

## 이질아메바에 의한 인체 대장상피세포주 HT-29에서의 interleukin-8 유전자의 발현

김정복<sup>1)\*</sup>, 정헌채<sup>2)</sup>, 임경일<sup>3)</sup>, 조양자<sup>1)</sup>, 김정룡<sup>2)</sup>

한양대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1)</sup>, 서울대학교 의과대학 내과학교실 및 간연구소<sup>2)</sup>, 연세대학교 의과대학 기생충학교실<sup>3)</sup>

**국문초록:** 이질아메바에 의한 장염 환자의 조직 또는 이질아메바를 실험적으로 감염시킨 동물의 조직 검사에서 호중구의 침윤이 특징적으로 관찰된다. 그러나 이와같은 호중구의 침윤을 설명할 수 있는 기전에 대한 연구는 매우 미흡하다. 따라서 본 연구자들은 아메바 감염 초기에 인체 대장상피 세포에서 interleukin-8(IL-8)이 유도되어 호중구 침윤과 같은 염증반응이 유발될 것이라는 가설을 설정하였다. 이를 위하여 인체 대장상피세포주인 HT-29에 이질아메바 영양형을 실험적으로 노출시킨 뒤 발현되는 IL-8 mRNA를 역전사 증합효소법(reverse transcriptional polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 검사함과 동시에 발현된 IL-8 mRNA를 인공적으로 합성시킨 표준 RNA와 RT-PCR법을 이용하여 정량하였다. 실험 결과 이질아메바 영양형에 노출된 30분 후 부터 IL-8 mRNA가 발현되기 시작하였다. 그리고 그 발현 분자수는 노출 시간의 증가에 따라 계속 증가하여 3시간 대에는  $3.1 \times 10^7$  molecules/ $\mu$ g total RNA를 나타내었다. 동시에 IL-8 mRNA의 발현은 노출시킨 이질아메바 영양형의 수에 비례하였다. 즉, HT-29/아메바 영양형의 비율이 10:1인 경우 IL-8 mRNA의 발현 분자수는  $1.2 \times 10^7$  molecules/ $\mu$ g total RNA로 나타났다. 이와같은 IL-8 mRNA의 발현은 IL-8 단백질 분비로 이어짐을 ELISA 검사로 확인할 수 있었다. 한편 이질아메바 파쇄액(lysate)도 대장상피세포주인 Caco-2에서 IL-8 mRNA 발현을 유도하였다. 결론적으로 본 실험은 이질아메바 감염 초기에 대장상피세포로부터 IL-8이 발현되며, 이에 의하여 염증반응이 촉발될 가능성이 있음을 시사해 준다.

### 서 론

침습성 이질아메바(*Entamoeba histolytica*) 감염 증은 전세계적으로 연간 약 4천만명이 감염되는 것으로 추정되고 있으며, 사망자 수도 4만명 이상이 보고되고 있다(Walsh, 1988). 이러한 아메바 감염증이 질환으로서의 특성을 나타내려면 먼저 장관 점막층의 침입이라는 과정이 필요하다.

최근 proinflammatory cytokine인 interleukin (IL)-1과 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )를 대장상피세포인 Caco-2에 투여했을 때 장세포에 아메바의 부착이 증가된다는 보고(Flores-Romo et al., 1994)가 있음

에 비추어 cytokine은 아메바 감염증에 있어서 중요한 역할을 담당할 것으로 추정된다. 그러나 이러한 cytokine이 아메바 감염증 초기에 어디서 발현되는지는 아직까지 확인된 바가 없다. 단지 대장상피세포 층을 뚫고 들어가서 만나게 되는 면역세포에서 IL-1 $\alpha$  및  $\beta$ , tumor necrosis factor(TNF)와 같은 cytokine들이 발현된다는 보고들(Seguín and Chadee, 1992; Wang et al., 1992)이 최근 발표된 바 있다. 그러므로 아메바에 감염된 대장상피세포에서 발현되는 cytokine에 대한 연구는 아메바 감염증의 병태생리를 규명하는데 있어서 필수적인 과정으로 판단된다. 그러나 아메바 감염에 의한 대장상피세포에서의 변화 중 cytokine에 대한 연구는 아직까지 세계적으로 대단히 미흡하다.

대장상피세포는 외부로부터 인체 내부환경을 보호하는 단순한 장벽으로서의 역할 이외에도 점막면역계의 중추적인 기능을 담당하고 있다. 즉, 인체 대장상피세포는 항원을 processing하여 T 세포에게 제시하기도 하고, 세균감염 등과 같은 외부 자극에

• 논문접수 1995년 8월 21일, 수정후 게재확정 1995년 9월 22일

• 이 논문은 1995년도 교육부 기초의학술연구비와 한국간염연구소의 연구비 지원으로 수행되었음.

