大韓微生物學會誌 第35卷 第2號 2000
J. Korean Soc. Microbiol., Vol. 35, No. 2, 2000

결핵균 감염에 의한 THP-1 세포에서의 Prothymosin alpha 유전자 발현증가

순천향대학교 의과대학 미생물학교실, 생명공학연구소*

송호연 · 장광식 · 변희선 · 이신제 · 김진구* · 최용경* · 고광균

=Abstract=

Up-regulation of Prothymosin alpha in THP-1 Cells Infected with *Mycobacterium tuberculosis*

Ho Yeon Song, Kwang Sik Jang, Hee Sun Byoun, Shin Je Lee, Jin Koo Kim*, Yong Kyung Choe* and Kwang Kjune Ko

*Department of Microbiology, Soonchunhyang University College of Medicine, 366-1 Ssang Yong-dong, Chonan, Choong-Nam 330-090, *Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejon 305-600, Korea*

Mycobacterium tuberculosis is capable of growing and survival within macrophage. The purpose of this study was to identify the genes regulated by infection of mycobacteria in human monocytic THP-1 cells. We used the differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction (DD RT-PCR) and nothern blot analysis to confirm the differentially expressed genes from THP-1 cells infected with live *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and live *Mycobacterium bovis* BCG. Among many up or down-regulated clones, 27 clones were sequenced and compared with known genes on GenBank. Thirteen of over-expressed clones from THP-1 cells infected with live *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv were identical to human prothymosin alpha, eight were novel clones and six clones showed homology with Human ferritin H chain, *Esherichia coli* bgl, Mouse RNA-dependent EIF-2 alpha kinase, *E. coli* htrL, Hyaluronan receptor and T cell receptor. Our result suggests that *Mycobacterium tuberculosis* might regulate prothymosin alpha gene transcription in monocytic THP-1 cell.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Differential display RT-PCR, THP-1, Prothymosin alpha

서 론

결핵은 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)의 감염에 의해 유발되는 전염성 질환으로 결핵 환자의 호흡기 비말을 다른 사람이 흡입함으로써 감염된다.

Date of Birth: 10,000 B.C, Date of Death: ?, 이것은 세계보건기구 (WHO)의 세계결핵프로그램 보고서[10]의 처음에 나오는 표현으로 결핵이 인류 역

접수 : 2000년 4월 21일, 게재결정 : 2000년 7월 22일
Corresponding author: 송호연, 330-090, 충남 천안시 쌍용동 366-1 순천향의과대학 미생물학교실
Tel: 0417-570-2413, Fax: 0417-577-2415, E-mail: songmic@asan.sch.ac.kr
본 연구는 1998년도 순천향대학교 자체 연구비 지원에 의해 수행되었음.

사와 함께 했을 정도로 오랫동안 인간의 생명을 위협하여 왔으며 현재 전 세계 인구의 1/3 정도가 결핵균에 감염되어 있고 이 중 약 300만명이 매년 결핵으로 사망할 정도로 단일 질환으로는 가장 높은 사망률을 나타내고 있다[37]. 특히 미국, 서유럽, 일본 등 결핵 유병률이 낮은 나라에서 1985년 이후 AIDS로 인한 결핵 환자가 증가하고 있고[8,16,25,38] 또한 다제내성 결핵균에 의한 난치성 폐결핵 환자가 증가하고 있어 세계보건기구에서는 1993년에 세계 결핵비상 (Global Tuberculosis Emergency)을 선포하고[36] 전 세계적인 결핵퇴치사업을 진행하고 있다.

결핵균은 체내로 들어온 뒤 대부분 숙주의 면역 방어기전에 의하여 제거되지만 일부의 결핵균이 숙주의 대식세포나 단핵구내에서 증식하거나 잠복감염상태로 오랫동안 생존할 수 있고 숙주의 면역기전이 감소하면 재 활성화되 결핵이 발병된다. 그러나 결핵균이 어떻게 전형적인 식균세포인 대식세포내에서 기생할 수 있도록 진화되어졌는지는 분명하지 않으며 숙주와 결핵균과의 상호작용에 대한 기전, 즉 어떤 경로로 결핵균이 대식세포에 섭취 (uptake)되고[29,30] 어떻게 대식세포내에서 생존할 수 있는지에 대한 기전은[11,32] 몇몇 연구 결과에도 불구하고 여전히 결핵연구의 중요한 과제로 남아 있다. 따라서 저자는 결핵균에 대한 숙주세포의 면역반응에 관한 연구에 좋은 모델로 이용되는[14] 사람의 단핵구 세포주인 THP-1 세포에 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv와 백신 균주인 *Mycobacterium bovis* BCG를 감염시킨 뒤 감염에 따른 THP-1 세포의 유전자 발현의 차이를 Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction (DD RT-PCR)을 이용하여 관찰하고 northern blot으로 확인하여 결핵균 감염으로 나타나는 숙주세포의 반응을 확인하고자 하였다.

