

## 분비백혈구단백분해효소억제제 (SLPI) 결손 생쥐에서 상처회복의 형태학적 차이

정제우, 정순정, 박주철, 김흥중<sup>1</sup>, Wahl SM<sup>2</sup>, 정문진

조선대학교 치과대학 구강조직학교실, <sup>1</sup>구강해부학교실,

<sup>2</sup>National Institute of Dental Craniofacial Research (NIDCR), National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

**간추림** : 분비백혈구단백분해효소억제제 (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 세틴계열의 단백분해 억제제로 점액에서 주로 발견되며 항미생물 작용을 지니고 있다. SLPI는 약 12kD의 분자량을 지니며 아교질과 fibronectin과 같은 구조 단백질의 과도한 분해를 억제한다. 손상된 조직의 치유는 과도한 단백질의 분해와 박테리아의 감염을 특징적으로 지니고 있으므로 상처의 치유가 느리게 진행된다.

이에 *Slpi* 유전자 결손된 생쥐를 이용하여 피부에 상처를 유도한 후 1, 3, 5, 7일째에 조직을 적출하여 다양한 조직화학적 염색법과 면역조직화학적 방법 및 RNase protection 방법 등을 이용하여 상처치유과정을 분석하였다.

조직화학적 분석결과 상처 유도 후, *Slpi* 결손 생쥐의 적출된 모든 피부조직에서 회복과정이 대조군의 생쥐에 비해 느렸으며, 다수의 염증반응세포들이 장기간 상처부위에 남아 있었다. 또한, *Slpi* 결손 생쥐에서 아교질의 침착이 느리게 진행되었으며 조직 장력 역시 낮은 것으로 확인되었다. RNase protection 결과로 발현되는 사이토카인 중 TGF- $\beta$ 1의 발현이 *Slpi* 결손 생쥐에서 증가되었다.

이러한 결과를 종합해 보면 SLPI는 피부의 상처회복에서 상피세포의 이동, 염증반응세포의 유입조절 등에 관여할 것으로 생각된다.

**찾아보기 낱말** : 상처회복, 분비백혈구단백분해효소억제제, 상피조직, 기질형성, 염증세포

### 서론

상처치유과정은 세포의 이동성과 접착성 등을 포함하는 세포들의 연속적인 형태학적인 변화라 할 수 있다. 이러한 세포학적인 변화는 배아(embryo) 발생, 조직의 변화 또는 종양과 암의 발생처럼 또 다른 생물학적 과정에 있어 결정적인 역할을 한다. 상처치유는 체액유출의 방지, 재생되는 세포성 장벽의 보호, 조직의 잔재와 외부물질의 제거를 위하여

고도로 발달된 생물학적 방어 기전이며, 상처를 아물게 하기 위하여 조직의 재생과 조직 잔재물의 제거가 일어나는 단기간의 과정이라고도 할 수 있다 (Gould 등 1997, Ashcroft 등 1999a, Song 등 1999). 상처치유는 백혈구의 유입, 기질의 침착, 재생피화, 그리고 궁극적으로 상흔의 형성을 동반한 염증반응의 해결을 포함하는 다수의 중복된 사건들로 둘러싸인 복잡한 과정이다. 특히 손상된 상처치유(impaired wound healing)는, 예를 들어 치유되기 힘든 급성상처, 만성궤양, 또는 노령화된 개체 등에서 발생한 상처의 치유를 말하는데, 이 과정에는 과도한 백혈구의 유입과 지속적으로 증대되는 기질 구성요소의 분해들이 연속적으로 일어난다 (Ashcroft 등 1999b, Jeong 등 2005). 따라서, 손상된 개체의 상처

\*이 논문은 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(R08-2003-000-10279-0).

교신저자: 정문진 (조선대학교 치과대학 구강조직학교실)  
전자우편: mjjeong@chosun.ac.kr

치유는 치유에 관여하는 기전을 밝히는 것이 중요하다.

지연되는 치유과정의 결정적인 요인은 염증반응이며, 이것은 감염이 없는 상태에서 염증반응이 부적절하게 과한 것을 의미한다. 현저하게 지연되는 상처치유에 적당한 실험동물 모델 (KO mice)이 사용되는데, 이것은 손상의 초기과정에 심한 백혈구의 유입이 특징적이다. 손상된 상처치유는 백혈구의 협착과 유입을 증가시키는 순환 에스트로젠이 없거나 분비백혈구단백분해효소억제제 (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)가 결손된 경우에 일어나며, 결국은 상처치유가 심하게 지연된다 (Barrick 등 1999, Grobmyer 등 2000).

