

## 탄저균 스톤 아포에 대한 대식세포에서의 TNF- $\alpha$ 와 IL-12의 분비

한양대학교 과학기술대학 분자생명과학부

백진주 · 정경화 · 채영규\*

### TNF- $\alpha$ and IL-12 Secretion in Macrophages in Response to Spores of *Bacillus anthracis* Sterne

JinJoo Baek, KyoungHwa Jung and YoungGyu Chai\*

Division of Molecular & Life Sciences, Hanyang University

Received : June 9, 2006

Accepted : July 19, 2006

*Bacillus anthracis* is a gram-positive, aerobic, spore forming, and rod-shaped bacterium. Anthrax spores are introduced into macrophage by phagocytosis and multiply after germination. The anthrax spores infected in macrophage produce lethal toxin eventually caused cell death. In this study, we analyzed apoptosis and cytokine TNF- $\alpha$  and IL-12 secretion after the infection of spores of *B. anthracis* Sterne in the murine macrophage RAW264.7 cells and in the primary human macrophages. In murine macrophage RAW264.7 cells infected by spore of *B. anthracis* Sterne, the cells were markedly changed in secretion of TNF- $\alpha$  (482~6,213 pg/ml) by lethal toxin, and induced apoptosis. In case of RAW264.7 cells infected by formalin-inactivated spores of *B. anthracis*, the cells were not able to produce lethal toxin, which released lower level concentration of TNF- $\alpha$  (7.7~97.2 pg/ml), and rarely induced apoptosis. When primary human macrophage cells infected with spores of *B. anthracis* Sterne, they secreted TNF- $\alpha$  (5~16 pg/ml), and induced apoptosis about 1% of total cells. We presented that inducing apoptosis by spores of *B. anthracis* Sterne capable of expressing lethal toxin is related with the secretion of TNF- $\alpha$  in murine macrophage RAW264.7 cells. These studies revealed that human and murine macrophages has affected differently by anthrax lethal toxin produced by spores of *B. anthracis* Sterne.

**Key Words:** *Bacillus anthracis* Sterne, Spores, Murine macrophage RAW264.7 cells, Human macrophage, Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-12

## 서 론

탄저균은 아포 (spore)를 형성하는 간균 (rod-shape)형태의 호기성 그람양성 세균으로 가축이나 사람에게서 탄저 (anthrax)를 유발한다. 숙주 내 대식세포의 식균작용으로 유입된 탄저균 아포는 숙주의 전신으로 이동하고, 발아 증식한 결과 탄저독소가 생성된다 (10, 22). 탄저균의 독소는 세 개

의 단백질로 구성되어 있으며, 그 각각은 방어항원, 부종요소, 그리고 치사요소이다 (29). 탄저 치사독소는 방어항원과 치사요소로 구성되며, 실험동물에 주입하였을 경우 치명적인 쇼크를 유발하여 숙주를 사멸케 한다 (28).

아직까지 탄저 치사독소에 의한 세포 내 병인 기전이 확실히 규명된 것은 아니다. 현재까지 보고된 결과로부터 추정할 수 있는 탄저 치사독소의 기전은 다음과 같다. 즉, 탄저 방어항원이 세포에 존재하는 수용체에 먼저 결합하게 되고, 세포 수용체에 결합한 방어항원은 푸린 등에 의해 N-말단이 절단되어 63 kDa 크기의 단편이 되고, 이들이 모여 방어항원의 헵타머 (heptamer)를 형성하여 탄저독소에 대한 수용체가 된다 (20). 형성된 헵타머에 부종요소 혹은 치사요소가 경쟁적으로 결합하게 되면 수용체 매개세포 내 이동 (endocytosis)

\*교신저자: 채영규. 426-791 경기도 안산시 상록구 사동 1271, 한양대학교 과학기술대학 분자생명과학부  
Phone: 031-400-5513, Fax: 031-406-6316,  
e-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

\*\*본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 (과제번호: 20050301034475)의 지원에 의해 이루어진 것임.

에 의하여 세포 내로 들어가 엔도솜 (endosome)을 형성한다. 엔도솜 내부의 pH가 낮아지게 되면 헤파타머의 구조가 변화하게 되고, 부종요소와 치사요소는 세포질로 이동하게 된다 (2). 탄저 치사요소는 아연 의존성 단백질 가수분해효소로 알려져 있다 (16). 현재까지 알려진 치사요소의 세포 내 기질은 mitogen-activated protein kinase kinases (Meks)로 Mek 5를 제외한 대개의 Meks (Mek 1~Mek 7)의 N-말단을 절단하는 것으로 알려져 있다 (4, 32). 그러나 치사요소에 감수성이 있거나 혹은 저항성이 있는 대식세포 모두 치사요소에 의해 Meks의 N-말단이 가수분되기 때문에 Meks의 절단이 대식세포의 사멸에 직접적인 연관이 있는 것으로 보이지 않는다 (30).

