Mok Oh, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,
College of Medicine, University of Ulsan, 388-1 Pungnap-dong, Sonpa-gu, Seoul 138-736, South Korea

Phone : 02-3010-3136 Fax : 02-3010-6968 E-mail : ymoh55@amc.seoul.kr

Results :

(1) PMSF(10^{-4} M), E-64(10^{-4} M), Pepstatin(10^{-6} M) and 1, 10-Phenanthroline(10^{-4} M) reduced the MUC5AC secretion by $1\pm 4.9\%$ (mean \pm standard deviation; $P=1.0$ compared with the control), $-6\pm 3.9\%$ ($P=0.34$), $-13\pm 9.7\%$ ($P=0.34$) and $41\pm 8.2\%$ ($P=0.03$), respectively.

(2) The amounts of MUC5AC secretion stimulated by MMP-9(250ng/ml), MMP-12(100ng/ml) and TACE(200ng/ml) were $103\pm 6\%$ ($P=0.39$), $102\pm 8\%$ ($P=1.0$) and $107\pm 13\%$ ($P=0.39$), respectively, compared with the controls.

Conclusion : Metalloproteinase(s) is (are) suggested to play a role in mucin secretion. It appears that metalloproteinases, other than MMP-9, MMP-12 or TACE, affect the mucin secretion in this in vitro model. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:289-296)

Key words : Mucin, Secretion, Metalloproteinase.

서 론

점액은 기도의 상피 표면을 덮고 있으면서 점액-섬모 청소 작용을 돕는 역할을 한다. 점액-섬모 청소 작용은 기도에 끊임 없이 들어 오는 여러 가지 물질을 체외로 제거하여 개체를 방어한다¹.

하지만, 기도 질환에서는 점액이 과량 분비되는 경우가 많으며 과량 분비된 점액은 환자에게 불편함을 줄뿐만 아니라 질병의 예후에도 나쁜 영향을 미치기도 한다. 대표적인 기도 질환이라고 할 수 있는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)과 천식(asthma)을 살펴 보면, 만성폐쇄성폐질환 중 만성 기관지염은 점액 과량 분비를 특징으로 하는 질환이고 천식도 환자의 약 77%가 점액 과량 분비를 호소한다². 만성폐쇄성폐질환 환자와 천식 환자는 점액이 과량으로 분비되는 경우 불편함이 있을 뿐만 아니라 천식의 경우는 예후에도 나쁜 영향을 준다³.

그런데, 이처럼 기도 질환을 앓고 있는 환자가 과량의 점액이 분비되어도 아직 효과적인 치료법이 없다. 그 이유는 점액의 분비 기전에 대해서 아직 명확하게 밝혀진 바가 없기 때문이다. 그 동안의 연구를 통해서 알 수 있는 것은 어떤 자극이

기도에 들어오면 점액 분비를 증가시킨다는 것과 epidermal growth factor receptor (EGFR) 시스템이 점액 (mucus)의 성분 중 중요한 당화 단백질인 mucin을 생산하는 주요 기전이라는 것이다^{4,6}.

하지만, mucin 분비 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 점액을 과량 분비하는 기도 질환에서 점액을 효과적으로 억제하려면 mucin 생산과 분비 기전 모두를 효과적으로 막아야 할 것이다.

한편, proteinase(단백 분해 효소)는 단백질을 분해(proteolysis)하는 효소로서 생명 활동을 유지하는데 꼭 필요하다. proteinase의 기능 중에는 소화 기능이나 잘못 만들어진 단백질을 분해하는 기능이 외에도 신호 전달을 매개하고 조절하는 기능이 있다. 예를 들어서 mucin 생산 기전 중에서 G-protein coupled receptor 신호가 EGFR로 전달되는 과정에 proteinase에 의한 proteolysis가 필요하다⁷. 이때 필요한 proteinase가 ADAM(disintegrin and metalloproteinase)이라는 것이 알려졌다⁸. mucin 생산이 EGFR를 통해서 이루어진다고 하였는데, 그렇다면 우리가 아직 잘 알지 못하는 mucin 분비 기전에도 proteinase가 매개할 것인가 하는 궁금증을 가질 수 있다. 그리고, mucin 분비 기전에 proteinase가 매개한다면 수 많은 proteinase 중 어느

것이 매개할 것인가 하는 의문도 생긴다.