SLPI는 C말단 72번째 류신에 위치한 단백질분해효소 저해자리를 지닌 두개의 cysteine-rich 도메인으로 구성된 12kD의 단백질이다 (Thompson과 Ohlsson 1986). SLPI는 neutrophil elastase, cathepsin G, mast cell chymase, 그리고 각질층 (stratum corneum)에서 발견되는 chymotrypsin-like enzyme과 같은 세린 단백질 분해효소의 단백질 억제제이다 (Zhu 등 2002). SLPI는 정액 (seminal fluids), 점막표면 (mucosal surface), 기관지점액 (bronchial fluids), 자궁점액 (cervical fluids), 침 (saliva)에서 주로 발견되었으나, 설치류의 염증세포들과 사람과 설치류의 진피성 각질화세포에서도 검출되었다 (Wingens 등 1998). SLPI는 항 단백질분해효소로서의 일차적인 기능 외에 항균 (anti-microbial)과 세포내의 효소합성에 영향을 미치고 단핵구의 matrix metalloproteinases (MMP) 생성과 활성을 억제하는 항염증 (anti-inflammatory) 작용을 포함한 선천적숙주방어 (innate host defense)와 연관된 다중성기능을 가진 것으로 알려졌다 (Jin 등 1997, Jin 등 1998, Ding 등 1999, Park 1999). 상처치유에서 SLPI가 각질화세포에서 분비되며, 사이토카인으로서 작용할 것이라고 보고하였으나 (Ascroft 등 2000), 치유의 각 단계별 형태학적인 비교와 기질형성의 조절 등에 관한 조직화학적 및 기계적장력 등의 차이점의 결과 도출이 미비한 형편이다. 따라서, 본 연구는 *Slpi* 유전자가 결손된 생쥐를 이용하여 상처치유의 형태학적 특징을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 피부 상처유도

National Institute of Dental Craniofacial Research (NIDCR, NIH, USA)에서 제작된 6~8주된 수컷 SLPI 야생형 (wild type, WT)과 결손형 (knockout, KO) 생쥐를 methoxyfluorane으로 마취시킨 뒤 등쪽의 털을 제거한 뒤 각 알콜솜으로 소독한 후, 1회용 수술용 칼을 이용하여 1cm의 간격을 두고 모두 4군데에 1cm씩 일정하게 상처를 유도하였다. 상처유도 후 1일부터 14일 (1, 3, 5, 7, 14일)까지 생쥐를 우리 (cage)에서 키운 뒤 각 시기별로 진피를 포함한 피부전체를 절제하여 실험에 이용하였다. 각 군당 5마리의 생쥐를 사용하였다.

### 2. 조직학적 분석과 영상분석

절제된 피부를 고정액으로 옮긴 다음, 실온에서 12시간 고정하여, 에탄올 농도 상승 순으로 탈수하여 Paraplast (Sherwood Medical Industries, USA)에 포매하였다. 포매된 조직은 박절기 (Reichert-Jung 820, USA)로 6~7 $\mu$ m 두께의 절편을 제작한 다음, 조직변화를 관찰하기 위하여 H-E, Giemsa, PAS, Massons-Trichrome 등으로 염색한 후 조직절편들은 영상분석기가 장착된 현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영 분석하였다. 그리고 영상분석 프로그램을 이용한 조직계측법 (histometry)을 이용하여 WT과 KO사이의 상처치유 정도, 염증세포의 상처부위로의 유입 등을 분석하였고, 기질합성을 측정하고자 Picrosirius Red 염색을 시행한 뒤 편광필터를 장착한 현미경 (Zeiss, Germany)으로 촬영하였다.

### 3. 면역조직화학법

수화시킨 조직절편에 sodium citrate (0.1 M, pH 6.0) 용액에 5분간 2회에 걸쳐 항원성 회복 과정을 거친 후, 조직내의 peroxidase 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소 처리과정을 거쳤다. 항체의 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% NGS (normal goat serum)으로 처리한 후, 일차항체로는 큰포식세포에

특이 항체인 Mac3 (rat anti-Mac3, R&D, USA)를 희석 (1 : 500)하여 사용하였으며, 이어 biotinylated goat anti-rat IgG (DAKO Co., USA)로 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 이어서 peroxidase가 결합된 streptaavidin (DAKO Co., USA)으로 10분간 처리한 후 DAB (Sigma, Immunochemical Co., USA)에 5분간 처리하여 조직을 발색시켰다. 반응이 끝난 재료들은 탈수 후, Permount (Fisher, USA)로 봉입 관찰하였다.

