

*Bacteroides fragilis*와 대장균의 혼합 감염에 의한 복강 조직의 Proinflammatory Cytokine 유전자 발현 조절

한양대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학 연구소, 외과학교실²; 중부대학교 생명공학부¹

김정목 · 김영전¹ · 박훤겸² · 조양자

=Abstract=

Cytokine Gene Expression of Peritoneal Tissues in Response to Mixed Infection of *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli*

Jung Mogg Kim, Young-Jeon Kim¹, Hwon-Kyum Park² and Yang-Ja Cho

Department of Microbiology and Institute of Biomedical Science, Department of
General Surgery², Hanyang University College of Medicine;
Department of Life Sciences, Joongbu University¹

Bacteroides fragilis and *Escherichia coli*, normal colonic inhabitants, are the most frequently isolated bacteria in infected tissues, particularly in intraabdominal abscesses. This study was designed to determine whether enteric bacteria may alter the *B. fragilis*-induced expression of proinflammatory cytokines in mouse peritoneal tissue (MPT). After C57BL/6 mice were inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* in the presence or absence of *E. coli*, RNA was extracted from MPT. Expression of interleukin (IL)-1 α and tumor necrosis factor (TNF) α mRNA was assessed using RT-PCR and standard RNA. Each cytokine protein was also measured by ELISA. The co-inoculation of *E. coli* into mouse peritoneal cavity advanced the onset of abscess development by *B. fragilis* infection. When mouse was co-infected with *E. coli* and *B. fragilis* intraperitoneally, there was a synergistic increase in the expression of IL-1 α and TNF α mRNA in MPT and this was paralleled by increased cytokine protein secretion. Mixed inoculation of heat-killed *E. coli* and *B. fragilis* did not cause a synergistic increase in those cytokine mRNA expression. These results suggest that enteric bacteria may significantly affect proinflammatory cytokine signal produced by host peritoneal cavity in response to *B. fragilis* infection.

Key Words: *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, Intraabdominal abscess, Proinflammatory cytokine, Quantitative RT-PCR, Synergy

서 론

장관 내에 정상 세균총으로 존재하는 *Bactero-*

*ides fragilis*와 대장균 (*Escherichia coli*)은 복강내
감염 조직에서 가장 흔하게 검출되는 균들이다¹⁾.
특히 *B. fragilis*의 복강 내 감염이 농양 형성으로
이어질 수 있음은 동물 모델을 이용한 실험에서

접수 : 2000년 2월 2일, 게재결정 : 2000년 4월 10일

Reprint request to: 김정목, 서울시 성동구 행당동 17번지, 우편번호 133-791 한양대학교 의과대학 미생물학교실
전화: 2290-0645, Fax: 2293-1629, E-mail: jungmogg@email.hanyang.ac.kr

*본 논문은 1999년 한양대학교 교내 연구비에 의하여 연구되었음.

이미 증명된 바 있다³⁾. 복강 내 농양 조직은 세균과 호중구를 비롯한 각종 염증세포가 밀집되어 있는 주위를 피브린 (fibrin)과 콜라겐 섬유 (collagen fiber)로 이루어진 피막 (capsule)으로 둘러 쌓여 있는 구조로 되어 있다³⁾. 그런데 염증세포가 침윤되기 위해서는 복강 조직으로부터 proinflammatory cytokine의 발현이 필수적이다. 본 저자들은 *B. fragilis*를 감염시킨 C57BL/6 마우스 복강 조직에서 proinflammatory cytokine인 interleukin (IL)-1 α , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) α 뿐만 아니라 monocyte chemotactic protein (MCP)-1과 macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α 와 같은 chemokine 발현이 상향 조절됨을 확인한 바 있다¹⁾.
²⁾ 이들 proinflammatory cytokine은 염증세포의 유입과 활성화에 관여할 뿐만 아니라 B세포의 분화 및 활성화, prostaglandin I₂와 E₂, nitric oxide 등과 같은 염증 매개물질 생성에 관여하여^{4,7,12)} 장내 염증 반응과 농양 형성을 유도하는 역할을 할 수 있다. 또한 최근에는 *B. fragilis*가 복강 벽에 부착되고 자극을 받은 복강 세포로부터 TNF α 생성이 증가됨으로써 abscess가 유도될 것이라는 가설이 발표되었다¹⁰⁾. 이와 같이 proinflammatory cytokine은 *B. fragilis* 감염에 의한 면역 병리 기전을 조절하는 key factor로 작용한다.