이런 의문에 답하기 위해서, mucin 분비를 많이 한다고 알려진 폐 세포주 Calu-3에 여러 가지 proteinase 억제제를 처리하여 mucin 분비에 미치는 변화를 살펴 보았다. 또한, 점액 분비가 증가하는 기도 질환인 만성폐쇄성폐질환이나 천식 등의 질병 병인과 관련되어 있다고 보도된 proteinase인 matrix metalloproteinase-9(MMP-9)⁹와 MMP-12¹⁰ 그리고 아직 잘 규명되지 않았지만 폐의 염증과 관련되어 있을 것으로 추정하는 tumor necrosis factor-alpha converting enzyme(TACE)¹¹ 등이 mucin 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보았다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 배양

Calu-3를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (10% fetal calf serum 및 항생제 함유)에 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24-well plate에 한 well 당 3×10⁵ 개의 세포를 심고 약 3일간 배양하여 세포가 plate의 바닥을 덮는 상태로 키웠다.

2. mucin 분비 정량

현재까지 알려진 mucin 9 가지 중 천식과 같은 기도 질환에서 제일 중요하다고 알려진 MUC5AC¹² 분비량을 ELISA로 정량하였다. 검체 50μl를 96-well plate에 넣고 10μl의 coating buffer(1% tritonX, 1% deoxycholic acid in phosphate buffered saline)를 첨가한 다음 carbonate/ bicarbonate buffer(2x)를 넣고 44°C에서 건조시켰다. 200ul의 2% 우태혈청 알부민을 1시간 처리한 다음 phosphate buffered saline(PBS)로 3차례 세척하였다. 이어서 생쥐의 anti-human MUC5AC(1/500 희석; Neomarker 사, 미국). 50μl를 1시간 동안 처리

한 다음 PBS로 3차례 세척하였다. HRP anti-murine IgG(1/10000 희석; KPL 사, 미국) 100ul 을 1시간 동안 처리한 다음 PBS로 3차례 세척하였다. 여기에 100ul의 TBM peroxidase substrate와 peroxidase solution B(KPL 사, 미국) 1대 1 혼합액을 첨가하고 발색이 될 때까지 20분 가량 기다렸다. 50ul의 2N H₂SO₄ 첨가 후 spectrophotometer(파장 450nm)로 흡광도를 측정하였다.

3. 복합 proteinase 억제제

거의 모든 proteinase의 기능을 억제한다고 알려져 있는 복합 proteinase 억제제(proteinase inhibitor cocktail; Calbiochem사, 미국)를 media 10ml에 1정 용해시켰다. Calu-3 세포가 증식하여 12-well plate의 바닥을 덮고 나면, 복합 proteinase 억제제를 함유하는 media(serum free)로 갈아 주고 24시간 후에 media를 얻었다. 이 media를 5분간 원침하여 세포를 가라 앉힌 후 상층액을 얻어서 MUC5AC ELISA를 하였다. 이 결과를 아무 것도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

4. 군에 특이적(group specific) proteinase 억제제

생명 활동에 관여하는 수 많은 proteinase를 군에 따라 나누면 serine proteinase, cysteine proteinase, aspartic proteinase, metalloproteinase 등 4군으로 나눌 수 있다. 각 군에 특이적인 proteinase 억제제는 각각 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich사, 미국), N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine(E-64; Sigma-Aldrich사, 미국), pepstatin A (Sigma-Aldrich사, 미국), 1,10-phenanthroline (Sigma-Aldrich사, 미국)를 사용하였다.

