

침습성 세균 감염에 의한 사람 장상피세포에서의 Cyclooxygenase-2 발현 및 이의 발현이 상피세포 Apoptosis에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학 연구소

김정목 · 강신재 · 조양자

=Abstract=

Expression of Cyclooxygenase-2 in Intestinal Epithelial Cells in Response to Invasive Bacterial Infection and its Role of Epithelial Cell Apoptosis

Jung Mogg Kim, Shin Jae Kang and Yang-Ja Cho

Department of Microbiology and Institute of Biomedical Science,
Hanyang University College of Medicine

Invasion of enteric bacteria, such as *Salmonella* and invasive *E. coli*, into intestinal epithelial cells induces proinflammatory gene responses and finally epithelial cell apoptosis. In this study, we asked whether invasive bacterial infection of human intestinal epithelial cells could upregulate cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression and whether increased COX-2 expression could influence intestinal epithelial cell apoptosis. Expression of COX-2 mRNA and prostaglandin (PG) E₂ production were upregulated in HT-29 colon epithelial cells which were infected with *S. dublin* or invasive *E. coli*, as examined by quantitative RT-PCR and radioimmunoassay. Inhibition of COX-2 expression and PGE₂ production using NS-398, a specific COX-2 inhibitor, showed a significant increase of epithelial cell apoptosis and caspase-3 activation in HT-29 cells infected with invasive bacteria. However, the addition of valerylsalicylate, a specific COX-1 inhibitor, did not change apoptosis in *S. dublin*-infected HT-29 cells. These results suggest that upregulated COX-2 expression and PGE₂ production in response to invasive bacterial infection could contribute to host defense by inhibiting apoptosis of intestinal epithelial cells.

Key Words: Apoptosis, Cyclooxygenase-2, Intestinal epithelial cells, Invasive bacteria, Prostaglandin E₂, Quantitative RT-PCR

서 론

병원성 장내세균인 *Salmonella*와 invasive *Escherichia coli* 등은 장관 점막을 침입한 후, 다양한 기전을 통하여 소화기 질환을 유도한다. 동물 실험

에 따르면 침습능을 변화시킨 *Salmonella mutant*를 감염시켜도 장관에는 별다른 병변이 나타나지 않는 반면, 정상적인 침습능을 지닌 *Salmonella*를 구강을 통하여 감염시킬 경우 2~4시간 이내에 설사가 시작된다¹⁾. 따라서 세균 침입 초기에 나타나는 숙주 반응은 질병 발현과 밀접한 관련이 있

접수 : 1999년 12월 11일, 게재결정 : 2000년 1월 12일

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

다. 그런데 이들 세균이 체내에 유입된 후 제일 먼저 접촉하는 숙주 부위가 장관 점막 상피세포라는 점을 고려해 볼 때, 점막 상피세포에서의 변화 또는 이 세포로부터 유도되는 signal이 질병 발현의 시작을 유도하리라 추정된다. 이 대표적인 예로 대장상피세포에서 발현되는 각종 친염증성 (proinflammatory) 매개체를 들 수 있다. 즉, 병원성 세균들이 대장상피세포 층을 침입했을 때 이 세포에서는 감염 1시간 이내에 친염증성 cytokine을 발현하여 점막 염증 반응을 촉발시킨다¹⁷⁾.

Prostaglandin (PG)은 위장관 분비를 조절하는 중요한 인자이다²⁷⁾. 특히 PGE는 배양 상피세포에서 chloride 분비를 촉진할 뿐만 아니라³²⁾, 생체에 투여했을 때 설사를 야기시킬 수 있다^{24,25)}. 더구나 PG의 일종인 prostanoid는 세균 감염에 의한 설사에 있어서 중요한 매개체로 보고되고 있고^{12,13)}, 이 PG의 생성을 차단시킬 수 있는 약제를 투여할 경우 설사의 정도를 약화시킬 수 있다¹⁴⁾. PG은 free arachidonic acid로부터 생성된다. 즉, arachidonic acid가 PGH로 변화되고, 이어서 PGE, PGF, thromboxan, prostacyclin으로 변환된다. 이 과정 중 arachidonic acid가 PGH로 변화되는 단계는 cyclooxygenase (COX) 또는 prostaglandin H synthase (PGHS)라는 불리는 효소에 의해 매개된다. COX는 두 가지 종류가 존재하는데, 생체 내에서 늘 발현되는 (constitutive expression) COX-1과 어떤 자극을 받았을 때 생성되는 COX-2가 있다²⁸⁾. 특히 COX-2는 정상적인 생체 조직에서 매우 낮은 정도로 발현되고 있지만, 경우에 따라서는 대식세포, 대장상피세포 등에서 매우 높은 정도로 발현된다²⁸⁾.

위장 상피세포는 세균의 침입을 방지하는 매우 단단한 장벽을 구성하고 있다. 그리고 위장 상피세포는 위선 (gastric gland) 또는 장관 점막 상피세포층의 crypt compartment에서 증식하여 위장 점막 표면으로 이동한다. 위장 점막 표면을 둘러싸고 있는 상피세포는 수명이 약 3~5일 정도인데, 자연적으로 apoptosis라는 기전을 통하여 제거된다⁹⁾. 그런데 *Salmonella*와 같은 침습성 세균 또는 *Helicobacter pylori*가 위장 상피세포에 감염되었을 때, 감염된 상피세포는 정상 속도보다는 빠른 apoptosis 과정을 겪게 된다^{19,22)}. 한편 COX-2의 발현을 증가시킨 세포에서는 apoptosis가 억제되고, 일부 대장종양세포에서는 COX-2의 발현이 정상 세포에 비해 증가되어 있다^{16,27,30)}. 이와 같은 결과들은 COX-2가 대장상피세포의 apoptosis를 조절할 수

있음을 시사해 준다. 특히 침습성 세균에 감염된 대장상피세포에서 COX-2 생성이 증가된다는 보고⁸⁾에 비추어 세균 감염증에 의한 COX-2 발현과 apoptosis와의 관계 규명은 침습성 세균에 대한 면역병리기전을 이해하는데 있어서 대단히 중요한 단계라고 판단된다. 그러나 아직까지 침습성 세균 감염증에 있어서 COX-2 발현과 apoptosis 상호간의 관계에 대해서는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 병원성 세균의 침입에 의하여 인체 대장상피세포에서 COX-2가 발현되는지의 여부와, COX-2 발현의 결과 생성되는 PGE₂에 의해 대장상피세포 apoptosis가 변화될 수 있는지를 확인하여 침습성 세균 감염증에 대한 숙주 면역병리기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 침습성 세균 배양

본 연구에서 사용한 기본 균주로는 *S. dublin* lane strain과 invasive *E. coli* (serotype O29:NM, ATCC 43892)였다. 그리고 유전자 조작을 통해 세포 내 침습성을 제거시킨 invasion-defective mutant 균주인 *S. dublin invA*와 세포 내에서의 증식 능력을 제거한 replication-defective mutant 균주인 *S. dublin aroA*를 이용하였다¹⁹⁾. 또한 비병원성 그람 음성 대조균으로는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. 기본 균주들은 tryptic soy broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA)에 넣어 37°C에서 대수기까지 배양한 뒤, 침습성을 높이는 조작을 시행한 다음 대장상피세포에 감염시켰다¹⁹⁾.