실험적으로 동물 복강 내에 대장균만을 감염시켰을 경우에는 농양이 형성되지 않지만, *B. fragilis*와 대장균을 혼합 감염시켰을 때에는 *B. fragilis* 만을 감염시켰을 때에 비하여 농양 형성과 사망율이 증가한다^{3,21,26)}. 이와 같은 현상을 설명할 수 있는 기전 중의 하나로 *B. fragilis*가 대장균의 phagocytic killing을 억제한다는 가설이 제시되었다¹⁹⁾. 그런데 대장균과 이질 아메바를 대장 상피세포에 혼합 감염시켰을 때에는 이질 아메바만을 감염시켰을 때에 비하여 proinflammatory cytokine 유전자가 synergistic하게 증가한다¹⁶⁾. 따라서 proinflammatory cytokine이 농양 형성에 관여할 수 있을 것이라는 점에 비추어^{1,10)}, 대장균은 *B. fragilis* 감염에 의해 유도되는 proinflammatory cytokine의 발현을 조절할 가능성이 있다. 그러나 현재까지 *B. fragilis* 감염증에서 이와 같은 가능성을 보고한 논문은 발표된 바 없다.

본 연구에서는 *B. fragilis*에 감염된 복강 세포로부터 발현되는 proinflammatory cytokine을 대장균이 조절할 수 있을 것이라는 가설을 설정하였다. 이 가설을 증명하기 위해 실험동물의 복강 내에

*B. fragilis*와 대장균을 혼합 감염시킨 뒤 발현되는 cytokine을 역전사 증합효소법 (reverse transcriptional polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 검사함과 동시에 표준 합성 RNA와 정량적 역전사 PCR (quantitative RT-PCR)을 이용하여 발현된 cytokine mRNA 분자수를 측정하였다. 또한 발현된 mRNA가 단백질 분비까지 이어지는지의 여부를 확인하기 위하여 조직 추출액을 대상으로 효소면역 측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 분비된 cytokine 단백질을 검사하였다.

재료 및 방법

1. 세균 배양 및 복강 내 농양 형성

B. fragilis 배양을 위하여 표준 균주 (ATCC 23745)를 vitamin K (0.1 μ g/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A) 및 hemin (5 μ g/ml, Sigma)이 함유된 5% sheep blood agar에 접종한 뒤, anaerobic chamber (Forma Scientific Inc., Mariette, OH, U.S.A)와 혼합 가스 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) 속에서 2~3일간 배양하여 균 집락을 확인하였다. 이 집락을 peptone-yeast-glucose 배지 (PYG medium, 0.5% yeast extract, 2% proteose peptone, 0.5% NaCl, 0.0055% cystein-hydrochloride, 20% glucose)에 접종하여 24시간 배양한 후 균을 수거하였다. 그 뒤 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 세척한 후 실험에 이용하였다. 균수 측정은 McFarland nephelometer를 이용하였다.

복강 내 농양을 형성시키기 위하여 기존의 방법대로¹⁾ 1 \times 10⁸ 집락형성단위 (colony-forming unit, CFU)의 *B. fragilis*와 *E. coli* DH5 α (Promega, Madison, Wis, U.S.A.)에 같은 양의 멸균된 흰쥐 장내용물 (autoclaved colonic and cecal contents, ACC)과 10% (wt/vol) BaSO₄를 혼합한 뒤, 25 gauge 주사바늘로 C57BL/6 마우스 (생후 8~10주) 복강 내에 주사하였다. ACC는 특수하게 고안된 사육상자에서 흰쥐 배설물을 채취하여 잘 건조시킨 뒤, 내용물의 2배 되는 증류수에 녹여 121 $^{\circ}$ C에서 고압멸균을 시행하였다. 그 후 1500 rpm으로 원침하여 상청액만을 수거한 뒤, 0.4 μ m filter (Millipore products, Bedford, MA, U.S.A.)로 여과하여 실험에 이용하였다. 한편 대조군에는 ACC와 10% BaSO₄를 혼합시킨 내용물만을 접종하였다. 경우에 따라서는 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열 처리한 *E. coli* DH5 α

를 이용하였다.

2. 복강 내 농양주위 조직으로부터 RNA 추출 및 역전사 PCR

2-1. 조직 RNA 추출

*B. fragilis*를 포함한 농양 유도물질을 주입하고 일정 시간이 경과한 후 마우스를 경부 골절시킨 뒤, 복강을 절개하여 장을 제외한 복강내 조직을 채취하였다. 채취한 조직으로부터의 RNA는 Ottawa sand¹⁸⁾ (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ, U.S.A.)와 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 추출하였다. 한편 추출한 RNA의 integrity는 gel 전기영동법에 의하여 분석하였다²²⁾.