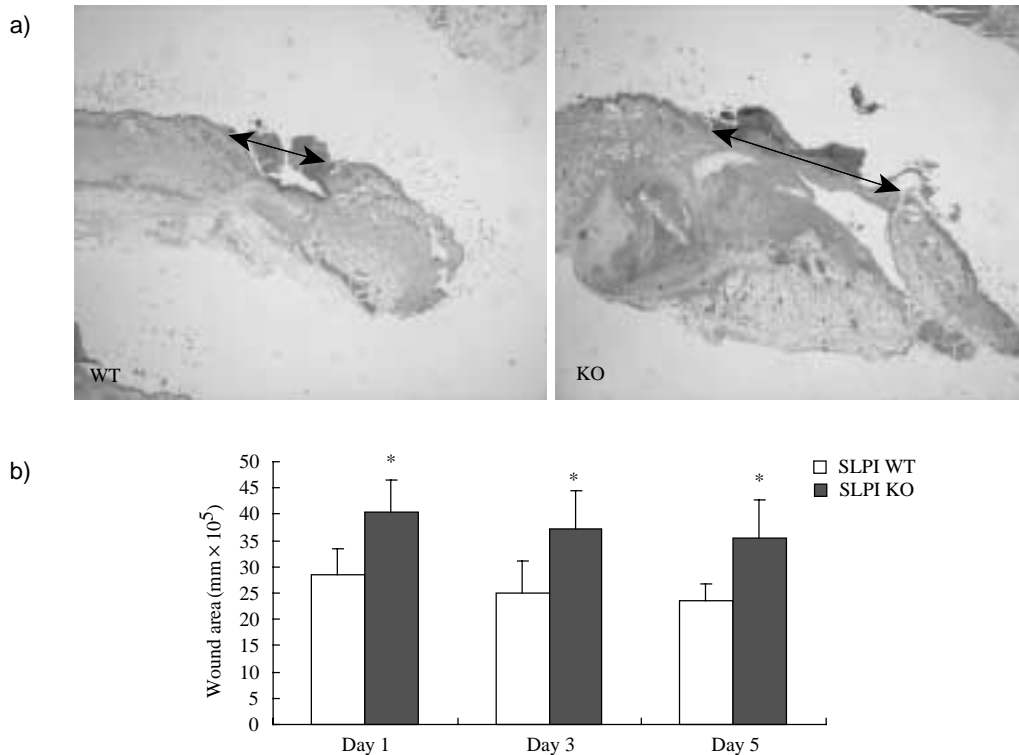
#### 4. RNase protection assays (RPA)

각각의 조직을 total RNA 분리시약인 Trisol

(Invitrogen, USA)을 이용하여 총 RNA를 뽑은 뒤, 각 조직별로 3 mg의 RNA를 이용하였다. 발현되는 다양한 사이토카인의 변화를 측정하고자 TGF- $\beta$  등의 probe를 포함한 MCK 3b 또는 MCR 4와 같은 다중 probe (Pharmingen, USA)를 구입하여 제조사에서 주어진 방법에 따라 진행하며, 발현된 각각의 RNA의 양을 GAPDH를 표준으로 하여 계산하였다.

#### 5. 기계적장력측정

피부에 유도된 상처가 회복되는 다양한 시점에 mice를 희생시킨 후, 상처부위의 장력을 측정하기 위하여 Biochemical tissue characterization (BTC-



**Fig. 1.** a) Microscopic view of wounds harvested at day 3 post wounding ( $\times 2.5$ ). WT skin wounds were wider than those of SLPI KO mice with an increased inflammatory response. At day 3, both wound area and amount of inflammation are comparable to those seen in WT mice (H&E). b) Wound measurements determined by image analysis revealed larger wounds in the KO mice, as compared to WT. Healing was also delayed in the KO mice. Five mouse were used per data point each mice had four wounds that wer analyzed; therefore, 20 sample were analyzed for each measurement. Asterisks (\*) indicate 0.05 of p value compared to each WT.

2000)을 사용하였다. 압력은 100 mmHg의 최대치를 사용하였고, 장력의 분석은 20~80 mmHg 사이에서 측정하였다.

## 6. 통계분석

통계차이는 Excell (Microsoft) 프로그램의 t-검정을 이용하였다. 유의도는 0.05 미만의 p값으로 하였다 ( $p < 0.05$ ).