2. 대장상피세포 배양 및 감염 실험

실험에 사용한 인체 대장상피세포주로는 HT-29 세포 (ATCC HTB 38)였다. 이 세포주는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum; FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)이 포함된 DMEM 배지 (Sigma, St. Louis, Mo., USA)에 키워 실험에 이용하였다. 감염 실험은 기존의 방법대로 시행하였다¹⁹⁾. 즉, 대장상피세포를 6-well plate에 monolayer 되게 배양한 다음, 일정 수의 세균을 첨가하였다. 그 뒤, 37°C, 5% CO₂ 배양기 속에서 1시간 동안 방치한 후, 멸균된 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하고, 침입하지 않고 남아 있는 세균을 제거하기 위하여 gentamicin (50 μ g/ml, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 다음 일정

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR analysis of HT-29 colon epithelial cells

mRNA species	Sense primers	Antisense primers	Size of PCR products (bp)	
			Target	Standard
COX-1	5'-CTTGACCGCTACCA GTGTGA-3'	5'-AGAGGGVAGAATA CGAGTGT-3'	309	-
COX-2	5'-TTCAAATGAGATTGT GGGAAAATTGCT-3'	5'-AGATCATCTCTGCC TGAGTATCTT-3'	305	425
β -actin	5'-TGACGGGGTCACCCAC ACTGTGCCCATCTA-3'	5'-CTAGAAGCATTGCGGT GGACGATGGAGGG-3'	661	746

시간 배양하였다.

세포 내 침입 세균 (intracellular bacteria) 수 측정 은 agar dilution 법으로 시행하였다. 즉, gentamicin 존재 하에서 일정 시간 배양 후, 멸균된 PBS로 HT-29 세포를 2회 세척한 뒤, 멸균 증류수를 가하여 세포를 파괴시켰다. 그 뒤, tryptic soy broth로 희석한 후, 이 용액을 55°C로 유지시킨 tryptic soy agar와 혼합하였다. 그 뒤, 이 용액을 Petri dish에 부어 굳힌 다음, 37°C에서 하룻밤 배양한 후 균수를 측정하였다.

3. 감염된 장상피세포에서의 COX-1 및 COX-2 mRNA 발현능 확인을 위한 RT-PCR

인체 대장상피세포의 RNA는 기존의 방법대로 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 추출하였고, 추출한 RNA의 integrity는 gel 전기영동법에 의하여 분석하였다²⁰⁾.

추출한 1 μ g의 total RNA를 0.1 μ g의 oligo(dT)₁₅와 함께 37°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 만든 후, PCR thermal cycler (GenAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn., USA)로 cDNA를 증폭시켰다.

PCR을 위한 COX-1, COX-2와 β -actin primer의 염기 서열 및 PCR 생성물의 크기는 Table 1과 같다. 이들 primer들은 적어도 한 개의 intron을 포함하도록 설계하여, 오염된 genomic DNA가 증폭되더라도 그 크기에 의하여 cDNA로부터 증폭된 PCR product와 쉽게 구별되도록 하였다. 증폭 프로그램은 95°C에서 45초 간 denaturation시키고, COX-2의 경우 60°C에서 1분 30초, COX-1과 β -actin의 경우 72°C에서 1분 40초 동안 annealing과 extension이 일어나도록 하였다. 이런 cycle의 총 횟

수는 32회로 시행하였다. 양성 대조군으로는 사람 말초혈액 림프구를 TNF- α (5 ng/ml)로 6시간 자극한 RNA를 이용하였으며, 음성 대조군으로는 cDNA 합성 과정에서 RNA 대신 증류수를 넣어 PCR을 시행한 것을 사용하였다. PCR이 끝난 후, PCR 산물은 2% NuSieve agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)로 전기영동한 뒤 ethidium bromide 염색으로 확인하였다.

4. 발현된 COX-2 및 β -actin mRNA의 정량

발현된 COX-2 mRNA와 β -actin mRNA의 정량을 위하여 표준 RNA를 제작하였다. 이 표준 RNA는 기존의 방법대로 역전사의 첫 단계부터 세포에서 추출한 RNA와 동일한 시험관에서 사용 가능하도록 설계하였다¹⁾. 즉, 표준 RNA는 COX-2 gene을 증폭할 수 있는 sense primer와 antisense primer의 염기 서열이 일렬로 연결되도록 설계하였으며, 이의 PCR 증폭 product 크기가 세포로부터 추출된 RNA에서 증폭된 목표 RNA의 PCR product의 크기에 비해서 약 100 bp 정도 차이나게 하였다. 이와 같은 설계에 입각하여 제작한 COX-2에 대한 표준 RNA의 PCR product의 크기는 425 bp이고, β -actin에 대한 표준 RNA의 PCR product의 크기는 746 bp였다 (Table 1). 그 뒤, 세포로부터 추출한 1 μ g의 RNA와 2~5 배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 동일한 시험관에서 반응시켜 역전사를 시행하여 기존의 방법대로 발현된 mRNA의 분자수를 정량하였다^{1,20)}.