DD RT-PCR은 세포들 사이의 mRNA 발현 수준 차이를 쉽고 체계적으로 찾을 수 있는 방법으로 Oligo-dT primer와 인위적으로 만들어진 짧은 primer (random primer) 한 쌍을 사용하여 mRNA 발현의 차이 (up- or down-regulation)를 polyacrylamide gel에서 비교 분석하고 nothern blot 등으로 유전자 발현의 차이를 확인하는 방법으로[18,19] Ragno 등은[26] 1997년에 이 방법을 이용하여 결핵균 감염으로 인한 대식세포의 cytochrome c oxidase subunit VIIc 유전자가 하강조절 되어짐을 밝혔는데 이 유전자의 발현감소는 숙주의 세포사멸 (apoptosis)를 막아 주는 것으로 알려져 있다. 또한 Lim 등도 같은 방법을 이용하여 ferritin heavy chain의 상승발현 (up- regulation)을 보고한 바 있다[20].

본 연구에서 확인된 prothymosin alpha 단백질은 산성 (pH 3.55)의 세포내 단백질로 세포의 생존과 성장주기에 밀접한 관계가 있고[7,35] 논의의 여지는 있으나 세포성 면역반응에도 관여하는 것으로 알려져 있으며[31,33,34] 흥미로운 것은 prothymosin alpha의 발현증가가 동물세포에서는 세포의 분열증식을 유도하지만 진균에서는 증식을 현저히 억제하는 것으로 보고되고 있고[24] *Candida albicans*의 기회감염에 대한 저항성을 향상시키는 것으로 알려져 있다[12]. 따라서 prothymosin alpha 유전자의 발현이 결핵균 감염과 관련이 있다는 본 연구 결과와 더불어 prothymosin alpha 유전자가 결핵에서 어떤 역할을 하는지에 대한 연구가 앞으로의 흥미로운 연구분야로 사료된다.

재료 및 방법

1. 재 료

1. 1 결핵균주와 THP-1 세포

본 실험에 사용된 균주는 결핵연구소에서 분양받은 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)와 *Mycobacterium bovis* BCG (French 117392)를 7H9 액체배지 (7H9 broth, 0.05% Tween 80, 2% Bacto Middlebrook ADC enrichment)에서 37℃, 2~3주간 진탕배양하여 사용하였다.

THP-1 세포 (human acute monocytic leukemia cell line)는 한국세포주은행에서 분양 받았으며 10% 우혈청 (Gibco BRL)이 첨가된 RPMI-1640 (GIBCO BRL) 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

1. 2 *E. coli* 균주와 Plasmid

Escherichia coli TOP10F' (*rec*A *lac*Z△M15 *end*A *lacI*^{q} *mcr*A, *mcr*CB, *mrr*, *hsd*R P3)를 plasmid 형질전환에 사용하였고, cloning vector로 pCR2.1 (Invitrogen)를 사용하였다. *E. coli*는 Luria-Bertani (Difco) 배지에 배양하였으며 필요에 따라 ampicillin (50 μg/ml)를 첨가하여 사용하였다.

2. 방 법

2. 1 결핵균의 감염

우혈청이 10% 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양된 THP-1 세포 (1.5×10^7/ml)와 2~3주 동안 키

워진 *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG를 1:10의 비율로 접종하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 감염시켰다. 또한 60℃ 수조에서 1시간 열 처리하여 *M. tuberculosis* H37Rv를 감염시킨 THP-1 세포와 대조군으로는 결핵균을 감염시키지 않은 THP-1 세포를 사용하였다.

2. 2 THP-1 세포로부터의 전체 RNA 추출

2.1의 조건으로 감염시킨 THP-1 세포의 전체 RNA를 추출하기 위하여 세포를 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 수확한 후, RNAzol B (GenHunter) 2 ml를 처리하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포에 chloroform 150 μl를 넣고 5분 동안 반응시킨 후, 12,000 g에서 15분 동안 원심분리하였다. RNA가 포함된 상층액를 취하여 동일 양의 isopropanol을 가한뒤 원심분리하여 RNA pellet을 얻어 75% 에칠알콜 800 μl로 세척한 후, Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) water 50 μl로 녹였다. Message-Clean kit (GenHunter)를 사용하여 오염된 DNA를 제거하고 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA의 농도를 확인한 뒤 1% RNA agarose gel (1X MOPS, 2% formaldehyde)에서 RNA를 전기영동하여 RNA가 잘 분리되었는지를 확인하였다.