\* 별첨 요청 저자

의해 HLA class II 분자 또는 intercellular adhesion molecule이 발현되기도 한다. 또한 염증반응을 매개하는 IL-1, IL-6, IL-8과 같은 각종 cytokine을 발현할 수 있는 능력을 지니고 있다(Jung et al., 1995a). 특히 사람의 호중구 활성화 펩티드(neutrophil-activating peptide, NAP-1)로 알려지고 있는 IL-8은 강력한 호중구 화학주성 인자이면서 활성인자이기도 하다(Oppenheim et al., 1991). 이와 같은 IL-8은 단핵구, 섬유아세포, 혈관내세포 또는 상피세포가 lipopolysaccharide(LPS) 혹은 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine에 자극을 받았을 때 생성된다. 때로는 psoriasis(Schroder et al., 1989), 궤양성대장염(Mahida et al., 1992), 류마티스 관절염(Seits et al., 1991)과 같은 병적조건 또는 어떤 세균감염(Jung et al., 1995a)에 의해서 국소적으로 생성이 증가되기도 한다. 이와같이 IL-8은 병리기전상 호중구의 침윤이라는 중요한 성질을 지니고 있으므로 오늘날 각종 염증성 질환에 있어서 면역병리의 유발인자의 하나로 지목받고 있다. 그러나 아메바 감염증에서 IL-8 유전자가 어떻게 발현되는 지에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구자들은 아메바 감염 초기에 인체 대장상피세포에서 각종 cytokine이 유도되어 염증반응이 촉발될 것이라는 가설을 설정하였다. 본 연구에서는 이러한 cytokine 중 IL-8에 초점을 맞추어 아메바 감염증에 있어서 IL-8의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 이질아메바의 배양 및 인체 대장상피세포주 배양

이질아메바는 연세의대 기생충학교실에서 TYI-S-33 배지에서 무균 배양하고 있는 YS-27 strain을 이용하였다(Chang et al., 1994).

인체 대장상피세포주로는 HT-29(ATCC HTB 38)와 Caco-2(ATCC HT-37)를 사용하였다. 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, U.S.A.)이 첨가된 DMEM(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)을 사용하여 monolayer로 키운 뒤, 실험에 이용하였다.

아메바를 멸균된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 뒤, 일정 수의 HT-29 세포: 이질아메바의 비율(HT-29/Eh ratio)에 맞추어 배양세포에 첨가하였다. 동시에 이질아메바 5 × 10<sup>5</sup>개를 질소를 이용한 세포분쇄기(cell disruption bombs, Parr Instrument Company, Moline, ILL, U.S.A.)를 사용하여 아메바 파쇄액(lysate)을 만든 다음, 인체 대장상피세포에 작용시켰다.

한편 이질아메바 영양형 수 확인은 hemocytometer와 현미경을 이용하였다. 그리고 대장상피세

포수 계산은 trypan blue와 현미경을 이용하여 시행하였다.

2. RNA 추출과 IL-8 유전자의 검색을 위한 역전사 PCR(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

2-1. IL-8 mRNA의 PCR 증폭을 위한 oligonucleotide primer의 합성: IL-8 mRNA의 primer 염기서열은 sense primer는 5'-ATGAC-TTCCAAGCTGGCCGTGGTC-3'였고, antisense primer는 5'-TCTCAGCCCTCTCAAAAAGTCTT-3'였다. 대조군으로 사용한  $\beta$ -actin의 primer 염기서열은 sense primer는 5'-TGACGGGGTCACCC-ACACTGTGCCCATCTA-3'였고, antisense primer는 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGA-GGG-3'였다. 이들의 PCR product의 크기는 IL-8의 경우는 289 bp,  $\beta$ -actin의 경우는 661 bp였다. 한편 각 primer들은 적어도 한 개의 intron을 포함하도록 설계되어, 오염된 genomic DNA가 증폭되더라도 그 크기에 의하여 cDNA로부터 증폭된 PCR product와 쉽게 구별되도록 하였다.

이들 oligonucleotide primer들은 Applied Biosystems사의 381A DNA 합성기를 사용하여 합성하였으며, oligonucleotide purification cartridge(OPC Oligo-Pak column, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A.)를 이용하여 정제하였다.

2-2. IL-8 mRNA 정량을 위한 PCR 증폭

1) 배양세포로부터 RNA 추출: 이질아메바에 노출시킨 배양세포로부터의 RNA는 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform법을 이용하여 추출하였다(Chomczynski and Sacchi, 1987). 추출한 RNA의 integrity는 gel 전기영동법 또는 Northern blot법에 의하여 분석하였다.

2) in vitro transcription: 추출한 1  $\mu$ g의 total RNA를 0.1  $\mu$ g의 oligo(dT)<sub>15</sub>와 함께 37°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 만들었다. 이때 사용한 buffer는 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 1 mM, 20 unit의 RNasin ribonuclease inhibitor(Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.)와 50 unit의 역전사효소(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Gibco Research Laboratories, Gaithersburg, MD, U.S.A.)로 구성되었다. 역전사 후 95°C에서 10분간 역전사효소를 비활성화시킨 뒤, 얼음에 담귀 냉각시켰다.