최근 숙주와 병원균의 관계에 대한 연구와 탄저 치사독소의 병인 기전을 이해하기 위해 다양한 연구 방법이 시도되고 있다. 탄저 치사독소가 처리된 세포에서 분비되는 사이토카인에 대한 연구는 발표자에 따라 다양한 결과를 보여 주고 있다 (Table 1). Table 1에서 보듯이 사용한 탄저 치사독소의 농도나 대상 세포주에 따라 분비된다고 보고된 사이토카인의 양상이 다르다. 즉, Hanna 등 (11)은 생쥐 대식세포인 RAW264.7 세포에 아급사 (sublytic) 수준의 치사독소를 처리했을 경우 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )가 분비된다고 보고하였다. 그러나 Erwin 등 (7)은 생쥐 대식세포에 아급사 수준 ( $10^{-6}$   $\mu$ g/ml)의 치사독소를 처리했을 때 오히려 사이토카인의 분비가 억제된다고 하였다. 또한, Moayeri 등 (21)은 생쥐에 100  $\mu$ g의 치사독소를 처리하였을 때 IL-1 $\beta$ 는 증가하였으나, TNF- $\alpha$ 의 분비량에는 변화가 없다고 하였다. 인간 대식세포를 사용한 Popov 등 (25)은 치사독소를 처리하여도 생쥐 대식세포와는 달리 인간 대식세포가 죽지 않기 때문에 같은 대식세포일지라도 종에 따라 치사독소에 대한 반응이 다르게 나올 수 있음을 보고하였다. 이러한 연구 결과의 양상은 치사독소 정제도나 치사독소의 농도 및 종에 따라 사이토카인 분비에 대한 결과가 다를 수 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 탄저 치사독소의 정제도나 농도에 구애받지 않도록 탄저균 Sterne 균주의 아포를 사용하여 생쥐 및 사람의 대식세포에 처리하고 얻어지는 사이토카인 중 TNF- $\alpha$ 와 IL-12의 발현을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

실험에 사용한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포와 인간 대식세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 IU/ml penicillin과 10  $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C와 5% CO<sub>2</sub>가 유지된 배양기에서 배양하였다 (24). 인간 대식세포의 분화 여부는 대식세포의 특이적인 표지자 (marker)라 알려진 CD14과 CD18을 웨스턴 블랏 (Western blot)분석으로 확인하였다 (자료미제시).

### 2. 탄저균 영양세포의 배양

탄저균은 *B. anthracis* Sterne를 사용하였으며, 김 등 (13)과 서 등 (27)의 배양 방법을 사용하여 배양하였다. 탄저균의 영양세포는 탄저균 아포를 brain heart infusion (BHI: BD Science, Canada) 파우더 37 g/L과 Bacto-agar 15 g/L을 넣어 만든 BHI agar 배지에 도말한 후 37°C에서 밤새 배양하여 수확하였다.

### 3. 탄저균 아포의 확보

탄저균 아포 생성을 위한 배지는 Tarr's sporulation agar를 사용하였다 (6). 사용된 배지는 1.5 g sucrose (Showa, Japan), 1.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Germany), 0.75 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Merck, Germany), 7.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Germany), 75 mg MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Merck, Germany), 150 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, Germany), 2 mg FeCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Yakuri, Japan)를 1500 ml의 증류수에 넣고 녹인 후 11.25 g Bacto-agar (Gibco, USA)를 넣어 만들었다 (6). 탄저균을 준비된 Tarr's sporulation agar 배지에

Table 1. Cytokine expression by anthrax lethal toxin on different cells of immune system

| Cell Lines       | Toxin | Time (hr) | Cytokines                              | References |
|------------------|-------|-----------|--|------------|
| RAW264.7         | LeTx* | 2~4       | TNF- $\alpha$ ↑                        | 11         |
| RAW264.7         | LeTx* | 24        | IL-1 $\beta$ , IL-18 ↑                 | 5          |
| J774A.1          | LeTx* | 2         | TNF- $\alpha$ ↓                        | 7          |
| J774A.1          | spore | 5~7.5     | TNF- $\alpha$ , IL-12 ↑                | 23         |
| Human macrophage | LeTx* | 48        | TNF- $\alpha$ ↓, IL-1 $\beta$ , IL-6 ↑ | 25         |
| Mouse macrophage | spore | 5~7.5     | TNF- $\alpha$ , IL-6 ↑                 | 24         |

RAW264.7: murine macrophage cell line, J774A.1: murine macrophage cell line, LeTx\*: lethal toxin

도말하고, 37°C에서 14일 동안 배양하여 아포를 확보하였다.

