

황색포도구균에 의한 J774A.1 마우스 대식세포주의 Apoptosis 유도 및 관련인자

동아대학교 의과대학 미생물학교실, 의과학연구소¹

김상호¹ · 이창민 · 정수진 · 정민호 · 김진구 · 차재관¹
이형식¹ · 임영진¹ · 이상화

=Abstract=

Apoptosis Induction and Associated Factor of *Staphylococcus aureus* in J774A.1 Mouse Macrophage Cell Line

Sang-Ho Kim¹, Chang-Min Lee, Soo-Jin Jeong, Min-Ho Jeong, Jin-Koo Kim,
Jae-Kwan Cha¹, Hyung-Sik Lee¹, Young-Jin Lim¹ and Sang-Hwa Lee

The Institute of Medical Science and Department of Microbiology¹,
Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea

Staphylococcus aureus infections are often life-threatening. Relatively little is known about the host response to these infections, in particular, the implication of apoptosis induced by this microorganism. In this study, we have shown that *S. aureus* was cytotoxic to J774A.1 cell, a murine macrophage cell line. The cell death mediated by *S. aureus* occurred through apoptosis, as shown by increase in the proportion of fragmented host cell DNA. Although phagocytosis and NO production had important role in the induction of apoptosis, the contact between bacteria and host cells was not essential for this pathway. A certain bacterial product could also induce typical caspase-dependent apoptosis of J774A.1 cell. It is expected that new interpretation may be possible to host-parasite relationship based on these results.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, J774A.1, Macrophage, Apoptosis, Bcl-2, Bax, PARP cleavage

서 론

인체에서 포도구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 피부에는 화농성 질환을 발병시키고 창상 감염과 증이염, 결막염, 골수염을 비롯하여 전신성 패혈증과 수막염을 일으키는 등 감염의 중요한 원인균으로 자리잡고 있으며, 이차적으로 류마티스열과 급성사구체신염을 야기하는 입상에

서 흔히 분리되는 병원균이다¹³). 효과적인 항생제의 개발에도 불구하고 여전히 포도구균은 패혈증을 포함한 생명을 위협하는 감염증의 원인균이다^{4,14}). 포도구균은 적어도 다섯 종 이상의 막손상 독소 (alpha, beta, gamma, delta, leukocidin)³)와 exfoliative toxin 그리고 초항원으로 작용하는 toxic shock syndrome toxin-1과 몇 종류의 장독소를 비롯한 많은 병원성 인자를 생산하는 것으로 알려져 있다¹⁰). 그 외에도 coagulase, catalase, hya-

접수 : 2000년 3월 23일, 게재결정 : 2000년 6월 29일

교신저자: 정민호, 602-103, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지 동아대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학 연구소
Tel: (051) 240-2989, Fax: (051) 242-7265, e-mail: mhjeong@mail.donga.ac.kr

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 기초과학연구비에 의하여 지원되었음.

luronidase, fibrinolysin, lipase, nuclease, penicillinase 등의 많은 생물학적 활성이 있는 효소들을 생산한다. 이러한 여러 가지 병원성 인자의 발견으로 포도구균에 의한 감염증의 병인론은 많은 부분이 잘 알려져 있으나 감염증 초기에 어떠한 경로를 거쳐서 감염이 성립되고 전신적인 감염증으로 발전하는가에 대해서는 다른 세균에서와 같이 알려진 것이 적다^{4,16}.

많은 병원성 세균이 숙주세포의 apoptosis를 유발하여, 숙주세포를 파괴하고, 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다^{2,8,9,17}. 특히 숙주의 방어기작에 관여하는 세포의 apoptosis를 통하여 자신의 생존력을 높임으로서 병원성 감염의 강도를 증강할 수 있는 것으로 생각되고 있다¹⁸. 따라서 포도구균의 감염 과정에서 숙주 면역계에 작용하는 세포의 apoptosis 유발 여부는 전신 감염으로 진행되는 병인론 해석에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 면역계의 주요 effector cell인 대식세포가 포도구균에 노출되었을 때 이질균의 경우¹⁷와 같이 apoptosis가 유도되는지를 조사하였고, 이 과정에서 포도구균과 대식세포의 관련인자를 추적하였으며, 대식세포의 apoptosis 관련 유전자 산물의 발현 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 세포주

S. aureus ATCC 13565, 14458, 19095 표준균주 및 동아 의대 임상병리학과에서 분리한 균주를 실험에 사용하였으며 세균 배지는 brain heart infusion broth (BHI; Difco Laboratories, Michigan, USA)를 이용하여 배양하여 실험에 사용하였다. 생쥐 유래 대식세포주 (J774A.1)는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며, RPMI 1640 (Gibco BRL, NY, USA) 혹은 MEM 배지 (Gibco BRL, NY, USA)에 sodium bicarbonate (Sigma, MO, USA, 0.2%)와 우태아 혈청 (Gibco BRL, NY, USA, 10%)을 첨가하여 대식세포 배양을 위한 완전배지로 사용하였다.