24 well에 Calu-3 세포가 증식하여 바닥을 덮으면, PMSF(10⁻⁴M), E-64(10⁻⁴M), Pepstatin A

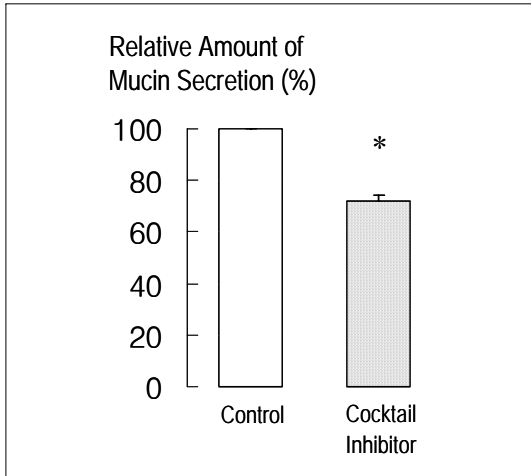


Fig. 1. A combination of multiple proteinase inhibitors(cocktail inhibitor) reduced the amount of mucin secretion. The 24 hour mucin secretion for 24 hours from a mucin-producing lung cell line, Calu-3, with or without the cocktail of inhibitors, was measured by ELISA for MUC5AC. Data are the means from 6 experiments; the error bar represents the standard error of the mean. * $P=0.02$ as compared with the control(Mann-Whitney U test).

(10^{-6} M), 1,10-Phenanthroline(10^{-4} M)를 함유한 새 media(serum free)로 갈아 주고 24시간 후에 media를 얻었다. 이 media를 5분간 원침하여 세포를 가라 앉힌 후 상층액만을 얻어서 MUC5AC ELISA를 하였다. 이 결과를 아무 것도 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

5. 1,10-phenanthroline 용량-반응 관계

matalloproteinase를 전반적으로 억제하는 1,10-phenanthroline이 mucin 분비를 억제하는 효과가 용량-반응 관계를 보이는지 확인하였다. 24 well에 Calu-3 세포가 자라서 바닥을 덮으면, 1,10-Phenanthroline을 각각 0 M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 함유한 새 media(serum free)로 갈아 주고 24시간 후에 media를 얻어 앞서 기술한 방법과 같이 mu-

cin 분비량을 정량하였다.

6. MMP-9, MMP-12, TACE

Calu-3 세포가 자라서 바닥을 덮으면, 각각 MMP-9(250ng/ml; R&D 사, 미국), MMP-12 (100ng/ml; R&D 사, 미국), TACE (200ng/ml; R&D 사, 미국) 함유한 새 media(serum free)로 갈아 주고 24시간 후에 media를 얻어 앞서 기술한 방법과 같이 mucin 분비량을 정량하였다.

7. 통계 처리

두 군간의 비교는 Mann-Whitney U test(SPSS for windows version 10.0)를 이용하였고 $P<0.05$ 일 때 두 군간에 차이가 있다고 정의하였다.

결 과

1. 복합 proteinase 억제제

복합 proteinase 억제제가 mucin 분비를 $28\pm 2.4\%$ (평균 \pm 표준오차; 대조군과 비교 시 $P=0.02$) 감소시켰다(실험 회수 6번, Fig. 1).

2. 군 특이적 proteinase 억제제가 mucin 분비에 미치는 영향

군 특이적 proteinase 억제제인 PMSF(10^{-4} M), E-64(10^{-4} M), Pepstatin(10^{-6} M), 1,10-Phenanthroline(10^{-4} M)는 MUC5AC 분비를 각각 $1\pm 4.9\%$ ($P=1.0$), $-6\pm 3.9\%$ ($P=0.34$), $-13\pm 9.7\%$ ($P=0.34$), $41\pm 8.2\%$ ($P=0.03$) 감소시켰다(실험 회수 4번, Fig. 2).