5. 침습성 세균에 감염된 대장상피세포로부터 생성된 PGE₂ 및 interleukin-8 (IL-8) 측정

세균을 감염시킨 뒤, 일정 시간 후 배양 상청액

을 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 그 후 2 mg/ml의 bovine serum albumin (BSA, Sigma)과 20 μ M의 arachidonic acid (Sigma)가 포함된 DMEM 1 ml을 첨가한 다음 15분 더 배양한 뒤 상청액을 회수하였다. 그 뒤, radioimmunoassay를 시행하여 상청액에 포함된 PGE₂의 양을 측정하였다. 즉, [³H]이 label된 PGE₂를 배양 상청액에 첨가한 뒤, 항-PGE₂ 단세포균 항체를 가하였다. 결합되지 않은 [³H]-labelled PGE₂를 magnetic dextran-coated charcoal에 흡착시킨 뒤, 원심분리 방법으로 제거하였다. 그 후 항-PGE₂ 단세포균 항체와 결합된 [³H]-labelled PGE₂만을 liquid scintillation counter로 측정하여 배양 상청액에 포함된 PGE₂의 양을 구하였다. 이상의 방법에서 사용된 시약들은 PerSeptive Biosystems 회사 (Framingham, MA, USA)의 것을 이용하였다.

배양 상청액에 포함된 IL-8 단백질은 기존의 방법대로 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다¹⁾.

6. 침습성 세균 감염 후 대장상피세포의 apoptosis 측정

Apoptosis가 진행 중인 세포의 염색체는 DNase에 의해 분절화 (fragmentation)가 일어나 결국 oligonucleosome 형태로 세포질 내로 유출된다¹⁵⁾. 이와 같은 oligonucleosome은 histone과 DNA로 구성되어 있다. 이를 이용하여 침습성 세균을 감염시킨 HT-29 세포 (1×10^5)의 lysate를 만든 뒤, 미리 streptavidin이 coating되어 있는 well에 가하였다. 그 후 biotin이 결합된 마우스 항-histone 단세포균 항체를 첨가하여 실온에 1시간 방치한 다음, peroxidase가 결합된 마우스 항-DNA 단세포균 항체를 1시간 동안 가하였다. 최종적으로 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonate)로 10분 동안 발색시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 과정에서 사용한 시약들은 cell death detection ELISA^{plus} kit (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 이용하였다. 한편 세포질 내로 유출된 oligonucleosome의 상대적 증가율은 제조회사의 설명서대로 감염 시키지 않은 대조군에 대한 상대적인 흡광도의 비율 (enrichment factor)로 표기하였다.

7. 침습성 세균 감염 후 대장상피세포의 caspase-3 활성도 측정

Caspase-3 활성도는 p-nitroanilide (pNA)로 label

된 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)의 분해 정도로 측정하였다²²⁾. 즉, trypsin 처리하여 떨어뜨린 대장상피세포를 PBS로 1회 세척한 다음, 3×10^6 개의 세포에 lysate buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaH₂PO₄/NaHPO₄ (pH 7.5), 130 mM NaCl, 1% Triton-X100, 10 mM NaPPi]를 첨가하였다. 그 뒤 얼음 속에서 20분 동안 방치한 뒤, 4°C에서 12,000 rpm으로 3분 원심하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액에 1 mM HEPES buffer와 함께 50 μ M의 DEVD-pNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 첨가한 뒤, 37°C에서 1시간 방치하였다. 그 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교한 상대적인 수치로 caspase-3 활성도를 평가하였다. 양성 대조군으로는 인체 T 세포 림프종 세포주인 Jurkat 세포에 항-Fas 단세포균 항체 (clone CH-11, IgM, Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, USA) (50 ng/ml)을 8시간 동안 가하여 얻은 세포 파쇄액을 이용하였다. 한편 각 실험마다 DEVD-pNA의 첨가에 앞서서 caspase-3 억제제인 Asp-Glu-Val-Asp-CH₂F (DEVD-fmk, 50 μ M; Clontech)를 사용하여 증가된 caspase-3 활성도가 억제되는지를 확인하여 활성도 증가가 특이적인 것인지를 평가하였다.

결 과

1. 침습성 세균 감염 후 대장상피세포에서의 COX-2 유전자 발현 및 PGE₂ 생성

*S. dublin*을 감염시킨 HT-29 세포에서는 감염 초기부터 COX-2 mRNA의 발현이 증가된 반면, COX-1 및 β -actin mRNA signal은 대조군에 비해 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1). 이와 같은 결과를 바탕으로 감염 24시간까지 COX-2 mRNA 발현 분자수를 정량한 결과, 감염 3시간 후에 대조군에 비해 약 55배 증가하여 peak에 도달한 뒤 (*S. dublin* 감염군, 1.6×10^7 transcripts/ μ g RNA; 비감염 대조군, 2.9×10^5 transcripts/ μ g RNA), 감염 24시간까지 감소하는 경향을 보여 주었다 (Fig. 2A). 이 실험 system에서의 PGE₂ 생성량은 *S. dublin* 감염 3시간에 1.31 ± 0.25 ng/ml로 대조군 (0.21 ± 0.29 ng/ml)에 비하여 6.2배의 증가를 나타내기 시작하여 (p value < 0.05), 감염 12시간에 최대에 도달한 뒤 (*S. dublin* 감염군, 8.72 ± 1.15 ng/ml; 비감염 대조군, 0.23 ± 0.12 ng/ml), 감소하는 경향을 보여주었으나 24시간까지 높은 농도를 유지하고 있었다

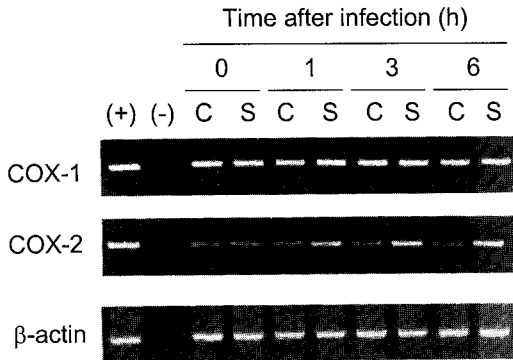


Figure 1. RT-PCR analysis of COX-1, COX-2 and β -actin mRNA in *S. dublin*-infected HT-29 colon epithelial cells. Confluent monolayers of HT-29 cells were infected with *S. dublin* (5×10^7 /well) for the indicated hours, after which cellular RNA was extracted by the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. The (+) and (-) represent positive and negative controls, respectively. The "C" represents the bands of RT-PCR products for cellular RNA extracted from uninfected HT-29 cells and the "S" represents those from *S. dublin*-infected cells.

