

Orientia tsutsugamushi 감염에 의한 사람 제대정맥 내피세포에서 부착분자 발현의 변화

서울대학교 의과대학 미생물학교실

이은봉 · 한승훈 · 김상욱 · 인경수 · 성승용 · 김익상 · 최명식

=Abstract=

Increased Expression of Adhesion Molecules on Human Umbilical Vein Endothelial Cells by *Orientia tsutsugamushi* Infection

Eun Bong Lee, Seung Hoon Han, Sang Wook Kim, Kyung Soo Ihn,
Seung Yong Seong, Ik Sang Kim and Myung Sik Choi

Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine

Scrub typhus is caused by *Orientia tsutsugamushi* characterized by fever, headache, lymphadenopathy and eschar formation. Infiltration of inflammatory cells around blood vessels and within the affected organs is known to be pathologic hallmark of the scrub typhus. Recently, expression of adhesion molecules on vascular endothelial cells was implicated as an important pathogenic mechanism in rickettsial disease. This study was performed to examine the expression of adhesion molecules and to investigate its role in the pathogenesis of *O. tsutsugamushi* infection. The expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was measured by flow cytometry and indirect immunofluorescence. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 was significantly increased 4 hours after the infection and persisted at least for 24 hours. Expression of those molecules was not induced by killed *O. tsutsugamushi*. Adhesion of polymorphonuclear cells and mononuclear cells to HUVEC was increased after the infection with *O. tsutsugamushi*. In conclusion, adhesion molecules are expressed on HUVEC during the infection of live *O. tsutsugamushi* and those molecules can contribute to the infiltration of inflammatory cells during the infection.

Key Words: *O. tsutsugamushi*, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1

서 론

Scrub typhus는 *Orientia tsutsugamushi*에 의해서 발생하는 열성 질환으로서 동북 동남아시아에 걸쳐서 발생하며 발열, 두통, 림프절 종대 및 특징

적인 피부발진을 일으킨다³⁾. *O. tsutsugamushi*는 유핵세포내에서만 생존할 수 있는 그람음성 간구균으로 원래는 리케치아속에 속해 있었으나 항원성, 계놈상의 차이 및 전형적인 지질다당체가 없는 세포구조상의 특성으로 인해 현재는 오리엔티아속으로 분류되고 있다²⁷⁾. Scrub typhus 환자에서의

접수 : 2000년 7월 4일, 게재결정 : 2000년 8월 21일

Correspondence to: Choi, Myung Sik M.D., Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-Gu, Seoul, Korea Tel: 822-740-8305, Fax: 822-743-0881, E-mail: myung@plaza.snu.ac.kr

본연구는 서울대학교병원 1997년도 임상연구비 (01-1997-059-0)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

부검 소견은 혈관 내피세포의 증식, 혈관주위의 염증세포 침윤 및 피부, 폐, 신장, 간 등 여러 장기 조직내의 염증을 특징으로 한다^{4,16}.

혈관 내피세포는 interleukin-1 (IL-1)이나 tumor necrosis factor (TNF)와 같은 염증성 자극에 노출 시 E-selectin (endothelial selectin), P-selectin (platelet selectin), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)과 같은 부착분자를 통하여 염증세포를 부착시킴으로써 염증반응에서 중추적 역할을 수행한다^{6,11}.

병원균에 의한 혈관 내피세포의 감염시도 부착분자 발현은 초기 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. *Rickettsia ricketti*는 혈관 내피세포에서 E-selectin을²⁰, *R. conorii*는 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1의 발현을 증가시켜⁷ 혈관내 염증세포 부착과 혈관 외 유출을 일으킨다²⁸. *O. tsutsugamushi*의 경우 사람 채대정맥 내피세포 (HUVEC)를 잘 감염시킬 수 있고², HUVEC 감염시 tissue factor, plasminogen activator inhibitor의 발현을 증가시킨다^{1,15}. Scrub typhus 환자의 혈관 내피세포내에서 *O. tsutsugamushi*가 발견되며, 혈관주위에서 염증세포의 침윤이 현저하고, 일부 환자에서는 혈관염의 소견도 보인다. 생쥐의 경우 *O. tsutsugamushi*로 감염시키면 감염 초기에는 다형핵 백혈구가, 후기에는 단핵구의 침윤이 현저한 것으로 알려졌다¹³. 이러한 소견들은 scrub typhus에서도 *O. tsutsugamushi*의 혈관 내피세포내의 감염과 이에 따른 부착분자의 발현이 혈관내 염증세포의 부착과 혈관 외 유출을 일으킴으로써 초기 염증반응에 중요한 역할을 할 것을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 *O. tsutsugamushi*에 의한 감염시 혈관 내피세포에서의 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1의 발현 양상과 그 의미 및 기전을 알아보고자 사람 채대정맥 내피세포 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)를 *O. tsutsugamushi*로 감염시키고 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 부착분자의 발현 양상을 확인하고, 감염으로 인해 다형핵 백혈구 및 단핵구의 HUVEC 부착능이 증가하는지를 평가하였다.

재료 및 방법

1. HUVEC 배양

채대정맥을 Hank's balanced salt solution (HBSS)

으로 2차례 세척하고 0.02%의 collagenase (Sigma, U.S.A.)로 처리하여 HUVEC을 분리한 후, 20% 우태아 혈청, 100 µg/ml endothelial cell growth supplement (Sigma, U.S.A.)와 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 M199배지 (Sigma, U.S.A.)로 37°C, 5% CO₂에서 3~4회 계대 배양한 후 사용하였다¹². Rabbit anti-factor VIII related antigen antibody (DAKO, USA) 및 FITC-mouse anti-rabbit antibody (DAKO, U.S.A.)를 이용한 면역 형광법으로 HUVEC임을 확인하였다.

