

TNBS 유도 대장염에서의 Microarray 분석과 *Saccharomyces boulardii*의 역할에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병연구소, 경희대학교 의과대학 내과학교실*, 고려대학교 생명과학대학†

이상길 · 김효종* · 지성길†

Saccharomyces boulardii Reduced Intestinal Inflammation in Mice Model of 2,4,6-trinitrobenzene Sulfonic Acid Induced Colitis: Based on Microarray

Sang Kil Lee, M.D., Hyo Jong Kim, M.D.*, and Sung Gil Chi, Ph.D.†

Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Yonsei University College of Medicine, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyung Hee University*, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University†, Seoul, Korea

Background/Aims: *Saccharomyces boulardii* has been reported to be beneficial in the treatment of inflammatory bowel disease. The aim of this work was to evaluate the effect of *S. boulardii* in a mice model of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis and analyze the expression of genes in *S. boulardii* treated mice by microarray. **Methods:** BALB/c mice received TNBS or TNBS and *S. boulardii* treatment for 4 days. Microarray was performed on total mRNA from colon, and histologic evaluation was also performed. **Results:** In mice treated with *S. boulardii*, the histological appearance and mortality rate were significantly restored compared with rats receiving only TNBS. Among 330 genes which were altered by both *S. boulardii* and TNBS (>2 folds), 193 genes were down-regulated by *S. boulardii* in microarray. Most of genes which were down-regulated by *S. boulardii* were functionally classified as inflammatory and immune response related genes. **Conclusions:** *S. boulardii* may reduce colonic inflammation along with regulation of inflammatory and immune responsive genes in TNBS-induced colitis. (Korean J Gastroenterol 2010;55:33-45)

Key Words: *Saccharomyces boulardii*; Microarray; TNBS colitis

서 론

Probiotics의 사람이 복용하였을 때 건강에 이로운 효과를 나타내거나 치료효과를 나타내는 정의는 살아있는 미생물로서 정의된다.¹ Probiotics의 효과와 안정성은 이미 수십 년 전부터 인정되어 왔으며, 이 중에서 효모(yeast)인 *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*)는 호열성 및 비병원성 균주

로서 항생제 연관 설사, 여행자 설사 등의 질환에 이미 널리 사용되고 있다.² 이외에도 *Clostridium difficile*에 의한 위막성 장염의 치료와 재발 방지, 소아에서의 급성 설사증, 과민성 장증후군과 후천성면역결핍증환자에 동반된 설사에도 좋은 효과를 보였다.³ 최근에는 크론병에서도 메살라민(mesalamine)만 투여한 것보다 *S. boulardii*를 같이 투여한 환자에서 재발이 적은 것으로 보고되었다.^{4,6}

접수: 2009년 2월 5일, 승인: 2009년 7월 29일
연락처: 이상길, 120-752, 서울시 서대문구 성산로 250
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: (02) 2228-1991, Fax: (02) 393-6884
E-mail: sklee@yuhs.ac

* 이 논문은 2006년도 연세대학교 학술연구비와 2008년도 소화기병연구소 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

Correspondence to: Sang Kil Lee, M.D.
Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, 250, Seongsanno, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-1991, Fax: +82-2-393-6884
E-mail: sklee@yuhs.ac

지금까지 *S. boulardii*가 효과를 나타내는 기전에 대해서는 많은 연구가 진행되었다. *S. boulardii*는 숙주의 면역 기능을 강화시키는 역할을 하는 것으로 보고되었는데 Kupper 세포,⁷ 과립구,⁸ 단핵구⁸의 기능을 활성화와 염증이 있는 곳으로의 이동 촉진과 부과적인 immunoglobulin A⁷의 분비 증가가 기전으로 보고되었다. 이 외에도 *S. boulardii*는 병원성 세균이나 염증성 사이토카인에 의한 막투과도의 이상을 방지하는 효과를 보였는데, 이는 tight-junction 구성물질인 zonula occludens (ZO-1), claudin-1, ZO-2 같은 물질의 농도와 성상을 유지하는 기전으로 알려졌다.⁹ *S. boulardii* 자체가 항염증 작용을 한다는 최근의 연구결과도 알려졌는데 interleukin 8 (IL-8), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) 등의 염증성 사이토카인에 의한 염증반응을 억제하였다.³ 이는 전사인자인 NF- κ B^{9,10}나 mitogen-activated protein kinase (MAPK)⁹나 nitric oxide (NO)¹¹의 활성화를 억제하거나, 항염증 작용과 연관된 것으로 알려진 peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR- γ)¹²를 증가시키는 작용을 통한 것으로 보고되었다. 이러한 기전이 알려짐에 따라서 *S. boulardii*를 이용한 염증성 질환에서의 치료에 대한 모색이 되고는 있으나, 다양한 염증 반응 신호 전달체에서 *S. boulardii*가 어떤 작용을 할지에 대해서는 보다 폭넓은 연구가 필요한 실정이다.

이번 연구는 microarray 분석법을 이용하여 *S. boulardii*의 처리가 Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)로 대장염을 유도한 흰쥐에서 어떠한 유전자 변화를 보여주는지를 분석하고자 한다.

대상 및 방법

1. TNBS를 이용한 흰쥐에서의 장염 유발

8주령의 수컷 BALB/c (Samtako Bio Korea, Seoul, Korea) 흰쥐를 이용하였다. 실험 전에 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으나 TNBS 처리 2시간 전부터 물 이외의 사료를 제한하였다. 흰쥐에 장염을 유발하기 위해서, 가볍게 마취한 다음 외경 2 mm 크기의 경구 식이용 관을 이용하여 항문으로 TNBS (2 mg)와 50% 에탄올 혼합물(0.1 mL)을 10마리에게 투여하였고, 대조군 5마리에게는 동량의 생리식염수를 주입하였다. 주입한 후에 주입된 용액이 흘러내리지 않도록 약 3분간 꼬리를 높인 자세를 유지하였다. 장염 유발 4일째에 흰쥐를 희생하였다. 개복한 후에 대장의 말단부를 제거하여 중축으로 절개를 하고 난 후에 생리식염수로 세척하고 난 뒤, 육안으로 장염의 정도가 가장 심한 부분에서 조직을 두 개 채취하여 하나는 조직학적 분석, 나머지는 microarray에 이용하였다. Microarray를 위해서는 5마리

의 개체를 무작위로 선택하였다. 실험 후 흰쥐는 이산화탄소 혼수를 이용해 안락사시켰다.

2. *S. boulardii*의 처리

S. boulardii (비오플®, 건일제약, 서울)는 동결건조된 형태 (282.5 mg/캡슐, 5×10^9 생균/캡슐)로 제조사로부터 제공을 받았다. 첫날부터 실험 4일째까지 제공받은 *S. boulardii* 10 mg을 1 mL 생리식염수에 녹여서 하루에 두 번 영양관을 통해서 10마리의 흰쥐에게 경구 투여하였다.