(Fig. 2B). 그런데 감염 3시간 후에 측정된 세포 내 *S. dublin* 수를 검사한 결과, 정상적인 균의 침습율은 투여 균수의 약 3.8%를 나타내었고, invasion-defective mutant 균주의 경우는 약 0.005%, replication-defective mutant 균주는 약 0.23%를 나타내었다. 이 때, invasion-defective mutant 균주를 감염시킨 HT-29 세포에서 COX-2 mRNA와 PGE₂ 생성의 증가는 관찰되지 않았다. 반면 replication-defective mutant 균주를 감염시킨 HT-29 세포에서 COX-2 mRNA와 PGE₂ 생성은 정상적인 기능을 나타내는 *S. dublin*을 감염시킨 세포에서 관찰된 수치에 비해 현저하게 낮아지고 있었다 (Table 2).

Invasive *E. coli*를 감염시킨 HT-29 세포에서도 COX-2 mRNA의 발현이 대조군에 비해 약 35배 상향 조절되었다 (감염 3시간, invasive *E. coli* 감염균, 9.5×10^6 COX-2 transcripts/ μ g total RNA; 대조군, 2.7×10^5 COX-2 transcripts/ μ g RNA). 이 실험 system에서 감염 12시간에 측정된 PGE₂ 생성량은 4.72 ± 0.92 ng/ml이었다. 반면 비침습성 세균인 *E. coli* DH5 α 는 COX-2 mRNA 발현 및 PGE₂ 생성의 증가를 나타내지 못했다 (Table 2). 본 실험에서 각 균주마다 inoculation size를 다르게 한 이유는 침습능이 낮은 균주들의 세포 내 균수를 가능하면 높게 유지하기 위함이었다.

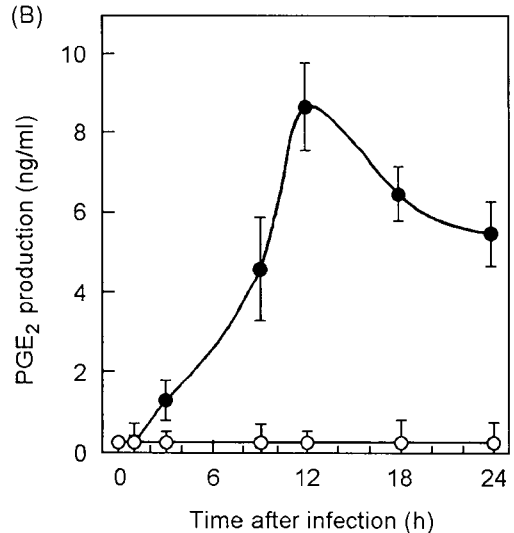
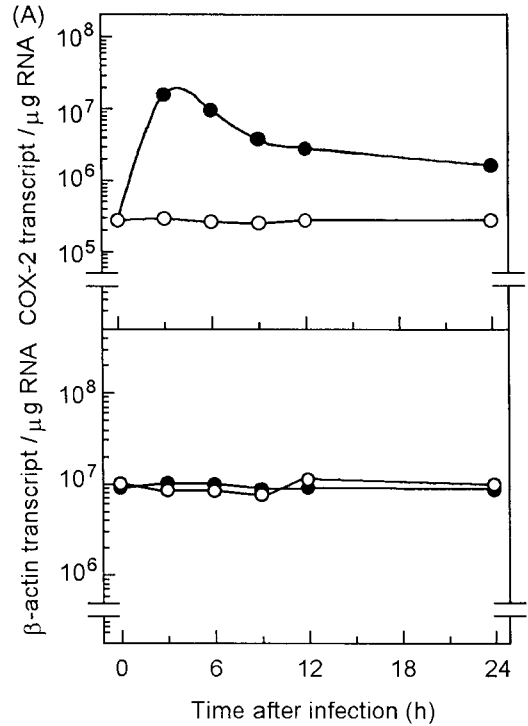


Figure 2. (A) Quantification of COX-2 and β -actin mRNA in *S. dublin*-infected HT-29 colon epithelial cells. Data are the representative of three different cultures and similar data were obtained in three different cultures. (B) PGE₂ production in *S. dublin*-infected HT-29 cells. At the indicated times after *S. dublin* infection, cultures were washed and incubated for 15 minutes in a 1 ml vol of DMEM containing 2 mg/ml BSA and 20 μ M arachidonic acids. PGE₂ levels were analyzed by radioimmunoassay. Data represent mean \pm SEM of the results from three different cultures.

Table 2. COX-2 mRNA expression and PGE₂ production by HT-29 cells in response to bacterial infection

Bacteria	Inoculum	Intracellular bacteria ^a (% of inoculum)	No. of COX-2 mRNA ^b (ratio infected/control)	PGE ₂ production ^c (ratio infected/control)
<i>S. dublin</i>	5.0 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁶ (3.8)	1.8 × 10 ⁷ (67)	8.53 ± 1.87 (47)
<i>S. dublin invA</i> (invasion-defective)	1.0 × 10 ⁸	5.8 × 10 ² (0.0005)	2.3 × 10 ⁵	0.15 ± 1.87 (0.8)
<i>S. dublin aroA</i> (replication-defective)	1.0 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁵ (0.23)	3.8 × 10 ⁶ (14)	1.75 ± 0.85 (9.7)
<i>E. coli</i> O29:NM	2.5 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁶ (0.8)	9.5 × 10 ⁶ (35)	4.72 ± 0.92 (26)
<i>E. coli</i> DH5α (non-invasive)	5.0 × 10 ⁸	8.5 × 10 ³ (0.0017)	3.2 × 10 ⁵ (1.2)	0.21 ± 0.16 (1.7)
None	0	0	2.7 × 10 ⁵	0.18 ± 0.11

Confluent HT-29 monolayers in 6-well plates were infected for 1 hour with the indicated dose of bacteria, washed, and further incubated with gentamicin.

^a Monolayers were lysed in sterile water 3 hour after the addition of gentamicin, and numbers of intracellular bacteria were determined by plating of serial dilutions on tryptic soy agar plates and overnight incubation. Data represent mean value of the results from three different experiments.

^b Cellular RNA was extracted 3 hour after the addition of gentamicin, and numbers of COX-2 mRNA were determined by quantitative RT-PCR. Data are expressed as number of COX-2 transcripts/μg cellular RNA. These are the representatives of three different cultures and similar data were obtained in these three cultures.