## 결 과

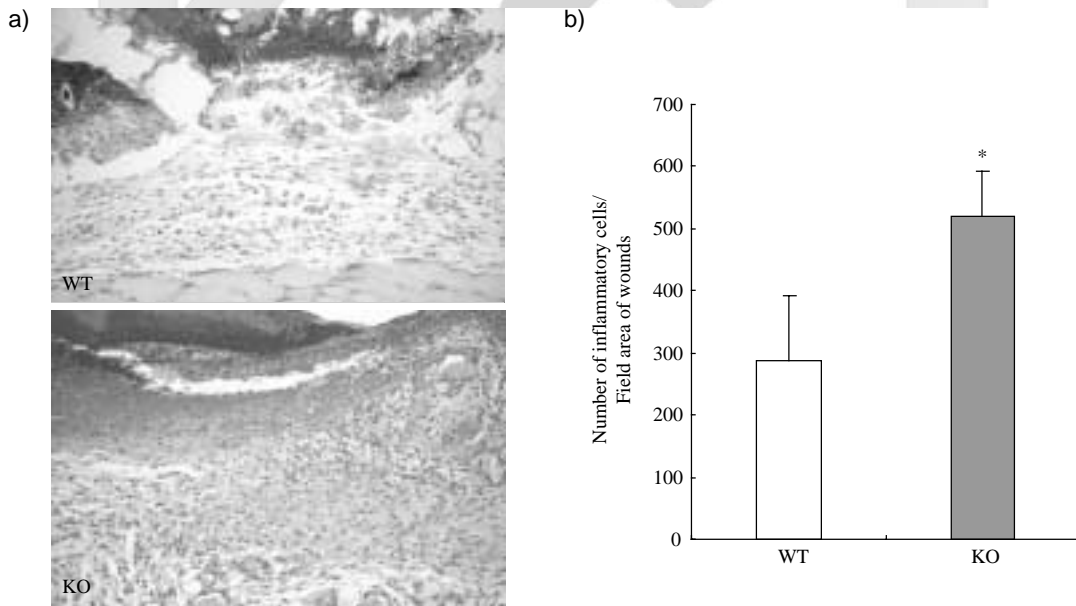
### 1. 상처회복의 조직측정

SLPI KO과 WT 간의 피부 상처 회복을 조직학적으로 분석하기 위하여, 제작된 시료에 일반적인 H&E 염색을 시행하였다. 상처유도 후 3일째 조직에서 보는 것처럼 KO상처부위가 WT에 비해 더 넓은 것을 관찰하였다(Fig. 1a). 상처 유도 후 1일, 3일, 5

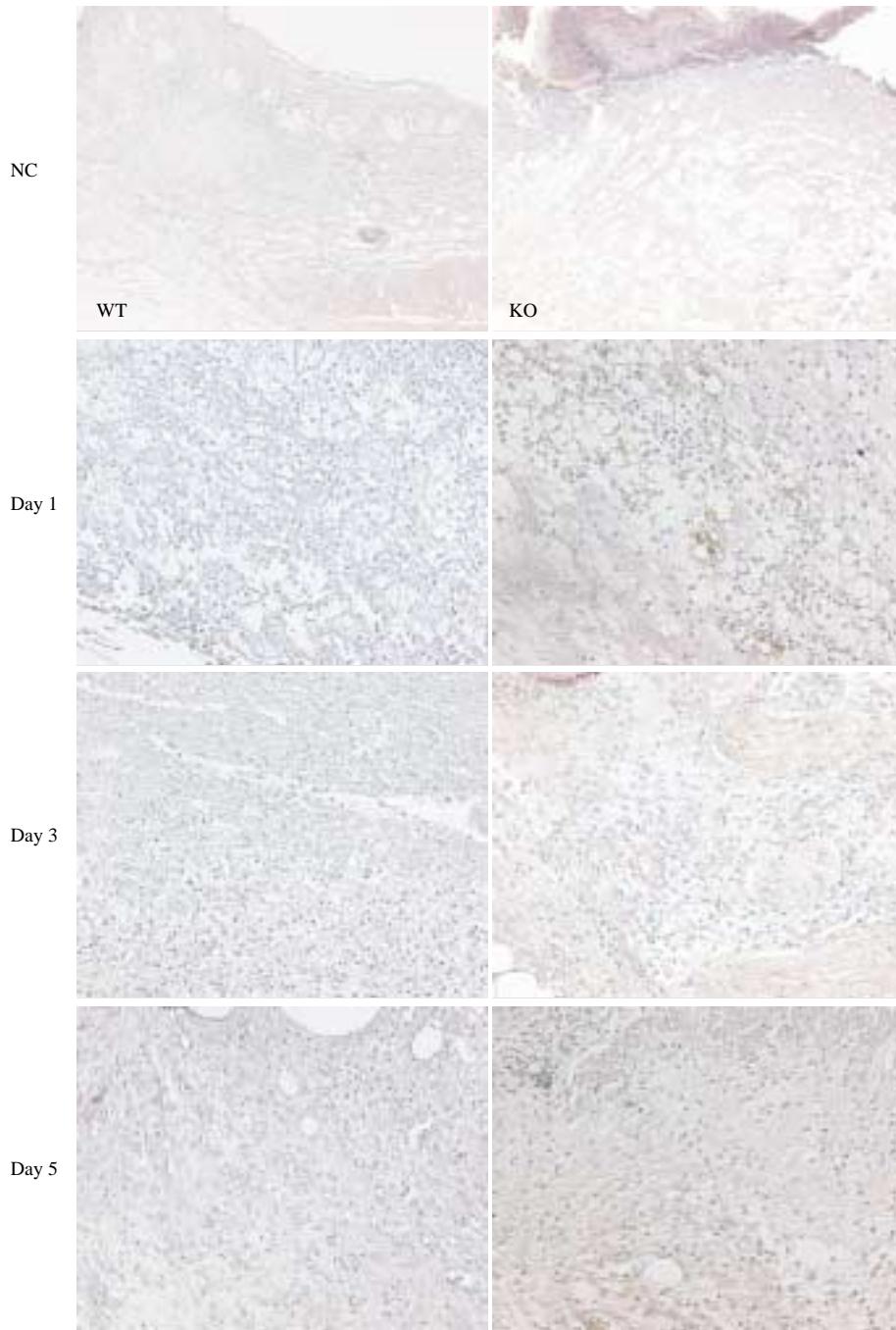
일째 조직의 상처부위가 회복되는 것을 형태계측을 하여 면적을 측정한 결과 1일부터 5일까지의 모든 조직에서 KO의 상처가 WT에 비해 넓게 측정되었다(Fig. 1b).