2. 세포주의 균 감염

세균은 2500 rpm으로 20분간 원심하고 침사를 우태아 혈청이 들어있지 않은 RPMI 1640 혹은 MEM 배지로 2회 세척하여 1×10^9 CFU/ml이 되도록 재부유하여, 2×10^6 이 되게 수를 맞춘 J774A.1

세포주에 세균을 접종하고 규정된 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

3. Trypan blue 배제법을 이용한 세포 생존능 검사

세포를 0.25%의 trypan blue (Sigma, MO, USA)와 1:1로 희석하고 5분간 방치한 다음 hemocytometer를 이용하여 광학현미경으로 살아있는 세포수를 세었다.

4. DNA 분절 전기영동

생쥐의 대식세포를 회수하여 원심하고 침사는 2.5 ml의 NET buffer로 현탁시키고 proteinase K (Sigma, MO, USA)를 200 µg/ml 되도록 넣고 SDS를 1% 되도록 첨가하여 55°C 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 포화된 NaCl을 675 µl 넣고 시료가 균일하게 되도록 15초 동안 진탕하였다. 8000 rpm으로 20분간 원심하고 상층액을 따로 모았다. Tris 완충액으로 포화된 phenol을 2.5 ml 넣고 1시간 동안 흔들어서 잘 섞이게 하고 3000 rpm으로 20분간 원심하여 다시 상층액을 따로 모아 2.5 ml의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)을 넣어 15분간 처치하여 단백을 제거하였다. 상층액에 2배 용량의 차가운 ethanol을 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 DNA가 침전되게 한 후 원심하여 침사를 모아 TE 완충액에 녹였다. 260 nm와 280 nm에서 OD를 측정하고 OD_{260/280} 값이 1.7 이상인 시료만을 RNase로 1시간 처리하여 전기영동 완충액과 잘 섞어 ethidium bromide (10 mg/ml)가 첨가된 2% agarose gel에서 1시간 동안 전기영동하였다. DNA 분자량 측정을 위해 Boehringer Mannheim사 DNA molecular weight marker VIII를 사용하였다.

5. Fluorescence activated cell sorter를 이용한 apoptosis의 측정

포도구균을 조건에 맞게 감염시키고 추가 배양한 J774A.1 세포주를 모아서 binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)로 세척하고 재부유시켜 FITC-annexin V와 PI 혼합액 (Travigen, FITC-annexin V; 1 µg/ml, PI; 10 µg/ml)으로 상온의 암소에서 10분간 반응시키고, Lysis II program으로 bivariate flow cytometric analysis를 하였다.

6. SDS-PAGE와 Western blot

Apoptosis와 관계된 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 포도구균을 조건에 맞게 감염시키고 추가 배양한 대식세포에서 단백을 분리하고 전기영동을 실시하였다. Stacking gel과 separating gel은

5%와 12% polyacrylamide의 조성으로 만들었다. 단백질의 양은 약 2 µg/ml가 되도록 조정하여 각 홈에 10 µl 넣고 수직형 전기영동을 200 Volt에서 45분 동안 실시하였다 (BIO-RAD Mini-Protean II). 단백질 분자량 측정에는 Sigma 회사의 SDS molecular weight markers kit (MW-SDS-70L)를 기준으로 하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준 단백질로 하여 Coomassie brilliant blue 방법으로 측정하였다. 상기 방법으로 전기영동한 gel은 Mini transblot cell (BIO-RAD Mini-Protean II)를 이용하여 4°C에서 250 mA, 100 V로 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 3% BSA가 포함된 25°C Blotto solution (pH 7.4)에서 1시간 동안 blocking한 후, apoptosis와 관련된 유전자 산물에 대한 항체 (anti-Bcl-2 Ab, anti-Bax Ab, anti-PARP Ab 등, Calbiochem, CA, USA)가 들어있는 0.05% tween-20를 함유한 4°C PBS에서 밤새 교반하였다. 이를 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (Amersham, NJ, USA)로 25°C에서 60분간 반응시키고 세척한 후, enhanced chemiluminescence (Amersham, NJ, USA) 검출 방법으로 분석하였다.