^c Cultures were washed 12 hour after the addition of gentamicin and incubated for 15 minutes in a 1 ml vol of DMEM containing 2 mg/ml BSA and 20 μM arachidonic acid. PGE₂ levels were analyzed by radioimmunoassay. Data are expressed as ng/ml and represent mean ± SEM of the results from three different cultures

2. 침습성 세균 감염에 의한 대장상피세포의 caspase-3 활성 및 apoptosis 유도

*S. dublin*을 감염시킨 HT-29 대장상피세포에서 caspase-3 활성도와 apoptosis 유도능을 시간대 별로 관찰하였다. 그 결과, *S. dublin*을 감염시킨 HT-29 세포에서는 COX-2 mRNA가 peak에 도달할 감염 3시간까지 caspase-3 및 apoptosis의 정도는 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았다. 그러나 감염 6시간부터 caspase-3의 활성이 증가되어 24시간까지 지속되었다 (p value<0.05) (Fig. 3A). 반면, 실질적인 DNA 분절화는 감염 18시간이 지나서야 나타나기 시작하였다 (Fig. 3B). 이와 같은 결과들은 *S. dublin* 감염 초기에는 COX-2의 발현이 증가하여 PGE₂ 생성을 증가시키고, 이어서 caspase-3이 활성화된 이후 apoptosis가 유도된다는 시간대별 발생 순서를 제시해 주고 있다.

3. 침습성 세균 감염에 의해 발현된 PGE₂에 의한 대장상피세포 apoptosis의 억제

앞서의 결과에서 침습성 세균 감염에 의해 HT-

29 대장상피세포주에서 PGE₂의 생성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이와 같이 증가된 PGE₂가 대장상피세포의 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 *S. dublin*을 감염시킨 HT-29 세포에 COX-2 특이 억제제인 NS-398¹⁰⁾ (10 μM, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)을 가하였을 때의 apoptosis는 *S. dublin*만을 감염시킨 군에 비하여 약 68% 증가하였다. 이와 동일하게, 감염 12시간 후에 측정된 caspase-3 활성도 역시 NS-398 처리에 의해 증가되었다 (Fig. 4B). 이와 같은 현상은 또 다른 침습성 세균인 *E. coli* O29:NM을 감염시킨 HT-29 세포에서도 동일하게 관찰되었다 (감염 24시간 후 cell death detection ELISA 측정 결과의 enrichment factor; *E. coli* O29:NM 감염군, 3.8 ± 0.4; *E. coli* O29:NM + NS-398 처리군, 6.9 ± 0.4; mean ± SD, n=2). 그러나 COX-1 특이 억제제인 valeryl-salicylate⁹⁾ (10 μM, Cayman Chemical Co.)를 처리했을 경우 HT-29 세포의 apoptosis에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (감염 24시간 후 cell death detection ELISA 측정 결과의 enrichment factor; *S. dublin* 감염군,

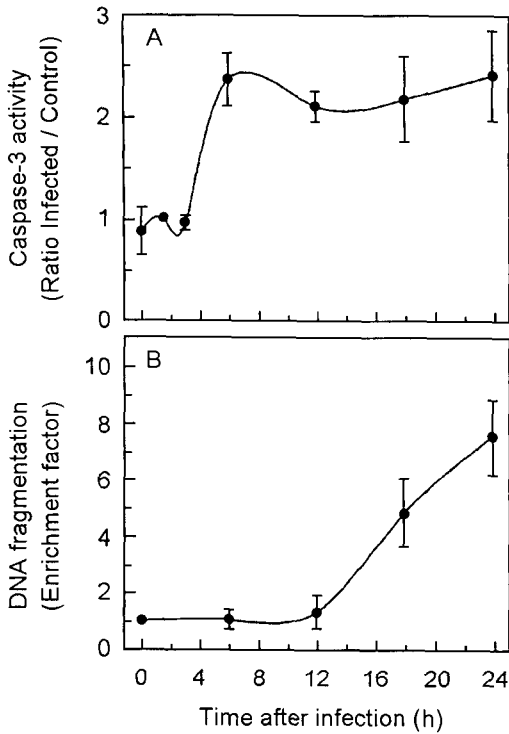


Figure 3. Time course of caspase-3 activation and apoptosis following *S. dublin* infection of HT-29 cells. (A) Confluent monolayers of HT-29 cells in 6-well plates were infected with *S. dublin* (1×10^8 /well) and the cells were assayed for caspase-3 activity at the indicated times after infection. Values are means \pm SEM of three different experiments. (B) Parallel cultures were assessed for apoptosis at the indicated times after infection using the cell death detection ELISA. Numbers refer to DNA fragmentation as measured by the enrichment factor. Values are means \pm SEM of three different experiments.

6.8 ± 0.7 ; *S. dublin* + valerylsalicylate 처리군, 6.6 ± 0.9 ; mean \pm SD, n=3).

이와 같은 실험 system에 NS-398 (10 μ M)을 가한 뒤 24 시간 후에 PGE₂의 양을 측정 한 결과, *S. dublin* 감염에 의한 PGE₂의 생성은 NS-398에 의해 완전히 차단되었다 (Fig. 4C). 그러나 배양 상청액을 대상으로 IL-8을 측정 한 결과, NS-398에 의하여 IL-8의 양은 변화되지 않았다 (Fig. 4D). 이와 같은 결과는 NS-398이 COX-2에 특이적으로 작용하는 반면, *S. dublin* 감염에 의한 cytokine 생성에는 영향을 미치지 않음을 제시하여 준다.

고 찰

침습성 세균을 감염시킨 대장상피세포에서 COX-2 mRNA 발현 및 PGE₂ 생성이 증가되었다. 반면 COX-1은 세균 침입에 의해 발현 증가를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 숙주 반응의 관점에서 세균이 대장상피세포에 침입했을 때 COX-1의 발현보다는 COX-2의 발현이 더 중요할 것이라는 점을 제시해 준다. 그러나 정상적인 위장관 조직에서 COX-1은 constitutive하게 발현되는 반면, COX-2는 그 발현 강도가 낮다¹⁸⁾. 따라서 정상적인 환경의 위장관에서는 COX-1이 COX-2보다 더 중요한 역할을 수행하리라 추정되나, 아직까지 이 두 isoform이 위장관 내에서 어떤 역할을 수행하는지에 대해서는 제대로 규명되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 침습성 세균 감염에 의해 발현이 증가되는 COX-2가 숙주 반응에 어떤 영향을 미치는지 관찰하였다.