### 2. 염증반응세포와 사이토카인 비교

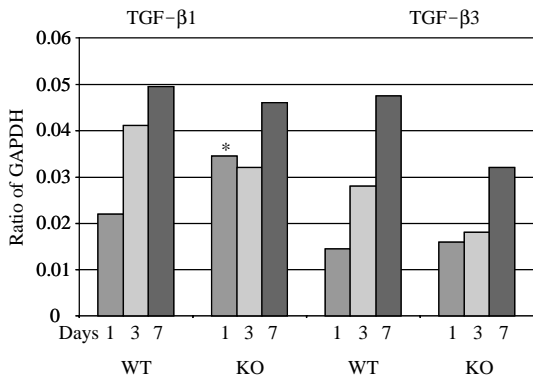
피부상처 유도 후 3일째 피부 상처조직으로 유입된 염증세포를 비교하기 위하여 Giemsa염색을 하였다. Giemsa에 염색된 염증세포들의 수는 WT보다 KO 상처부위에서 다수 유입되어 있음이 관찰되었으며(Fig. 2a). 상처 유도 후 3일째 조직에 유입된 염증세포를 측정하여 비교한 결과 약 1.7배 정도 많은 염증세포가 유입되었다(Fig. 2b). 염증반응시기에 출현하는 큰포식세포를 면역조직염색으로 1일부터 5일까지 확인한 결과 WT의 상처조직에 비하여 KO에서 DAB로 염색된 증가한 면역반응이 확인되었다(Fig. 3). 또한, 피부 상처회복 동안에 발현되는 사이토카인을 Rnase protection 분석법(MCK 3b probe)을



**Fig. 2.** a) Giemsa staining for infiltrated inflammatory cells to compare with WT and KO ( $\times 20$ ). Degree of differences of infiltrated cells can be easily observed at day 3 wound area. KO wound showed an increase in the number of cells compared to WT. b) Increased inflammatory cell in skin wounds of KO mice. Asterisk (\*) indicates below 0.005 of p value compared to WT at day 3 after wounding.



**Fig. 3.** Macrophage staining with the antibody for Mac3 at day 1 to 5 after wounding ( $\times 20$ ). The intensity of cell staining was increased with temporal pattern until day 5 in KO wounds. In concordance with Giemsa, Mac3 staining was confirmed the number of infiltrated inflammatory cells (including macrophage) between WT and KO. NC, negative control.