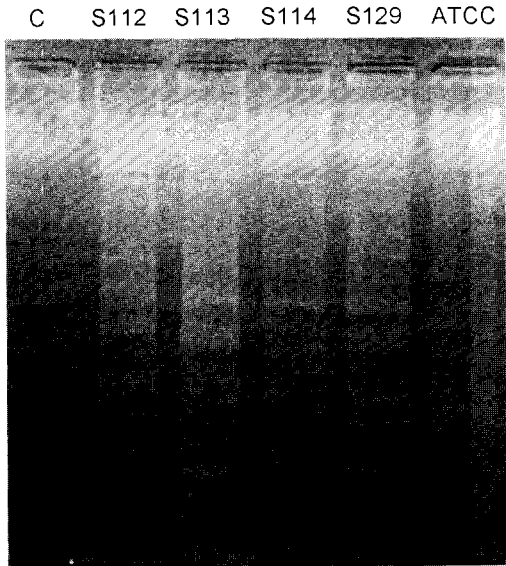


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells infected with *S. aureus*. Cells were infected with *S. aureus* standard strain ATCC 13565 or clinical isolates S112, S113, S114, and S129 at bacterium/cell ratio of 500 : 1 for 12 hours.

결 과

1. 포도구균에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis 유도

S. aureus ATCC 표준균주 및 동아 의대 임상병리학과에서 분리한 균주들을 대상으로 마우스 대

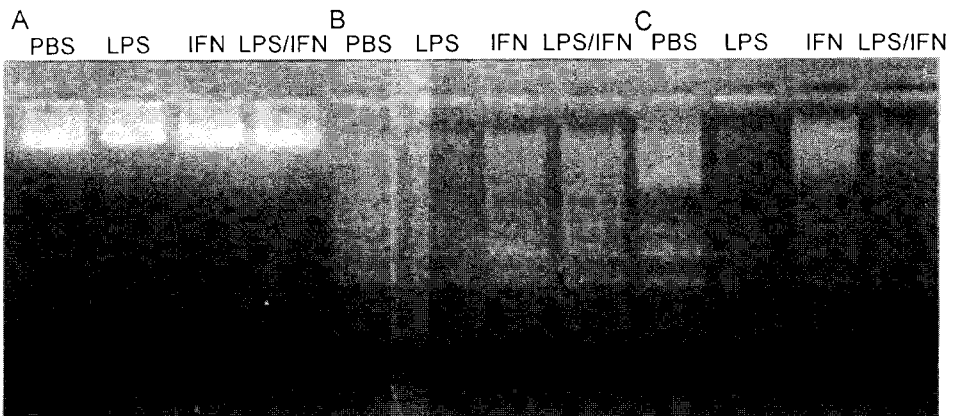


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells activated by LPS and/or interferon gamma (IFN-γ). Cells were pretreated with 1 µg/ml LPS and/or 100 U/ml IFN-γ and incubated for 12 hours (A; control, B; with *S. aureus* S114, C; with *S. aureus* ATCC 13565).

식세포에서 유래한 J774A.1 세포주에 대한 apoptosis 유발 여부를 일차적으로 검색한 결과, 표준 균주 ATCC 13565와 4종류의 임상분리균주 (S112, S113, S114, S129)에서 apoptosis의 전형적인 DNA 분절을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

2. J774A.1 세포의 탐식작용과 apoptosis

J774A.1 세포의 활성화와 apoptosis와의 연관성을 보기 위하여 LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극하였으나, 활성화된 대식세포 자체에서는 apoptosis가 유도되지 않았다. 이 경우에도 포도구균 감염에 의한 apoptosis는 변함없이 나타났다 (Fig. 2). 포

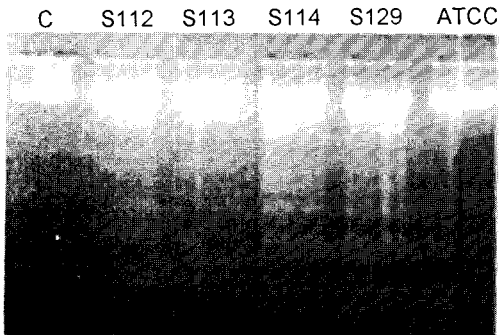


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells pretreated with 2 μ g/ml N^CMMA for 36 hours and infected with designated strains of *S. aureus* for 12 hours.

도구균 감염으로 인한 J774A.1 세포의 apoptosis 현상이 세균을 탐식하고 소화하는 과정에서 생성되는 nitric oxide (NO)와의 연관성을 조사하기 위하여 NO 생성 억제제인 N^CMMA (2 μ g/ml)로 세포를 36시간 전처리하여 같은 실험을 하였다. S114와 S129 포도구균을 제외한 균주에서는 J774A.1 세포의 apoptosis 유도현상을 관찰할 수 없었다 (Fig. 3). S114와 S129 포도구균의 J774A.1 세포에 대한 apoptosis 유도 기전을 보다 상세히 조사하기 위하여, actin polymerization을 억제하는 cytochalasin D (1 μ g/ml)로 J774A.1 세포를 1시간 전처리하여 세포의 탐식작용을 봉쇄한 다음 동일한 실험을 하였다. S129 포도구균의 경우에는 세포의 apoptosis 현상이 거의 소실되었으나, S114 포도구균의 경우에는 cytochalasin D 처리를 하지 않았을 때와 동일한 양상의 apoptosis 현상을 보였다 (Fig. 4). 즉, S114 포도구균은 대식세포의 탐식작용과 무관하게 세포의 apoptosis를 유도할 수 있음을 보여주었으며, 이는 균체의 접촉 혹은 세균이 만들어내는 어떤 물질에 의한 것임을 의미한다. 이를 구분하기 위하여 transmembrane apparatus를 사용하여 균체와 세포간의 접촉을 차단하고 같은 실험을 실시한 결과, S114 포도구균은 여전히 J774A.1 세포의 apoptosis를 유도함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