2-2. *in vitro* reverse transcription 및 cDNA PCR

연구대상 cytokine은 마우스 IL-1 α 및 TNF α 였다. 이들 cytokine의 염기서열 및 RT-PCR은 기존의 방법과 동일하였다¹⁾. 즉, 추출한 0.2~1 μ g의 조직 RNA를 0.1 μ g의 oligo(dT)₁₅와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 만든 후, PCR thermal cycler (GenAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn., U.S.A.)로 증폭시켰다. 증폭 프로그램은 기존의 방법대로 *Taq* polymerase (2.5 unit, Perkin-Elmer Cetus)를 첨가한 후 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 heat inactivation시켰다 (hot start method). IL-1 α 는 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denature, 60 $^{\circ}$ C에서 2분 30초 동안 annealing과 extension, TNF α 및 β -actin은 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denature, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 30초 동안 annealing과 extension이 일어나도록 하였으며, 총 시행횟수는 32회였다.

음성대조군으로는 cDNA 합성 과정에서 RNA 대신 증류수를 넣어 PCR을 시행한 것을 사용하였다. 양성대조군으로는 2.5 μ g/ml의 phytohemagglutinin (PHA, Sigma)으로 6시간 동안 자극시킨 마우스 비장세포 림프구로부터 추출한 RNA를 이용하였다.

PCR이 끝난 후, 이들 product는 2% NuSieve agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, U.S.A.)로 전기영동한 뒤 ethidium bromide 염색으로 확인하였다.

3. 발현된 cytokine 유전자의 정량

연구대상 cytokine mRNA의 정량을 위하여 추출한 1 μ g의 RNA와 2~5배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 동일한 시험관에서 반응시키는 방법을

사용하여 (competitive RT-PCR) IL-1 α 및 TNF α mRNA 발현 분자수를 측정하였다¹⁴⁾. 표준 RNA는 기존에 시행했던 것과 동일한 것을 이용하였다¹⁾. 정량 결과 5x10³ transcripts/ μ g RNA 이상이 발현된 경우를 의미있는 결과로 간주하였다¹⁶⁾.

4. 복강 내 조직 추출물에서의 cytokine 단백질의 측정

복강 내 조직 추출물에 포함된 proinflammatory cytokine 단백질은 ELISA 방법으로 측정하였다. 복강 내 조직 추출물은 기존의 방법을 이용하여 얻었으며¹⁾, 최종적으로 0.2 μ m filter로 여과한 뒤 실험에 이용하였다. 마우스 복강 조직에 들어 있는 IL-1 α 및 TNF α 의 양을 측정하기 위하여 R&D Systems (Minneapolis, MN, U.S.A.)에서 개발한 kit를 이용하여 제조회사의 설명서대로 시행하였다. 이 방법대로 2개 well에서의 평균치를 구한 뒤, 표준 곡선을 이용하여 분비된 cytokine 양을 산출하였다. 그 후 Wilcoxon ranksum-test를 이용하여 대조군과의 유의성을 검정하였고, p value가 0.05 이하인 것을 유의한 결과라고 판정하였다.

결 과

1. 대장균 혼합 감염에 의한 복강 내 농양 형성

대장균의 혼합 감염이 *B. fragilis*에 의한 복강 내 농양 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1x10⁸ CFU의 *B. fragilis*와 대장균을 동량의 멸균된 장내용물과 함께 C57BL/6 마우스에 접종한 뒤 3일 후 마우스 복강을 절개한 다음, 육안으로 농양 형성 유무를 관찰하였다. 실험 결과 *B. fragilis*만을 접종했을 때의 농양 형성율은 감염 마우스의 20%에 불과하였으나, 대장균을 함께 접종한 경우에는 80%에서 육안적으로 농양이 형성됨을 알 수 있었다. 그러나 7일 후에는 *B. fragilis*만을 접종한 마우스 모두에서 농양이 형성되어 대장균이 복강 내 농양의 형성 속도를 증가시키는 방향으로 작용함을 알 수 있었다 (Table 1).