3) cDNA PCR: 상기의 방법으로 만든 cDNA를 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M씩의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 그리고 25 pmol씩의 sense primer와 antisense primer가 포함된 100  $\mu$ l의 buffer에서 PCR thermal cycler(GenAmp PCR System 9600,

Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn., U.S.A.)로 증폭시켰다. 반응액을 95°C에서 5분간 가열한 후 85°C에서 7분 가량 유지시키면서 각 시험관에 2.5 unit의 *Taq* DNA 중합효소(Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.)를 첨가하였다. 증폭 프로그램은 95°C에서 45초간 denaturation시키고, 65°C에서 1분 40초 동안 annealing과 extension이 일어나도록 하였다. 이런 cycle의 총 횟수는 33회로 시행하였다.

음성대조군으로는 cDNA 합성 과정에서 RNA 대신 증류수를 넣어 PCR을 시행한 것을 사용하였고, 양성대조군으로는 IL-8 mRNA를 발현하는 것으로 알려진 5637 인체 방광암세포주(ATCC HTB 9)로부터 추출한 RNA를 이용하였으며,  $\beta$ -actin에 대하여는 HUT 78 인체 T 림프종 세포주(ATCC TIB 161)로부터 추출한 RNA를 이용하였다.

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

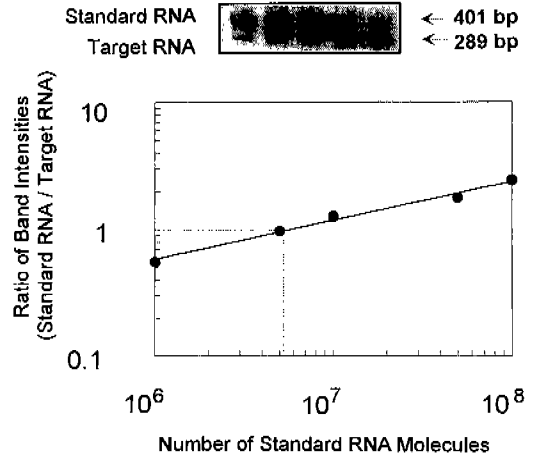
3. 발현된 IL-8 유전자의 정량

1) 정량적 역전사 PCR(quantitative RT-PCR)에 사용될 표준 RNA(standard RNA) 제작: IL-8 mRNA의 정량을 위하여 표준 RNA를 제작하였다. 이 표준 RNA는 역전사의 첫 단계부터 세포에서 추출한 RNA와 동일한 시험관에서 사용가능하도록 설계, 제작하였다. 따라서 표준 RNA는 각 cytokine gene을 증폭할 수 있는 sense primer와 antisense primer들의 염기 서열이 일렬로 연결되도록 설계하였으며, 세포로부터 추출된 RNA에서 증폭된 목표(target) RNA의 PCR product와 표준 RNA로부터 증폭된 PCR product의 크기가 약 100 bp 정도 차이나게 설계하였다. 즉, 표준 RNA에서 증폭된 IL-8의 product 크기는 401 bp이고,  $\beta$ -actin의 product의 크기는 520 bp로 설계하여 그 차이가 각각 112 bp 및 141 bp로 나타나게 하였다.

이러한 설계에 입각하여 표준 RNA의 모체가 되는 플라스미드인 pHCCQ를 제작한 뒤, *in vitro* transcription 방법에 의하여 표준 RNA를 제작하였다(Jung *et al.*, 1995b).

2) 정량적 역전사 PCR(quantitative RT-PCR): 발현된 cytokine 유전자를 정량하기 위하여 세포에서 추출한 1  $\mu$ g의 RNA에 2배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 한 시험관에서 반응시키는 방법을 사용하였다.

추출한 1  $\mu$ g의 RNA와 연속 희석한 표준 RNA를 동일한 시험관에 넣고 역전사를 시행하였다. 그 뒤, 이렇게 얻은 cDNA에 IL-8 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행한 뒤, PCR product를 전기영동하여 Polaroid film에 그 image를 기록하였다. Polaroid film을 영상 밀도계(imaging densitometer



**Fig. 1.** Quantitation of IL-8 mRNA using RT-PCR. Varying copy numbers of synthetic standard RNA were co-reverse transcribed with 1  $\mu$ g of cellular RNA extracted from colon epithelial cells exposed to *E. histolytica* trophozoites. After reverse transcription, the cDNA reaction mixture was amplified using IL-8 specific primers. Electrophoresis of PCR products were done and the intensities of their band were quantified using imaging densitometer. At the equimolar point, the number of mRNA molecules for IL-8 could be calculated.

GS-670, BioRad, Hercules, CA, U.S.A.)로 처리하여 각 PCR band의 peak에 해당하는 면적을 구하였다. 그 뒤 목표 RNA로부터의 PCR product와 표준 RNA로부터의 PCR product의 면적비를 이중로그 스케일을 이용하여 첨가된 세포 RNA의 양과 표준 RNA의 분자수에 대하여 plot하여 표준곡선을 그린 뒤, 등전점(equimolar point)을 구하였다. 그 뒤, 각 sample 내에 존재하는 IL-8 mRNA 양을 계산하였다(Fig. 1).