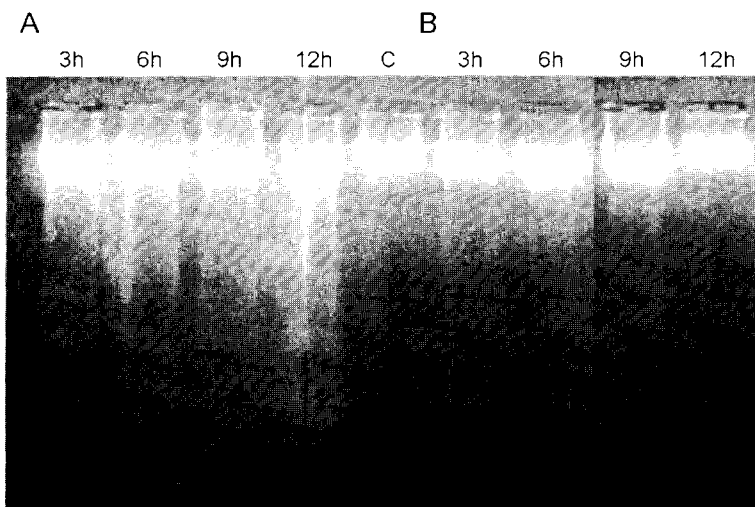


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells pretreated with 1 μ g/ml cytochalasin D for 1 hour and infected with *S. aureus* S114 (A) or S129 (B) for designated time.

3. S114 포도구균에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis

S114 포도구균의 대식세포에 대한 세포독성 효과의 상세한 정보를 얻기 위하여, RPMI 1640 배지에 배양한 1.7×10^6 개의 J774A.1 세포에 1×10^9 개의 S114 포도구균을 접종하고 규정된 시간 동안 배양하여 J774A.1 세포주의 생존율과 전체 세포수를 trypan blue 배제 시험으로 측정하였다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이 감염 후 6시간까지는 세

포수가 조금씩 증가하다가 이후에는 감소하였으며, 생존율은 3시간까지 100%를 유지하였으나 6시간에 80%로 감소하였고 12시간에는 50%대로 급격히 떨어졌다. S114 포도구균에 의한 J774A.1 세포의 생존율 변화와 apoptosis와의 연관성을 분명하게 확인하기 위하여 전기영동상 DNA 분절 생성 여부를 조사하였다. Fig. 7에서와 같이 3시간까지는 대조군과 S114 포도구균으로 감염시킨 J774A.1 세포에서 크게 차이가 없었으나, 6시간부터는 apoptosis의 전형적인 지표인 DNA 분절을 관찰할 수 있었다. 이 전기영동상의 결과는 Fig. 6에서의 생존 세포수의 감소와 일치한다. 따라서 포도구균 감염에 의한 J774A.1 세포독성 효과는 세균에 의하여 유도되는 apoptosis 때문임을 확인할 수 있었다. S114 포도구균에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis 유도는 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색하여 유세포분석기로 분석한 결과로도 확인할 수 있었다. Fig. 8에서 보이는 것과 같이 균 감염 후 12시간에는 PI로 염색된 사망세포와 함께 annexin V에만 염색된 초기 apoptosis 및 두 가지에 모두 염색된 말기 apoptosis에 접어든 세포들을 분명하게 관찰할 수 있었다. S114 포도구균 감염에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis 과정에서 세포의 apoptosis에 관여하는 일부 암유전자 (*bcl-2*, *bax*)의 발현 여부와 apoptosis의 신호전달 과정에 관여하는 caspase 계열의 효소작용으로 인

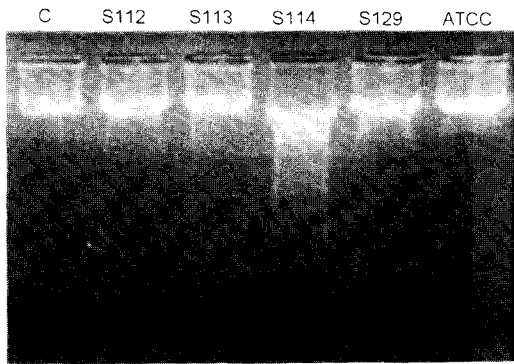


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells infected with designated strains of *S. aureus* using transmembrane apparatus for 12 hours.