Polarity를 띄는 대장상피세포를 이용한 실험에서 PGE₂는 주로 상피세포의 basolateral surface로부터 분비된다⁵⁾. 이와 같은 결과는 분비된 PG이 주로 점막 하부 또는 점막 상피세포의 기저층에 영향을 미칠 것이라는 점을 시사해 준다. 이와 같은 사실과 더불어 대장상피세포의 basolateral surface를 PG으로 자극했을 때, 상피세포로부터 chloride 분비가 촉진된다는 보고가 있다³²⁾. 따라서 본 실험에서 관찰된 바와 같이 침습성 세균 감염에 의한 COX-2와 PGE₂의 발현 증가는 대장상피세포로부터의 분비를 증가시키는 기전 중의 하나로 제시될 수 있을 것이다. 그런데 증가된 대장상피세포로부터의 분비는 설사라는 증상으로 나타날 수도 있지만, 또 한편으로는 장관 점막으로부터 세균을 제거할 수 있는 역할을 수행한다. 또한 PG은 점액 분비를 촉진시킬 뿐만 아니라 점막 내 혈류 흐름을 증가시켜 장관 점막층의 integrity를 유지시키는 역할도 보고되고 있다³⁾. 한편 *Salmonella*와 invasive *E. coli*와 같은 세균이 대장상피세포에 감염되었을 때 apoptosis가 정상보다 빠르게 진행된다¹⁹⁾. 점막 표면을 덮고 있는 상피세포의 apoptosis가 과도하게 진행될 경우 장관 점막 상피세포층의 파괴를 인해 병변이 확산될 것이다. 따라서 PGE₂에 의해 세포 파괴가 억제된다는 사실은 COX-2 발현/PGE₂ 생성 증가가 숙주 방어기전에 관여하리라는 점을 시사해 준다.

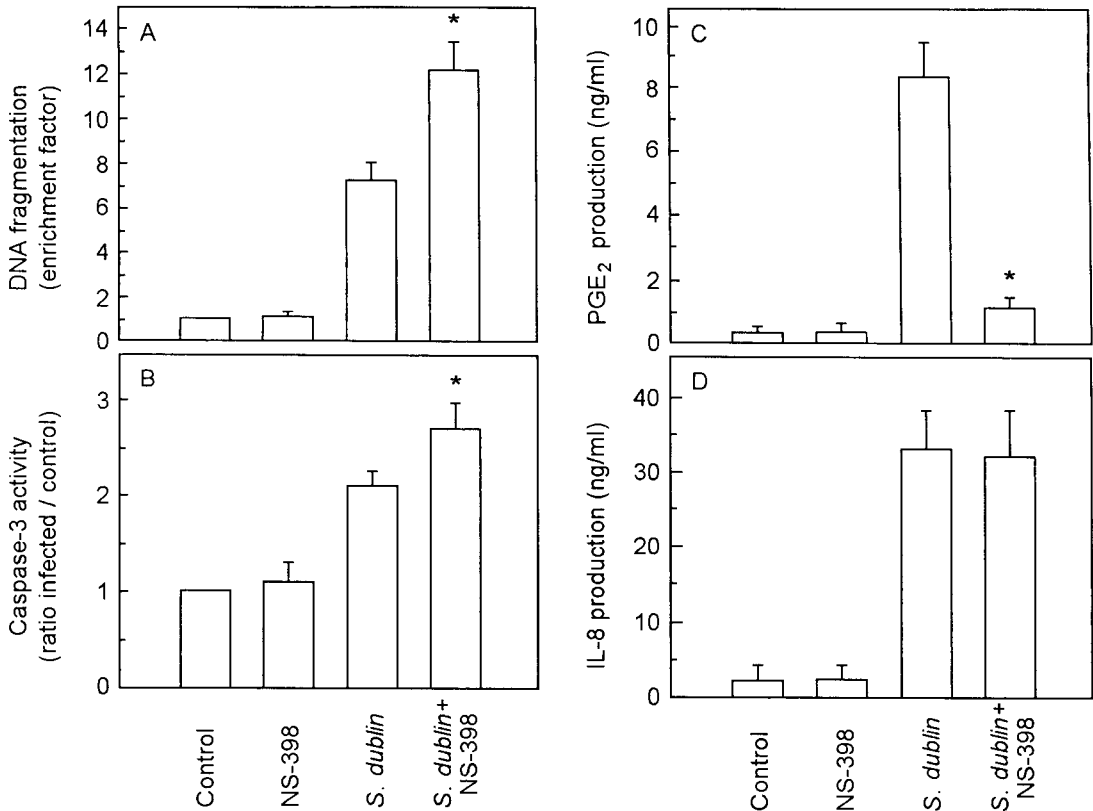


Figure 4. Effects of COX-2 inhibition on apoptosis in *S. dublin*-infected HT-29 colon epithelial cells. (A) Confluent monolayers of HT-29 cells in 6-well plates were infected with *S. dublin* (1×10^8 /well) in the presence of NS-398 (10 μ M), a specific inhibitor, and gentamicin for 24 hours. Apoptosis was assessed using the cell death detection ELISA. Numbers refer to DNA fragmentation as measured by the enrichment factor. Values are mean \pm SEM of the results from three different cultures. (B) Cultures and infection conditions were identical to A. After 24 hours, infected cells were assayed for caspase-3 activity. Values are mean \pm SEM of the results from three different cultures. (C) Cultures and infection conditions were identical to A. After 24 hours, cultures were washed and incubated for 15 minutes in a 1 ml vol of DMEM containing 2 mg/ml BSA and 20 μ M arachidonic acids. PGE₂ levels were analyzed by radioimmunoassay. Values are mean \pm SEM of the results from three different cultures. (D) Cultures and infection conditions were identical to A. After 24 hours, culture supernatants were harvested and IL-8 levels were determined by ELISA. Values are mean \pm SEM of the results from three different cultures. Asterisks of all panels indicate values significantly different from *S. dublin*-infected cells without added NS-398 ($p < 0.05$).