2. 3 Differential display에 의한 특이 유전자 발현 확인

2-3-1 DD RT-PCR

mRNA의 역전사 과정은 2 μM의 one-base anchored H-T_{11}M primer (M은 G, A, C) 2 μl, 5X 역전사 완충액 9.4 μl, 2.5 mM dNTP 1.6 μl, 0.1 μg/μl 농도의 전체 RNA (DNA-free) 2 μl, 그리고 DEPC 처리된 2차 증류수로 전체 양이 19 μl가 되게 한 후, 37℃에서 10분 처리하고 1 μl MMLV 역전사효소를 넣어 65℃ 5분, 37℃ 60분, 75℃ 5분 동안 수행한 후 -20℃에 보관하였다. 위 전사체의 Polymerase chain reaction (PCR)은 H-T_{11}M primer와 8종의 random primer를 사용하였으며 94℃에서 30초, 40℃에서 2분, 72℃에서 30초로 GeneAmp PCR system (Perkin-Elmer 2400)에서 40 cycles 돌려 DNA를 증폭시켰다. DD RT-PCR은 GenHunter사의 반응 kit를 사용하였다.

2-3-2 유전자 발현의 비교을 위한 polyacrylamide 전기영동 및 silver 염색

염기서열 분석용 6% denaturing polyacrylamide 젤에서 1X TBE 완충액 (Trizma base 108 g, boric acid 55 g, EDTA 3.7 g/L)을 사용하여 30분 동안 1,700 볼트로 prerun을 시키고, PCR 산출물 3.5 μl에 2 μl loading dye를 섞어 80℃에서 2분간 denaturation시킨 뒤 3.5 μl의 시료를 loading하여 1,700 볼트에서 3.5시간 동안 전기영동을 실시하였다.

Silver 염색은 전기영동이 끝난 후 bind silane (Sigma)을 표면 처리한 유리판에 부착된 젤을 수평진탕기를 이용하여 고정용액 (10% acetic acid) 2 L로 20분간 고정하여 urea와 TBE buffer를 제거했다. 증류수로 세 번씩 2분간 씻어주고, 염색용액 (1 g/L silver nitrate, 0.056% formaldehyde) 2 L로 젤을 30분 반응시켰다. 반응 후 증류수로 세척한 후, 미리 냉각시킨 (10℃) 현상액 (60 g/2L $NaCO_3$, 0.056% formaldehyde, 2 mg/L sodium thiosulfate 400 μl)을 사용하여 현상하였다. Band가 보이면 정지용액 (10% acetic acid)으로 30분간 처리하여 반응을 정지시킨 후, 증류수로 씻어 공기중에서 건조시켰다. Silver 염색은 Silver sequence™ DNA staining reagents (Promega)를 사용하였다.

2. 4 특이 유전자 cDNA의 cloning 및 염기서열 분석

2-4-1 cDNA의 재증폭 및 클로닝

유리판 위에서 건조된 gel를 light box 위에 올려놓고 APC 필름 (Promega)을 이용하여 사진을 찍은 뒤 유전자 발현이 증가되었거나 감소한 band를 면도칼로 젤에서 직접 오려내어 2차 증류수 100 μl에 10분 동안 정치한 뒤 100℃에서 15분 동안 denaturation시켜 2분 동안 원심분리하였다. 취해진 상층액에 1/10 부피 3 M sodium acetate와 1/20 부피 glycogen (10 μg/ml), 2.5 부피 100% 에칠알콜을 넣어 -70℃에서 30분간 방치한 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리로 DNA를 침전시킨 후, 85% 에칠알콜로 세척하여 10 μl 2차 증류수로 녹였다. 이를 2-3-1의 방법과 같이 동일한 primer를 사용하여 PCR을 통해 재 증폭시켰다.

재 증폭이 끝난 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 젤로부터 DNA를 추출하여 1/2 부피 TBE modifier와 4.5 부피의 sodium iodide를 넣어 50℃ 수조에서 10분간 녹였다. 녹여진 시료에 Glassmilk 5 μl를 넣어 부착시켜 New wash (NaCl, Tris, EDTA, EtOH)용액 500 μl로 세 번 세척하였다. 세척되어진 DNA는 2차 증류수 5 μl로 녹였다. DNA 연결 (ligation)을 위해 pCR2.1 vector (Invitrogen) 2 μl에 10X 연결 완충액 1 μl, T4 DNA ligase 1 μl로 14℃ 수조에서 16시간 반응시켰다. 밤새 반응시킨 ligate는 competent cell (*Escherichia coli* TOP10F') 50 μl에 0.5 M β-mer-

captoethanol 2 μl와 함께 넣어 얼음 속에서 30분간 방치한 후, 42℃ 수조에서 30초간 열자극을 주어 대장균을 형질전환시켰다. 증균배지 SOC 250 μl를 넣어 37℃ 수조에 225 rpm 속도로 1시간 진탕 배양 한 후, 100 mM IPTG와 X-gal (50 mg/ml)을 함유한 LB (50 μg/ml ampicillin) 고체배지에 접종하여 37℃ 배양기에서 18시간을 배양시켰다. 배양된 colony 중에서 양성 colony 5개를 선택하여 1 ml의 LB (AP) 액체배지에 다시 배양하였다. 배양된 형질전환체를 알칼리 세포 파괴 방법으로 plasmid 추출을 하여 제한효소 절단 과정을 거쳐 1% agarose gel에서 양성임을 확인했다. 이렇게 확인되어진 부분 cDNA clone은 염기서열 분석을 위하여 다시 증폭시킨 뒤 Wizard kit (Promega)를 이용하여 plasmid를 순수 분리하였다.