2. *B. fragilis* 및 대장균 혼합 감염 후 복강 조직에서의 cytokine mRNA 발현

B. fragilis 및 대장균의 혼합 감염에 의한 농양 주위 조직에서 cytokine mRNA 발현이 상향조절 (upregulation)되는 지를 알아보기 위하여 복강 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤, RT-PCR로 IL-1 α

Table 1. The incidence of abscess formation in C57BL/6 mice inoculated with *B. fragilis* and *E. coli*¹

Inoculated bacteria	Day after inoculation	
	3	7
<i>B. fragilis</i>	1/5 (20) ²	5/5 (100)
<i>E. coli</i>	0/5	0/5
<i>B. fragilis</i> + <i>E. coli</i>	5/5 (100)	ND ³

1. C57BL/6 mice were inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* (1×10^8 CFU) and/or *E. coli* (1×10^8 CFU). Intraabdominal abscesses were observed after the mice were killed by cervical dislocation 3 or 7 days after inoculation.
2. Numbers of mice with intraabdominal abscess/total inoculated mice (%)
3. ND, not done

Table 2. Quantification of cytokine mRNA expression in mouse peritoneal tissues infected with *B. fragilis* and/or *E. coli*¹

Cytokines	Control	<i>B. fragilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. fragilis</i> + <i>E. coli</i> (fold-increase) ²
IL-1 α	4.1×10^4	2.6×10^5	3.6×10^4	6.5×10^6 (25)
TNF α	$<5 \times 10^3$	5.9×10^3	$<5 \times 10^3$	2.1×10^5 (36)
β -actin	5.5×10^5	5.2×10^5	5.1×10^5	5.3×10^5

1. C57BL/6 mice were inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* (1×10^8 CFU) and/or *E. coli* (1×10^8 CFU), after which peritoneal tissue RNA was extracted by Ottawa sand and the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method 3 days after inoculation. Quantification of cytokine mRNA was performed by RT-PCR using specific primers for each cytokine and synthetic standard RNA. Results are expressed as the number of cytokine transcripts/ μ g of tissue RNA.
2. Parenthesis is fold-increase of mixed infected group to *B. fragilis* alone

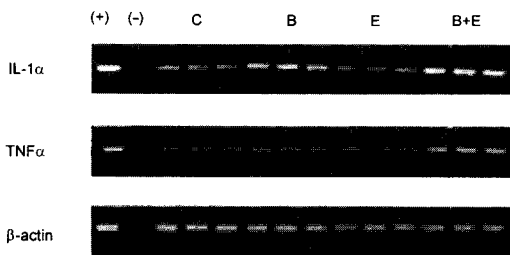


Figure 1. Cytokine mRNA expression in the intra-peritoneal tissues infected with *B. fragilis* and *E. coli*. C57BL/6 mice were inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* (1×10^8 CFU) and/or *E. coli* (1×10^8 CFU), after which peritoneal tissue RNA was extracted by Ottawa sand and the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method 3 days after inoculation. Each cytokine mRNA was observed by RT-PCR using specific primers. (+), positive control; (-), negative control; B, *B. fragilis*; E, *E. coli*; B+E, mixed infection of *B. fragilis* and *E. coli*.

및 TNF α mRNA의 발현 양상을 관찰하였다. 그 결과 혼합 감염시킨 군에서의 IL-1 α 및 TNF α

mRNA signal은 *B. fragilis* 만을 감염시킨 군에 비하여 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 1).

그런데 위와 같이 단순한 RT-PCR의 결과만으로는 mRNA의 증감 정도를 객관적으로 판단할 수 없기 때문에, 표준 RNA를 이용하여 발현된 마우스 mRNA 분자수를 정량하였다. 그 결과 IL- α mRNA의 경우에 있어서는 혼합 감염시킨 군의 조직 RNA 1 μ g 당 평균 6.5×10^6 mRNA 분자수가 발현되어 *B. fragilis* 만을 감염시킨 군 (2.6×10^5 mRNA 분자수/ μ g 조직 RNA)에 비해 25배의 발현 증가를 나타내었다. 또한 TNF α mRNA 발현을 정량했을 때에는 혼합 감염시킨 군에서 조직 RNA 1 μ g 당 2.1×10^5 mRNA 분자수가 발현되어 *B. fragilis* 만을 감염시킨 군 (5.9×10^3 mRNA 분자수/ μ g 조직 RNA)에 비해 36배 이상 발현이 증가하였다. 한편 β -actin mRNA의 경우에 있어서는 대조군 및 감염군에서 거의 비슷한 수준의 발현 정도 (약 5×10^5 mRNA 분자수/ μ g 조직 RNA)를 보여주었다 (Table 2). 한편 이들 cytokine mRNA의 발현이 단백질 분비와 연관되는 지를 확인하기 위하여

Table 3. Cytokine mRNA expression in mouse peritoneal tissues co-infected with *B. fragilis* and heat-killed *E. coli*