3. 장염의 조직학적 평가

TNBS에 의해 유발된 장염을 평가하기 위해서 조직을 채취하여 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 뒤 조직학적 평가를 위해서 파라핀 함몰 조직 절편을 만들었다. 조직 절편은 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였고 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 각 부분의 조직학 변화는 궤양의 유무, 염증의 정도, 병변의 깊이와 섬유화의 정도를 각각 점수로 환산하여 평가하였으며 각 항목별 점수를 합산하여 계산하였다.¹³

4. Microarray 분석

Microarray는 마이크로젠의 DNA chip 기술 매뉴얼(마크로젠, 서울, 한국)에 따라서 시행되었다. 간략히 설명하면 20 mg RNA templates를 0.2 mL의 T7-oligo (dT) promotor 1 mL의 control mRNA가 들어 있는 1 mL PCR tube에 혼합한다. 이 혼합물에 다시 nuclease-free water를 채워 총량이 21 μ L가 되도록 한다. 그 이후에 RNA는 70°C에 5분간 denature과정을 거치고 2분간 얼음에 둔다. 그 뒤에 8 μ L의 5X RT buffer, 2 μ L의 0.1 M DTT, 1 μ L의 AMV reverse transcriptase, 0.5 μ L의 RNase inhibitor, 2 μ L의 10 mM dNTP과 5.5 μ L의 nuclease-free water를 RNA 용액에 추가하여 thermal cycler를 이용해서 RT reaction을 한다.

다음으로는 20 μ L의 5X second strand buffer, 0.75 μ L의 10 mM dNTP, 3.25 μ L의 second strand enzyme 혼합물과 36 μ L의 nuclease-free water를 RT reaction 혼합물에 추가한 후에 16°C에서 2시간 반응시킨 뒤에 10 μ L의 T4 DNA polymerase를 첨가하고 다시 16°C에서 5분간 반응시킨다. 6.8 μ L 0.5 M EDTA 용액을 첨가하여 반응을 종료시킨 후에 0.75 μ L RNase I를 첨가한다. 이 용액을 37°C에서 30분간 반응시킨 후에 다시 2.5 μ L proteinase K를 첨가한 후에 37°C에서 30분간 반응시킨다. Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용해서 매뉴얼을 이용해 RT product를 정제하였다. Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용해서 In vitro transcription labeling을 시행하였다. GeneChip (AB 1700 mouse chip, 마크로젠)을 이용하여 microarray를 시행하였으며, Applied Bio-

systems 1700 chemiluminescent Microarray Analyzer를 이용해서 영상을 스캔하고 분석하였다. Microarray의 농도차이는 Avadis Prophetic 3.3 version software (Strand Genomics)를 이용해서 정상화 및 그룹화되었고, Lowess normalization 방법을 이용해 기술적 변이를 제거하였고, 2 fold change method K-means cluster를 이용하여 clustering하였다. 유전자의 생리학적인 분자학적 기능을 분류하기 위해서는 PANTHER database (<http://www.pantherdb.org/>)를 이용하였다.

결 과

1. *S. boulardii*가 TNBS로 유발한 장염의 조직학적 변화에 미치는 영향

TNBS를 처리한 10마리의 흰쥐 중에서 3마리, *S. boulardii*를 처리한 10마리 중에서 1마리가 4일 이전에 사망하였으며, 대조군 5마리 중에서 사망한 개체는 없었다. TNBS를 처리한 흰쥐에서는 대조군에 비해서 심한 궤양과 염증반응과 부분적인 섬유화가 관찰되었으며(Fig. 1B), *S. boulardii*를 처리한 군에서는 궤양, 염증반응 및 섬유화 반응이 TNBS군에 비해 정도가 감소됨을 보였고, 이러한 정도를 점수화하였을 때에 통계학적으로 의미 있는 조직학적 손상의 감소를 보였다(Fig. 1C, D)($p < 0.05$).

2. TNBS와 *S. boulardii*에 의한 microarray칩의 발현 양상

마크로젠의 DNA chip Microarray를 이용하여 총 33,013개의 유전자를 분석하였으며, TNBS에 의해서 총 1,510개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2배 이상 발현변이를 나타내었다. 이 중 총 738개의 유전자들이 2배 이상의 과발현을 나타내었고, 772개의 유전자들이 2배 이상의 저발현을 나타내었다. 이 중에서 *S. boulardii*가 TNBS에 의한 유전자 변화를 유의한 수준인 2배 이상으로 변화시킨 유전자가 330개 있었다. 이 중에서 TNBS에 의해 저발현된 유전자를 더욱 저발현시킨 것이 23개, 저발현된 유전자의 저발현폭을 감소시킨 것이 89개, TNBS에 의해서 과발현된 유전자를 더욱 과발현시킨 것이 26개, TNBS에 의해서 과발현된 유전자의 과발현폭을 감소시킨 것이 193개였다(Table 1, 2). 이를 볼 때에 *S. boulardii*는 주로는 TNBS에 의해서 과발현된 유전자의 과발현폭을 감소시키거나, TNBS에 의해 저발현된 유전자의 저발현폭을 감소시키는 작용을 하였다.