2-4-2 염기서열 분석

얻어진 부분적 cDNA clone은 T_7 primer를 이용해 dideoxy-chain termination 방법[28]을 적용한 자동 염기서열 분석기 (ABI 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer)를 통해 염기서열을 분석한 후 GenBank에 수록된 유전자들과 유사성을 비교하였다.

2. 5 Northern blot 분석

2-5-1. cDNA probe 제조

염기서열 분석 확인이 끝난 plasmid는 *Eco*RI으로 절단한 후 Geneclean kit를 이용하여 추출하고, cDNA 4 μl (0.1 μg/μl)를 100℃ 수조에서 10분 동안 denaturation 시켰다. High Prime labeling kit (GenHunter)를 사용하여 denatured cDNA 4 μl, High prime reaction mixture 2 μl, dA/G/T 1.5 μl, α-[^{32}P] dCTP 2.5 μl를 37℃ 수조에서 30분간 반응시켰다. Labelling이 끝난 시료 중 남은 nucleotide을 제거하기 위한 에칠알콜 침전반응을 시행하였다. 이렇게 준비된 probe는 hybridization에 사용되었다.

2-5-2 Northern blot

각각의 THP-1 세포로부터 추출된 전체 RNA 10 μg (RNA 4.5 μl, 10X MOPS buffer 2 μl, formamide 10 μl, formaldehyde 3.5 μl)을 1% formaldehyde 젤 (agarose 0.4 g, 5X MOPS buffer 7.7 μl, formaldehyde 7 ml, DEPC water 24.5 ml)상에서 전기영동한 후 DEPC water로 세척했다. 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)에 적신 젤을 capillary transfer 방법으로 16시간 동안 nylon membrane에 이동시켰다. Membrane은 2X SSC로 세척하고 80℃ 건조기에서 10분간 건조시킨 후, UV cross-linker (120 mJ/cm^2)에서 반응시켰다. 준비된 prehybridization 용액 (20X SSC 3 ml, 50X Denhart's soln.-1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% BSA- 1 ml, 10% SDS 0.5 ml, DEPC-DDW 5.5 ml)이 들어간 hybridization bag에 membrane을 넣고 denatured salmon sperm DNA 20 μg/ml와 조합한 다음, 65℃ 수조상에서 1시간 진탕시켰다. 2-5-1에서 준비한 probe를 사용해 65℃에서 12시간 hybridization 한 후, 2X SSC, 0.1% SDS 세척 완충액으로 실온에서 10분간 두 번 수세하였다. 방사성량을 측정한 후, 몇 번의 수세를 더 하여 주었다. 세척이 끝난 membrane에 wrap을 씌워 intensifing screen이 있는 cassette에 넣어 X-ray film에 24시간 감광시켰다.

결 과

1. Differential display에 의한 특이 유전자 발현 확인

살아 있는 결핵균 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)와 60℃에서 1시간 열 처리하여 사멸시킨 *M. tuberculosis* H37Rv 그리고 *Mycobacterium bovis* BCG (French 117392)를 단핵구 세포주인 THP-1 세포에 24시간 동안 감염시켰다. 감염된 THP-1 세포의 전체 RNA를 분리하여 agarose 젤에서 전기영동 후 28s, 18s, 5s rRNA band를 비교하여 전체 RNA가 RNase 오염없이 잘 분리되었음을 확인하였다.

실험방법 2. 3에서와 같이 각각 분리되어진 전체 RNA을 모체로 하여 mRNA의 polyA에 대응하는 H-T_{11}M primer (M: G, A, C)로 first strand cDNA를 만들고 다시 같은 H-T_{11}M primer와 8종의 random primer를 사용하여 PCR로 증폭하여 6% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동 한 후 silver 염색 방법으로 band를 관찰하여 mRNA의 발현이 증가하였거나 감소된 약 90개의 band를 분리하였고 이 중 27개 band의 염기서열을 확인하였다. 이 중 살아 있는 *M. tuberculosis* H37Rv를 감염시킨 THP-1 세포의 cDNA에서 매우 강하게 유도 발현되는 TC7-3을 찾았는데 비교군인 감염을 안 시킨 THP-1 세포와 열 처리하여 사멸시킨 *M. tuberculosis* H37Rv, 그리고 *M. bovis* BCG를 감염시킨 세포로 부터 나온 band보다 훨씬 증가된 양상을 나타내었다 (Fig. 1). 이는 mRNA의 양이 다른 비교 세포군과는 다르게 많이 발현되었음을 의미하는 것으로 살아 있는 *M. tuberculosis* H37Rv를 감염시킨 THP-1 세포에서 특정 유전자의 발현이 증가되

었음을 알 수 있었다.