3. 1,10-phenanthroline 용량-반응 관계

1,10-phenanthroline에 의한 mucin 분비 억제 효과

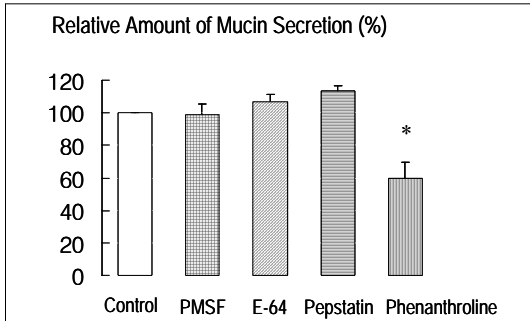


Fig. 2. A metalloproteinase inhibitor, phenanthroline, reduced the amount of mucin secretion. The 24 hour mucin secretion from a mucin-producing lung cell line, Calu-3, with or without one of the group-specific proteinase inhibitors, was measured by ELISA for MUC5AC. The concentrations of the group-specific proteinase inhibitors were 10^{-4} M of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10^{-4} M of E-64, 10^{-6} M of pepstatin and 10^{-4} M of 1,10-phenanthroline. Data are the means from 4 experiments; the error bars represent the standard errors of the means. * $P=0.03$ as compared with the control (Mann-Whitney U test).

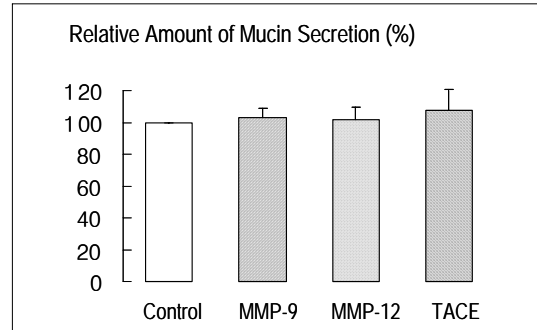


Fig. 4. The effects on mucin secretion of metalloproteinases known to have roles in the pathogenesis of mucus-secreting airway diseases. The 24 hour mucin secretion from a mucin-producing lung cell line, Calu-3, with or without one of the metalloproteinase, was measured by ELISA for MUC5AC. The concentrations of the metalloproteinases were 250ng/ml for matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), 100ng/ml for MMP-12 and 200ng/ml for tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE). Data are the means from 6 experiments; the error bars represent the standard errors of the means. No significant difference compared with the control (Mann-Whitney U test).

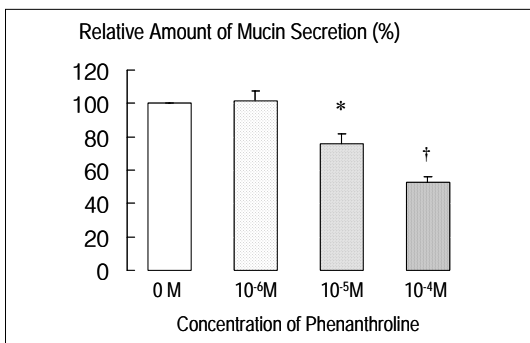


Fig. 3. A higher concentration of phenanthroline, a metalloproteinase inhibitor, further reduced the amount of mucin secretion. The 24 hour mucin secretion from a mucin-producing lung cell line, Calu-3, with or without a serial concentration of 1,10-phenanthroline, was measured by ELISA for MUC5AC. Data are the means from 6 experiments; the error bars represent the standard errors of the means. * $P=0.01$ and † $P=0.002$ as compared with the control (Mann-Whitney U test).

가 용량-반응 관계를 보이는지 확인하였다. 그 결과, 1,10-Phenanthroline 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M은 mucin 분비를 각각 $1\pm 7.8\%$, $24\pm 7.3\%$, $47\pm 3.8\%$ ($P=0.03$) 감소시켜서 용량-반응 관계가 있음을 확인하였다(실험 회수 6번, Fig. 3).

4. 기도 질환 관련 metalloproteinase가 mucin 분비에 미치는 영향

MMP-9(250ng/ml), MMP-12(100ng/ml), TACE (200ng/ml)에 의한 MUC5AC 분비량은 대조군에 비하여 각각 $103\pm 6\%$ ($P=0.39$), $102\pm 8\%$ ($P=1.0$), $107\pm 13\%$ ($P=0.39$)이었다(실험 회수 6번, Fig. 4).