3. *S. boulardii*에 의한 유전자 변화의 유전자 기능에 따른 발현 양상

TNBS에 의한 유전자 발현 변화에 *S. boulardii*가 미치는 영향을 유전자의 기능별로 분석하였을 때에, 다른 기능의

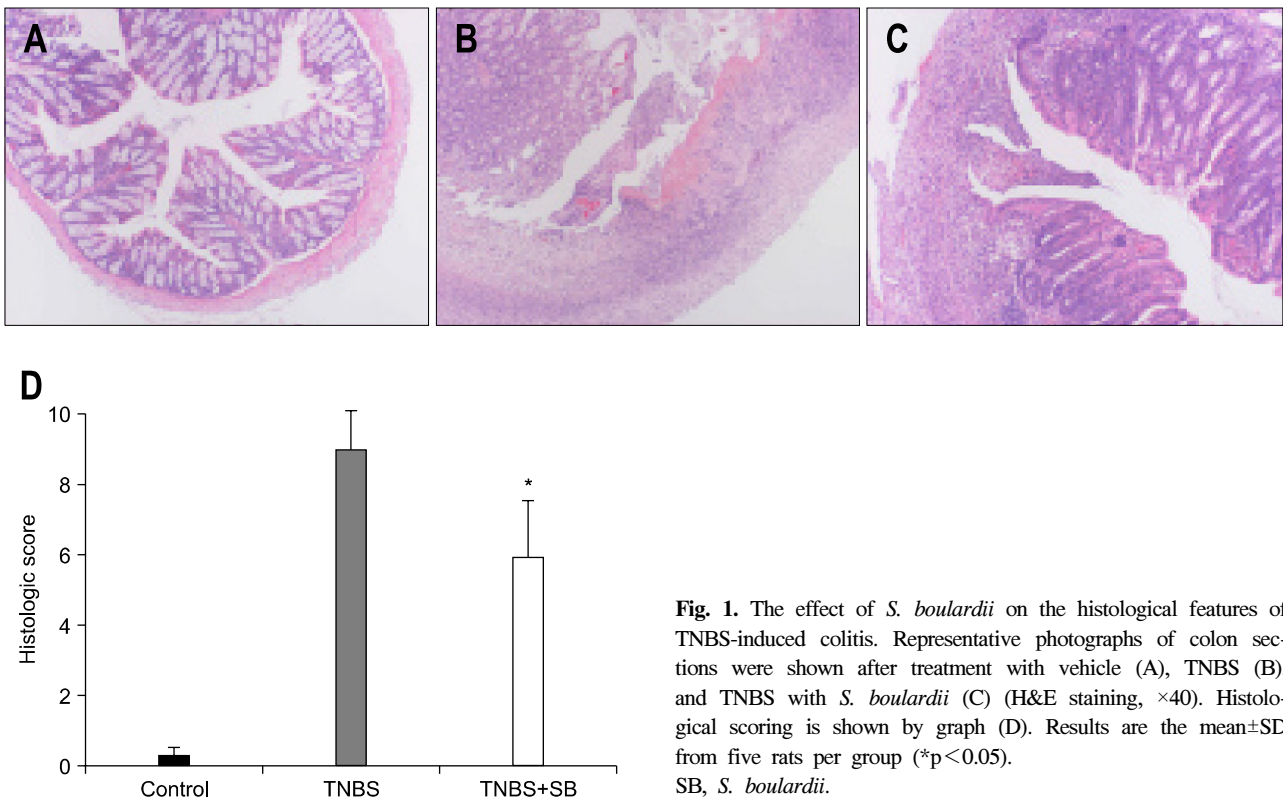


Fig. 1. The effect of *S. boulardii* on the histological features of TNBS-induced colitis. Representative photographs of colon sections were shown after treatment with vehicle (A), TNBS (B), and TNBS with *S. boulardii* (C) (H&E staining, $\times 40$). Histological scoring is shown by graph (D). Results are the mean \pm SD from five rats per group (* $p < 0.05$). SB, *S. boulardii*.

Table 1. Down-regulated Genes Modulations by *S. boulardii* on TNBS-induced Colitis Mice

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG8652.2	BB219290	Expressed sequence BB219290	23.927
mCG65051.3	Tgtp	T-cell specific GTPase	22.2054
mCG15918.2	Ltb	Lymphotoxin B	21.3349
mCG12531.2	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	20.4804
mCG12528.2	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	18.5716
mCG22168.2	Cd53	CD53 antigen	14.7447
mCG23449.2	Cd37	CD37 antigen	14.6591
mCG7050.1	Thrsp	Thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)	14.6573
mCG17997.2	Indo	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	14.3727
mCG146987	Gbp1	Guanylate nucleotide binding protein 1	14.1406
mCG2198.2	Il2rg	Interleukin 2 receptor, gamma chain	13.9665
mCG12963.1	Cd52	CD52 antigen	13.1077
mCG4163.1	Pou2af1	POU domain, class 2, associating factor 1	12.7336
mCG128171.1	Samsn1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	12.5214
mCG22405.1	Coro1a	Coronin, actin binding protein 1A	12.3893
mCG20328.2	5830443L24Rik	RIKEN cDNA 5830443L24 gene	11.4283
mCG13343.2	Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	11.2916
mCG3876.1	Ptpcap	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C polypeptide-associated protein	11.1825
mCG124701.3			11.0969
mCG132703.2	H2-DMb2	Histocompatibility 2, class II, locus Mb2	10.7731
mCG15086.3			9.63236
mCG12169.2	0610039P13Rik	RIKEN cDNA 0610039P13 gene	9.17402
mCG140488	Upp1	Uridine phosphorylase 1	8.91284
mCG19184	Grem1	Gremlin 1	8.84209
mCG13376.2	6330406L22Rik	RIKEN cDNA 6330406L22 gene	8.65699
mCG7082.2	Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	8.18446
mCG117393.1	Serpina1e; Serpina1d; Serpina1b	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1e;serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1d;serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1b	8.11905
mCG128030.1	Ian4	Immune associated nucleotide 4	8.00182
mCG3870.3	1810062O14Rik	RIKEN cDNA 1810062O14 gene	7.97324
mCG131283			7.94101
mCG8259.2	Il16	Interleukin 16	7.90424
mCG6027.2	Ii	Ia-associated invariant chain	7.57815
mCG113208.1	H2-Aa	Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	7.50726
mCG133140.1	Gnai2	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	7.40195
mCG141811			7.26196
mCG128047.2	Ian1	Immune associated nucleotide 1	7.19016
mCG4614.2	Cnot7	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7	7.1873
mCG13056.2	Wars	Tryptophanyl-tRNA synthetase	7.17602
mCG1828.1	Edg1	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	7.17183
mCG145061	Myo1g	Myosin IG	6.99996
mCG127161.1			6.99374
mCG128050.2	Ian6	Immune associated nucleotide 6	6.97217
NM_007534.1	Bcl2a1d; Bcl2a1b;Bcl2a1a	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d;B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b;B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	6.96582
mCG142489	E430029F06	Hypothetical protein E430029F06	6.91118
mCG117402			6.57967
mCG128236.1	Hcls1	Hematopoietic cell specific Lyn substrate 1	6.47773
NM_011335.1	Ccl21a; Ccl21c; Ccl21b	Chemokine (C-C motif) ligand 21a (leucine);chemokine (C-C motif) ligand 21c (leucine);chemokine (C-C motif) ligand 21b (serine)	6.43251

Table 1. Continued

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG9941.2	H2-Ea	Histocompatibility 2, class II antigen E alpha	6.35982
mCG122229	Gbp2	Guanylate nucleotide binding protein 2	6.33139
mCG126565.1	Snn	Stannin	6.25258
mCG21119.2	Gbp3	Guanylate nucleotide binding protein 3	6.17898
mCG20688.2	Igtp	Interferon gamma induced GTPase	6.15952
mCG17400.2	Pik3cd	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	6.11848
mCG131749.1	Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	6.07188
mCG126030.1			5.96361
mCG10585.2	Lcp1	Lymphocyte cytosolic protein 1	5.90658
mCG132597.1	Slc28a2	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	5.87419
NM_011335.1	Ccl21a; Ccl21c;Ccl21b	Chemokine (C-C motif) ligand 21c (leucine);chemokine (C-C motif) ligand 21b (serine);chemokine (C-C motif) ligand 21a (leucine)	5.85052
mCG5445.2	Slpi	Secretory leukocyte protease inhibitor	5.83702
mCG23058.2	2210407C18Rik	RIKEN cDNA 2210407C18 gene	5.77665
mCG147553			5.76224
mCG12906.1			5.72635
NM_008218.1	Hba-a1	Hemoglobin alpha, adult chain 1	5.70473
mCG16534.2	Rnase6	Ribonuclease A family, member 6	5.6391
AK080028.1			5.62519
mCG128455.1	Klhl6	Kelch-like 6 (<i>Drosophila</i>)	5.5446
mCG3553.3			5.52214
mCG1551.2	Cd3g	CD3 antigen, gamma polypeptide	5.5062
mCG9784.2	Rbp1	Retinol binding protein 1, cellular	5.39273
mCG9940.2	H2-Eb1	Histocompatibility 2, class II antigen E beta	5.38968
mCG10007.2	Cd48	CD48 antigen	5.27933
mCG10007.2	Cd48	CD48 antigen	5.27933
mCG1036474.1	Gm457	Gene model 457, (NCBI)	5.23029
mCG132704.1	H2-Ab1;Rmcs1	Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1;response to metastatic cancers 1	5.18907
mCG23208.1	Fscn1	Fascin homolog 1, actin bundling protein (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	5.02444
mCG142733	Ebi2	Epstein-Barr virus induced gene 2	4.95872
mCG9639.2	Lmo2	LIM domain only 2	4.75237
mCG5817.2	6330442E10Rik	RIKEN cDNA 6330442E10 gene	4.63981
mCG11329.2	Prg	Proteoglycan, secretory granule	4.52879
mCG2785.1	Ly6e	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	4.48894
mCG22224.1	S100a14	S100 calcium binding protein A14	4.48858
mCG147775			4.38969
mCG7804.1	Cd2	CD2 antigen	4.38821
mCG119015.1	Art2a	ADP-ribosyltransferase 2a	4.36866
mCG3383.2	Itgb2	Integrin beta 2	4.35904
mCG147992			4.3208
mCG14500.2	Rgl1	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	4.29709
mCG14500.2	Rgl1	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	4.29709
mCG122231			4.28879
mCG21986.3	Samhd1	SAM domain and HD domain, 1	4.27603
mCG23016.2	H2-DMa	Histocompatibility 2, class II, locus DMa	4.24347
mCG23012.2	Tap1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	4.23619
mCG12901.1	Ms4a6b	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	4.23418
mCG23392.1	Ubd	Ubiquitin D	4.17595
NM_175219.2	4930565N07Rik; A530032D15Rik	RIKEN cDNA 4930565N07 gene; RIKEN cDNA A530032D15Rik gene	4.17036
mCG12686.2	Cyfp2	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	4.14345