4. 이질아메바 영양형에 노출시킨 대장상피세포로부터 분비되는 IL-8 단백질의 측정

이질아메바 영양형에 노출시킨 대장상피세포의 배양상층액을 이용하여 대장상피세포로부터 분비된 IL-8 단백질을 ELISA 방법으로 측정하였다. 사용한 ELISA 방법은 quantitative sandwich enzyme immunoassay법이었다. 즉, 인체 IL-8에 대한 단세포군 항체가 coating된 microtiter plate에 배양상층액과 표준 IL-8을 가한 다음, 일정시간 배양한 뒤 결합되지 않은 IL-8을 제거하였다. 그리고 IL-8에 대한 horseradish peroxidase-linked polyclonal antibody를 일정시간 동안 가한 뒤, 결합되지 않은 항체-효소 결합체를 제거한 다음, 기질용액(tetramethylbenzidine)과 hydrogen peroxide를 첨가하

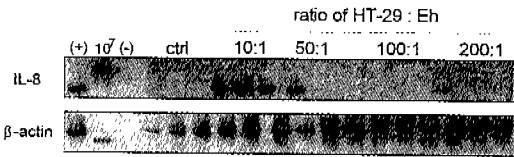
여 실온에서 20분 동안 발색시켰다. 2 N 황산을 사용하여 반응을 정지시킨 후, microtiter plate를 광파장 450 nm에서 ELISA reader(Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, U.S.A.)로 광학지수(optical density)를 측정하였다. 이상의 전과정은 R & D Systems사(614 McKinley Place N.E., Minneapolis, MN, U.S.A.)가 개발한 kits(Quantikine human IL-8 immunoassay D8000)를 이용하였다. 그리고 본 실험에서 사용한 ELISA kit의 최소측정범위는 20 pg/ml이었다.

결 과

1. 대장상피세포와 이질아메바 영양형의 비율에 따라 발현되는 IL-8 mRNA의 변화

대장상피세포 HT-29과 이질아메바 영양형의 비율(HT-29/Eh ratio)에 따른 IL-8 mRNA의 발현을 알아보기 위하여 HT-29/Eh ratio를 10:1, 50:1, 100:1, 200:1로 맞추어 노출 3시간을 기준으로 실험을 시행하였다.

이 결과 HT-29/Eh ratio가 10:1에서 강한 band가 보였고, 50:1 및 100:1에서는 미약한 발현을 나타냈다. 반면, 200:1에서는 IL-8 mRNA의 발현을 전혀 관찰할 수 없어서 IL-8 mRNA의 발현은 이질아메바 영양형의 노출수에 비례함을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 이후 실험에서는 HT-29/Eh ratio를 10:1-20:1로 조정하여 시행하였다.



**Fig. 2.** IL-8 mRNA expression for numbers of HT-29 cell vs. numbers of exposed-*E. histolytica*. After HT-29 cells were exposed to *E. histolytica* for 3 hours, cellular RNAs were extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. And IL-8 mRNA was observed by RT-PCR using specific primers. The (+) represents positive control for IL-8 and β-actin. The (-) represents negative control which was performed by omitting the RNA during cDNA synthesis and specific PCR amplification. The 10<sup>7</sup> shows the intensity for RT-PCR using 10<sup>7</sup> molecules of synthetic standard RNA instead of cellular RNA. The "ctrl" represents the band of RT-PCR products for cellular RNA extracted from HT-29 cells which did not expose to *E. histolytica* trophozoites. β-actin in included as a control since it is a constitutively expressed "house-keeping" gene.

2. 대장상피세포를 이질아메바 영양형에 실험적으로 노출시킨 후 발현되는 IL-8 mRNA의 시간에 따른 변화

HT-29 세포를 이질아메바 영양형에 노출시킨 뒤 발현되는 IL-8 mRNA를 역전사 PCR로 검사하였다. 이 때 대장상피세포와 이질아메바 영양형의 비율은 20:1로 조정하여 시행하였다.

실험 결과 노출 30분에서 부터 IL-8 mRNA가 발현되기 시작하여 노출 3시간까지 지속되었다(Fig. 3).

3. 이질아메바 lysate에 의한 IL-8 mRNA 발현

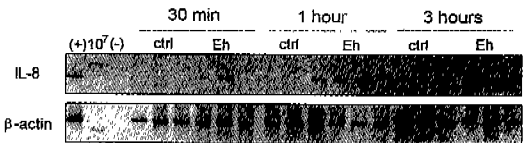
이질아메바 자체 뿐만 아니라 lysate 또한 대장상피세포에서 IL-8 mRNA를 발현시킬 수 있는지의 여부를 역전사 PCR법으로 검사하였다.

실험 결과 Caco-2 세포에서 IL-8 mRNA band가 관찰되었다(Fig. 4).

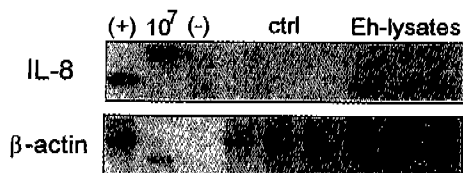
4. 발현된 IL-8 mRNA의 정량

이질아메바에 노출시킨 대장상피세포에서 발현되는 IL-8 mRNA를 본 연구자들이 설계 제작한 표준 RNA와 역전사 PCR법을 이용하여 정량하였다.