Cytokines	Control	<i>B. fragilis</i>	Heat-killed <i>E. coli</i>	<i>B. fragilis</i> + heat-killed <i>E. coli</i>
IL-1 α	4.0 x 10 ⁴	4.5 x 10 ⁵	4.3 x 10 ⁴	4.7 x 10 ⁴
TNF α	<5 x 10 ³	5.5 x 10 ³	<5 x 10 ³	5.2 x 10 ³
β -actin	5.1 x 10 ⁴	4.8 x 10 ⁴	5.3 x 10 ⁴	5.1 x 10 ⁴

C57BL/6 mice were inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* (1 x 10⁸ CFU) and heat-killed *E. coli* (1 x 10⁸ CFU), after which peritoneal tissue RNA was extracted by Ottawa sand and the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method 3 days after inoculation. Quantification of cytokine mRNA was performed by RT-PCR using specific primers for each cytokine and synthetic standard RNA. Results are expressed as the number of cytokine transcripts/ μ g of tissue RNA

조직 추출액을 ELISA 방법으로 측정한 결과, 혼합 감염된 군에서의 IL-1 α (119.6 \pm 11.7 ng/ml) 및 TNF α (58.0 \pm 7.9 ng/ml)의 농도는 *B. fragilis* 만을 감염시킨 군에 비하여 (IL-1 α , 50.4 \pm 8.8 ng/ml; TNF α , 19.2 \pm 4.5 ng/ml) 높게 나타나 (p value <0.05), 이들 cytokine mRNA 발현 양상과 유사함을 알 수 있었다 (Fig. 2).

3. 열처리에 의한 대장균의 혼합 감염이 복강 내 proinflammatory cytokine 발현에 미치는 영향

대장균에 의한 proinflammatory cytokine 발현 상승 효과가 사균에 의해서도 동일하게 나타날 수 있을 지를 알아보기 위하여 *E. coli* DH5 α 를 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열 처리한 뒤, *B. fragilis*와 함께 마우스에 접종하였다. 3일 후 복강 조직 RNA를 추출하여 발현된 cytokine mRNA 분자수를 정량한 결과, 앞서 나타난 것과 같이 대장균의 혼합 감염에 의한 cytokine mRNA 상승 효과는 관찰할 수 없었다 (Table 3). 이와 같은 결과는 살아 있는 대장균이 복강내 세포에 영향을 미쳐 *B. fragilis*에 의한 proinflammatory cytokine의 발현을 상향 조절할 것이라는 점을 시사해 준다.

고 찰

동물 실험에서 대장균의 감염은 *B. fragilis*에 의한 복강 내 농양 형성을 증가시킨다^{3,20,25}. 본 실험에서도 대장균이 혼합 감염되었을 때, *B. fragilis*에 의한 복강 내 농양 형성 시기가 촉진됨을 관찰할 수 있었다. 동시에 대장균과 *B. fragilis*의 혼합 감염에 의해 복강 조직에서는 proinflammatory cytokine - 즉, IL-1 α 와 TNF α 의 발현이 synergistic하게 증가되었다. 이들 cytokine은 염증세포

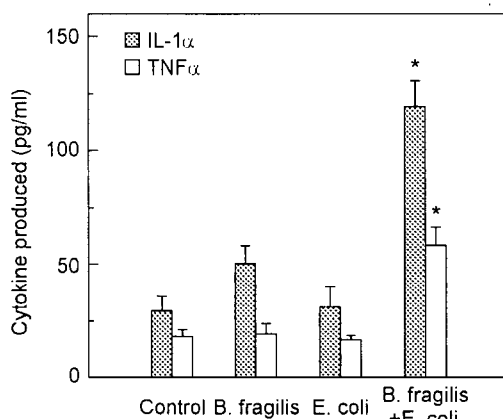


Figure 2. The amount of IL-1 α and TNF α protein in the intraperitoneal tissues after infection of *B. fragilis* and *E. coli*. After intraperitoneal tissues were taken from C57BL/6 mice inoculated with abscess-forming mixture containing *B. fragilis* (1 x 10⁸ CFU) and/or *E. coli* (1 x 10⁸ CFU) at day 3 after inoculation, tissue fluid was extracted using a polytron homogenizer and a sonic dismembrator. IL-1 α and TNF α protein levels were determined by ELISA. Each result is expressed as mean \pm SEM of five mice. Asterisks indicate values with *B. fragilis* and *E. coli* infection that are significantly different from *B. fragilis* alone (p<0.05).