Table 1. Continued

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG119015.1	Art2a	ADP-ribosyltransferase 2a	4.12792
mCG123521.1			4.0905
mCG12243.1	Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase	4.08069
mCG131454.1	Serpina1a	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1a	3.89904
mCG130733.1	Mef2c	Myocyte enhancer factor 2C	3.837
mCG130733.1	Mef2c	Myocyte enhancer factor 2C	3.837
mCG124992	9230117N10Rik	RIKEN cDNA 9230117N10 gene	3.81886
mCG1025534.1			3.77988
mCG127143.3	Bin1	Bridging integrator 1	3.73025
mCG68209.2	Ly6a	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A	3.69634
mCG50405	Gpr10	G protein-coupled receptor 10	3.68147
mCG128035.2	Imap38	Immunity-associated protein	3.67731
mCG21468.1	Ifit2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	3.66858
mCG3160.2	Nin	Ninein	3.65906
mCG4723.2	D1Ert578e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 578, expressed	3.64958
AK033032.1			3.63308
mCG21922.2	BC065791	cDNA sequence BC065791	3.61352
mCG16735.2	L259	L259	3.57373
mCG13158.1	Mfng	Manic fringe homolog (Drosophila)	3.56692
mCG18182.2	Satb1	Special AT-rich sequence binding protein 1	3.54207
mCG7943.2	Wsb2	WD repeat and SOCS box-containing 2	3.53116
mCG6766.2	Il18bp	Interleukin 18 binding protein	3.52036
AK079036.1			3.50756
mCG126571.1	Socs1	Suppressor of cytokine signaling 1	3.49201
mCG10374.1	Ushbp1	Usher syndrome 1C binding protein 1	3.48985
mCG142594	AW539457	Expressed sequence AW539457	3.47479
mCG1037964.1			3.47235
mCG3070.2	Prkcb	Protein kinase C, beta	3.46484
mCG3250.1	Bgn	Biglycan	3.44171
AK048574.1			3.42587
mCG3224.1	Ube2l6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	3.41934
mCG18018.1	Serpine1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1	3.34988
mCG1939.1	Slc15a3	Solute carrier family 15, member 3	3.32076
mCG14415.3	Ifi47	Interferon gamma inducible protein	3.30643
mCG20689.3	AI481100	Expressed sequence AI481100	3.30637
mCG13352.1	Pscd4	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 4	3.26798
mCG8601.2	Trim30	Tripartite motif protein 30	3.23656
mCG133006.1	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	3.22899
mCG119756.1	Evi2a;Evi2b	Ecotropic viral integration site 2a;ecotropic viral integration site 2b	3.2026
mCG13425.2	Cnn2	Calponin 2	3.18133
mCG16148.2	B130017P16Rik	RIKEN cDNA B130017P16 gene	3.17662
mCG23011.3	Psmb9	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	3.15542
mCG15923.1	Aif1	Allograft inflammatory factor 1	3.14676
mCG115375.1	Rin3	Ras and Rab interactor 3	3.13998
mCG140647.1	Ebf1	Early B-cell factor 1	3.10564
mCG141865	Il10ra	Interleukin 10 receptor, alpha	3.09147
mCG120042.2	Ifi203	Interferon activated gene 203	3.07131
mCG67998.3	BC028265	cDNA sequence BC028265	3.06844
mCG15413.2	AI132321	Expressed sequence AI132321	3.04168
mCG21536.1	Rgs19	Regulator of G-protein signaling 19	2.99075
mCG9634.1	Msc	Musculin	2.93674

Table 1. Continued

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG134497	Arhgap9	Rho GTPase activating protein 9	2.92521
mCG13049.2	Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	2.90988
mCG14532.1	Pla2g2a	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	2.81785
mCG123683.2	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	2.81546
mCG19410.2	Ifi1	Interferon inducible protein 1	2.79991
mCG19429.2	Cd83	CD83 antigen	2.78891
mCG14574.2	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	2.7282
mCG17340.2	Arhgef6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	2.72696
mCG10394.2	1110021O17Rik	RIKEN cDNA 1110021O17 gene	2.67625
mCG11761.2	Sipa1	Signal-induced proliferation associated gene 1	2.67308
AK039433.1			2.6576
mCG9128.2	Irf5	Interferon regulatory factor 5	2.61609
mCG23014.2	Psmb8	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)	2.59473
mCG6301.2	Mfge8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	2.59275
mCG8601.2	Trim30	Tripartite motif protein 30	2.56618
mCG10245.2	Chst2	Carbohydrate sulfotransferase 2	2.50992
NM_021342.1	Kcne4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	2.45661
mCG18089.1	9930117H01Rik	RIKEN cDNA 9930117H01 gene	2.38466
AK040125.1			2.38273
mCG16847.1	Ela1	Elastase 1, pancreatic	2.37377
mCG1036442.1			2.36078
mCG15331.2	Pscdbp	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	2.35156
mCG1044012.1			2.33769
mCG127250			2.33122
mCG2520.2	Msn	Moesin	2.32181
mCG118897.1			2.30729
mCG22120.1			2.29228
mCG131858	Malt1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	2.27686
mCG3993.2	Figl1	Fidgetin-like 1	2.26777
mCG127246			2.26028
mCG1036441.1			2.25944
mCG127079	Plcg2	Phospholipase C, gamma 2	2.25731
mCG131876.1			2.21653
mCG131871.1			2.20543
AK037888.1			2.2002
mCG142175.1			2.15129
mCG1322.2	2310015N21Rik	RIKEN cDNA 2310015N21 gene	2.14179
mCG120176	Xdh	Xanthine dehydrogenase	2.13901
mCG148075	Pirb	Paired-Ig-like receptor B	2.12779
mCG16780.2	1200002N14Rik	RIKEN cDNA 1200002N14 gene	2.12405
mCG121924.1	BC024988	cDNA sequence BC024988	2.09799
mCG121990.2			2.08857
mCG13347.2	Ncf4	Neutrophil cytosolic factor 4	2.03751
mCG13763.2	Zbp1	Z-DNA binding protein 1	2.00081
mCG142177			-2.2672
mCG8493.1	Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	4.7651