실험 결과 이질아메바에 노출시킨 30분 후 5.0 × 10<sup>5</sup> molecules/μg total RNA, 노출 1시간에 2.0 × 10<sup>7</sup> molecules/μg total RNA, 노출 3시간에 3.1 × 10<sup>7</sup> molecules/μg total RNA를 나타내어 노출시간이 증가할 수록 IL-8 mRNA 발현이 계속



**Fig. 3.** IL-8 mRNA profiles in HT-29 cells exposed to *E. histolytica*. After the colon epithelial cells, HT-29, were exposed to *E. histolytica* during 30 minutes, 1 and 3 hours, cellular RNAs were extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. The ratio of HT-29 cells/*E. histolytica* was 20:1. IL-8 mRNA was observed by RT-PCR using specific primers. The (+) represents positive control for IL-8 and β-actin. The (-) represents negative control which was performed by omitting the RNA during cDNA synthesis and specific PCR amplification. The 10<sup>7</sup> shows the intensity for RT-PCR using 10<sup>7</sup> molecules of synthetic standard RNA instead of cellular RNA. The ctrl represents the band of RT-PCR products for cellular RNA extracted from HT-29 cells which did not expose to *E. histolytica* trophozoites. β-actin in included as a control since it is a constitutively expressed "housekeeping" gene.



**Fig. 4.** IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells treated with lysates of *E. histolytica*. After Caco-2 cells were treated with lysates of *E. histolytica* trophozoites for 3 hours, cellular RNAs were extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. And IL-8 mRNA was observed by RT-PCR using specific primers. The (+) represents positive control for IL-8 and  $\beta$ -actin. The (-) represents negative control which was performed by omitting the RNA during cDNA synthesis and specific PCR amplification. The  $10^7$  shows the intensity for RT-PCR using  $10^7$  molecules of synthetic standard RNA instead of cellular RNA. The "ctrl" represents the band of RT-PCR products for cellular RNA extracted from Caco-2 cells which did not treated with lysates of *E. histolytica* trophozoites.  $\beta$ -actin in included as a control since it is a constitutively expressed "housekeeping" gene.

**Table 1.** Quantitation of IL-8 mRNA expressed in HT-29 cells exposed to *E. histolytica*.

| Exposure time | Control | <i>E. histolytica</i> -exposed |
|---------------|---------|--------------------------------|
| 30 minutes    | ND      | $5.0 \times 10^5$              |
| 1 hour        | ND      | $2.0 \times 10^7$              |
| 3 hours       | ND      | $3.1 \times 10^7$              |

After HT-29 cells were exposed to *E. histolytica* trophozoites for 30 minutes, 1 and 3 hours, cellular RNAs were extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. The ratio of HT-29 cells/*E. histolytica* was 20:1. Quantitation of IL-8 mRNA was obtained by RT-PCR using specific primers for IL-8 and synthetic standard RNA which was *in vitro* transcribed from pHCCQ. Results are expressed as the number of chemokine transcripts/ $\mu$ g total cellular RNA. Our experiment system could only detect more than  $5.0 \times 10^3$  IL-8 mRNA molecules/ $\mu$ g total RNA. ND represents not detected.

증가함을 알 수 있었다(표 1).

그리고 이질아메바 영양형의 노출세포수에 따른 IL-8 mRNA의 발현 분자수는 HT-29/*Eh* ratio 10:1 에서  $1.2 \times 10^7$  molecules/ $\mu$ g total RNA로 나타났다(표 2).

**Table 2.** Quantitation of IL-8 mRNA expression for numbers of HT-29 cells vs. numbers of exposed *E. histolytica*.

| control | Ratio of HT-29 cells: <i>E. histolytica</i> |                 |                   |                   |
|---------|---|-----------------|-------------------|-------------------|
|         | 10:1  | 50:1            | 100:1             | 200:1             |
| ND      | $1.2 \times 10^7$                           | $5 \times 10^6$ | $< 5 \times 10^3$ | $< 5 \times 10^3$ |

After numbers of HT-29 cells and *E. histolytica* trophozoites were adjusted to the above shown, the HT-29 cells were exposed to *E. histolytica* for 3 hours. And then, cellular RNAs were extracted by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. Quantitation of IL-8 mRNA was obtained by RT-PCR using specific primers for IL-8 and synthetic standard RNA was *in vitro* transcribed pHCCQ. Results are expressed as the number of IL-8 transcripts/ $\mu$ g total cellular RNA.