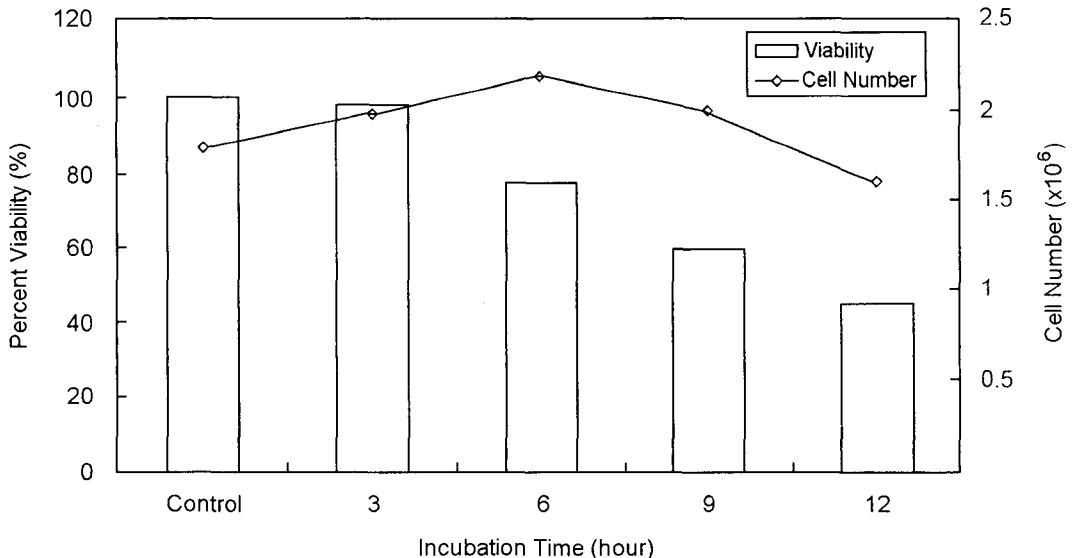


Figure 6. Percent viability and total cell number of J774A.1 cells infected with *S. aureus* S114 for designated time. One representative experiment out of four is shown.

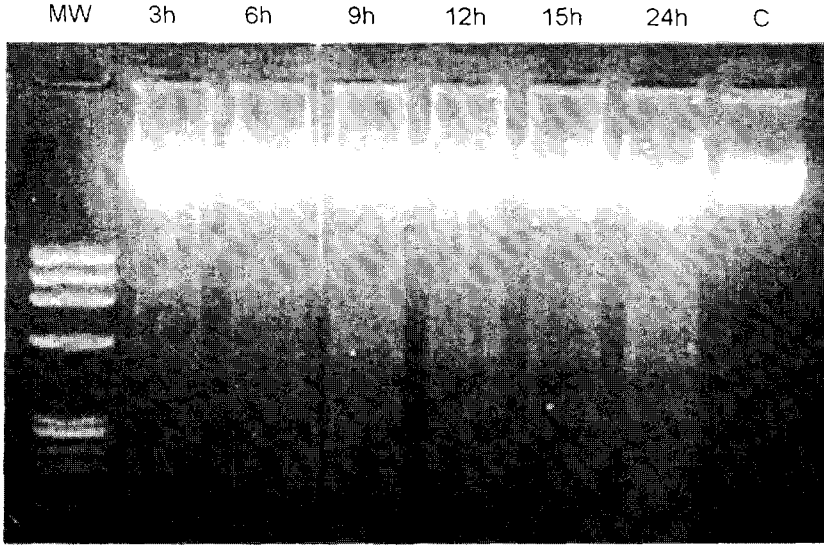


Figure 7. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from J774A.1 cells infected with *S. aureus* 114 for designated time.