점막 하부에 존재하는 대식세포 등에서도 세균 감염에 의해 COX-2의 발현이 증가된다³³). 특히 *Salmonella*와 같은 장관 점막 침습성 세균은 점막 상피세포 뿐만 아니라 Peyer's patches와 M 세포를 통해서 점막 하부로 침입하여 대식세포와 dendritic 세포를 감염시킨다²⁹). 그런데 이와 같은 세균이 인체에 들어왔을 때 제일 처음 숙주와 접촉하는 부위는 점막 상피세포이다. 따라서 숙주 반응도 상피세포층에서부터 시작된다¹⁷). 이와 같은 사실과 더불어 본 실험에서 관찰된 바와 같이 대장상피세포에 의한 COX-2 mRNA 발현과 PGE₂

생성은 감염 초기 (3시간 이내, Fig. 2)에 유도된다는 점을 고려해 볼 때, 급성 감염증에 의한 PGE₂ 생성 효과는 대식세포에 의한 것보다는 대장상피세포로부터 생성되는 signal에 의해 초래된다는 가설이 더 설득력 있는 것 같다. 그러나 감염 후반기에는 대장상피세포 이외의 세포에서 생성되는 PGE₂도 염증 반응에 관여할 수 있으리라는 점을 배제할 수 없다. 한편 본 실험에서 replication-defective 또는 invasion-defective *S. dublin*은 정상적인 기능을 나타내는 균에 비해 COX-2 mRNA 발현 및 PGE₂ 생성이 현저하게 감소되었다. 이와 같

은 사실은 침습성 세균에 의한 COX-2 mRNA 발현 및 PGE₂ 생성에는 균의 침입과 세포 내 증식이 결정적으로 중요함을 제시해 주고 있다.

침습성 세균 감염 초기에 대장상피세포에서는 각종 친염증성 cytokine이 발현되어 염증 반응을 매개한다¹⁷⁾. 그런데 PG은 대식세포에서 IL-1과 같은 친염증성 cytokine의 생성을 억제시킨다²³⁾. 또한 PG은 점막 손상에 관여할 수 있는 TNF α 생성을 억제시킨다³⁾. 따라서 침습성 세균 감염 초기에 대장상피세포로부터 유도되는 PG이 친염증성 cytokine에 대해 길항적으로 작용할 가능성도 제시되지만, 본 실험에서 COX-2 특이 억제제인 NS-398을 사용해서 PGE₂의 생성을 차단하여도 IL-8 발현에는 별 영향이 없었다. 그런데 침습성 세균에 감염된 대장상피세포에서는 NF- κ B의 활성이 증가된다⁹⁾. 또한 NF- κ B가 활성화될 경우 그 signal에 의해 IL-8과 COX-2 유전자의 발현이 상향 조절된다⁹⁾. 따라서 NS-398을 작용시켰을 때, PGE₂의 생성이 감소하는 반면, IL-8 생성에는 별 영향이 없었다는 본 연구 결과로 미루어, NS-398은 NF- κ B pathway 활성화 이후 단계에 작용할 것으로 보인다. 그러나 아직까지 침습성 세균 감염에 의해 증가된 PG이 친염증성 cytokine에 대해 어떤 영향을 미칠 지에 대해서는 확실히 규명된 바 없으므로, 향후 이에 대한 연구가 요망된다.

본 실험에서 caspase-3은 감염 6시간이 지나서야 활성화되었고, 실질적인 DNA 분절화는 감염 18시간이 지나서야 뚜렷이 나타났다. 이에 비하여 COX-2 및 PGE₂ 발현 증가는 apoptosis 유도 과정에 비하여 상대적으로 일찍 시작되고 있었다. 이 때 PGE₂ 생성을 차단했을 경우 대장상피세포의 apoptosis가 증가한다는 사실에 비추어, 증가된 PGE₂는 감염 초기에 상피세포 apoptosis 유도를 차단하는 역할을 수행할 것으로 추정된다. 이와 같은 현상은 *H. pylori*를 감염시킨 위상피세포에서도 동일하게 관찰되었다²¹⁾. 따라서 세균 감염증에 의한 COX-2 발현/PGE₂ 생성 증가와 이에 의한 감염 세포의 apoptosis 억제는 장관 점막 세균 감염증의 일반적인 특성일 가능성이 있다. 그러나 COX-2 발현/PGE₂ 생성 증가라는 현상이 감염병의 병리기전 상 apoptosis의 억제 효과 이외에 어떤 역할을 하는지에 대해서는 좀더 깊은 연구가 필요할 것이다.

침습성 세균을 감염시킨 대장상피세포 이외에도, 유전자 도입을 통해 COX-2 발현을 인위적으

로 증가시킨 세포에서도 apoptosis가 억제된다³⁰⁾. 그렇지만 아직까지 COX-2가 apoptosis 과정 중 어느 단계에 작용하는 지는 확실치가 않다. 본 실험에서 COX-2 특이 억제제인 NS-398을 처리했을 때, caspase-3의 활성이 증가하였다. 그런데 caspase-3은 apoptosis의 signal 전달 과정 중 하부 단계에 위치한다¹⁵⁾. 따라서 *Salmonella* 감염증에서 나타나는 COX-2 발현/PGE₂ 생성 증가에 의한 apoptosis 억제 효과는 caspase-3 활성화 이전 단계에 작용할 가능성이 높다.

PGE₂의 또 다른 기능 중의 하나로 wound healing을 들 수 있다^{3,26,31)}. 따라서 증가된 PGE₂에 의한 대장상피세포 apoptosis의 억제라는 관찰을 토대로 미루어 볼 때, 증가된 PGE₂가 침습성 세균 감염에 의해 파괴된 점막 상피세포층의 integrity 회복에 관여할 가능성이 있다. 이와 같은 추정을 뒷받침할 수 있는 또 다른 근거로서 human xenograft model에 *Salmonella*를 감염시켰을 때, 대장상피세포의 증식이 증가된다는 보고와⁷⁾ 인공 합성 PG을 염증세포에 작용시켰을 때, 조직세포에 손상을 주는 물질의 분비가 억제된다는 보고³⁾를 들 수 있다. 이와 같은 여러 관찰들은 침습성 세균 감염에 의한 대장 점막 상피세포의 apoptosis 진행 속도를 늦출 뿐 만 아니라, apoptosis로 파괴된 대장 점막 상피세포층의 integrity 회복에 PG이 관여하고 있음을 시사해 준다. 결론적으로 PGE₂에 의한 대장상피세포의 apoptosis 억제는 장관 상피세포층의 integrity 회복 그리고 PGE₂에 의한 secretion의 증가는 대장 점막으로부터 감염된 세균을 제거하는 기능을 수행할 가능성이 매우 높다. 그러므로 침습성 세균에 감염된 대장상피세포로부터 COX-2 mRNA 발현 및 PGE₂ 생성 증가는 일종의 방어 기전으로 작용하리라 추정된다.