2. *O. tsutsugamushi*의 배양 및 정량

먼저 L929세포 (ATCC CCL-1, U.S.A.)를 10% 우태아 혈청과 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM; Gibco, U.S.A.)로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배지를 걸러낸 후 *O. tsutsugamushi* (Boryung)를 2시간 처리한 후 daunomycin이 첨가되어 있는 배지를 넣고 6일간 배양한 후 감염된 세포를 수확하였다. 감염된 세포를 세포분쇄기로 분쇄한 후 원심분리하여 *O. tsutsugamushi*를 얻어 질소탱크에 보관하였다. *O. tsutsugamushi*를 감염시키지 않은 L-929세포를 상기와 동일한 방법으로 처리하여 얻은 세포 분쇄물을 대조군으로 사용하였다. *O. tsutsugamushi*의 정량을 위해서는 96-well 세포배양용기에 L929세포를 충분히 자라도록 한 후, 연속 희석시킨 *O. tsutsugamushi*로 감염시키고 *O. tsutsugamushi*에 대한 단세포균 항체인 KI-37²⁰ 및 FITC-conjugated anti-mouse antibody (Serotec, U.S.A.)로 반응시키고 well당 전체 세포수와 감염된 세포수를 측정하였다. 감염된 세포가 전체 세포의 10%가 되는 희석농도를 기준으로 well당 감염된 균수를 산출하고 희석배수를 곱하여 *O. tsutsugamushi*를 정량하였다. 정량결과 1 ml 당 3x10⁸개의 *O. tsutsugamushi*가 존재하였다³⁰.

3. 유세포 분석법

6-well 세포배양용기에 HUVEC이 꼭 차도록 키운 후 *O. tsutsugamushi*로 감염시켰다. 정해진 시간 후에 0.05% trypsin / 0.53 mM EDTA로 3분간 처리하여 (Sigma, U.S.A.) 배양용기에서 HUVEC을 유리시킨 후 PBS 및 1% albumin과 0.1% sodium azide가 포함되어 있는 PBS (PBS-AA)로 각 1회 세척한 후 10 µg/ml의 anti-E-selectin, anti-ICAM-1 또

는 anti-VCAM-1 (Pharmigen, U.S.A.)으로 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS-AA로 2회 세척하였다. 1:200으로 희석된 FITC-conjugated anti-mouse IgG를 첨가하고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 0.5% paraformaldehyde로 4℃에서 고정한 후 유세포 분석 (FACStar plus, Beckton-Dickinson, U.S.A.)을 실시하였다. 유세포 분석 시는 살아 있는 혈관 내피세포 5,000개를 분석하여 양성인 세포 수를 측정하였다. 모든 실험은 각각 3회씩 실시하여 평균값을 취하였다. 감염 용량에 따른 부착분자 발현 양상을 보기 위해서는 6-well 용기에 HUVEC이 꼭 차라도록 배양한 후 well당 *O. tsutsugamushi*를 multiplicity of infection (MOI) 15, 150, 300, 3,000으로 각각 감염시켰고, 시간에 따른 부착분자 발현의 변화를 보기 위해서는 각 well당 *O. tsutsugamushi*를 MOI 3,000으로 감염시킨 후 4시간, 12시간 24시간에 부착분자의 발현 양상을 조사하였다. 살균된 *O. tsutsugamushi*에 의한 감염시 부착분자 발현의 변화를 보기 위해서는 0.1% paraformaldehyde로 24시간 동안 살균시킨 *O. tsutsugamushi*를 MOI 3,000으로 HUVEC에 감염시키고 시간에 따른 부착분자의 발현 양상을 보았다.

4. 염증세포 부착능 측정

건강인의 신선 전혈을 Ficoll-Hypaque (Pharmacia, U.S.A.)에 층층하여 단핵구층과 적혈구가 포함된 다형핵 백혈구층을 얻은 후 증류수로 적혈구를 제거하여 순수한 다형핵 백혈구를 얻었다. 바닥이 평평한 96-well 세포배양용기에 HUVEC이 단층으로 충분히 자라도록 키운 후 각각 8개의 well에 M199배지를 첨가하거나 *O. tsutsugamushi*를 MOI 1,500으로 감염시켰다. 감염 4시간 및 24시간 후, 분리해 둔 단핵구 또는 다형핵 백혈구를 각 well당 1×10^5 개 씩 넣어주고 37℃에서 30분간 반응시켰다. PBS로 3차례 세척하였다. 단핵구의 경우는 역상현미경으로 400배에서 무작위로 각 군마다 8영역을 선정한 후 부착되어 있는 세포를 직접 세었다. 다형핵 백혈구의 경우는 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (pH 6.0, Sigma, U.S.A.) 및 0.2 µg/ml의 dianisidine dihydrochloride (pH 6.0, Sigma, U.S.A.)를 상온에서 30분, 5분간 반응시킨 후 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 판독기로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 표준 곡선과 비교하여 다형핵 백혈구수를 산출하였다.

5. 통계적 분석

연속변수간의 비교에는 Student t-test 또는 분산분석을, 연속변수간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 적용하였고, p값이 0.05보다 작은 경우 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. *O. tsutsugamushi* 감염 후 부착분자 발현의 증가

1) 감염 균수에 따른 부착분자 발현

E-selectin의 경우는 *O. tsutsugamushi*로 감염시키지 않은 경우 $4.1 \pm 0.8\%$ 의 세포가 E-selectin을 발현하였으나 *O. tsutsugamushi*를 MOI 15, 150, 1,500, 3,000으로 감염시킨 경우는 $4.3 \pm 0.7\%$, $4.5 \pm 0.8\%$, $8.2 \pm 0.4\%$, $11 \pm 0.7\%$ 의 세포가 E-selectin을 발현하여 감염 용량의 증가와 E-selectin의 발현정도는 양의 상관관계를 보였다 ($r=0.97$, $p<0.05$). ICAM-1의 경우는 *O. tsutsugamushi*로 감염시키지 않은 경우 $46.9 \pm 0.4\%$ 의 세포가 ICAM-1을 발현하였으나 *O. tsutsugamushi*를 MOI 15, 150, 1,500, 3,000으로 감염시킨 경우는 $53 \pm 3\%$, $59 \pm 5\%$, $67 \pm 6\%$, $78 \pm 9\%$ 의 세포가 ICAM-1을 발현하여 감염 용량의 증가와 ICAM-1의 발현정도는 양의 상관관계를 보였다 ($r=0.87$, $p<0.05$). VCAM-1의 경우도 *O. tsutsugamushi*로 감염시키지 않은 경우 $9.0 \pm 2.8\%$ 의 세포가 VCAM-1을 발현하였으나 *O. tsutsugamushi*를 MOI 15, 150, 1,500, 3,000으로 감염시킨 경우 $15 \pm 5\%$, $25 \pm 9\%$, $32 \pm 8\%$, $47 \pm 19\%$ 의 세포가 VCAM-1을 발현하여 감염 용량의 증가와 VCAM-1 발현정도 사이에는 양의 상관관계를 보였다 ($r=0.80$, $p<0.05$) (Fig. 1).