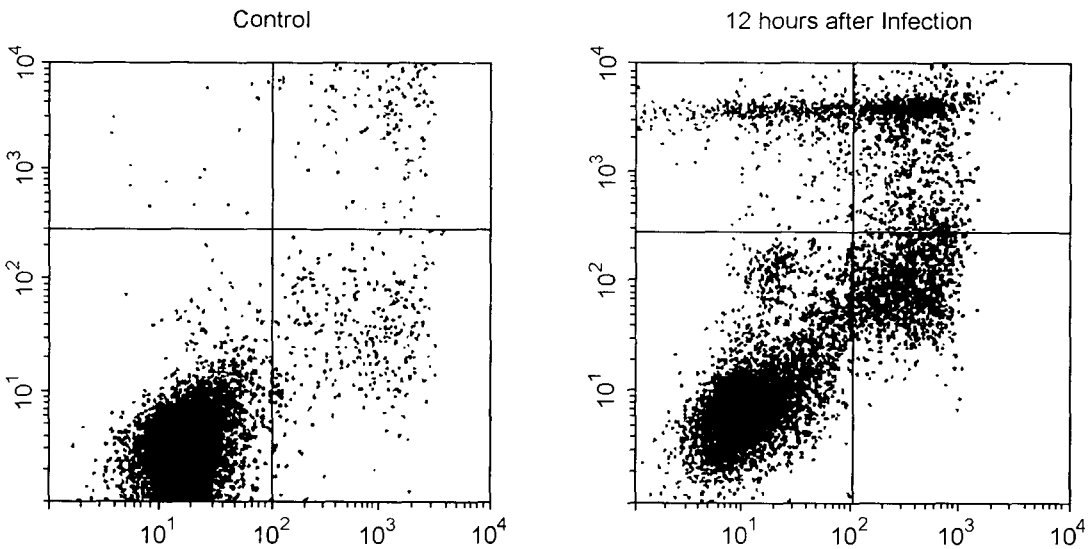


Figure 8. Dotted diagram of annexin V-FITC / propidium iodide flow cytometric analysis of apoptosis of J774A.1 cells infected with *S. aureus* S114 for 12 hours. LLQ (both negative); viable cell, RLQ (annexin V positive); early apoptotic cells, LUQ (propidium iodide positive); dead cells, RUQ (both positive); late apoptotic cells.

한 PARP (poly(ADP-ribose) polymerase)의 단백질 해 여부를 조사하였다. 포도구균 감염 후 apoptosis 과정을 거치는 J774A.1 세포에서 bcl-2와 bax 암유전자 산물의 발현은 시간이 지남에 따라 발현되는 강도가 증가되었으며, PARP가 cleavage에 의한 89 kDa의 band도 전기영동상에서 DNA 분절

이 나타나기 전인 균 감염 후 3시간부터 나타나기 시작하였다 (Fig. 9).

고 찰

세포의 죽음은 두 가지 형태가 존재한다. 하나

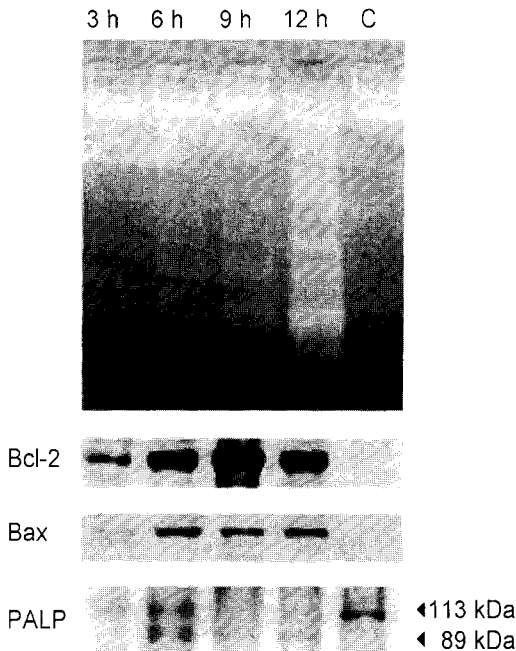


Figure 9. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts and western blot analysis of Bcl-2, Bax and PARP cleavage from J774A.1 cells infected with *S. aureus* S114 for designated time.

는 병적인 상태로서 세포를 둘러싼 환경이 급격하게 변화했을 때 세포가 더 이상 적응할 수 없게 되어 세포팽창과 이온 농도 변화 그리고 막 물의 유입으로 세포가 파괴되는 괴사와, 다른 하나는 programmed cell death 혹은 apoptosis로 부르는 것으로서 정상적인 성장 과정과 homeostasis 과정에서 중요한 역할을 한다⁶⁾.

세포의 apoptosis는 일부 세균성 감염 질환에서도 관찰된다. 병원성 세균의 측면에서 숙주를 공격하는 방법으로서 apoptosis를 유발하는 것은 효과적인 수단이다. 특히 다형핵백혈구나 대식세포와 같은 전문적인 탐식세포를 apoptosis로 유도함으로써, 숙주의 방어기작에 대하여 적극적으로 대처할 수 있을 것이다. 대식세포는 탐식작용 이외에도 세균 자극에 의하여 다양한 proinflammatory cytokine을 생산 분비하여 급성 염증 반응을 시작하게 하며, 탐식한 항원을 처리하여 획득 면역 반응을 매개하는 항원 제시 세포로 역할을 하며, 세균의 LPS, ds-RNA, T세포의 IFN- γ 등의 자극으로 활성화되면 ROI와 TNF를 생산하여 중앙 세포를 파괴하는 등 면역계에 있어 중추적인 역할을 담

당하는 세포이다^{5,15)}. 따라서 세균성 감염에 의한 대식세포의 apoptosis는 숙주의 염증 반응 유발, 염증에서 회복, 그리고 획득 면역을 확보하는 등에 필요한 적절한 신호를 만드는데도 어떤 역할을 수행한다고 알려져 있다^{1,7)}.