2. 특이 발현 유전자의 염기서열 분석

Silver 염색한 젤로부터 분리한 TC7-3 DNA 단편을 $H_{11}C$ primer와 7번 random primer를 사용하여 2-3-1와 같은 방법으로 다시 PCR하여 differential display 산출물을 증폭하였다. 이를 1% agarose gel에 전기영동하여 약 350 bp 크기의 DNA band를 확인하였다. 증폭된 유전자는 agarose gel로부터 추출하여 pCR2.1 T vector에 클로닝하였다.

Figure 1. Differential display RT-PCR pattern of total RNA by silver stain. Four re-amplified cDNA from naive THP-1 (A), THP-1 cells infected with live *M. tuberculosis* H37Rv (B), heat-killed *M. tuberculosis* (C) and live *M. bovis* BCG (D) were compared by differential display using H-$T_{11}C$ primers in combination with arbitrary primer No. 7

클론된 TC7-3은 T_7 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 poly T primer ($T_{11}C$)와 vector 서열 사이에 있는 237 bp의 TC7-3 염기서열이 확인되었다 (Fig. 2). 확인된 TC7-3 염기서열을 이미 밝혀진 유전자들과 유사성을 알아보기 위해 GenBank에서 유사성을 조사한 결과 TC7-3의 237 bp와 100% 상동을 나타내는 human prothymosin alpha 유전자를 확인하였다. 같은 방법으로 유전자 발현이 증가되었거나 감소된 나머지 26개 유전자들의 염기서열을 분석하여 GeneBank에서 유사성을 확인한 결과 대조군과 비교하여 유전자 발현이 증가한 유전자들 중 13개가 human polythymosin alpha로 확인되었고 8개의 clone들이 GeneBank에서 유사성이 없는 새로운 유전자들로 나타났으며 나머지 6개의 clone들은 human ferritin H chain, *E. coli* bgl, EIF-2 alpha kinase, *E. coli* htrL, hyaluronan receptor, T cell receptor 등과 유사성을 나타내었다. 유전자 발현이 증가한 13개의 human polythymosin alpha 유전자 중 5곳에서 *M. bovis* BCG 감염에 따른 유전자 발현의 증가가 같

GTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGAGGAAAATGGGGAGCAGGAGGCTGACAATGAGG
TAGACGAAGAAGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAAGGT
GATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAGGAAGCTGAGTCAGCTACGGGC
AAGCGGGCAGCTGAAGATGATGAGGATGACGATGTCGATACCAAGAAGCAGAAG
ACCGACGAGGATGACTAGACAGCAAAAAAGGAAAAGTTAAACGAAAAAAAAAAA

Query :	1	gaggaaaatggggagcaggaggctgacaatgaggtagacgaagaagaggaagaaggtggg	60
Sbjct :	276	gaggaaaatggggagcaggaggctgacaatgaggtagacgaagaagaggaagaaggtggg	335
Query :	61	gaggaagaggaggaggaagaagaaggtgatggtgaggaagaggatggagatgaagatgag	120
Sbjct :	336	gaggaagaggaggaggaagaagaaggtgatggtgaggaagaggatggagatgaagatgag	395
Query :	121	gaagctgagtcagctacgggcaagcgggcagctgaagatgatgaggatgacgatgtcgat	180
Sbjct :	396	gaagctgagtcagctacgggcaagcgggcagctgaagatgatgaggatgacgatgtcgat	455
Query :	181	accaagaagcagaagaccgacgaggatgactagacagcaaaaaaggaaaagttaaac	237
Sbjct :	456	accaagaagcagaagaccgacgaggatgactagacagcaaaaaaggaaaagttaaac	512

Figure 2. Nucleotide sequences of TC7-3 (upper) are matched perfectly with the sequences of human prothymosin alpha gene through GenBank. The sequences underlined are primer and vector part. Query: TC7-3, Sbjct: human prothymosin alpha.