2) 시간에 따른 부착분자 발현 양상의 변화

*O. tsutsugamushi*를 MOI 3,000으로 HUVEC에 감염시킨 후 4시간, 12시간, 24시간에 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 분자의 발현 양상을 관찰한 결과 부착분자 발현의 증가가 관찰되었다. E-selectin은 감염 전 4.0%의 세포에서만 양성이었으나 감염 4시간 후에는 $52 \pm 4.4\%$ 의 세포에서 감염 12시간 및 24시간 후에는 각각 $51.0 \pm 5.4\%$, $25.7 \pm 4.0\%$ 의 세포에서 양성을 보였다. E-selectin은 감염 전과 비교하여 감염 후 4시간, 12시간 및 24시간 후에 통계적으로 유의한 발현 증가를 보였으나 (감염 전과 비교시 각각 $p<0.05$, t-test), 감염시간이 지

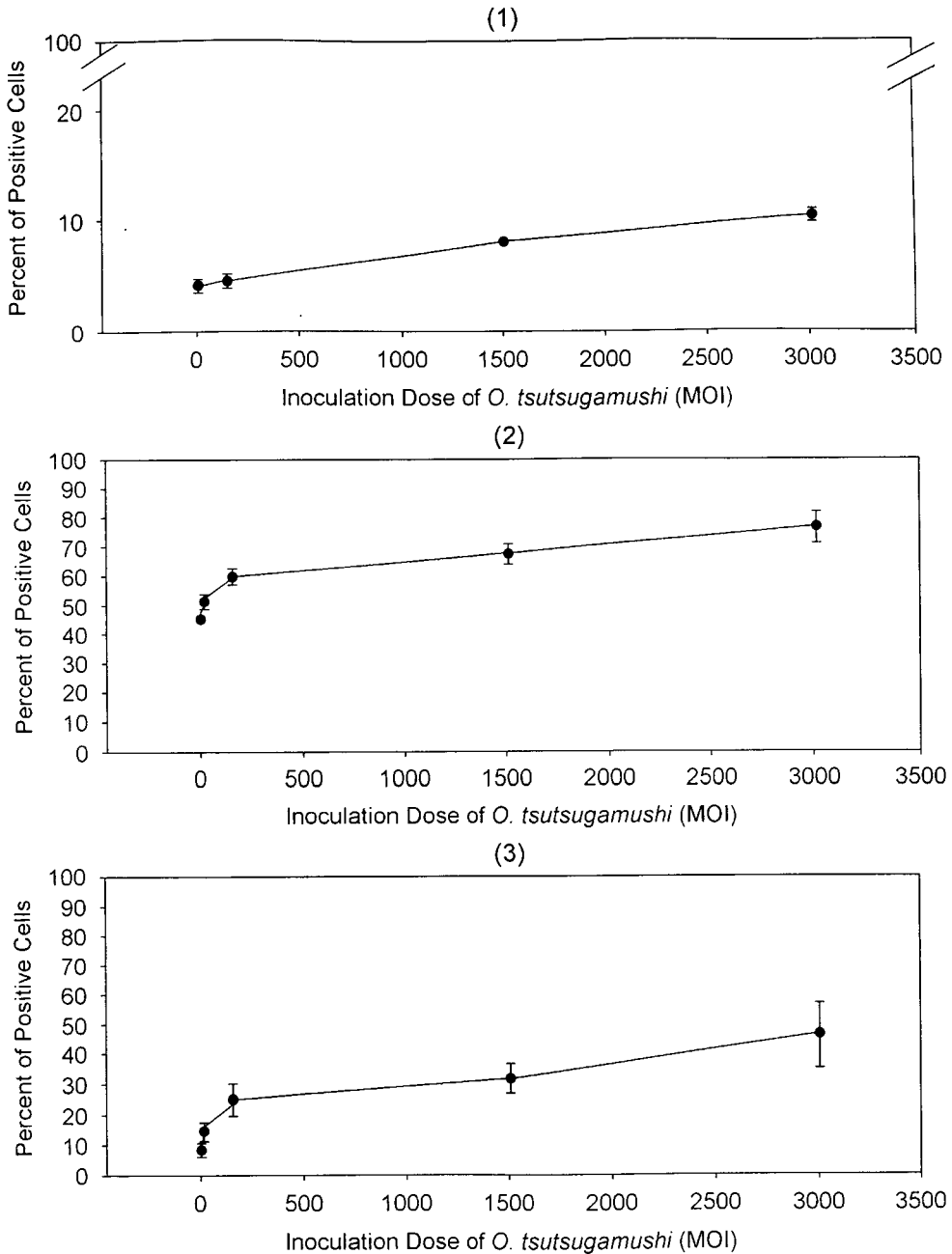


Figure 1. Expression of adhesion molecules on HUVEC showed strong correlation with the inoculation dose of *O. tsutsugamushi* (E-selectin, $r=0.97$, $p<0.05$; ICAM-1, $r=0.87$, $p<0.05$; VCAM-1, $r=0.80$, $p<0.05$). HUVEC was incubated with various doses (MOI, 15, 150, 1,500, 3,000) of *O. tsutsugamushi* for 4 hours (E-selectin) or 24 hours (ICAM-1 and VCAM-1). E-selectin (1), ICAM-1 (2) and VCAM-1 (3) were measured with flow cytometry after incubation with anti-adhesion molecule antibodies and FITC-conjugated anti-mouse IgG antibodies.