의 활성화에 관여할 뿐만 아니라 B세포의 분화 및 활성화, prostaglandin I₂와 E₂, nitric oxide 등과 같은 염증 매개물질 생성에 관여하여^{4,7,12} 복강 내 감염에 대한 염증 반응을 매개하는 기능을 수행한다.

B. fragilis 만을 이용한 기존의 실험에서는 복강 내 농양이 형성되기 전에 (감염 3일) IL-1 α mRNA의 발현이 최대로 증가하여 농양이 형성되는 시기 (감염 5일)에는 감소하는 경향을 보인 반면, TNF α

mRNA는 농양이 형성되기 전에는 발현되지 않다가 농양이 형성되는 시기에 급속히 증가하는 경향을 나타내었다¹⁾. 그런데 본 실험에서와 같이 대장균과 *B. fragilis*가 혼합 감염될 경우에 있어서는 농양이 형성되는 시기에 TNF α 뿐만 아니라 IL-1 α mRNA도 높게 발현되었다. 특히 이 때가 감염 3일이라는 점을 고려해 볼 때, 대장균의 혼합 감염은 농양 형성 시기를 앞당길 뿐만 아니라 proinflammatory cytokine을 높게 발현시켜 농양주위 조직의 염증 반응을 더욱 촉진시키는 역할을 할 것으로 추정된다.

B. fragilis 감염에 의한 농양 형성 과정에 있어서 대장균의 혼합 감염이 이 과정을 촉진하는 이유에 대해 현재까지 제대로 규명되어 있지 않다. 기존에 발표된 문헌을 고찰하면 *B. fragilis*의 지질 다당체 (lipopolysaccharide, LPS) 또는 이 균으로부터 생성되는 지방산 (fatty acid)이 호중구에 작용하여 대장균의 phagocytic killing을 억제함으로써 초래된다는 보고가 있다^{19,21)}. 본 연구에서는 대장균과 *B. fragilis*의 혼합 감염에 의해 복강 조직 세포로부터 proinflammatory cytokine의 발현이 증가되어 농양 형성이 촉진될 것이라는 점을 제시하였다. 그런데 TNF α 에 대한 항체를 투여했을 때 복강 내 농양 형성이 차단된다¹⁰⁾. 이와 같은 결과는 TNF α 가 농양 형성을 촉진시키는 방향으로 작용함을 의미한다. 또한 TNF α 는 복강내 패혈증의 병리 기전을 매개하는 중요한 인자로 알려져 있다²⁶⁾. 더구나 세균 감염증에서 발현되는 TNF α 는 숙주세포 파괴 기전으로 작용한다^{13,14)}. 따라서 이러한 여러 연구 결과들을 고려해 볼 때, 대장균과 *B. fragilis*의 혼합 감염에 의한 농양 형성율과 사망율의 증가는 TNF α 의 발현 증가 때문일 가능성이 높다.

IL-1은 강력한 pyrogen으로 작용한다⁶⁾. 대장균과 *B. fragilis*가 혼합 감염되었을 때에는 *B. fragilis*가 단독으로 감염되었을 때에 비해 발열 (fever)이라는 증상이 더 심하게 나타난다¹⁵⁾. 이와 같이 발열이 더 심해지는 이유도 IL-1 α 의 synergistic한 증가 때문으로 추정된다. 그런데 본 연구에서 가열 처리하여 사멸시킨 대장균을 *B. fragilis*와 혼합 감염시킬 경우에는 살아 있는 대장균을 혼합 감염시켰을 때에 비하여 proinflammatory cytokine의 synergistic한 증가를 관찰할 수 없었다. 한편 열처리하여 사멸시킨 대장균 또는 *B. fragilis*는 복강내 농양 형성에 있어서 synergy 현상을 나타내지 못

한다²⁰⁾. 그리고 사람 혈관내피세포에 살아 있는 대장균으로 자극했을 때 생성되는 cytokine 양은 LPS에 비해 10~100배 더 높다⁹⁾. 이와 같은 결과들은 복강내 농양 형성 과정에 있어서 생존한 균에 의한 복강 세포의 자극이 죽은 균에 의한 자극보다 더 중요하다는 점을 시사해 준다.