유전자보다는 염증반응(inflammatory response)과 면역 및 방어(immunity and defense response)에 관련된 유전자의 변화가 많았다(Fig. 2). 염증반응에 관여하는 유전자들 대부분은

TNBS에 의해서 증가하였으며, 이 중 Itgb2, Ccl21, IL16, Cxcl19, Cxcl10는 *S. boulandii*에 의해서 현저하게 감소하였다. 세포와 세포나 세포외 기질과의 결합에 관여하는 유전자들 대

Table 2. Up-regulated Genes Modulations by *S. boulardii* on TNBS-induced Colitis Mice

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG14995.1			14.3012
mCG144713			12.3179
mCG1048584.1			10.307
mCG22595.2	Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	9.12296
mCG23624.2			5.91482
mCG10187.2	Hp	Haptoglobin	5.28022
mCG17008.1	9130214H05Rik	RIKEN cDNA 9130214H05 gene	4.38685
mCG1036745.1	Clra	C lectin-related protein A	4.09383
mCG3025.2	Mal	Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	3.50259
mCG17572.1	Igfbp6	Insulin-like growth factor binding protein 6	3.15539
mCG23533.1	2700055K07Rik	RIKEN cDNA 2700055K07 gene	3.04113
mCG18681.2	Suox	Sulfite oxidase	3.00239
mCG126985.1	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1	2.78879
mCG64633.2	1600014C10Rik	RIKEN cDNA 1600014C10 gene	2.73547
mCG23648.1			2.66288
mCG14105.2	Slc30a1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	2.49302
mCG13846.2			2.42384
mCG18465.3	Rgs1	Regulator of G-protein signaling 1	2.35598
mCG123049.1			2.33164
mCG5749.2	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	2.32376
mCG13037.1	Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	2.22205
mCG128612.1	Retnlb	Resistin like beta	2.18414
mCG15002.2	Pcsk1	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	2.03469
mCG144019	Saa2	Serum amyloid A 2	-2.1437
mCG10001.1	Cyp2c40	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 40	-2.1528
mCG8136.1	Cyp2d9	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 9	-2.4565
mCG2287.1	Spon1	Spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	-2.499
AK020017.1			-2.5372
mCG22749.2	Cyp2f2	Cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-2.5767
mCG127939.2	Siat10	Sialyltransferase 10 (alpha-2,3-sialyltransferase VI)	-2.6004
mCG56771.1	V2r14;V2r15	Vomeroneasal 2, receptor, 14; vomeronasal 2, receptor, 15	-2.7693
mCG11079.2	Syt8	Synaptotagmin 8	-2.7721
mCG14330.2	Vmd2l1	Vitelliform macular dystrophy 2-like protein 1	-2.7847
mCG2257.2			-2.8908
mCG133073.1	Cyp2d10	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 10	-2.9862
mCG13564.2	Clic6	Chloride intracellular channel 6	-3.3309
mCG147772	Prss22	Protease, serine, 22	-3.3795
mCG144019	Saa2	Serum amyloid A 2	-3.4
mCG19608.1	Cldn14	Claudin 14	-3.4074
mCG2145.1	Cbr2	Carbonyl reductase 2	-3.5264
mCG141343.1	Olfir78	Olfactory receptor 78	-3.6151
mCG141087	Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	-4.3871
mCG142167			-4.4803
mCG120735.1	Clca2	Chloride channel calcium activated 2	-4.6123
NM_146058.1	BC025446	cDNA sequence BC025446	-4.8128
mCG113451.2	Gyk	Glycerol kinase	-5.9278
mCG145386			-7.8678
mCG140410			-8.892
mCG16663.2			-18.215
mCG12625.1	C530030I18Rik	RIKEN cDNA C530030I18 gene	-2.0197
mCG9091.2	Akr1c6	Aldo-keto reductase family 1, member C6	-2.0207
AK036268.1			-2.0449
AK033575.1			-2.0471

Table 2. Continued

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG131372.1	C730031G17	Hypothetical protein C730031G17	-2.0605
mCG4123.1	Slc37a2	Solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	-2.0646
mCG20217.1	1110036H21Rik	RIKEN cDNA 1110036H21 gene	-2.071
mCG128542	1810030J14Rik	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	-2.0728
mCG14936.2	Ankrd9	Ankyrin repeat domain 9	-2.1062
mCG18385.3	Prph1	Peripherin 1	-2.1267
mCG14756.1	Sult1c1	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1	-2.1515
mCG19644.1	9530008L14Rik	RIKEN cDNA 9530008L14 gene	-2.1565
mCG21373.1	Nags	N-acetylglutamate synthase	-2.1886
mCG16530	Ang2	Angiogenin, ribonuclease A family, member 2	-2.2097
mCG114463.1			-2.2176
mCG9562.2	B230106I24Rik	RIKEN cDNA B230106I24 gene	-2.2318
mCG1036820.1			-2.2359
mCG1097.3	Pcp4	Purkinje cell protein 4	-2.2432
mCG19913.2	Hao3	Hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 3	-2.261
mCG20217.1	1110036H21Rik	RIKEN cDNA 1110036H21 gene	-2.2621
mCG125080.1	Sst	Somatostatin	-2.286
mCG16684.2	Slc22a1	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	-2.295
mCG129806.1	Myh11	Myosin heavy chain 11, smooth muscle	-2.3381
mCG130231.1	Cyp2c37	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 37	-2.3582
mCG10065.2	Snurf;Snrpn	SNRPN upstream reading frame;small nuclear ribonucleoprotein N	-2.3624
AK013860.1			-2.4178
mCG11432.1	Abhd6	Abhydrolase domain containing 6	-2.4302
mCG9319.1	Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	-2.4433
mCG4878.1	Ckm	Creatine kinase, muscle	-2.4598
mCG128542	1810030J14Rik	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	-2.5076
mCG6071.2	Akr1b7	Aldo-keto reductase family 1, member B7	-2.5138
mCG21459.2	0610041G09Rik; Acta2	RIKEN cDNA 0610041G09 gene;actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	-2.5255
mCG129677.1	C030022K24Rik	RIKEN cDNA C030022K24 gene	-2.5297
mCG1122.2	Mab21l2	Mab-21-like 2 (C. elegans)	-2.6082
mCG123117.1	MGC68340	Unknown (protein for MGC:68340)	-2.6544
mCG1049272.1			-2.784
mCG16519.2	Ang1;Rnase4	Angiogenin, ribonuclease A family, member 1;ribonuclease, RNase A family 4	-2.8052
mCG6867.2	Cyp3a13	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	-2.9001
mCG14318.3	Ugt1a1;Ugt1a9; Ugt1a12;Ugt1a5; Ugt1a10;Ugt1a13; Ugt1a6;Ugt1a2	UDP-glucuronosyltransferase 1 family, member 1; UDP glycosyltransferase 1 family polypeptide A9; UDP glycosyltransferase 1 family polypeptide A12; UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A5; UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10; UDP glycosyltransferase 1 family polypeptide A13; UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6; UDP-glucuronosyltransferase 1 family, member 2	-2.9614
mCG119907.1			-3.0104
mCG3350.2	Clca1	Chloride channel calcium activated 1	-3.1356
mCG16440.2	Ostb	Organic solute transporter beta	-3.1435
mCG20604.2	9030617O03Rik	RIKEN cDNA 9030617O03 gene	-3.1734
mCG1028722			-3.2555
mCG7009.1	Iapp	Islet amyloid polypeptide	-3.2712
mCG20388.3	Cyp2d22	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	-3.317
mCG141179.1	Eif2c4	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 4	-3.3875
mCG123507.2	Nap1l5	Nucleosome assembly protein 1-like 5	-3.3916