남에 따라 발현이 감소하는 양상을 보였다. ICAM-1은 감염 전 32.0%의 세포에서 양성이었으나 감

염 4시간 후에는 $77.0 \pm 4.0\%$ 의 세포에서 양성이었고, 감염 12시간 및 24시간 후에도 각각 $81.0 \pm$

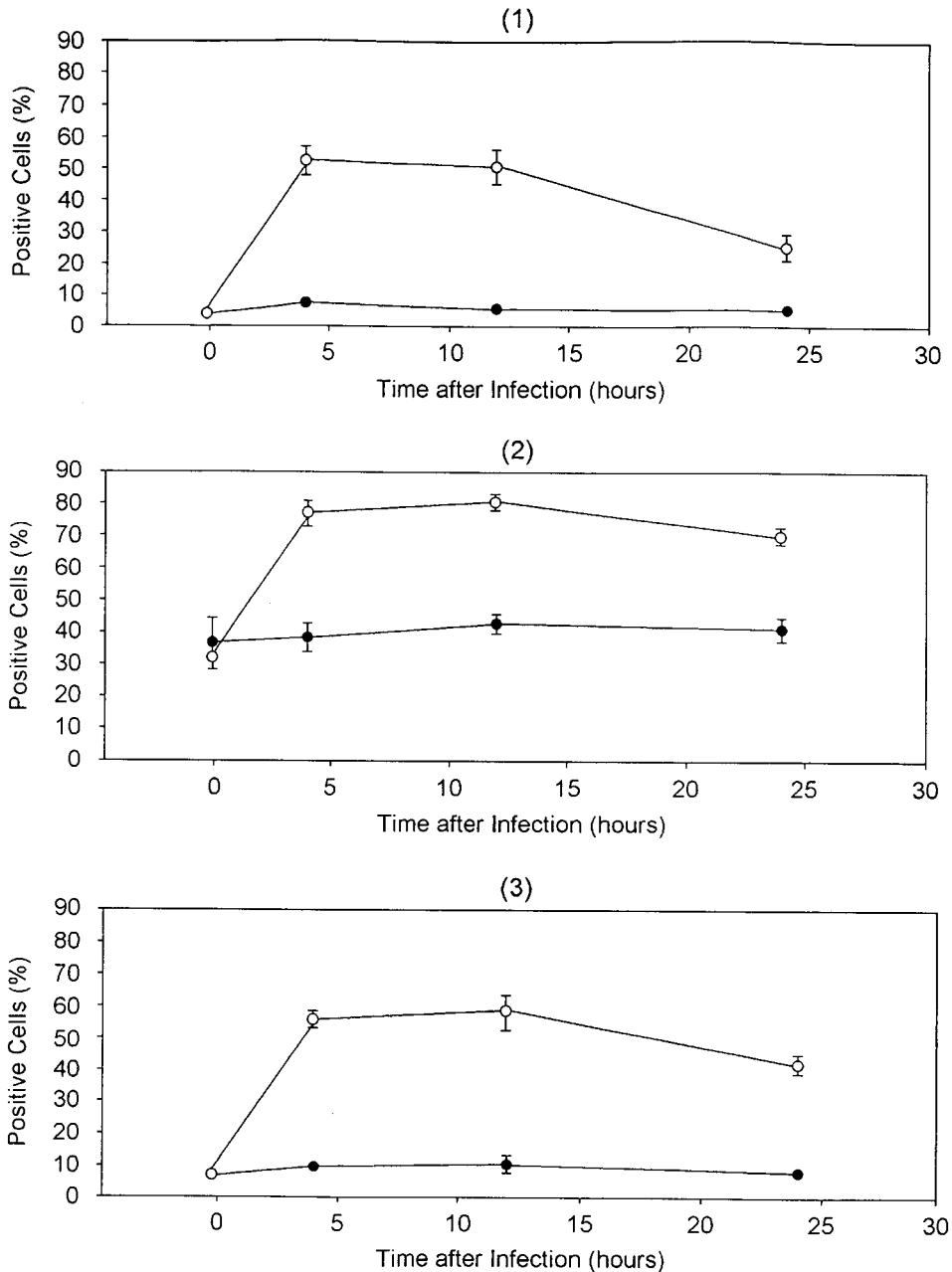


Figure 2. Time course of expression of adhesion molecules on HUVEC after infection with *O. tsutsugamushi* (○) or L929 cell lysate (●). Expression of E-selectin (1), ICAM-1 (2) and VCAM-1 (3) on the surface of HUVEC by infection with *O. tsutsugamushi* significantly increased compared with L929 cell lysate treatment as a control ($p < 0.05$ by t-test at 4, 12 and 24 hour points). Positive cells were measured with flow cytometry after incubation with mouse anti-adhesion molecule antibodies and FITC-conjugated anti-mouse IgG antibodies.

2.4%, $71.0 \pm 2.6\%$ 의 세포에서 양성반응을 보였다. ICAM-1은 감염 후 4시간, 12시간, 24시간째에 모두 감염 전에 비해 통계적으로 유의한 발현 증가

를 보였다 (감염 전과 비교시 각각 $p < 0.05$, t-test). VCAM-1은 감염 전 6.6%의 세포에서 양성이었으나 감염 4시간 후에는 $56.0 \pm 2.6\%$ 의 세포에서 양