Proinflammatory cytokine 발현이라는 관점에서 대장균이 복강 세포에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서는 불분명하다. 우리는 이에 대한 설명으로 다음 세 가지 가능성을 제시하고자 한다. 첫째로 대장균이 CD14의 발현을 억제하여 *B. fragilis*에 의한 복강내 농양을 촉진시킬 가능성이 있다. 이와 같은 가설을 제시한 근거로 패혈증 환자에서는 CD14 발현이 감소되어 있고, CD14의 발현은 대장균 감염에 의해 낮아질 뿐만 아니라⁵⁾, *B. fragilis*에 의한 복막염의 확산 인자로 CD14가 제시되고 있는 점을²⁷⁾ 들 수 있다. 둘째로 대장균이 면역세포에 영향을 미쳐 호중구/대식세포 등에 의한 *B. fragilis* 제거를 억제하거나 또는 *B. fragilis*가 면역세포에 영향을 미쳐 대장균의 제거를 억제함으로써 proinflammatory cytokine의 발현을 증폭시킬 가능성도 있다. 즉, 대장균은 CD4⁺ T세포에 반응하여 세균 제거를 방해함으로써 복강내 농양 형성을 조절할 수 있다는 점과¹¹⁾, *B. fragilis*는 호중구에 의한 대장균의 phagocytic killing을 억제한다는 점이¹⁹⁾ 이와 같은 가능성을 뒷받침하고 있다. 그런데 본 연구에서 나타난 바와 같이 대장균 단독으로는 위와 같은 여러 면역 반응을 조절할 수는 있어도 복강 내에서 농양을 형성하지 못할 뿐만 아니라 proinflammatory cytokine의 발현능도 미약하다. 반면 *B. fragilis*는 단독 감염으로도 복강내 proinflammatory cytokine의 발현과 농양 형성이 가능하다. 따라서 앞서 제시한 대장균의 여러 면역 조절능이 *B. fragilis*에 의한 능력과 합쳐졌을 때 cytokine의 발현이 더욱 증폭되는 것으로 추측된다. 셋째로 대장균에 의한 cAMP phosphodiesterase에 의한 효과 가능성을 들 수 있다. 대장균은 수용성 cAMP phosphodiesterase를 생성해 내지만, *Bacteroides*는 이와 같은 효소를 생성할 능력이 없다²²⁾. 그런데 이 효소는 면역세포의 기능과 증식을 조절한다⁸⁾. 특히 사람세포에서 이 효소의 기능을 억압할 경우 TNF α 의 생성이 감소된다는 보고에 비추어²⁴⁾ 살아 있는 대장균에서 분비되는 phosphodiesterase가 복강 세포에 영향을 미칠 경우 *B. fragilis* 감염에 의해 유도되는 proinflammatory

cytokine의 생성을 더욱 촉진시킬 것으로 추정된다. 그러나 아직까지 위에 제시한 가능성들을 증명할 만한 직접적인 증거는 보고되어 있지 않다. 따라서 *B. fragilis* 감염에 의한 면역 병리 기전을 이해하기 위해서는 이에 대한 연구가 반드시 필요할 것으로 생각된다.

결 론

*B. fragilis*와 대장균은 복강 내 농양 조직에서 가장 흔하게 검출되는 세균들이다. 본 연구는 *B. fragilis*에 감염된 복강 내 세포로부터 발현되는 proinflammatory cytokine을 대장균이 조절할 수 있을 것인지 연구하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. *B. fragilis* 만을 접종한 마우스에 비하여 대장균을 혼합 감염시켰을 경우 복강 내 농양의 형성 속도가 증가되었다.

2. *B. fragilis*와 대장균을 혼합 감염시킨 C57BL/6 마우스 복강 조직에서의 IL-1 α 및 TNF α 발현은 *B. fragilis* 만을 감염시킨 마우스에 비하여 synergistic하게 증가하였다.

3. 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열 처리한 대장균을 *B. fragilis*와 함께 마우스에 접종한 경우에 있어서는 살아 있는 대장균을 혼합 감염시켰을 때 나타나는 proinflammatory cytokine 발현 증가 현상을 관찰할 수 없었다.

이와 같은 결과는 살아 있는 대장균이 *B. fragilis* 감염에 의해 복강 내에서 발현되는 proinflammatory cytokine signal을 변화시킬 수 있음을 시사해 준다.