대식세포에 대한 세균의 apoptosis 유발은 여러 가지 세균에서 보고되고 있다. Zychlinsky 등¹⁷⁾은 침입능이 있는 *S. flexneri*가 생쥐 대식세포 유래의 J774A.1 세포주에 apoptosis를 유도한다고 최초로 보고하였으며, Arai 등²⁾은 *Salmonella choleraesuis*도 생쥐 대식세포에 apoptosis를 유도한다고 하였으며, 이 과정에서 IL-10의 역할에 대해 보고한 바 있다. Kato 등⁸⁾은 치주 질환을 일으킨다고 알려진 균 중에 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*도 대식세포의 apoptosis를 유도할 수 있어서 감염의 시작과 치주 질환의 발생에 중요한 역할을 할 것이라고 말했으며, Khelelf 등⁹⁾은 *Bordetella pertussis*가 생산하는 adenylate cyclase-hemolysin이 J774A.1 세포주에 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 저자들도 *Klebsiella pneumoniae*에 의한 생쥐 유래 대식세포의 apoptosis 현상을 보고한 바 있으며, 대식세포 뿐만 아니라 사람 유래 T-세포에 대한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 apoptosis 유발효과를 이미 보고한 바 있다^{11,12)}.

본 연구에서는 대식세포가 포도구균에 노출되었을 때도 apoptosis가 유도되는지를 조사하여 표준균주 ATCC 13565와 네 가지 임상분리균주에서 J774A.1 세포의 apoptosis를 유도함을 확인하였으며, 이 다섯 가지 포도구균 균주를 대상으로 대식세포를 apoptosis에 빠뜨리는 관련인자를 조사하였다. 대식세포 자체의 활성화에 의한 apoptosis 유발 가능성을 배제하기 위하여 LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극하고 실시한 실험에서 포도구균을 감염시킨 경우에만 apoptosis가 유도되었다. 따라서 J774A.1 세포의 apoptosis는 세포 자체의 활성화보다는 포도구균 감염이 직접적인 원인으로 작용한 것임을 알 수 있다. 다음으로 NO synthase의 억제제인 N^G-monomethyl-L-arginine을 전처리하고 실시한 실험에서는 S114 및 S129 포도구균 감염의 경우에만 apoptosis가 유도됨을 관찰하였다. 이 두 가지 균주에서 actin polymerization을 억제시켜서 대식세포로 하여금 탐식작용을 못하게 하는 cytochalasin D를 전처리한 경우, S129 포도구균 감염에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis는 거의 관찰할 수 없었다. 즉, 포도구균에 의한 대식세포의

apoptosis는 다른 세균에서와 마찬가지로 대부분이 탐식작용에 기인한 것임을 알 수 있으며, 탐식과정 중에서도 특히 NO의 생성이 중요한 유발인자임을 확인할 수 있다.

그러나 탐식작용과는 무관하게 대식세포의 apoptosis를 유도한 S114 포도구균의 경우에는 apoptosis를 유도하는 다른 인자의 존재 가능성을 시사하는 바, 저자들은 이를 확인하기 위하여 추가적인 실험을 진행하였다. 대식세포와 세균의 직접적인 접촉을 못하게 할 목적으로 transwell culture apparatus를 사용하여 실시한 실험에서도 S114 포도구균은 J774A.1 세포의 apoptosis를 유도하였다. 그러나 S114 포도구균을 배양한 배양액, 포도구균을 초음파 파쇄하여 얻은 균체 성분, 및 열로 불활성화 시킨 포도구균 등에서는 J774A.1 세포의 apoptosis 관찰할 수 없었다 (data not shown). 또한 T 세포에 apoptosis를 유발한다고 알려져 있고 superantigen으로도 잘 알려진 staphylococcal enterotoxin B와 sphingomyelinase 등의 몇 가지 독소는 J774A.1 세포에 apoptosis를 유도하지 못하였다 (data not shown). 따라서 S114 포도구균에 의한 J774A.1 세포의 apoptosis는 살아있는 세균이 생산하는, 매우 불안정한 대사산물에 의하여 유도된다는 것을 유추할 수 있다. 이러한 apoptosis 유발인자는 이미 알려져 있는 다른 독소와는 다른 것으로 생각되며, 이미 활성화된 숙주세포에서도 작용하고, 숙주세포의 NOS 활성화와도 무관한 것으로 보인다. S114 포도구균 감염 후 apoptosis 과정을 거치는 J774A.1 세포는, bcl-2와 bax 암유전자 발현이 시간이 지남에 따라 증가하고, 전기영동상에서 DNA 분절이 나타나기 전인 균 감염 후 3 시간부터 PARP가 조각나서 89 kDa의 band가 나타나기 시작하는 등, 전형적인 caspase-dependent apoptosis 양상을 보인다.