5. 이질아메바에 노출시킨 대장상피세포로부터 분비되는 IL-8 단백질의 측정

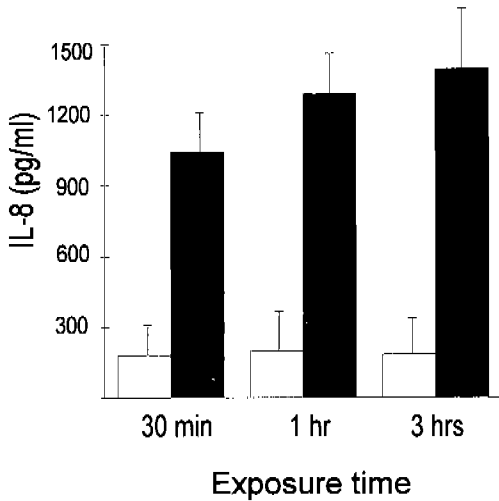
이질아메바에 노출시킨 뒤 발현되는 mRNA가 과연 IL-8 단백질 합성으로 까지 이어지는지의 여부를 확인하기 위하여 배양상층액으로부터 IL-8 단백질을 ELISA로 측정하였다.

측정 결과 이질아메바 영양형에 노출시킨 HT-29 세포에서 측정된 IL-8 단백질의 양은 IL-8 mRNA의 발현 pattern과 유사함을 알 수 있었다(그림 5).

고 찰

이질아메바가 대장에 감염된 초기에는 대장상피세포와의 접촉이 필수적이다. 그리고 이질아메바를 실험동물의 대장점막에 감염시켰을 때 호중구의 침윤이 특징적으로 나타난다(Chadee and Meero-vitch, 1985; Martinez-Palomo *et al.*, 1989). 그러나 이질아메바가 대장상피세포에 접촉한 이후 염증반응을 유발시키는데 필요한 chemo-tactic signal에 관해서는 별로 알려진 바가 없다. 이에 따라 이질아메바 감염 초기의 염증반응을 규명하기 위하여, 본 연구자들은 아메바에 감염된 인체대장상피세포에서 IL-8이 유도되어 염증반응이 유발될 것이라는 가설을 설정하였다. 이 가정은 chemokine IL-8이 염증반응을 유발시킬 수 있다는 점(Oppenheim *et al.*, 1991)과, 최근 몇몇 세균들이 인체상피세포주에 감염되었을 때 IL-8의 분비를 유도한다는 보고들(Jung *et al.*, 1995a; Massion *et al.*, 1994)을 토대로 하여 이루어졌다.

IL-8 mRNA 발현은 노출시킨 이질아메바 영양형의 수에 비례하였다. 따라서 감염증에서의 초기 inoculum size와 염증반응의 강도는 서로 비례한다



**Fig. 5.** Amounts of IL-8 proteins induced by HT-29 cells exposed to *E. histolytica*. After the HT-29 cells were exposed to (■) and not to (□) *E. histolytica* trophozoites for 30 minutes, 1 and 3 hours, culture supernatants were obtained. The ratio of HT-29 cells/*E. histolytica* was 20:1. The IL-8 levels were determined by ELISA. Results are expressed as mean and standard error. Each panel represents the mean of separate three experiments.

는 사실을 알 수 있었다. 그런데 본 실험에서 정량적 역전사 PCR의 측정범위는  $5 \times 10^3$  IL-8 mRNA molecules/ $\mu$ g total RNA 이상이었다. 최소 측정 범위인  $5 \times 10^3$  IL-8 mRNA molecules/ $\mu$ g total RNA는 약 200개의 세포당 1개에서 IL-8 mRNA가 발현되는 수준이다. 즉, 이 정도의 발현은 생물학적으로 별 의미를 지니고 있지 못한 것으로 판단되므로 HT-29/이질아메바의 비율이 최소한 50:1 이상은 되어야 염증반응을 촉발시킬 것으로 평가된다. 또한 이러한 성적을 토대로 본 실험에서는 HT-29/이질아메바의 비율을 20:1로 조정하여 시행하였다.

노출시간 대에 따라 인체 대장상피세포에서 발현되는 IL-8 mRNA는 이질아메바 노출 초기부터 발현되었고, 노출 1시간에서 부터는 약  $2 \times 10^7$  molecules/ $\mu$ g total RNA 이상의 일정한 발현 수준을 유지시켰다. 이와같은 IL-8 발현은 이질아메바에 감염된 실험동물에서 나타나는 호중구의 침윤을 설명할 수 있는 증거라고 할 수 있다. 그런데 IL-8 mRNA 발현 기전을 두가지로 가정할 수 있다. 첫째, 아메바에 존재하거나 분비되는 물질에 의한 것이라는 가설과, 둘째로 아메바가 세포에 부착됨으로 인해 발현될 것이라는 가설이다. 첫째의 가설을 확인하기 위해 본 실험에서 이질아메바 파쇄액을