Table 2. Continued

Probe ID	Gene symbol	Gene name	Folds
mCG147547			-3.4183
mCG20507.1			-3.4401
mCG6008.2	Ggt1	Gamma-glutamyltransferase 1	-3.4753
mCG20406.2	Tfpi2	Tissue factor pathway inhibitor 2	-3.5075
mCG123117.1	MGC68340	Unknown (protein for MGC:68340)	-3.5204
mCG23713.3	Cyp4f14	Cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 14	-3.5671
mCG142287	Slc26a3	Solute carrier family 26, member 3	-3.5847
BC050987.1			-3.6021
mCG18656.1	Tlr5	Toll-like receptor 5	-3.617
mCG13591.2	F830003B07	Hypothetical protein F830003B07	-3.6674
mCG147785	Saa3	Serum amyloid A 3	-3.7447
mCG117884	Hoxb6	Homeo box B6	-3.7462
mCG5070.2	9030425E11Rik	RIKEN cDNA 9030425E11 gene	-3.8063
mCG142672			-3.9345
mCG145172	Ces3	Carboxylesterase 3	-3.9714
mCG120048.1			-4.0282
mCG133246.1	9030624L02Rik	RIKEN cDNA 9030624L02 gene	-4.2692
mCG147785	Saa3	Serum amyloid A 3	-4.3242
mCG129928.1	Gsta2;Gsta1	Glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2);glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	-4.3994
mCG1178.1	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-4.4645
mCG7690.2	Car12	Carbonic anhydrase 12	-4.5391
mCG147297			-4.6285
mCG129934.1			-4.734
mCG142672			-4.755
mCG1544.3	Tmem25	Transmembrane protein 25	-5.1027
mCG125060			-5.2169
AK033690.1			-5.4956
mCG12622.1	Grp	Gastrin releasing peptide	-5.506
mCG18519.1	Fkbp5	FK506 binding protein 5	-6.2062
mCG23510.1	Ces2	Carboxylesterase 2	-6.3379
mCG23646.1	Gpt1	Glutamic pyruvic transaminase 1, soluble	-6.7527
mCG20040.2	Car1	Carbonic anhydrase 1	-6.8954
mCG141930	Slc10a2	Solute carrier family 10, member 2	-7.1089
mCG142670			-7.7334
mCG144014	Es22	Esterase 22	-7.8314
mCG141694			-8.6598
mCG23407.1	9130231C15Rik	RIKEN cDNA 9130231C15 gene	-8.8614
mCG119535	Hsd3b2	Hydroxysteroid dehydrogenase-2, delta<5>-3-beta	-10.737
mCG19918.2	Hsd3b6	Hydroxysteroid dehydrogenase-6, delta<5>-3-beta	-13.204
mCG4201	Cyp2d26	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	-16.967

Minus means that TNBS reduced gene expression.

부분도 TNBS에 의해서 증가하였으며, 이 중 Sip1, Cd37, Cd53는 *S. boulardii*에 의해서 현저하게 감소하였다. 세포의 주기, 증식과 분화에 관여하는 유전자들은 *S. boulardii*에 의해서 변화를 보이지 않았으며, 세포형태와 운동성에 관여하는 유전자 중에서 Nin, Msn, Evl, Lcp1, Rac2는 *S. boulardii*에 의해서 감소하였으며, Cldn14는 증가하였다. 코엔자임관련

유전자 중에서는 Rbp1의 TNBS에 의한 과발현을 *S. boulardii*에 의해서 감소시켰고, 발생에 관련된 유전자 중에서는 Mef2c, Lmo2, Ly6e, Grem1의 TNBS에 의한 과발현을 *S. boulardii*가 감소시켰다. 면역 및 방어에 관여된 유전자중에서 Ces3, 9130231C15Rik, Es22, Ces2, Tlr5, 9030624L02Rik, Saa3, Clra, Saa3의 TNBS에 의한 저발현을 *S. boulardii*가 감소

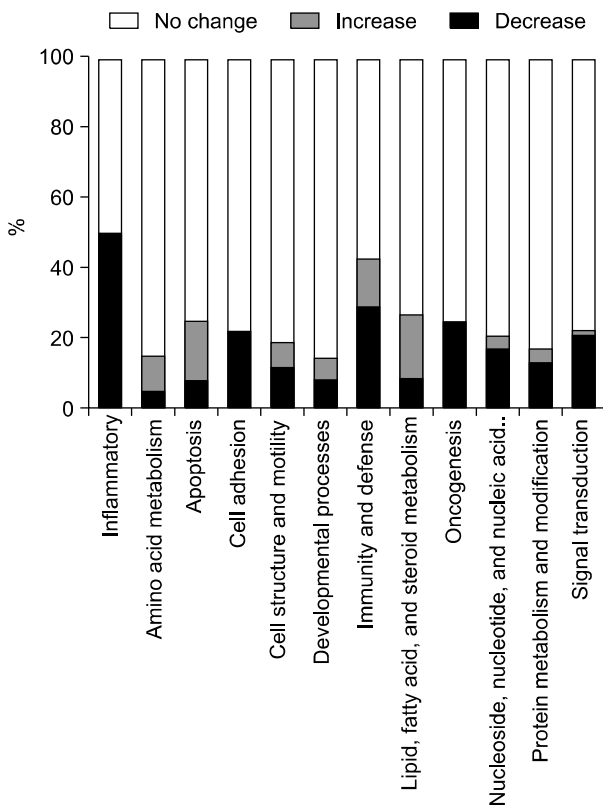


Fig. 2. Functional classification of differentially expressed genes on treatment of *Saccharomyces boulardii*.