결론적으로 본 연구를 통하여 숙주 대식세포의 apoptosis를 유도하는 포도구균의 감염에서 탐식작용과 NO를 비롯한 살균작용 이외에도 일부 세균에서는 caspase-dependent apoptosis를 유도하는 세균 생산 물질이 중요한 역할을 담당한다는 것을 알 수 있었다. 이 물질에 대한 상세한 정보는 계속 연구중이며, 이를 바탕으로 숙주 기생체간의 관계에 대한 새로운 해석이 가능할 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 면역계의 주요 effector cell인 대식세포가 포도구균에 노출되었을 때 apoptosis가 유도되는지를 조사하였고, 이 과정에서 포도구균과 대식세포의 관련인자를 추적하였으며, 대식세포의 apoptosis 관련 유전자 산물의 발현 변화를 관찰하였다. 포도구균 표준균주와 임상분리균주 대부분이 J774A.1 세포주에 apoptosis를 유도하였다. 포도구균에 의한 대식세포의 apoptosis는 다른 세균에서와 마찬가지로 대부분이 탐식작용에 기인한 것이며, 탐식과정 중에서도 특히 NO의 생성이 중요한 유발인자임을 확인하였다. 그러나 S114와 같은 일부 균주는 살아있는 세균이 생산하는, 매우 불안정한 apoptosis 유발인자를 생성하며, 이는 이미 활성화된 숙주세포에서도 작용하고, 숙주세포의 NOS 활성화와도 무관하게 작용하였다. 이 경우에도 bcl-2와 bax 암유전자 발현이 시간이 지남에 따라 증가하고, 전기영동상에서 DNA 분절이 나타나기 전부터 PARP가 조각나는 등, 전형적인 caspase-dependent apoptosis 양상을 보였다. 결론적으로 본 연구를 통하여 숙주 대식세포의 apoptosis를 유도하는 포도구균의 감염에서 탐식작용과 NO를 비롯한 살균작용 이외에도 일부 세균에서 caspase-dependent apoptosis를 유도하는 물질이 중요한 역할을 담당한다는 것을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Aliprantis AO, Yang R, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* **285**: 736-739, 1999.
- 2) Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y: Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem Biophys Res Comm* **213**: 600-607, 1995.
- 3) Bhakdi S, Tranum-Jensen J: Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* **55**: 733-751, 1991.
- 4) Bone RC: How gram-positive organisms cause

- sepsis. *J Crit Care* **8**: 51-59, 1993.
- 5) Gordon S: The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* **149**: 685-688, 1998.
 - 6) Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312, 1998.
 - 7) Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghorri N, Falkow S, Zychlinsky A: The *Salmonella* invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2396-2401, 1999.
 - 8) Kato S, Muro M, Akifusa S, Hanada N, Semba I, Fujii T, Kowashi Y, Nishihara T: Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect Immun* **63**: 3914-3919, 1995.
 - 9) Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N: *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: Role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* **61**: 4064-4071, 1993.
 - 10) Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM: Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* **12**: 224-242, 1999.
 - 11) Lee SH, Jeong SJ, Yoo SH, Park SM, Jeong MH, Yee ST, Seo SY, Kim JM: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptosis of Jurkat cell line through the cleavage of Poly (ADP-ribose) polymerase. *Korean J Microbiol* **33**: 507-515, 1998.
 - 12) Lee SH, Kim SS, Jeong MH, Seo SY, Song JM, Kim HS, Yee ST, Park SM, Kim JM: Apoptosis in murine peritoneal macrophages induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Immunol* **18**: 571-582, 1996.
 - 13) Neely JL: *Staphylococcus aureus*: a continuing problem. *W V Med J* **90**: 238-241, 1994.
 - 14) Sheagren JN: *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen. *N Engl J Med* **310**: 1437-1442, 1984.
 - 15) Tarkowski A, Wagner H: Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus*: can the tissue injury be reduced by modulating the host's immune system? *Mol Med Today* **4**: 15-18, 1998.
 - 16) Verhoef J, Mattsson E: The role of cytokines in Gram-positive bacterial shock. *Trends Microbiol* **137**: 136-140, 1995.
 - 17) Zychlinsky A, Prevost MCJ, Sansonetti PJ: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**: 167-169, 1992.
 - 18) Zychlinsky A, Sansonetti PJ: Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest* **100**: 493-496, 1997.
-