고 찰

본 연구 결과를 보면 4가지 proteinase 군 중에서

metalloproteinase 군을 억제하는 proteinase 억제제만이 폐 세포주의 mucin 분비를 감소시켰다. 이 사실은 metalloproteinase 중 어떠한 것이 mucin 분비에 관여함을 시사한다. mucin 분비 기전에 어떤 proteinase가 관여하는지 밝히는 것이 본 연구의 목적이었고 본 연구 결과 mucin 분비 기전에 metalloproteinase가 관여하리라는 증거를 얻었다. 하지만, mucin 분비 기전에 관여하는 특정 metalloproteinase는 찾지는 못하였다. 다만, 그 동안 기도질환의 발병 기전에 관할 것이라고 알려진 MMP-9이나 MMP-12, 그리고 TACE 등의 metalloproteinase는 본 연구 모델에서는 mucin 분비에 관여하지 않을 가능성이 높음을 확인하였다. 왜냐하면, MMP-9 (250ng/ml), MMP-12(100ng/ml), TACE(200ng/ml)를 처리함에도 mucin 분비에 영향이 없었기 때문이다.

MMP-9는 천식의 경우, 객담에서 증가해 있고 천식이 호전되면 MMP-9가 정상화됨이 알려져 있다¹³. 한편, 만성폐쇄성폐질환의 경우, 폐조직에서 MMP-9가 증가해 있고 MMP-9 농도와 FEV₁과 역 상관관계가 있음이 보고 되었다¹⁴. 하지만, 아직 MMP-9과 mucin 분비의 관련성에 대해서는 보고된 바가 없다.

마찬가지로 MMP-12도 아직 mucin 분비와 관련성에 대해서 보고된 바가 없다. MMP-12는 만성 폐쇄성폐질환(폐기종, emphysema) 발생 기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 왜냐하면 MMP-12 결핍 생쥐는 흡연을 하여도 폐기종이 발생하지 않았기 때문이다¹⁰.

TACE는 천식이나 만성폐쇄성폐질환과의 관련성에 대해서 아직 보고가 없지만 mucin 생산 기전에 관여하는 것으로 최근 보고 되었다¹⁵. mucin을 생산하는데 주요 역할을 한다고 알려진 것은 epidermal growth factor receptor(EGFR) 시스템인데 이 기전을 통해서 여러 가지 자극이 mucin 생산을 자극한다^{4,6}. 하지만, mucin 생산이 아니라

mucin 분비 기전에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없다.

Proteinase 중 serine proteinase인 neutrophil elastase는 아주 강력한 secretagogue이지만 어떻게 mucin 분비를 일으키는지 그 분자생물학적 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 neutrophil이 neutrophil elastase를 통해서 mucin 분비 세포의 mucin 분비를 자극하는 cell-to-cell interaction 에 관심을 둔 연구라기 보다는 mucin 분비하는 세포가 어떤 신호를 어떻게 받아서 세포막과 세포내의 어떤 분자생물학적 기체를 동원하여 mucin을 분비하는가에 관심을 두었다. 따라서, 본 연구의 관점에서 보면 serine proteinase는 상관없고 metalloproteinase 중 미지의 어떤 것이 세포 신호전달 과정에 관여하여 mucin을 분비한다는 가설을 지지한다고 볼 수 있다.

점액을 과량 분비하는 기도 질환에서 점액을 효과적으로 억제하려면 mucin 생산과 분비 기전 모두를 효과적으로 막아야 할 것이다. 본 연구 결과를 토대로 판단하면 metalloproteinase 억제제를 사용하면 mucin 분비를 억제할 수 있으리라 생각한다. 하지만, metalloproteinase 군 전체를 억제하는 방법은 생명 활동에 필요한 여러 metalloproteinase들을 억제하는 부작용을 초래할 가능성이 있다. 따라서, 본 연구에서는 밝히지 못하였지만 mucin 분비 기전에 관여하는 특정 metalloproteinase를 찾아서 그 proteinase만 선택적으로 억제하는 것이 중요하리라 생각하며 이것이 향후 더 연구해야 할 과제이다.

요 약

연구배경 :

기도 질환에서 점액이 과량 분비되는 경우 환자에게 불편함을 줄뿐만 아니라 기도 질환 예후에도 나쁜 영향을 미친다. 그러나, 기도 질환에서 점액

이 과량 분비되는 것을 효과적으로 막는 방법이 없다. 점액의 성분 중 mucin은 당화 단백질로서 점액이 점성을 띄게 만드는 주요 성분이다. 본 연구를 통해서 mucin 분비 기전에 proteinase가 관여하는지 확인하고 만일 proteinase가 mucin 분비 기전에 관여 한다면 어느 proteinase가 그런 역할을 하는지 확인하고자 하였다.