#### 4. 대식세포 배양 및 아포 처리

분석에 사용할 대식세포는 RPMI 1640 배지 (10% FBS, 100 IU/ml penicillin과 10  $\mu$ g/ml streptomycin, Gibco, USA)를 사용하여 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포와 인간 대식세포를 각각  $1 \times 10^6$  세포/100 mm plate가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다 (23). 실험군으로서 사용할 대식세포는 PBS (pH 7.2)으로 2회 세척 후 RPMI 1640 배지 (10% FBS, no penicillin과 streptomycin)를 넣고 탄저균 아포 혹은 영양세포를  $1 \times 10^6$  개/ml 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 배양하였다. PBS (pH 7.2)으로 2회 세척하고 gentamicin (Sigma, USA)을 25  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 동안 배양하였다. Gentamicin의 배양이 끝난 시점을 1시간으로 기준을 삼았다. 이 시점부터 3, 5, 및 7시간에 배양한 세포는 scraper (Falcon, USA)를 사용하여 수확하였다. 수확한 세포는 바로 FACS 분석에 사용하였고, 배양이 끝난 배지는 1.5 ml 튜브에 모아서 ELISA로 분석하기 전까지 -70°C에 얼려서 보관하였다.

#### 5. 유세포 분류기 (Fluorescence-activated cell sorter: FACS) 분석

FACS 측정을 위한 세포 염색은 BD ApoAlert™ annexin V-FITC apoptosis kit (BD Biosciences, USA)를 사용하였다. 시간별로 모은 세포는 곧바로 FACS용 5 ml 유리 튜브 (Falcon, USA)에 옮겨 1,000 x g, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 PBS (pH 7.2) 완충액을 1 ml 넣어 섞고 다시 1,000 x g, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 얻어진 펠렛에 바인딩 완충액을 200  $\mu$ l 넣고 와류한 후에 다시 1,000 x g, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 결합 완충액을 제거하고 다시 결합 완충액 500  $\mu$ l를 넣어 와류한 후에 annexin V-FITC (20  $\mu$ g/ml) 5  $\mu$ l, propidium iodide (50  $\mu$ g/ml) 10  $\mu$ l를 첨가하여 25°C, 15분간 암배양 (暗培養)하였다. 배양이 끝난 세포는 Cell Quest software (Becton-Dickinson; Mountain View, CA)를 이용한 FACScan flow cytometer로 분석하였다.

#### 6. 웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯 분석은 정 등 (12)의 방법을 사용하여 분석하였다. 즉, 인간 대식세포에서 추출한 단백질 20  $\mu$ g을 Laemmli sample 용액 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 넣고 5분간 끓인 후, 12% polyacrylamide-gel에 로딩하여 전기영동을 수행하였다. 그 후 젤 내의 단백질을 20% 메탄올 용액에서 80 V로 60분 동안 Polyvinylidene fluoride (PVDF) 막으로 옮겼다.

단백질이 이송된 PVDF 막은 5% nonfat-dry milk가 포함된 TBS-T 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 넣고 교반기에서 1시간 동안 반응하여 blocking 하였다. Blocking이 끝난 PVDF 막은 anti-CD14 항체와 anti-D18) (200  $\mu$ g/ml) 항체를 1:5000배 희석하여 첨가한 TBS-T 완충액에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 PVDF 막은 TBS-T로 15분간 3회 씻은 후 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000 dilution)을 넣고 1시간 반응시켰다. 다시 PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 15분간 3회 씻은 후, ECL advanced 키트를 이용하여 반응 시키고 필름으로 감광하였다.

#### 7. 효소면역분석법 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)

대식세포에서 분비된 사이토카인의 양을 측정하기 위해서 Bioscience 사의 ELISA kit를 사용하여 회사에서 제공한 지침서에 따라 분석실험을 수행하였다. 분석실험은 96-well plate에 실험군과 대조군에서 얻어진 상층액 시료 50  $\mu$ l/well과 표준완충용액 50  $\mu$ l/well을 넣고, 표준용액은 100  $\mu$ l/well씩 분주하였다. 그 후에 biotinylated anti-TNF- $\alpha$  (혹은 biotinylated anti-IL-1 $\beta$ , biotinylated anti-IL-12) 용액을 50  $\mu$ l/well씩 분주한 후 가볍게 교반하였다. 그 후, 웰을 밀봉하여 1시간 30분간 상온에서 반응시킨 후, 상층용액을 제거하고 PBS로 4회 이상 세척하였다. 1x Streptavidin-HRP 반응용액을 100  $\mu$ l/well씩 넣고 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 상층용액을 제거하였다. 완충용액으로 4회 이상 세척한 시료에 안정화된 크로모젠을 100  $\mu$ l/well씩 넣고 빛을 차단한 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 반응 종료용액을 100  $\mu$ l/well씩 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 1. 사이토카인의 정량