인체 대장상피세포에 작용시킨 결과 IL-8 mRNA가 발현됨을 관찰할 수 있었다. 동시에 배양여액을 이용한 실험에서도 미약한 IL-8 mRNA의 발현을 관찰하였다(김정목, 정현채 개인정보). 이러한 관찰은 이질아메바의 생성물이 인체 호중구를 끌어당길 수 있는 능력이 있다는 보고를 설명해 줄 수 있는 증거라고 판단된다(Salata et al., 1989). 한편 proteolytic activity를 나타내는 이질아메바 분비물질이 세포독성을 일으킨다는 보고(Reed et al., 1989)가 있음에 비추어, 본 실험에서 배양여액에 존재하는 이와같은 물질에 의해 IL-8 mRNA가 발현되었으리라 추정된다. 그러나 최근 이질아메바 영양형은 Caco-2 세포의 부과성을 증가시킨 반면, 아메바 lysate 또는 배양여액은 이러한 현상을 일으키지 못한다(Li et al., 1994). 따라서 향후 proteolytic activity를 나타내는 이질아메바 분비물질의 농도와 IL-8 발현 정도, 그리고 염증반응의 정도를 상호 비교할 경우 이질아메바에 의한 병원기전을 규명하는데 중요한 정보를 제공해 줄 것이다. 둘째의 가설은 이질아메바에는 적어도 2개의 surface adhesion molecule이 있으며, N-acetyl-D-galactosamine, galactose 등에 의하여 부착이 억제된다는 보고(Ravdin et al., 1985)와 아메바에 의한 HT-29 세포 파괴가 galactose 등에 의해 저지된다는 보고(Burchard et al., 1993)를 토대로 하였다. 즉, 본 실험에서 관찰된 IL-8 mRNA의 유도가 아메바에 의한 부착 및 파괴에 의해 초래되었을 가능성이 높다. 본 연구자들은 현재 이질아메바 부착을 억제시키는 물질에 의한 IL-8 mRNA 발현 억제 여부를 확인하였다.

ELISA 검사 결과 시간에 따른 IL-8 mRNA 발현 양상과 배양상층액에서의 IL-8 단백질의 양은 비례하였다. 따라서 이질아메바의 노출에 의해 발현된 IL-8 mRNA transcripts는 동일 세포에서 IL-8 단백질 유도까지 이어짐을 알 수 있어서 RT-PCR 결과 확인된 IL-8 mRNA는 결국 생물학적 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

이와같이 대장상피세포로부터 유도된 IL-8에 의해 활성화된 호중구가 숙주방어기전에 어떻게 작용하는 지에 대해서는 확실하게 증명된 바가 없다. 이를 추정한 보고들을 살펴보면, 시험관 내에서 비활성화 호중구가 이질아메바에 의해 파괴된다는 보고(Guerrant, et al., 1981)와 cytokine에 의해 활성화된 호중구가 *Acanthamoeba*와 *Naegleria* (Ferrante et al., 1986; Michelson et al., 1990). 그리고 이질아메바 영양형을 파괴시킬 수 있다는 보고(Denis and Chadee, 1989)가 있다. 따라서 IL-8에 의해 활성화된 호중구는 이질아메바 감염 초기의 제1방어선을 형성하여 인체 장관 내에 들어온 아메바의 절대 숫자를 줄여주는 역할을 담당할 것으로 추정된다. 이질아메바 감염자의 90% 이상에서 침

습성의 증상이 발현되지 않는 이유 중의 하나로 이와 같은 기전을 제시할 수 있을 것이다. 만일 이와 같은 초기 방어기전을 돌파한 아메바에 의해 세포 파괴가 더욱 진행되어 대장 점막이 완전히 파괴되면 결국 고유층(lamina propria)에 존재하는 각종 면역세포 또는 IL-8에 의해 이끌려진 호중구 등과 같은 염증세포와 이질아메바의 직접 접촉이 이루어질 것이다. 따라서 감염 후반기에는 이와같은 염증세포에서 IL-1, TNF 같은 각종 proinflammatory cytokine이 발현되어 (Seguin and Chadee, 1992; Wang et al., 1992). 염증반응이 더욱 심하게 나타날 것이고, 동시에 아메바 감염에 대한 방어기전이 본격적으로 발휘하게 될 것이다. 그러므로 면역세포의 접촉이 없는 이질아메바 감염 초기에는 본 연구에서 제시한 대로 대장상피세포에서 발현되는 IL-8 등과 같은 cytokine에 의해 아메바 감염에 대한 방어기전이 성립될 것으로 추정된다. 한편 nitric oxide가 이질아메바를 저지시키는 주요물질 이라는 보고(Lin et al., 1994)에 비추어 IL-8에 의해 모여든 호중구에서 nitric oxide가 발현됨으로써 장관 내 아메바 감염증을 제거할 수 있으리라 판단된다. 그리고 이질아메바가 대장상피층에 감염되었을 경우, IL-8 이외의 기타 다른 cytokine도 발현될 가능성이 높다. 즉, 생체 내에서는 각종 cytokine 들이 서로 network를 형성하여 감염 면역에 대한 신호전달 및 방어기전 역할을 수행할 것이므로 이 부분에 대한 연구는 필수적이다. 아울러 대장상피세포를 이용한 본 연구의 모델은 이질아메바의 병인연구에 아주 좋은 모델로 활용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

Burchard GD, Prange G, Mirelman D (1993) Interaction between trophozoites *Entamoeba histolytica* and the human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. *Parasitol Res* **79**: 140-145.

Chadee K, Meerovitch E (1985) The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*): liver changes and amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* **119**: 485-494.