방 법 :

(1) mucin 분비 억제 실험

균 특이적 proteinase 억제제를 사용하여 어느 균에 속하는 proteinase가 mucin 분비를 억제하는지 mucin을 생산하는 폐 세포주인 Calu-3를 이용하여 알아보았다. 균 특이적 proteinase 억제제로 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, serine proteinase inhibitor), E-64(cysteine proteinase inhibitor), Pepstatin(aspartic proteinase inhibitor), 1,10-Phenanthroline(metalloproteinase inhibitor)를 사용하였다. 균 특이적 억제제를 Calu-3에 24시간 동안 처리하여 분비된 mucin양을 enzyme linked immunoabsorbant assay(MUC5AC)로 정량하였고 그 결과를 대조군과 비교하였다.

(2) Mucin 분비 자극 실험

Metalloproteinase 중에서 기도 질환 발병과 관련 있다고 알려진 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-12 그리고 TNF-alpha converting enzyme(TACE)를 Calu-3에 24시간 처리하여 분비된 mucin양을 enzyme linked immunoabsorbant assay (MUC5AC)로 정량하였고 그 결과를 대조군과 비교하였다.

결 과 :

(1) 균 특이적 proteinase 억제제인 PMSF(10^{-4} M), E-64(10^{-4} M), Pepstatin(10^{-6} M), 1,10-Phenanthroline(10^{-4} M)는 MUC5AC 분비를 각각 $1\pm 4.9\%$ (평균 \pm 표준오차; 대조군과 비교 시 $P=1.0$), $-6\pm 3.9\%$ ($P=0.34$), $-13\pm 9.7\%$ ($P=0.34$), $41\pm 8.2\%$ ($P=0.03$) 감소시켰다(실험 회수 4번).

(2) MMP-9(250ng/ml), MMP-12(100ng/ml), TACE(200ng/ml)에 의한 MUC5AC 분비량은 대조군에 비하여 각각 $103\pm 6\%$ ($P=0.39$), $102\pm 8\%$ ($P=1.0$), $107\pm 13\%$ ($P=0.39$)이었다(실험 회수 6번).

결 론 :

mucin 분비 기전에 metalloproteinase가 관여함을 시사하지만 MMP-9, MMP-12, TACE는 in vitro 모델에서 mucin 분비에 영향을 미치지 않았다.

참 고 문 헌

1. Basbaum C, Welsh MJ. Mucus secretion and ion transport in airways. In: Murray JF, Nadel JA, editors. Textbook of respiratory medicine. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 327-48.
2. Openshaw PJ, Turner-Warwick M. Observations on sputum production in patients with variable airflow obstruction: implications for the diagnosis of asthma and chronic bronchitis. *Respir Med* 1989;81:25-31.
3. Lange PL, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339:1194-1200.
4. Niles RM, Christensen TG, Breuer R, Stone PJ. Serine proteases stimulate mucous glycoprotein release from hamster tracheal ring organ culture. *J Lab Clin Med* 1986;108:489-97.
5. Nadel JA. Role of mast cell and neutrophil proteases in airway secretion. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:S48-S51.
6. Takeyama K, Dabbagh K, Lee H-M, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin pro-

- duction in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3081-6.
7. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinases cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402:884-8.
 8. Moss ML, Jin SC, Milla ME, Burkhar W, Carter HL, Chen W, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- α . *Nature* 1997;385:733-6.
 9. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlated with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1945-50.
 10. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277:2002-4.
 11. Ermert M, Pantazis C, Duncker HR, Griminger F, Seeger W, Ermert L. In situ localization of TNF α /beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. *Cytokine*. 2003 ;22:89-100.
 12. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:517-23.
 13. Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9:28-33.
 14. Kang MJ, Oh YM, Lee JC, Kim DG, Park MJ, Lee MG, et al. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *J Korean Med Sci*. 2003;18:821-7.
 15. Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11618-23.
-