결 론

병원성 세균이 장관 점막 상피세포에 침입했을 때, 상피세포로부터 점막 염증 반응을 촉발시킬 수 있는 친염증성 매개체가 유도된 후, 최종적으로 상피세포는 apoptosis 과정을 밟게 된다. 본 연구에서는 *S. dublin*과 invasive *E. coli*가 대장상피세포에 감염되었을 때 나타나는 COX-2의 발현과 apoptosis의 관계를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. dublin*과 invasive *E. coli*를 감염시킨 HT-29

세포에서는 감염 초기부터 COX-2 mRNA 발현과 PGE₂ 생성이 증가되었다.

2. *S. dublin*을 감염시킨 HT-29 세포에서 COX-2 mRNA가 peak에 도달한 감염 3시간에는 caspase-3 및 apoptosis의 증가가 관찰되지 않았다. 그러나 감염 6시간이 지난 후에야 비로소 caspase-3의 활성이 증가되어 24시간까지 지속되었다. 반면, 실질적인 DNA 분절화는 감염 18시간이 지나서야 나타나기 시작하였다.

3. *S. dublin* 또는 *invasive E. coli*를 감염시킨 HT-29 세포에 COX-2 특이 억제제인 NS-398을 가하여 PGE₂의 생성을 완전히 차단했을 때, apoptosis와 caspase-3 활성도는 이들 침습성 세균만을 감염시킨 군에 비하여 현저하게 증가되었다 ($p < 0.05$).

이와 같은 결과에 비추어 *S. dublin*에 감염된 대장장상피세포에서는 COX-2 발현의 증가와 더불어 PGE₂ 생성이 증가되고, 이것에 의해 장상피세포의 apoptosis가 억제됨으로써 숙주 방어 기전에 관여할 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 1) 김정목, 정현채, 조양자, 송인성, 김정룡: *Helicobacter pylori*의 실험적 감염에 의하여 유발되는 인체 위장피세포에서의 proinflammatory cytokine 유전자의 발현 양상 및 정량. *대한미생물학회지* **30**: 651-663, 1995.
- 2) Appleton IA, Tomlinson A, Willoughby DA: Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv Pharmacol* **35**: 27-78, 1996.
- 3) Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara Y, Kobayashi K, Kuroki T: Prostaglandins in the stomach: an update. *J Clin Gastroenterol* **27**: S1-S11, 1998.
- 4) Bhattacharyya DK, Lecomte M, Dunn J, Morgans DJ, Smith WL: Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. *Arch Biochem Biophys* **317**: 19-24, 1995.
- 5) Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD: Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 657-662, 1997.
- 6) Crawford JM: *The gastrointestinal tract*. In Co-trans RS, Kumar V, Robbins SL (eds), *Pathologic Basis of Diseases*, 5th ed. Philadelphia, Saunders, pp767-793, 1994.
- 7) Eberhart CE, DuBois RN: Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **109**: 285-301, 1995.
- 8) Eckmann L, Stenson WF, Savidge TC, Lowe DC, Barrett K, Fierer J, Kagnoff MF: Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. *J Clin Invest* **100**: 296-309, 1997.
- 9) Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Troung F, Eckmann L, Kagnoff MF: Nuclear factor- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* **163**: 1457-1466, 1999.
- 10) Futake N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S: NS-398, a new anti-inflammatory, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* **47**: 55-59, 1994.
- 11) Galan JE, Curtiss R: Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 6383-6387, 1989.
- 12) Giannella RA, Rout WR, Formal SB: Effects of indomethacin on intestinal water transport in *Salmonella*-infected rhesus monkeys. *Infect Immun* **17**: 136-139, 1977.
- 13) Gots RE, Formal SB, Giannella RA: Indomethacin inhibition of *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *cholera*-mediated rabbit ileal secretion. *J Infect Dis* **130**: 280-284, 1974.
- 14) Gracey M, Phadke MA, Burke V, Raut SK, Singh B: Aspirin in acute gastroenteritis: a clinical and microbiological study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **3**: 692-695, 1984.
- 15) Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWS, McManus BM: Apoptosis: molecular aspects of cell death and diseases. *Lab Invest* **78**: 893-913, 1998.

- 16) Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL: Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* **59**: 2223-2228, 1999.
- 17) Kagnoff MF, Eckmann L: Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**: 6-10, 1997.
- 18) Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G: Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* **111**: 445-454, 1996.
- 19) Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthot T, Kagnoff MF: Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial infection. *J Clin Invest* **102**: 1815-1823, 1998.
- 20) Kim JM, Jung HC, Jin DS, 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.
- 21) Kim JM, Jung HC, Kim JS, Ko ES, Song IS, Kim CY: Cyclooxygenase-2 is upregulated in human gastric epithelial cells infected with *H. pylori*. *Gastroenterology* **116**: A215, 1999.
- 22) 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* 2000 (in press).
- 23) Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB: Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* **137**: 3189-3194, 1986.
- 24) Lanza FL, Kochamn RL, Geis GS, Rack EM, Deysach LG: A double-blind, placebo-controlled, 6-day evaluation of two doses of microprostol in gastroduodenal mucosal protection against damage from aspirin and effects on bowel habits. *Am J Gastroenterol* **86**: 1743-1748, 1991.
- 25) Matuchansky C, Mary JY, Bernier JJ: Further studies on prostaglandin E1-induced jejunal secretion of water and electrolytes in man, with special reference to the influence of ethacrynic acid, furosemide, and aspirin. *Gastroenterology* **71**: 274-281, 1976.
- 26) Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL: Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* **98**: 2076-2085, 1996.
- 27) Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* **282**: 1254-1257, 1999.
- 28) Smith WL, DeWitt DL Prostaglandin endoperoxidase H synthase-1 and -2. *Adv Immunol* **62**: 167-215, 1996.
- 29) Svanborg C, Godaly G, Hedlund M: Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opinion Microbiol* **2**: 99-105, 1999.
- 30) Tsujii M, DuBois RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase-2. *Cell* **83**: 493-501, 1995.
- 31) Wallace JL, Tigley AW: Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. *Aliment Pharmacol Ther* **9**: 227-235, 1995.
- 32) Weymer A, Huott P, Liu W, McRoberts JA: Dharmasathaphorn K. Chloride secretory mechanism induced by prostaglandin E1 in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* **76**: 1828-1836, 1985.
- 33) Yusof WN, Nagaratnam M, Koh CL, Puthuchery S, Pang T: Release of prostaglandin E2 by human mononuclear cells exposed to heat-killed *Salmonella typhi*. *Microbiol Immunol* **37**: 667-670, 1993.