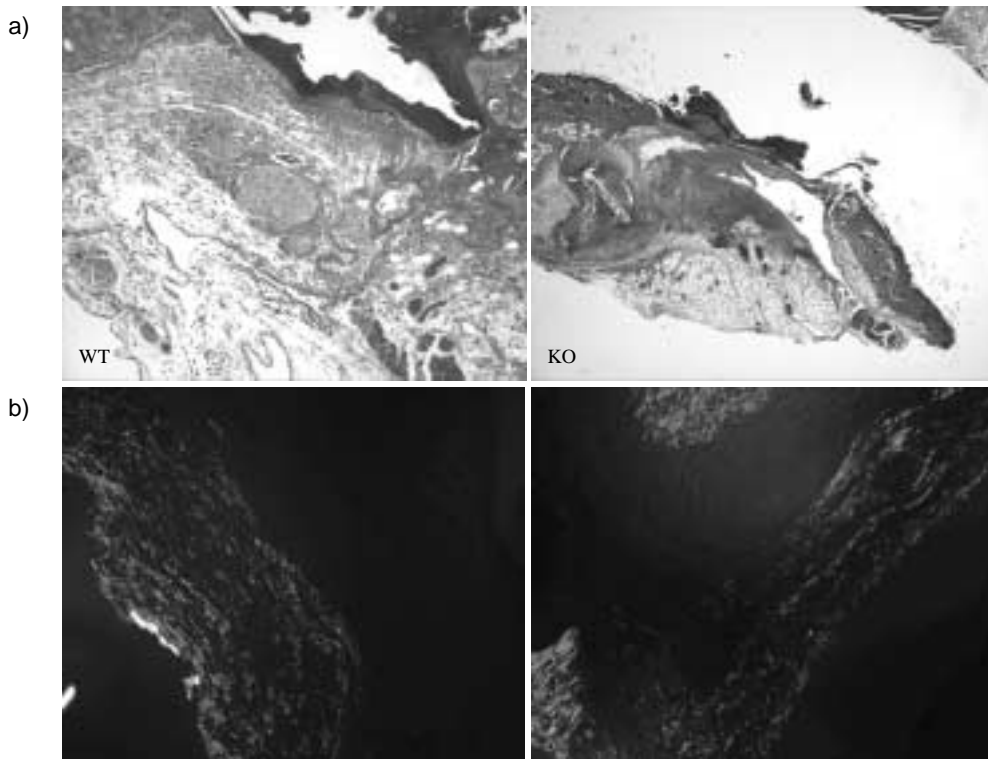


**Fig. 4.** RNase protection assay at various time points. Band intensities were normalized to GAPDH. At day 1 significant increasing can be observed in TGF-β1 production. Asterisk (\*) indicates  $p < 0.05$ .

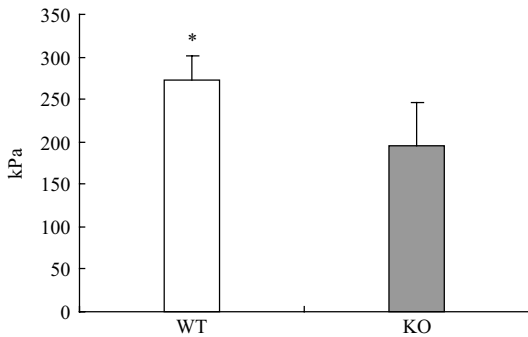
이용하여 확인한 결과, 몇 가지 발현의 차이를 보이는 사이토카인의 RNA 중 특이할 만한 것은 1일째에서 TGF-β1의 발현이 WT에 비해 KO에서 증가된 것을 확인하였다(Fig. 4).

### 3. 기질 재형성과 조직장력 비교

기질형성에 중요한 인자중 하나인 아교질의 침착을 상처조직내에서 관찰한 결과 3일째 조직에서 WT의 상처 조직에 비하여 KO에서 감소된 형태를 관찰할 수 있었으며(Fig. 5a), 이를 편광현미경을 이용하여 침착되는 양을 비교 분석하여, WT에 비해 KO의 1일, 5일 조직에서 침착되는 양이 적은 것을 확인하였다(Fig. 5b). 또한, 아교질을 포함한 다른 결합조직성분을 포함한 진피의 진정한 회복장력을 측



**Fig. 5.** a) Microscopic view of wounds harvested at day 3 post wounding ( $\times 10$  for WT;  $\times 2.5$  for KO). SLPI KO wounds showed an decrease in the amount of stained collagen fibers (blue) when compared to the control. Masson's trichrome stain. b) For the detection of matrix deposition, polarizing filter was used after Picrosirius Red staining in each wound section ( $\times 10$ ). Significantly decreased matrix deposition was observed in KO at day 5 after wounding.



**Fig. 6.** Wound stiffness at wounds was determined using the biomedical tissue characterization system (BTC-2000) at day 5 after wounding. Pressure was applied to a maximum of 100 mmHg and then released. Stiffness was measured between 20 and 80 mmHg. The stiffness of the KO wound was lower than that of WT. Asterisk (\*) indicates below 0.005 of p value compared to KO at day 5 after wounding. kPa means that modulus accounts for the material property of the tissue and is a measure of the stiffness of the tissue.

정하기 위하여 장력측정으로 고안된 특수한 장비인 BTC-2000을 사용한 결과 WT의 회복되는 조직장력이 KO보다 큰 것으로 확인되었다(Fig. 6).

## 고찰

피부에 길이가 1cm가 되도록 일정하게 상처를 유도한 후 WT과 *Slpi* 유전자가 결손된 생쥐 (KO)에서 회복의 차이점을 분석하였다. 피부의 상처는 KO의 경우 WT에 비교하여 상처부위가 넓게 관찰되었는데, 이것은 상처회복이 WT에 비해 더디게 진행된다는 것을 의미하며, 이러한 조직학적인 시료를 바탕으로 형태계측을 실시한 결과에서 보는 것과 같이 상처회복의 면적이 KO에서 WT 보다 넓게 측정되는 동일한 결과를 얻었다(Fig. 1a, b). 그러므로 이러한 결과는 SLPI가 피부 상처회복에 결정적인 역할을 할 것이라는 조직학적인 증거이다. 피부상처 유도 후 3일째 피부조직에 유입된 염증세포수를 측정 한 결과 KO의 피부상처조직과 WT과 비교하였을 때, 상당한 수의 염증세포가 KO에 유입된 것으로

확인되었다(Fig. 2a, b). 상처조직에 위치하는 염증세포 중 큰포식세포만을 특이하게 검출하는 Mac3 항체를 이용하여 1일, 3일, 5일째 조직에 면역반응을 실시한 결과 KO의 상처조직이 WT과 비교하여 양성반응을 보이는 큰포식세포가 많이 관찰되었다(Fig. 3). 따라서, 이것은 SLPI가 염증세포들(큰포식세포 포함)의 상처 내 유입을 조절하는 인자일 가능성을 시사하는 결과임을 알 수 있다.