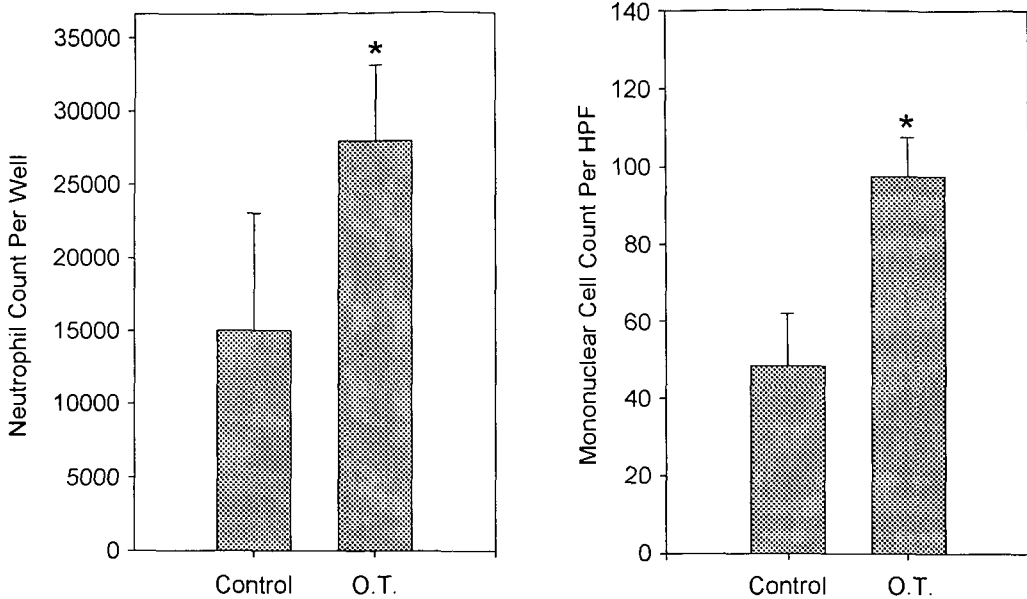


Figure 3. Increased polymorphonuclear and mononuclear cell adhesion to human umbilical vein endothelial cells infected with *O. tsutsugamushi*. The number of polymorphonuclear or mononuclear cells bound to HUVEC were measured after 4 or 24 hours of infection with *O. tsutsugamushi* (O.T.) or media alone (control) with dianisidine dihydrochloride method (polymorphonuclear cells) or direct counting (mononuclear cells) * $p < 0.05$ by t test.

성을 보였고 감염 12시간 및 24시간 후에는 각각 $58.0 \pm 5.3\%$, $42.4 \pm 3.0\%$ 의 세포에서 양성을 보였다. VCAM-1도 E-selectin 및 ICAM-1과 마찬가지로 감염 후 4시간, 12시간, 24시간째에 감염 전과 비교하여 통계적으로 유의한 발현 증가를 보였다 (감염 전과 비교시 각각 $p < 0.05$, t-test) 한편 대조군으로 L929세포의 분쇄물을 HUVEC에 감염시킨 후 4시간, 12시간, 24시간 후에 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 분자의 발현 양상을 유세포 분석방법으로 정량적으로 관찰시 시간에 따른 부착분자의 발현 증가는 없었다 (Fig. 2).

2. 염증세포 부착능 평가

1) 다형핵 백혈구 부착능 평가

*O. tsutsugamushi*를 96-well 배양용기의 한 well 당 MOI 1,500으로 감염시킨 후 4시간째에 다형핵 백혈구, 24시간째에 말초혈액 단핵구의 부착정도를 평가하였다. 다형핵 백혈구의 경우는 *O. tsutsugamushi*를 감염시킨 후 96-well 하나 당 평균 $28,000 \pm 5,100$ 개가 HUVEC에 부착한 반면 *O. tsutsugamushi*를 처리하지 않았을 때는 평균 $15,000 \pm 8,100$ 개의 다형핵 백혈구가 부착하여 감염 4시간 후에 다형핵 백혈구의 부착이 유의하게 증가함을

확인할 수 있었다 ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 3)

2) 말초혈액 단핵구 부착능 평가

말초혈액 단핵구의 경우는 *O. tsutsugamushi*를 감염시키고 24시간 후에 시야 당 (400X) 98 ± 10 개가 HUVEC에 부착한 반면 *O. tsutsugamushi*를 감염시키지 않은 경우는 48 ± 14 개가 부착하여 감염 24시간 후에 말초혈액 단핵구의 부착이 유의하게 증가함을 알 수 있었다 ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 3).

3. *O. tsutsugamushi*의 사멸여부에 따른 부착분자의 발현

0.1% paraformaldehyde로 사멸시킨 *O. tsutsugamushi*를 MOI 3,000으로 감염시키고 4시간, 12시간, 24시간 후에 부착분자의 발현 양상을 관찰하였다. 살아 있는 *O. tsutsugamushi*를 감염시킨 경우에는 달리 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 모두 4시간, 12시간, 24시간에 발현의 증가는 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 감염 후 24시간째에 *O. tsutsugamushi*를 염색하여 간접면역형광법으로 관찰하였을 때 세포 내에서 증식한 균은 발견되지 않았다.