Chang JK, Im KI, Soh CT (1995) Axenization of *Entamoeba histolytica*, Korean strain YS-27. *Korean J Parasitol* **33**(4): 111-111.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Denis M, Chadee K (1989) Human neutrophils activated by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  kill *Entamoeba histolytica*

trophozoites *in vitro*. *J Leukocyte Biol* **46**: 270-274.

Ferrante A, Abell TJ (1986) Conditioned medium from stimulated mononuclear leukocytes augments human neutrophil-mediated killing of a virulent *Acanthamoeba* sp. *Infect Immun* **51**: 607-617.

Flores-Romo L, Bacon KB, Estrada-garcia T, et al. (1994) Fluorescence-based quantitative adhesion assay to study interactions between *Entamoeba histolytica* and human enterocytes. Effect of proinflammatory cytokines. *J Immunol Methods* **166**: 243-250.

Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL (1981) Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* **143**: 83-93.

Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. (1995a) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95**: 55-65.

Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY (1995b) Study for the host defense mechanism using quantitative analysis of cytokine gene expression in human intestinal epithelial cells and intestinal mucosa: analysis by quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction using synthetic standard RNA. *Korean J Med* **49**: 1-13.

Lin JY, Seguin R, Keller K, et al. (1994) Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun* **62**: 1534-1541.

Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ (1992) Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci* **82**: 273-275.

Martinez-Palomo A, Tsutsumi V, Anaya-Velazquez F, Gomez-Robles A (1989) Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* **41**: 273-279.

Michelson MK, Henderson WR, Chi EY, Fritsche TR, Klebanoff SJ (1990) Ultrastructural studies on the effect of tumor necrosis factor on the interaction of neutrophils and *Naegleria fowleri*. *Am J Trop Med Hyg* **42**: 225-233.

Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaiada N, Matsushima K (1991) Properties of the novel

- proinflammatory supergene intercrine cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**: 617-648.
- Ravdin JI, John JE, Johnston LT, et al. (1985) Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect Immun* **48**: 292-297.
- Reed SL, Keene WE, McKerrow JM (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* **27**: 2772-2777.
- Salata RA, Ahmed P, Ravdin JI (1989) Chemoattractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. *J Parasitol* **75**: 644-646.
- Schroder JM, Young J, Gregory H, Christophers E (1989) Amino acid sequence characterization of two structurally related neutrophil activating peptides obtained from lesional psoriatic scales. *J Clin Dermatol* **92**: 515-521.
- Seguin R, Chadee K (1992) *Entamoeba histolytica* modulates TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , and c-fos gene expression in macrophage. *Arch Med Res* **23**: 147-149.
- Seits M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M (1991) Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **87**: 463-469.
- Walsh JA (1988) Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. p93-105, In Ravdin JI (ed.), *Amebiasis-human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Wang AM, Dolye MV, Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9717-9721.
- Wang W, Keller K, Chadee K (1992) Modulation of tumor necrosis factor production by macrophage in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun* **60**: 3169-3174.

**=Abstract=**

Interleukin-8 gene expression in the human colon epithelial cell line, HT-29, exposed to *Entamoeba histolytica*

Jung Mogg Kim<sup>1)\*</sup>, Hyun Chae Jung<sup>2)</sup>, Kyung-il Im<sup>3)</sup>, Yang-Ja Cho<sup>1)</sup> and Chung Yong Kim<sup>2)</sup>

*Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine<sup>1)</sup>, Department of Internal Medicine and Liver Research Institute, Seoul National University College of Medicine<sup>2)</sup>, Department of Parasitology, Yonsei University College of Medicine<sup>3)</sup>*

The protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, is one of major causative agents of intestinal disease all over the world. In acute experimental infection, the early host response to *E. histolytica* is characterized by an infiltration of neutrophils. However, the chemotactic signal for this response is not well known. Based on the finding that human epithelial cells produce the potent neutrophil chemoattractant and activator, interleukin-8 (IL-8), IL-8 gene expression was examined thoroughly in human colon epithelial cells exposed to *E. histolytica* trophozoites. Cellular RNAs were extracted from HT-29 or Caco-2 human colon epithelial cells exposed to *E. histolytica* trophozoites for 30 minutes, 1 and 3 hours. IL-8 mRNA transcripts were measured by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) using synthetic standard RNA. The number of IL-8 mRNA molecules increased from 30 minutes to 3 hours of exposure period, reaching  $3.1 \times 10^7$  molecules/ $\mu$ g of total RNA. Expression pattern of IL-8 mRNA transcripts was parallel to the amounts of IL-8 protein measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lysates of *E. histolytica* also induced expression of mRNA for IL-8 in colon epithelial cells. These results suggest that acute inflammatory reaction by *E. histolytica* may be initially triggered by proinflammatory cytokines such as IL-8 secreted from epithelial cells of the colon.

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, interleukin-8, human colon epithelial cells, quantitation of mRNA by RT-PCR, synthetic standard RNA

[*Korean J. Parasitol.* **33**(4): 357-364, December 1995]

\*Corresponding author