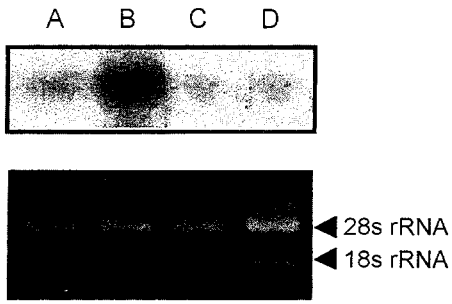

Figure 3. Northern blot analysis of TC7-3 clone (upper) and agarose gel analysis of total RNA (lower). Normal THP-1 cells (A), THP-1 cells infected with live *M. tuberculosis* (B), heat-killed *M. tuberculosis* (C) and live *M. bovis* BCG (D).

이 나타났다.

3. Northern blot 분석

Differential display RT-PCR 방법으로 선별된 TC7-3이 위양성이 아님을 밝히고 비교군과 유전자 발현양의 차이를 알아보기 위해 Northern blot hybridization을 실시하였다. 각각의 결핵균을 24시간 처리한 세포와 처리하지 않은 세포로부터 전체 RNA를 추출하여 1% formaldehyde denaturing agarose gel에서 분리하고 hybridization하였다. 이때 probe는 differential display PCR로 cloning한 clone, TC7-3을 사용하였다. Fig. 3에서와 같이 TC7-3 clone, 즉 prothymosin alpha 유전자는 정상 THP-1 세포에서의 발현은 미미하였으나 살아 있는 *M. tuberculosis*를 감염시킨 것에서는 강하게 발현되었다. 또한 열 처리로 사멸된 *M. tuberculosis*와 *M. bovis* BCG로 감염시킨 THP-1 세포에서는 정상 THP-1 세포의 발현양상과 비슷한 결과를 가졌다 (Fig. 3). 이 결과는 DD RT-PCR의 결과와 같은 양상으로 human prothymosin alpha mRNA의 발현이 살아있는 *M. tuberculosis* H37Rv 감염으로 상승 조절됨이 확인되었다.

고 찰

인체 전염성 질환으로 후진국 병으로만 알려져 있던 결핵이 AIDS와 난치성 결핵으로 인하여 선진국으로 확산됨에 따라 전 세계적으로 결핵비상이 선포되었고 더욱 중요한 연구분야로 대두되게 되었다[16,17].

*Mycobacterium tuberculosis*와 *Mycobacterium leprae* 같은 병원성 mycobacteria는 숙주세포 안에서 생존과 성장을 할 수 있는데 특히 *M. tuberculosis*는 폐포의 대식세포 안에서 수년동안 휴면상태를 유지하다가 숙주의 면역기능이 감소되면 재 활성화되어 발병하게 된다. 결핵균이 숙주의 대식세포내에서 생존할 수 있는 방법으로는 결핵균이 대식세포의 phagosome 안에서 vesicule의 산성화에 필요한 vesicular proton pump를 제외 시키거나[32] 결핵균의 표면에 있는 sulfitides가 phagosome-lysosome의 결합을 막거나[11] 결핵균의 phospholipase가 vesicle의 막을 녹여 결핵균이 세포질로 피할 수 있다는 보고[15] 등이 있으나 결핵균의 잠복감염과 재 활성화의 기전은 아직도 결핵연구의 커다란 과제로 남아 있다. 결핵균의 이런 잠복감염의 특성은 오랜기간의 약물치료를 필요로 하고 치료의 실패나 결핵균의 약제내성의 획득과도 깊은 관계가 있기 때문에 잠복감염상태에 있는 균을 제거할 수 있는 약물이나 백신의 개발 없이는 결핵은 앞으로도 지속적으로 인간의 생명을 위협하게 될 것이다. 이런 결핵균의 잠복감염의 유도나 재활성화 기전에는 어떤 숙주요인이 반드시 관여할 것으로 생각되며 이에 따른 결핵균의 반응, 특히 잠복감염을 유도하는 특이 유전자의 발현이 동반될 것으로 생각되며 이 유전자가 유도하는 물질이 결국 신약개발이나 백신개발에 중요하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

결핵균에 대한 숙주의 면역반응은 주로 대식세포, 단핵구 및 T-림프구 등이 생산하는 cytokine이 주된 역할을 하는데 결핵균의 lipoarabinomannan (LAM)이나 PPD (purified protein derivatives)는 대식세포나 단핵구에서 TNF-α, IL-1-β, PGE_2, TGF-β 등의 생산을 유도하고 CD4+ 림파구의 Th1은 IL-2, IFN-γ를, Th2는 IL-4, IL-5, IL-10[22]를 생산하는데 TNF-α, GM-CSF, IFN-γ, IL-2, IL-4 등은 결핵균의 증식을 억제하는데 비해[3,6,23,27] IL-1β, PGE_2, TGF-β, IL-6, IL-10 등은 대식세포를 비활성화 시켰고 결핵균의 생존을 증가시켜 주는 것으로 알려져 있다[1,2,4,5].