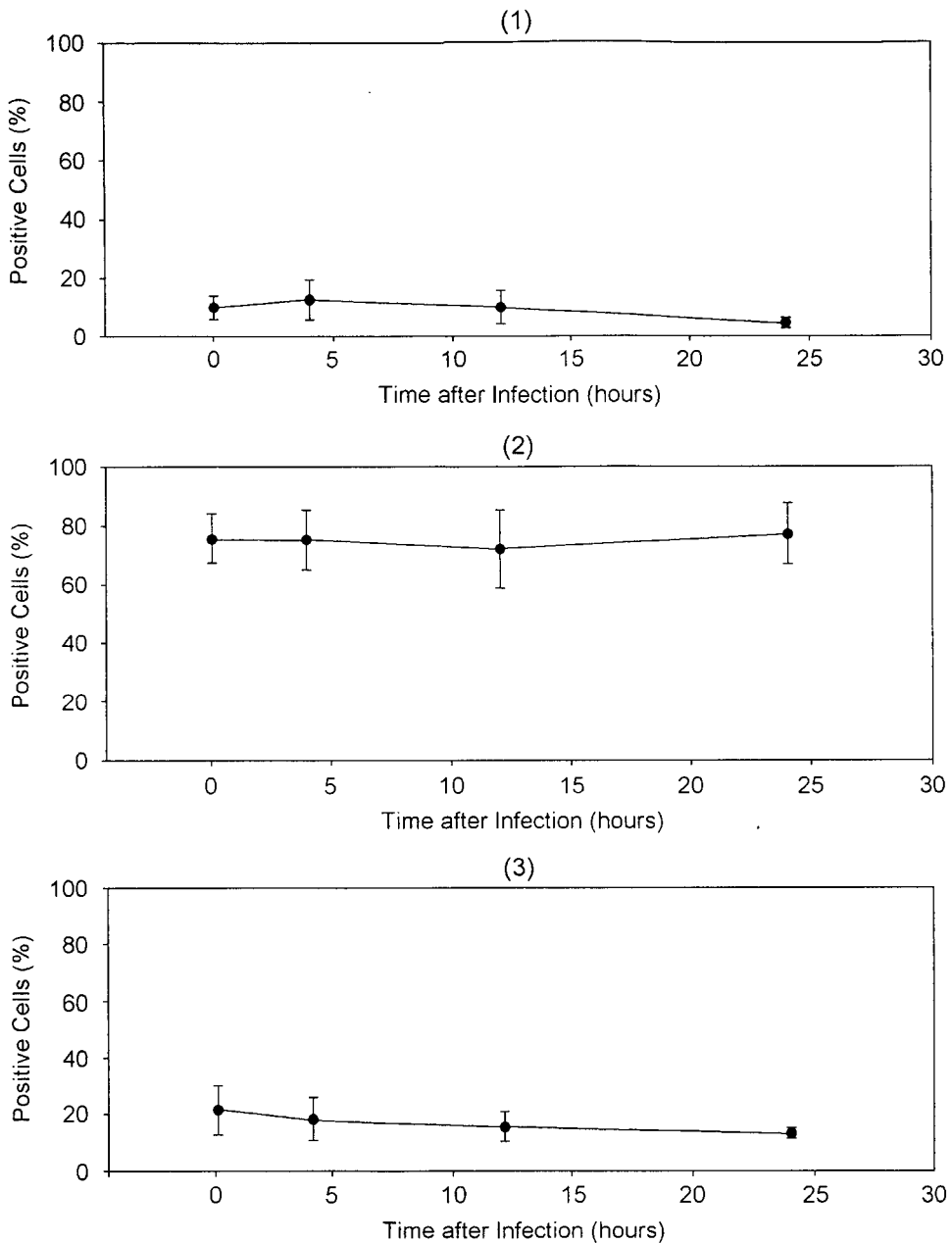


Figure 4. Time course of expression of E-selectin (1), ICAM-1 (2) and VCAM-1 (3) on the surface of human umbilical vein endothelial cells after infection with killed *O. tsutsugamushi*. Expression of adhesion molecules was not increased with the incubation with killed *O. tsutsugamushi*. Positive cells were measured with flow cytometry after incubation with mouse anti-adhesion molecule antibodies and FITC-conjugated anti-mouse IgG antibodies.

고 찰

*O. tsutsugamushi*에 의해 감염되면 임상적으로는

발열, 림프절 종대, 두통 등의 전신증상이 나타나고^{3,29)} 병리적으로는 감염된 조직에서 혈관 내피세포의 증식 및 혈관주위로 림프구, 단핵구의 침윤을 보인다¹⁶⁾. *O. tsutsugamushi*에 감염되어 사망한

31예를 부검한 소견에 의하면 폐 침범이 30예, 심장 침범이 25예 및 다수의 뇌막 침범이 있었던 것으로 보고된 바 있고¹⁶⁾, 뇌척수액에서 실시한 중합효소연쇄반응 결과에 의하면 다수의 환자에서 질병 초기에 이미 뇌척수액 내에 *O. tsutsugamushi*가 침투해 있는 것이 확인되었다¹⁹⁾. 여러 장기를 동시 다발적으로 침범한다는 사실은, 피부를 통해 들어온 *O. tsutsugamushi*가 혈류를 통해 전신의 장기로 침투해 들어간다는 사실을 시사하며 따라서 *O. tsutsugamushi*가 혈류로부터 전신 장기로 침투하기 위해서는 혈관 내피세포에 초기 감염이 일어날 것으로 예상되며 실제로 혈관 내피세포는 *O. tsutsugamushi*가 잘 감염되는 세포로 알려져 있다.

연구 결과 혈관 내피세포를 *O. tsutsugamushi*로 감염시키면 부착분자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. E-selectin, ICAM-1 및 VCAM-1 모두 감염 후 현저한 발현 증가를 보였으나 E-selectin의 경우는 감염 12시간 후부터는 발현이 급속히 감소하는 것이 관찰되었다. 이러한 사실은 시간상으로는 차이가 있으나 염증성 사이토카인에 의한 자극이나 다른 균에 의한 감염시도 E-selectin은 초기에 발현되었다가 소실되는 소견들과 부합하는 소견이다⁶⁾.

감염에 따른 부착분자의 발현은 *O. tsutsugamushi* 이외의 다른 병원균에서도 이미 보고된 바 있다. *Treponema pallidum*은 혈관 내피세포에서 ICAM-1을²¹⁾, *Borrelia burgdorferi*는 E-selectin, VCAM-1, ICAM-1을^{23,24)}, *Candida albicans*는 E-selectin, VCAM-1, ICAM-1을¹⁰⁾, *R. rickettsii*는 E-selectin을²⁶⁾ *R. conorii*는 E-selectin, VCAM-1 및 ICAM-1을⁷⁾, *Leptospira icterohemorrhagiae*는 E-selectin을⁸⁾, cytomegalovirus는 E-selectin을²⁵⁾, *Listeria monocytogenes*는 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1을⁹⁾ 발현시키는 것으로 보고된 바 있다. 하지만 감염시 각 부착분자의 발현시키는 균에 따라 차이를 보여 *B. burgdorferi*의 경우는 E-selectin의 최대발현이 4시간에 일어나고 ICAM-1, VCAM-1의 최대발현은 12시간에 나타나나 *C. albicans*의 경우는 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1의 발현이 최소 8시간까지 지속적으로 증가한다¹⁰⁾. 부착분자를 발현시키는 대표적 물질인 지질다당체의 경우 4시간 이후 부착분자의 발현이 증가되는 사실을 바탕으로 본 실험에서는 감염 후 4시간, 12시간, 24시간 후에 부착분자의 발현을 측정하였다. *O. tsutsugamushi*의 경우는 감염 4시간에 세 부착분자의 발현이 현저하게 증가

하여 감염 후 최소 24시간까지 발현이 지속되었으나 E-selectin의 경우는 감염 12시간 이후 발현이 급속히 감소하였다. 이러한 최대발현시간의 차이는 감염 용량의 차이에 기인할 수도 있겠지만 각 균마다 부착분자를 발현시키는 경로가 서로 다를 수 있음을 시사한다.