참 고 문 헌

- 1) 김정목, 김원섭, 조양자: *Bacteroides fragilis*로 감염된 마우스 복강 조직에서의 친염증성 cytokine 유전자의 발현. 대한미생물학회지 **34**: 253-264, 1999.
- 2) 김정목, 윤서구, 김영전, 조양자: *Bacteroides fragilis* 감염에 의해 유도된 복강 내 농양 조직에서의 monocyte chemotactic protein-1과 macrophage inflammatory protein-1 α 의 발현. 대한미생물학회지 **31**: 201-212, 1997.
- 3) 전윤희, 김정목, 정용훈, 박장환, 조양자: 마우스 장내농양 (intraabdominal abscesses) 형성에 관한 연구. 한양의대 학술지 **12**: 384-393, 1992.
- 4) Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* **59**: 783-836, 1990.
- 5) Birkenmaier C, Hong YS, Horn JK: Modulation of the endotoxin receptor (CD14) in septic patients. *J Trauma* **32**: 473-478, 1992.
- 6) Dinarello CA: Interleukin-1. *Adv Pharmacol* **25**: 21-51, 1994.
- 7) DiPiro JT: Cytokine networks with function: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacology* **17**: 205-223, 1997.
- 8) Ekholm D, Mulloy JC, Gao G, Degerman E, Franchini G, Manganiello VC: Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) 3 and 4 in normal, malignant, and HTLV-I transformed human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **58**: 935-950, 1999.
- 9) Furst-Ladani S, Redl H, Haslberger A, Lubitz W, Messner P, Sleytr UB, Schlag G: Bacterial cell envelopes (ghosts) but not S-layers activate human endothelial cells (HUVECs) through sCD14 and LBP mechanism. *Vaccine* **18**: 440-448, 1999.
- 10) Gibson FC III, Onderdonk AB, Kasper DL, Tzianabos AO: Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*. *J Immunol* **160**: 5000-5006, 1998.
- 11) Gleason TG, Sawyer RG, Pruett TL: Bacterially preexposed T cells impair bacterial elimination by non-Th1/Th2 cell mechanisms in a model of intra-abdominal infection. *Surgery* **124**: 418-428, 1998.
- 12) Kagnoff MF, Eckmann L: Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**: 6-10, 1997.
- 13) Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Withoft T, Kagnoff MF: Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* **102**: 1815-1823, 1998.
- 14) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY: Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor α and

- soluble Fas ligands. *Scand J Gastroenterol* **35**: 40-48, 2000.
- 15) Kim JM, Jung HC, Im KI, Song IS, Kim CY: Synergy between *Entamoeba histolytica* and *Escherichia coli* in the induction of cytokine gene expression in human colon epithelial cells. *Parasitol Res* **84**: 509-512, 1998.
- 16) Kim JM, Jung HC, Jin DZ, Im KI, Song IS, Kim CY: Cytokine genes are down-regulated when attachment of *Entamoeba histolytica* to HT-29 colon epithelial cells is prevented. *Scand J Immunol* **45**: 613-617, 1997.
- 17) Levison ME, Bush LM: Peritonitis and other intra-abdominal infections. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, pp 636-670, 1990.
- 18) Liou GI, Matragoon S: A simple method to homogenize multiple tissue samples in small sizes without cross contamination. *BioTechniques* **13**: 719, 1992.
- 19) Magnuson DK, Weintraub A, Pohlman H, Maier RV: Human endothelial cell adhesiveness of neutrophils, induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in vitro, is inhibited by *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide. *J Immunol* **143**: 3025-3030, 1989.
- 20) Rotstein OD, Kao J, Houston K: Reciprocal synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in an intra-abdominal infection model. *J Med Microbiol* **29**: 269-276, 1989.
- 21) Rotstein OD, Vittorini T, Kao J, McBurney MI, Nasmith PE, Grinstein S: A soluble *Bacteroides* by-product impairs phagocytic killing of *Escherichia coli* by neutrophils. *Infect Immun* **57**: 745-753, 1989.
- 22) Sambrook I, Fritsch EF, Maniatis T: Analysis of RNA. Molecular Cloning, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 7.37, 1989.
- 23) Siegel LS, Hylemon PB, Phibbs PV Jr: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Pseudomonas* and *Bacteroides*. *J Bacteriol* **129**: 87-96, 1977.
- 24) Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, Sawada M: Ibutilast suppresses TNF alpha production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res* **837**: 203-212, 1999.
- 25) Verweij WR, Namaver F, Schouten WF, Macclaren DM: Early events after intraabdominal infection with *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **35**: 18-22, 1991.
- 26) Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, Goldie AS, Ross JA, Grant IS, Ramsay G, Howie JC: Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. *Br J Surg* **85**: 818-825, 1998.
- 27) Woltmann A, Gangloff SC, Bruch HP, Rietschel ET, Solbach W, Silver J, Goyert SM: Reduced bacterial dissemination and liver injury in CD14-deficient mice following a chronic abscess-forming peritonitis induced by *Bacteroides fragilis*. *Med Microbiol Immunol* **187**: 149-156, 1999.