이와 같이 결핵균과 대식세포와의 상호작용이 결핵의 병인론에 중요한 요소로 사료되어 저자는 결핵균 감염시 나타나는 숙주의 반응을 조사하고자 결핵균을 감염시킨 THP-1 세포에서 전체 RNA를 추출하고, cDNA를 합성한 후 differential display RT-PCR 방법으로 발현되는 유전자들을 비

교 분석하였다. 그 결과 살아 있는 *M. tuberculosis* H37Rv를 감염시킨 THP-1에서는 mRNA 발현이 상승되었고 정상 THP-1 세포나 열 처리된 *M. tuberculosis*와 *M. bovis* BCG를 감염시킨 THP-1 세포에서는 발현이 미약한 유전자 TC7-3을 발견하였다. TC7-3은 cloning하여 237 bp의 염기서열을 확인하였고 유전자은행을 통해 유전자의 유사성을 알아본 결과 1984년 Haritos 등이[13] 쥐 흉선에서 처음 분리한 prothymosin alpha 유전자임을 확인하였다. 그외 유전자 발현이 증가된 12개의 clone들도 유전자 유사성검사에서 human prothymosin alpha와 일치하였다.

Human prothymosin alpha 유전자는 109~111개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 발현시키며 아미노기 말단에 thymosin alpha 1를 포함하는 산성 (pH 3.55)의 단백질로 세포의 증식과 생존에 중요하게 관여하고 비활동의 세포가 증식할 때 mRNA와 단백질의 양이 10배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다[7,13]. 또한 암세포에서 c-myc, v-ras 등 oncogene의 활성에 관여하며 직장암과 유방암에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는데[9,21] THP-1 세포도 암세포이기 때문에 결핵균을 감염시키지 않은 THP-1 세포에서도 대부분 약간의 발현을 관찰할 수 있었다. prothymosin alpha의 세포성 면역반응과의 관련성은 논문에 따라 약간의 차이는 있으나 T-림파구에서 IFNγ, IL-2, IL-3, MIG 등의 생산을 촉진시키는 것으로 보고되고 있고[31,33,34] 쥐에서 Candida albicans의 기회감염에 대한 저항성을 향상시킬 뿐 아니라[12] 흥미로운 것은 prothymosin alpha의 발현증가가 동물세포에서는 세포의 분열 증식을 유도하지만 진균인 *Saccharomyces cerevisiae*를 prothymosin alpha cDNA를 운반하는 yeast shuttle vector로 형질전환을 시켰을 때 *Saccharomyces cerevisiae*의 분열 증식이 현저히 억제되는 것으로 알려져 있는데 이는 prothymosin alpha가 갖고 있는 강산성의 특성에 의한 것이 아니고 c-terminal에 있는 9개의 아미노산이 주된 역할을 하는 것으로 보고하고 있다[24].

본 실험의 결과 단핵구 세포주인 THP-1 세포에서 prothymosin alpha의 발현이 결핵균의 감염에 의해 현저히 활성화되었음을 확인하였는데 이는 prothymosin alpha가 결핵균에 대한 대식세포나 단핵구의 면역능 유도와 관계가 깊은 것으로 생각되며 특히 prothymosin alpha의 발현증가가 진균의 증식을 현저히 억제하는 것으로 보아 결핵균 감염에 의한 prothymosin alpha의 발현증가가 대식세포내의 결핵균 증식에 어떤 영향을 미치는지에 대한 추가적인 연구를 진행하고 있으며 연구 결과에 따라서는 결핵균의 대식세포내 잠복감염의 기전에 대한 단서를 제공할 수도 있으리라 사료된다.

결 론

결핵균과 인체의 대식세포 사이의 상호작용을 연구함으로써 대식세포의 방어기전이나 잠복감염에 관여하는 유전자를 규명하고자 본 연구를 시도하였다.

결핵균의 감염에 의해 THP-1 세포의 유전자 발현이 증가되었거나 감소된 27개 유전자들의 염기서열을 분석하여 GenBank에서 유사성을 확인한 결과 대조군과 비교하여 유전자 발현이 증가한 유전자들 중 13개가 human polythymosin alpha로 확인되었고 8개의 clone들이 유사성이 없는 새로운 유전자들로 나타났으며 나머지 6개의 clone들은 human ferritin H chain, *Escherichia coli* bgl, Mouse RNA-dependent EIF-2 alpha kinase, *E. coli* htrL, hyaluronan receptor, T cell receptor 등과 유사성을 나타내었다.

본 연구의 결과 human prothymosin alpha 유전자는 결핵균에 대한 숙주의 면역반응과 중요한 관련이 있을 것으로 생각되고 특히 결핵균 감염에 따른 prothymosin alpha의 발현증가가 대식세포내의 결핵균 증식에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 앞으로 진행해야할 흥미로운 분야로 사료된다.

참 고 문 헌

1) Bermudez LE: Production of transforming growth factor-beta by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN-gamma. *J Immunol* **150:** 1838-1845, 1993.