시켰고, AI481100, IL10ra, Ifit2, H2-DMa, Cd3g, Pira3, H2-Ab1;Rmcs1, H2-Eb1, Cd48, Igtp, Gm457, Gbp2, H2-Ea, Ian1, Ian6, E4 30029F06, Ian4, Ii, H2-Aa, Gbp3, Anxa8, H2-DMb2, 5830443 L24Rik, Gbp1, Pou2af1, Ly6a, Ltb, Tgtp의 TNBS에 의한 과발현을 *S. boulardii*가 감소시켰다.

고 찰

이번 연구에서는 *S. boulardii*의 염증성 장질환에서의 효과와 작용 기전을 알아보기 위하여 TNBS로 유발한 대장염 동물모델을 이용하여 조직학적 분석과 microarray를 하였다. 이번 연구의 결과 *S. boulardii*는 TNBS로 대장염을 유발한 흰쥐의 조직학적 손상을 완화시켰고, TNBS에 의한 다양한 유전자 발현 변화에 영향을 주었으며, 특히 염증반응과 면역 및 방어 반응에 관여하는 유전자에 대해서 많은 영향을 주었다. 이러한 결과는 *S. boulardii*의 항염증 효과가 염증반응과 면역 및 방어 반응에 관여하는 유전자의 발현변화를 통해서 나타남을 강하게 시사한다.

TNBS로 유발된 흰쥐의 장염증은 임상적, 조직학적, 면역학적으로 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 중에서 크론병과 유사함이 알려져 있다.¹⁴ 이로 인해서 크론병을 연

구하기 위한 동물모델로서 TNBS를 많이 이용하고 있다. TNBS로 유발된 흰쥐의 장염증과 실제 크론병환자에서의 유전자 발현을 비교한 연구에 의하면, TNBS 유발 염증에서는 실제 크론병의 원인으로 알려진 염증반응, 면역 및 방어, 신호전달체계에 관여하는 유전자의 변화를 보였지만, 실제 크론병환자에서 나타나는 유전자 변화와는 차이가 있는 것으로 보고되었다.¹⁵ 이러한 차이는 microarray 분석 자체가 재현성이 떨어진다는 점과 더불어, 크론병은 만성적인 병인에 반해서 TNBS로 유도한 장염에서는 주로 만성적인 경과보다는 크론병의 초기 병인에 연관된 반응을 주로 보일 수밖에 없다는 점에서 설명이 되고 있다. 이번 연구는 TNBS의 처리기간과 사용된 microarray의 종류나 방법에 있어서 차이가 있기 때문에, 각개의 유전자에 대해서 다른 연구들과 비교하기는 힘들다. 하지만, 다른 연구의 결과와 비슷하게 유전자의 기능으로 분류하여 분석하였을 때, TNBS에 의해서 염증반응과 면역반응에 관여하는 유전자는 증가하였으며, 세포대사(cell metabolism)에 관여하는 유전자는 감소하였다.

항생제 연관 설사나 여행자 설사 등에서 *S. boulardii*의 임상적 효과는 이미 오래 전부터 알려져 있었으나, 최근 들어서 만성 염증질환인 염증성장질환(inflammatory bowel disease)에서도 효과가 있다고 보고되었다. 이를 설명하기 위한 연구들의 결과에 의해서 PPAR- γ , NF- κ B를 비롯한 몇 가지 매개인자가 알려졌다으나, microarray를 통해서 광범위한 영역의 유전자에 대한 연구는 진행된 적이 없다.

이번 연구에서 염증반응에 관여하는 유전자들 대부분은 TNBS에 의해서 증가하였으며, 이들 중 많은 수가 *S. boulardii*에 의해서 현저하게 감소하였다. 이번 연구에서 *S. boulardii*는 TNBS에 의한 IL-16 발현 증가를 현저하게 감소시켰는데, IL-16은 T 림프구에서 유래된 사이토카인(cytokine)으로 TNBS에 의해 유도된 흰쥐의 장염과 크론병 환자에서 증가하는 것으로 알려져서 크론병의 대표적인 병인으로 인정되고 있다.¹⁶

이외에도 Ltb (lymphotoxin B)은 *S. boulardii*에 의해서 20배 이상 발현량이 감소하였는데, Ltb는 활성화된 림프구나 B 세포에 의해서 주로 발현하며, 점막 연관 면역계(gut associated immune system)의 생성과 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁷ 점막연관 면역계는 항원 전달 과정을 통한 면역 관용이나 염증의 기전에 작용할 것으로 생각이 되는데, 이에 관여하는 Ltb의 역할에 대한 연구는 없다. 하지만, 자가면역성 질환인 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)에서 Ltb의 발현이 질환의 발생, 진행 정도 및 경과와 관련이 됨이 최근에 보고되었다. 이 과정에서 Ltb는 림프구(lymphoid follicles)의 발생에 관여하여 염증성 사이토카인을 분비시키고 염증세포와 섬유화세포를 증식시키는 작

용을 하였다.¹⁸ 이러한 점에서 *S. boulardii*에 의한 Ltb 발현 감소는 장관 내의 항염증 작용을 설명하는 기전이 될 것으로 생각한다. 최근에는 lymphotoxin B에 대한 항체가 류마티스 관절염의 치료적 관점에서 개발되어 연구중인데,¹⁸ 이번 연구의 결과에서도 TNBS에 의한 장염에서 Ltb의 발현이 증가하여(대조군에 비해 25배 이상), lymphotoxin B 항체에 대한 크론병에 대한 적응이 가능할 수 있음을 시사한다.

Cxcl10 (chemokine ligand 10)은 Th1-계의 케모카인(chemokine)을 생성하는 유전자이며 Cxcl10 단백질은 Cxcr3와 결합하여 T 세포, 단핵세포(monocytes), 호산구(eosinophils)를 활성화시키고 결집시킨다. 최근 들어서 Cxcl10은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus) 등의 질환에서도 증가되어 있는 것으로 알려졌다.¹⁹ IL-10 KO 쥐를 이용하여 크론병과 유사한 장염증을 유발한 모델을 이용한 연구에서도 Cxcl10은 이번 연구의 TNBS 유도 장염에서와 마찬가지로 증가되었으며, peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) 배위자인 fenofibrate를 처리하였을 때 흰쥐에서는 염증 소견의 감소와 CXCL10 발현이 감소하고, in vitro에서 HT-29 세포에 TNF- α 를 처리하였을 때 CXCL10 유전자 발현 감소를 보였다.²⁰ 이번 연구에서도 *S. boulardii*는 Cxcl10의 발현을 현저히 감소시켰다.

Cxcl9 (chemokine ligand 9)도 Cxcl10, Cxcl11와 같이 Cxcr3에 결합하여, 염증에 관여하는 세포의 증식과 모집을 통해서 염증반응을 매개하는데, 주로 상피세포, 혈관내피세포와 조혈세포에서 발현된다.²¹ 소아 염증성장질환환자를 대상으로 한 연구에서는 Cxcl9이 크론병과 궤양성대장염에서 모두 정상인에 비해서 증가되어 있었으며, CXCL9 77147452G/A 유전자 다양성(polymorphism)이 크론병의 병인과 관련이 있다고 보고되었다.²¹ 이번 연구에서 *S. boulardii*는 TNBS에 의한 Cxcl9의 과발현을 현저히 감소시켰는데, *S. boulardii*의 크론병에서의 효과 기전으로 추정된다.