실제로 부착분자의 발현이 염증반응에 기여하는지를 보기 위하여 HUVEC을 *O. tsutsugamushi*로 감염시키고 다형핵 백혈구 및 단핵구가 혈관 내피세포에 부착되는 지를 측정하였다. 다형핵 백혈구의 경우 감염 전에 비해 감염 4시간이 지나 HUVEC에 부착이 증가하였고, 단핵구의 경우 감염 후 24시간이 지나 HUVEC에 부착이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 염증반응이 일어나기 위해서는 혈관내의 중성구, 림프구, 단구와 같은 염증세포들이 혈관벽에 부착하고 혈관 밖으로 이동하여 손상 부위에 집결하여야 하므로 *O. tsutsugamushi* 감염 후 다형핵 백혈구나 단핵구의 혈관 내피세포 부착이 증가했다는 사실은 감염 후 부착분자 발현이 혈관주위에 염증을 유발하는데 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

혈관 내피세포에서 부착분자를 발현시키는 것으로 알려진 감염균 중 그람음성 세균은 열이나 기타 외부 처리에 대해 내성이 매우 강한 지질다당체에 의해 부착분자가 발현되기 때문에 균을 사멸시켜도 부착분자를 발현시킬 수 있으나¹⁸⁾, enterovirus¹⁴⁾, Herpes simplex¹⁷⁾, cytomegalovirus²⁵⁾, *L. icterohemorrhagiae*⁸⁾와 *B. burgdorferi*²³⁾, *C. albicans*¹⁰⁾, *L. monocytogenes*⁹⁾ 및 *R. rickettsii*¹⁸⁾, *R. conorii*⁷⁾ 등 대부분의 병원성 미생물은 사멸시키면 부착분자를 발현시키지 못한다. *O. tsutsugamushi*와 같은 리케치아과에 속하는 *R. conorii*의 경우는 지질다당체를 지니고 있으나 사멸시키면 부착분자를 발현시키지 못하고 polymixin B로 지질다당체를 제거하여도 부착분자의 발현에는 영향이 없어 지질다당체 이외의 다른 매개체가 부착분자를 발현시킬 것으로 제시된 바 있다⁷⁾. 본 연구 결과 지질다당체가 없는 것으로 보고된 *O. tsutsugamushi*도 혈관 내피세포에서 부착분자 발현을 일으킬 수 있다는 것이 증명됨으로써, *Rickettsia*과에 의한 혈관 내피세포에서의 부착분자 발현은 지질다당체 이외의 다른 경로를 밟을 것으로 추정된다. 부착분자 발현의 기전은, 살아 있는 *O. tsutsugamushi*만이 부착분자를 발현시킨 결과로 볼 때 세포의 고유한 구성성분에 의하기 보다는 균과 세포간의

상호작용에 의한 것임을 시사한다. Tumor necrosis factor (TNF)나 interleukin-1 (IL-1)은 강력한 염증유도 사이토카인으로 부착분자를 발현시키는 것으로 알려져 있으며, *R. conorii*의 경우 IL-1 α 가 부착분자 발현의 매개체임이 밝혀졌다. 향후 *O. tsutsugamushi*의 감염시 사이토카인이 부착분자 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다⁷⁾.

본 실험에서는 부착분자의 발현정도를 리케치아속과 직접 비교하지는 않았으나 부착분자를 발현시키기 위해 사람 제대정맥 혈관 내피세포 1개당 1,500개 이상의 *O. tsutsugamushi*의 비율로 감염시켜야 한다는 사실로 추정할 때 다른 리케치아에 의한 감염과 비교하면 *O. tsutsugamushi*에 의한 부착분자의 발현정도는 낮을 것으로 추정된다. 이러한 사실은 다른 리케치아속에 의한 감염병과 비교할 때 *O. tsutsugamushi*에 의한 감염병에서는 혈관응고장애나 출혈이 현저하지 않으며 병리적으로도 혈관염이 현저하지 않다는 사실과 부합한다⁴⁾. 또한 생체내에서 부착분자의 발현은 혈관 내피세포의 직접 감염뿐만 아니라 대식세포와 같은 세포의 감염과 이에 따른 염증성 사이토카인의 분비에 따른 2차적 현상으로 나타날 수도 있을 것이다. 따라서 본 연구의 임상적 의의를 증명하기 위해서는 scrub typhus 환자에서 혈관 내피세포를 감염시킨 *O. tsutsugamushi* 균과 부착분자 발현 정도간의 양적 관계를 파악하여야 할 것이다.