2) Bermudez LE, Champsi J: Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect Immun* **61:** 3093-3097, 1993.

3) Bermudez LE, Young LS: Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol* **140:** 3006-3013, 1988.

4) Denis M, Gregg EO: Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* **71:** 139-141, 1990.

5) Denis M, Gregg EO: Recombinant interleukin-6 increases the intracellular and extracellular growth of *Mycobacterium avium. Can J Microbiol* **37:** 479-483, 1991.

6) Denis M, Gregg EO, Ghandirian E: Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol* **12:** 721-727, 1990.

7) Dosil M, Freire M, Gomez-Marquez J: Tissue-specific and differential expression of prothymosin alpha gene during rat development. *FEBS Lett* **269:** 373-376, 1990.

8) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282:** 677-686, 1999.

9) Gaubatz S, Meichle A, Eilers M: An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol Cell Biol* **14:** 3853-3862, 1994.

10) Global tuberculosis programme: The TB treatment observer, WHO Newsletter, 1997.

11) Goren MB, D'Arcy hart P, Young MR, Armstrong JA: Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acid Sci USA* **73:** 2510-2514, 1976.

12) Haritos AA, Salvin SB, Blacher R, Stein S, Horecker BL: Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **82:** 1050-1053, 1985.

13) Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL: Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **81:** 1391-1393, 1984.

14) Jagannath C, Sepulveda E, Srinivasan I, Emanuele RM, Hunter RL: Abstracts of the 97th General Meeting of the American society for Microbiology P. 560, U-97, 1997.

15) Johansen KA, Gill RE, Vasil ML: Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect Immun* **64:** 3259-3266, 1996.

16) Kelley D: TB by the numbers. The state of tuberculosis in the United States. *J Emerg Med Serv JEMS* **24:** S4-S5, 1999.

17) Lee SK, Tan KK, Chew SK, Snodgrass I: Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Acad Med Singapore* **24:** 442-426, 1995.

18) Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257:** 967-971, 1992.

19) Liang P, Pardee AB: Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* **10:** 261-267, 1998.

20) Lim JS, Lee SH, Lee E, Kang Y, Kim JW, Kim JK, Kim HH, Lee C, Kim SJ, Bai GH, Lee HG, Kim KD, Chung TW, Choe YK: Differential expression of ferritin heavy chain in THP-1 cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochem Mol Biol Int* **43:** 981-988, 1997.

21) Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB: Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* **8:** 2821-2826, 1993.

22) Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7:** 145-173, 1989.

23) Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF: Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* **134:** 1619-1622, 1985.

24) Pavlov N, Evstafieva A, Rubtsov Y, Vartapetian A: Human prothymosin alpha inhibits division of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, while its mutant lacking nuclear localization signal

does not. *FEBS Letters* **366:** 43-45, 1995.

25) Pitchenik AE, Fertel D, Bloch AB: Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Chest Med* **9:** 425-441, 1988.

26) Ragno S, Estrada I, Butler R, Colston MJ: Regulation of macrophage gene expression following invasion by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Lett* **57:** 143-146, 1997.

27) Rose RM, Fuglestad JM, Remington L: Growth inhibition of *Mycobacterium avium* complex in human alveolar macrophages by the combination of recombinant macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4:** 248-254, 1991.

28) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 5463-5467, 1977.

29) Schlesinger LS: Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* **150:** 2920-2930, 1993.

30) Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA: Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* **144:** 2771-2780, 1990.

31) Serrate SA, Schulof RS, Leondaridis L, Goldstein AL, Sztein MB: Modulation of human natural killer cell cytotoxic activity, lymphokine production, and interleukin 2 receptor expression by thymic hormones. *J Immunol* **139:** 2338-2343, 1987.

32) Sturgil-Koszacky S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddiz PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG: Lack of acidicfication in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263:** 678-681, 1994.

33) Sztein MB, Serrate SA: Characterization of the immunoregulatory properties of thymosin alpha 1 on interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in normal human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* **11:** 789-800, 1989.

34) Thurman GB, Seals C, Low TL, Goldstein AL: Restorative effects of thymosin polypeptides on purified protein derivative-dependent migration inhibition factor production by the peripheral blood lymphocytes of adult thymectomized guinea pigs. *J Biol Response Mod* **3:** 160-173, 1984.

35) Vareli K, Tsolas O, Frangou-Lazarides M: Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *Eur J Biochem* **238:** 799-806, 1996.

36) WHO declares tuberculosis a global emergency. *Soz Praventivmed* **38:** 251-252, 1993.

37) WHO report on the tuberculosis epidemic. *http://www.who.ch/* 1996.

38) Zumla A, Squire SB, Chintu C, Grange JM: The tuberculosis pandemic: implications for health in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93:** 113-117, 1999.