최근에 들어서 그 기능에 대해서 많은 관심을 받고 있는 Indo (indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase)도 *S. boulardii*에 의해서 발현이 감소하였다. Indo는 L-tryptophan을 분해시키는 효소를 만드는데, 태반, 폐, 소장, 대장, 위, 신장, 뇌 등에서 발현되며 최근에는 염증반응을 조절하는 작용으로 주목을 받고 있다.^{22,23} 최초에 Indo는 생체 내의 여러 감염으로 인해 증가되었기 때문에 innate면역계에 관여하여 면역반응을 주도하는 것으로 생각되었으나, 태아에서 모체의 T 세포의 면역반응을 조절하는 면역관용에 관여함이 밝혀짐에 따라서 오히려 adaptive면역반응을 감소시키는 역할이 우세하다고 보고되었다.²³ 이 사실 이후에 Indo는 T 세포의 반응을 억제하여 면역관용이나 면역감쇄의 효과를 나타내며, 이러한 작용을 통해서 관절염이나 이식 후 거부 등을 방지하는 역할을 한다는 것이 추가로 알려졌다.²⁴ 최근에는 만성염증성 질환

환이나 암과 같은 병적인 환경에서의 면역반응 조절에 있어서 그 역할이 연구되고 있으나,²⁵ Indo의 발현조절 기전에 대해서는 알려진 것이 적다. 이번 연구에서 *S. boulardii*는 TNBS에 의해서 증가된 Indo의 발현을 현저하게 감소시켰는데, 이의 해석에 대해서는 추가 연구가 필요할 것이다.

이외에 항염증작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있고, 저자들의 앞선 연구에서 *S. boulardii*의 항염증작용의 매개체로 알려진 PPAR γ 는 이번 연구에서도 TNBS에 의해서 5배 정도로 감소하였으며, *S. boulardii*에 의해서 그 감소폭이 줄었다. 그러나 이번 연구에서 TNBS에 의한 PPAR γ 의 발현 정도와 *S. boulardii*에 의한 PPAR γ 의 발현 변화의 정도는 앞서 언급한 여러 유전자에 비해서 변화의 폭이 작았다.

이번 연구는 *S. boulardii*의 염증성장질환에서의 치료 기전을 알기 위해서 TNBS로 유발한 대장염 동물모델을 이용하여 microarray 분석을 하였다. Microarray 분석의 특성을 고려할 때 이번 실험에서 변화가 보인 유전자의 특이성과 재현성이 있는가에 대해서는 더 많은 실험이 필요할 것이다. 또한 각 유전자별로 추후에 면역조직화학적, western blot, RT-PCR 등을 비롯한 여러 가지 방법을 통해서 특정 유전자 검증과정을 거쳐야 할 것이다.

요 약

목적: *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*)는 이미 여러 종류의 실사병에 사용되고 있으며 작용 기전이 정확히 알려져 있지는 않지만 염증성 장질환에서도 치료 효과가 보고되고 있다. 이에 저자들은 *S. boulardii*의 염증성 장질환에서의 효과와 작용 기전을 알아보기 위하여 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)로 유발한 대장염 동물모델을 이용하여 조직학적 분석과 microarray를 하였다. **대상 및 방법:** BALB/c 흰쥐에게 경구 식이용 관을 이용하여 항문으로 TNBS (2 mg)와 50% 에탄올 혼합물(0.1 mL)을 주입하였다. *S. boulardii*는 10 mg을 하루에 두 번 4일 동안 경구 투여시켰다. Microarray는 마이크로칩의 DNA chip 기술 매뉴얼에 따라서 시행되었다. **결과:** TNBS로 유발한 장염에서 *S. boulardii*의 처리는 조직학적 손상과 사망률을 감소시켰다($p < 0.05$). 총 33,013개의 유전자 중에서 TNBS와 *S. boulardii*에 의해서 유의한 수준인 2배 이상으로 변화한 것이 330개 있었다. 이 중에서 TNBS에 의해서 과발현된 유전자의 과발현폭을 *S. boulardii*가 감소시킨 것이 193개였다. 이들 유전자를 기능에 따라 분류하면 염증반응과 면역반응에 관여하는 유전자들이 많았다. **결론:** *S. boulardii*의 항염증 효과가 염증반응과 면역 및 방어 반응에 관여하는 유전자의 발현변화를 통해서 나타날 가능성이 높고, 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

색인단어: *Saccharomyces boulardii*, Microarray, TNBS colitis

참고문헌

- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.
- Goossens D, Jonkers D, Stobberingh E, van den Bogaard A, Russel M, Stockbrugger R. Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. *Scand J Gastroenterol* 2003; 239(suppl):S15-S23.
- Zanello G, Meurens F, Berri M, Salmon H. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol* 2009;11:47-58.
- Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993;31:129-134.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-1464.
- Garcia Vilela E, De Lourdes De Abreu Ferrari M, Oswaldo Da Gama Torres H, et al. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:842-848.
- Rodrigues AC, Cara DC, Fretez SH, et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol* 2000;89:404-414.
- Caetano JA, Paramés MT, Babo MJ, et al. Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:245-259.
- Mumy KL, Chen X, Kelly CP, McCormick BA. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by post-invasion signaling events. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:599-609.
- Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, et al. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:69-76.
- Girard P, Pansart Y, Gillardin JM. Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. *Nitric Oxide* 2005;13:163-169.
- Lee SK, Kim HJ, Chi SG, et al. *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells. *Korean J Gastroenterol* 2005;45: 328-334.
- Medina C, Videla S, Radomski A, et al. Therapeutic effect of phenantroline in two rat models of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1314-1319.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96:795-803.
- Yamamoto S, Isuzugawa K, Takahashi Y, et al. Intestinal gene expression in TNBS treated mice using genechip and subtractive cDNA analysis: implications for Crohn's disease. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2046-2053.
- Keates AC, Castagliuolo I, Cruickshank WW, et al. Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* 2000;119:972-982.
- Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 2004; 53:456-465.
- O'Rourke KP, O'Donoghue G, Adams C, et al. High levels of Lymphotoxin-Beta (LT-Beta) gene expression in rheumatoid arthritis synovium: clinical and cytokine correlations. *Rheumatol Int* 2008;28:979-986.
- Aggarwal A, Agarwal S, Misra R. Chemokine and chemokine receptor analysis reveals elevated interferon-inducible protein-10 (IP)-10/CXCL10 levels and increased number of CCR5+ and CXCR3+ CD4 T cells in synovial fluid of patients with enthesitis-related arthritis (ERA). *Clin Exp Immunol* 2007; 148:515-519.
- Lee JW, Bajwa PJ, Carson MJ, et al. Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. *Gastroenterology* 2007; 133:108-123.
- Lacher M, Kappler R, Berkholz S, Baurecht H, von Schweinitz D, Koletzko S. Association of a CXCL9 polymorphism with pediatric Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:701-707.
- King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2167-2172.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-1193.
- Platten M, Ho PP, Youssef S, et al. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 2005;310:850-855.
- Brandacher G, Winkler C, Schroecksnadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab* 2006;7:599-612.