결론적으로 본 연구 결과 혈관 내피세포가 *O. tsutsugamushi*에 의해 감염되면, 지질다당체 이외의 다른 경로를 통해 부착분자인 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1의 발현이 증가되며, 이와 동시에 염증세포의 혈관내 부착이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 부착분자의 발현에 따른 염증반응은 감염시 질병의 발생 및 방어에 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

결 론

O. tsutsugamushi 감염에 의한 병리학적 발병 기전을 밝히기 위해 혈관 내피세포에서의 부착분자의 발현 양상, 기전 및 그 의의에 대해서 알아보 고자 하였다. 제대정맥 혈관 내피세포를 순수 분리 배양하여 *O. tsutsugamushi*로 감염시킨 결과 감염 균수 및 시간에 따른 부착분자 E-selectin, ICAM-1, VCAM-1의 발현 증가가 관찰되었고 또

부착분자의 발현 증가에 따른 다형핵 백혈구 및 단핵구의 혈관 내피세포내 부착이 증가하였다. 살아 있는 균과 달리 사멸된 *O. tsutsugamushi*는 부착분자의 발현을 증가시키지 못하여 살아 있는 세포 및 *O. tsutsugamushi*간의 상호작용이 부착분자 발현에 중요함을 확인할 수 있었다. 이러한 부착분자의 발현은 *O. tsutsugamushi* 감염시 염증세포의 혈관내 부착을 유도함으로써 질병발생 및 방어에 중요한 기여를 할 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 1) 배현주, 김미란, 기선호, 장우현, 박선양, 최강원: 체외배양한 인제대정맥 혈관 내피세포에서 *R. tsutsugamushi* 감염이 tissue factor와 type 1 plasminogen activator inhibitor의 발현에 미치는 영향에 관한 연구. 감염 27: 333-345, 1995.
- 2) 송호연, 이강순: *Rickettsia tsutsugamushi* 감염에 의한 혈관 내피세포의 손상기전에 관한 연구. 대한미생물학회지 29: 65-78, 1994.
- 3) 최강원: 주추가무시 병의 임상증상. 대한의학협회지 31: 608-611, 1988.
- 4) Allen AC, Spitz S: A comparative study of the pathology of scrub typhus (*tsutsugamushi* disease) and other rickettsial disease. *Am J Pathol* 21: 603-680, 1945.
- 5) Amano K, Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Kaya S, Fukushi K: Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 55: 2290-2292, 1987.
- 6) Bevilacqua MP: Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 11: 767-804, 1993.
- 7) Dignat-George F, Teyssie N, Mutin M, Bardin N, Lesaule G, Raoult D, Sampol J: *Rickettsia conorii* infection enhances vascular cell adhesion molecule-1- and intercellular adhesion molecule-1-dependent mononuclear cell adherence to endothelial cells. *J Infect Dis* 175: 1142-1152, 1997.
- 8) Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P: *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes.

- Infect Immun* **63**: 2995-2999, 1995.
- 9) Drevets DA: *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol* **158**: 5305-5313, 1997.
 - 10) Filler SG, Pfunder AS, Spellberg J, Spellberg JP, Edwards JE Jr: *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* **64**: 2609-2617, 1996.
 - 11) Imhof BA, Dunon D: Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* **58**: 345-416, 1995.
 - 12) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**: 2745-2756, 1973.
 - 13) Jerrells TR, Osterman JV: Host defenses in experimental scrub typhus: inflammatory response of congenic C3H mice differing at the *Ric* gene. *Infect Immun* **31**: 1014-1022, 1981.
 - 14) Kirkpatrick CJ, Bultmann BD, Gruler H: Interactions between enteroviruses and human endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* **118**: 15-25, 1985.
 - 15) Lee M, Park S, Kye KC, Choi DH, Kim BK, Choi KW, Lee JS: Coagulopathy in scrub typhus change of the plasma t-PA concentration and its relationship with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Hemostas* **62**: 372, 1989.
 - 16) Levine H: Pathologic study of thirty-one cases of scrub typhus fever with especial reference to the cardiovascular system. *Am Heart J* **31**: 314-328, 1946.
 - 17) MacGregor RR, Friedman HM, Macarak EJ, Kefalides NA: Virus infection of endothelial cells increases granulocyte adherence. *J Clin Invest* **65**: 1469-1477, 1980.
 - 18) Noel RF Jr, Sata TT, Mendez C, Johnson MC: Pohlman. Activation of human endothelial cells by viable or heat killed Gram-negative bacteria requires soluble CD14. *Infect Immun* **63**: 4046-4053, 1995.
 - 19) Pai H, Sohn S, Seong Y, Kee S, Chang WH, Choe KW: Central nervous system involvement inpatients with scrub typhus. *Clin Infect Dis* **24**: 436-440, 1997.
 - 20) Park CS, Kim IC, Lee JB, Choi MS, Choi SB, Chang WH, Kim IS: Analysis of antigenic characteristics of *Rickettsia tsutsugamushi* Boryong strain and antigenic heterogeneity of *Rickettsia tsutsugamushi* using monoclonal antibodies. *J Kor Med Science* **3**: 319-324, 1993.
 - 21) Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard MV: Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* **165**: 484-493, 1992.
 - 22) Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Radolf JD, Norgad MV: Virulent *Treponema pallidum* promotes adhesion of leukocytes to human vascular endothelial cells. *Infect Immun* **62**: 4622-4625, 1994.
 - 23) Schaible UE, Vestweber D, Butcher G, Stehle T, Simon MM: Expression of endothelial cell adhesion molecules in joints and heart during *Borrelia burgdorferi* infection of mice. *Cell Adhesion Commun* **2**: 465-479, 1994.
 - 24) Sellati TJ, Burns MJ, Ficzola MA, Furie MB: *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro. *Infect Immun* **63**: 4439-4447, 1995.
 - 25) Span AHM, Mullers W, Miltenburg AMM, Bruggeman CA: Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. *Immunology* **72**: 355-360, 1991.
 - 26) Sporn LA, Lawrence SO, Silverman DJ, Marder VJ: E-selectin-dependent neutrophil adhesion to *Rickettsia rickettsii*-infected endothelial cells. *Blood* **81**: 2406-2412, 1993.
 - 27) Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov. as *Oientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 589-591, 1995.
 - 28) Walker DH, Gear JHS: Correlation of the distribution of *Rickettsia conorii*, microscopic lesions, and clinical features in South Africa tick fever. *Am J Trop Hyg* **34**: 361-371, 1985.

- 29) Walker DH, Occino C, Trigali GR, Di Rosa S, Mansueto S: Pathogenesis of rickettsial eschars: the tache noire of boutonneuse fever. *Hum Pathol* **19**: 1449-1454, 1988.
- 30) 多村 憲, 浦上 弘. 感染細胞計數法による *Rickettsia tsutsugamushi* の簡便な感染價測定法について. 日本細胞學雜誌 **36**: 783-785, 1981.
-