피부의 상처회복과정 중 기질의 재형성은 상처회복의 시점을 얼마만큼 단축시키고 연장시키는가에 중요한 요인 중 하나이다. 따라서, 진피내의 아교질의 침착의 정도와 양을 확인하는 것은 상처회복조직을 분석하는데 중요하다. 이에 선행된 실험인 Masson's trichrome염색에서 아교질의 침착이 KO에서 약한 것을 확인하였는데, 이를 뒷받침하는 실험으로 편광현미경을 이용하여 아교질의 침착되는 양을 비교 분석하였다. KO의 경우는 WT에 비해 상처 유도 후 1, 5일 시료에서 침착 되는 양이 적은 것이 확인되었다(Fig. 5a, b). 또한 아교질을 포함한 다른 결합조직성분을 포함한 진피의 진정한 회복장력을 측정하기 위하여 장력측정으로 고안된 특수한 장비인 BTC-2000을 사용한 결과, WT의 장력이 KO보다 큰 것으로 보아 진피내 결합조직성분의 재구성이 상처회복과정 중 SLPI에 의해 직, 간접적인 조절을 받는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

이러한 결과를 종합해보면, SLPI가 없는 상태에서 상처회복이 늦어졌으며, 염증반응이 길어졌으며, 기질의 축적이 늦어졌다. 따라서, SLPI는 상처회복 과정에서 몇 가지 다양한 기능을 하는 것으로 사료된다. 즉, 유입되는 백혈구의 활성을 조절하고, TGF- $\beta$  활성을 감소시킴으로서 염증반응을 줄일 것으로 보인다. 선행된 연구들을 보면 증가된 엘라스타제와 연장된 염증시기는 밀접한 관계가 있으며, 특히 상처회복에서 만성과 급성염증에 주되게 연관이 있는 것으로 보고되고 있다(Herrick 등 1997, Ashcroft 등 1997, 1999a, b, 2003). 엘라스타제는 상처부위에 침착되는 다양한 구조적 기능적 단백질들인 proteoglycan, 아교질과 fibronectin 등을 분해할 수 있다(McDonald와 Kelley 1980, Kafienach 등 1998). 이것은 결국 상처부위 기질 침착을 감소시키고 손상된

상처회복을 유도함으로써 국소적으로 matrix metalloproteinase (MMP)를 활성화함으로써 기질분해를 돕는다고 볼 수 있다 (Ashcroft 등 1999). 따라서, SLPI는 NF- $\kappa$ B의 억제를 통해 큰포식세포 아교질 분해효소의 합성을 억제하기 때문에 (Zang 등 1997, Song 등 1999), SLPI는 과도한 조직붕괴를 조절하는 결정적인 인자로 해석할 수 있다.

피부상처과정동안에 발현되는 다양한 사이토카인 중 어떤 사이토카인이 SLPI KO 생쥐에서 중요한 역할을 하는지를 구명하기 위해, mck3b 다중 probe를 사용하여 RNA의 발현을 확인한 결과 몇 가지 발현의 차이를 보이는 사이토카인 중 특이할 만한 것은 초기 1일째에서 TGF- $\beta$ 1의 발현이 WT에 비해 KO에서 증가된 것을 확인하였다 (Fig. 5). 생체 (*in vivo*)와 시험관 (*in vitro*)의 실험 결과들에서 다양한 단백질분해 효소는 TGF- $\beta$ 와 같은 염증세포에 대한 화학주성물질의 활성화에 기여한다고 알려져 있었으나 (Wahl 등 1987), SLPI에 의해 억제될 수 있는 세린 단백질분해 효소에 관하여는 잘 알려지지 않았다. 하지만, 엘라스틴의 분해와 연관되어 분비되는 TGF- $\beta$ 에 대한 연구를 제외하고, SLPI는 세포활성을 조절함으로써 TGF- $\beta$ 를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있으며 (Heine 등 1990), TGF- $\beta$  활성화에 대한 큰포식세포는 세포활성에 앞서서 TGF- $\beta$ 의 생물학적활성에 중요한 요점이 된다 (Nunes 등 1995). 염증세포들과 탈과립화되는 혈소판들에 의해서 국소적으로 분비된 TGF- $\beta$ 는 아마도 엘라스틴 섬유로부터 분비되는 엘라스타제와 관련된 latent form binding protein 1 (LTBP)를 이차적으로 증가시킨다고 하였다 (Taipale 등 1995, Karonen 등 1997). 따라서, SLPI가 결여된 상태에서 TGF- $\beta$ 의 활성이 증가된 것은 SLPI가 초기에 염증세포들의 유입을 계속적으로 유지 시키도록 하는데 필수적인 요인으로 작용했다고 볼 수 있다.

## 참고 문헌

- Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW : Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory responses. *Am J Pathol* 155: 1137-1146, 1999a.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB : Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biol* 1: 260-266, 1999b.
- Ashcroft GS, Horan MA, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson M : Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinase (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. *Cell Tiss Res* 290: 581-591, 1997.
- Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM : Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* 6: 1147-1153, 2000.
- Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Burow M, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, Horan MA, Wahl SM, Nakayama T : Estrogen modulates cutaneous wound healing by down-regulating Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Clin Invest* 111: 1309-1318, 2003.
- Barrick B, Campbell EJ, Owen CA : Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen* 7: 410-422, 1999.
- Ding A, Thieblemont N, Zhu J, Jin F, Zhang J, Wright S : Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages. *Infect Immun* 67: 4485-4489, 1999.
- Gould LJ, Yager DR, Cohen K : In vitro analysis of fetal fibroblast collagenolytic activity. *Wound Repair Regen* 5: 151-158, 1997.
- Grobmyer SR, Barie PS, Nathan CF, Fuortes M, Lin E, Lowry SF, Wright CD, Weyant MJ, Hydo L, Reeves F : Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 28: 1276-1282, 2000.
- Heine UI, Wahl SM, Munoz EF, Allen JB, Ellingsworth LR, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB : Transforming growth factor-beta 1 specifically localizes in elastin during synovial inflammation: an immunoelectron microscopic study. *Arch Geschwulstforsch* 60: 289-294, 1990.

Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW : Topical estrogen accelerates cutaneous

- Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, Horan M, McCollum C, Ferguson M : Up-regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation. *Lab Invest* 77: 281-288, 1997.
- Jeong MJ, Ashcroft GS, Sim D, Jin W, McGrady G, Song X, Wahl SM : TNF- $\alpha$  neutralizing antibodies accelerate impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, in press, 2005.
- Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A : Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88: 417-426, 1997.
- Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A : Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun* 66: 2447-2452, 1998.
- Kafienah W, Buttle DJ, Bumett D, Hollander AP : Cleavage of type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* 330: 897-902, 1998.
- Karonen T, Jeskanen L, Keski-Oja J : Transforming growth factor  $\beta$ 1 and its latent form binding protein-1 associate with elastic fibers in human dermis: accumulation in actinic damage and absence in anetoderma. *Br J Dermatol* 137: 51-58, 1997.
- McDonald JA, Kelley DG : Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. *J Biol Chem* 255: 8848-8858, 1980.
- Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB : Characterization of latent TGF- $\beta$  activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 155: 1450-1459, 1995.
- Parks WC : Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 7: 423-432, 1999.
- Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billinghurst RC, Poole AR, Wahl SM : Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med* 190: 535-542, 1999.
- Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J : Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor- $\beta$ 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 4689-4696, 1995.
- Thompson RC, Ohlsson K : Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 6692-6696, 1986.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB : Transforming growth factor type  $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5788-5792, 1987.
- Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS, Meis JF, van Vlijmen-Willems IM, Zeeuwen PL, Mulder J, Kramps HA, van Ruissen F, Schalkwijk J : Induction of SLPI (ALP/HUS-D) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111: 996-1002, 1998.
- Zang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM : Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 99: 894-900, 1997.
- Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD, Ding A : Conversion of proepithelin to epithelins: role of SLPI and elastase in host defence and wound repair. *Cell* 111: 867-878, 2002.

Abstract

## Morphological Differences of the Wound Healing in Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Knockout Mice

Je-O Jeong, Soon-Jeong Jeong, Joo-Cheol Park, Heung-Joong Kim<sup>1</sup>,  
Wahl SM<sup>2</sup>, Moon-Jin Jeong

*Department of Oral Histology and <sup>1</sup>Oral Anatomy, College of Dentistry, Chosun University*

*<sup>2</sup>National Institute of Dental Craniofacial Research (NIDCR), National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is a serine protease inhibitor with anti-microbial properties found in mucosal fluids. At the tissue level, the ability of this 12kDa protein is to counteract the excessive degradation of functional and structural proteins such as collagen and fibronectin. Impaired healing states are characterized by excessive proteolysis and often bacterial infection, leading to the hypothesis that SLPI may have a role in this process.

To investigate the role of SLPI in skin how it contributes to tissue repair, we have generated mice null for the gene encoding SLPI (*Sdpi*), which show impaired cutaneous wound healing with increased inflammation. For the purpose of this, we have performed wound experiment in skin tissue with morphometrical analyses, immunohistochemistry, and Rnase protection assay.

From these analyses, the results were that delayed healing in KO mice wounds compared to that of WT, prolonged inflammatory phase and increased TGF- $\beta$ 1 in KO wounds, and lower mechanical properties in KO wounds.

Taken together, SLPI may play a crucial role in cutaneous wounds healing especially in matrix reorganization that suggests the development as a clinical drug for wound healing.

**Key words :** Wound healing, Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), Epithelial tissue, Matrix formation, Inflammatory cells