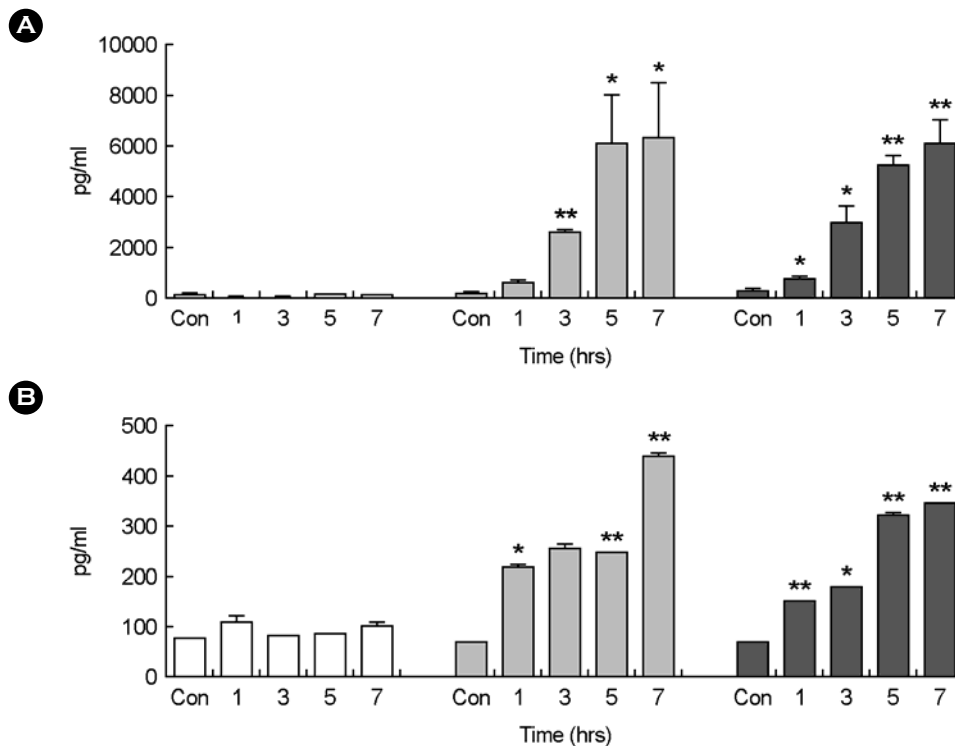
생쥐 대식세포 RAW264.7 세포에 살아있는 탄저균 아포 또는 탄저균 영양세포를 처리했을 경우 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 불활성화된 탄저균 아포를 처리한 경우보다 급격하게 증가함을 알 수 있었다. 불활성화된 탄저균 아포를 처리했을 경우 TNF- $\alpha$ 는 거의 분비 되지 않았으나, 살아있는 탄저균 아포를 처리했을 경우 아포 처리 3시간 이후에는 아포 처리 1시간 후 보다 5배, 탄저균 영양세포를 처리한 경우, 동일 시간에 4배 이상 분비량이 증가하였다 (Table 2). IL-12는 살아있는 아포, 불활성화된 아포, 영양세포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포 모두에서 분비되었으며, 처리 시간이 경과할수록 분비량이 증가하였다 (Fig. 1).

인간 대식세포에 탄저균 아포를 처리했을 경우, 아포가 살

**Table 2.** The amounts of TNF- $\alpha$  or IL-12 secreted from murine macrophage RAW264.7 cells were infected with spores of *B. anthracis* Sterne

|                    | TNF- $\alpha$ (pg/ml) |       |       |       | IL-12 (pg/ml) |      |      |      |
|--------------------|-----------------------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|
|                    | 1 hr                  | 3 hr  | 5 hr  | 7 hr  | 1 hr          | 3 hr | 5 hr | 7 hr |
| Inactivated spores | ND*                   | ND*   | ND*   | ND*   | 215           | 254  | 210  | 234  |
| Live spores        | 482                   | 2,433 | 6,022 | 6,213 | 110           | 246  | 210  | 234  |
| Vegetative cells   | 692                   | 2,844 | 5,128 | 6,045 | 151           | 175  | 318  | 340  |

ND\*: Not detectable

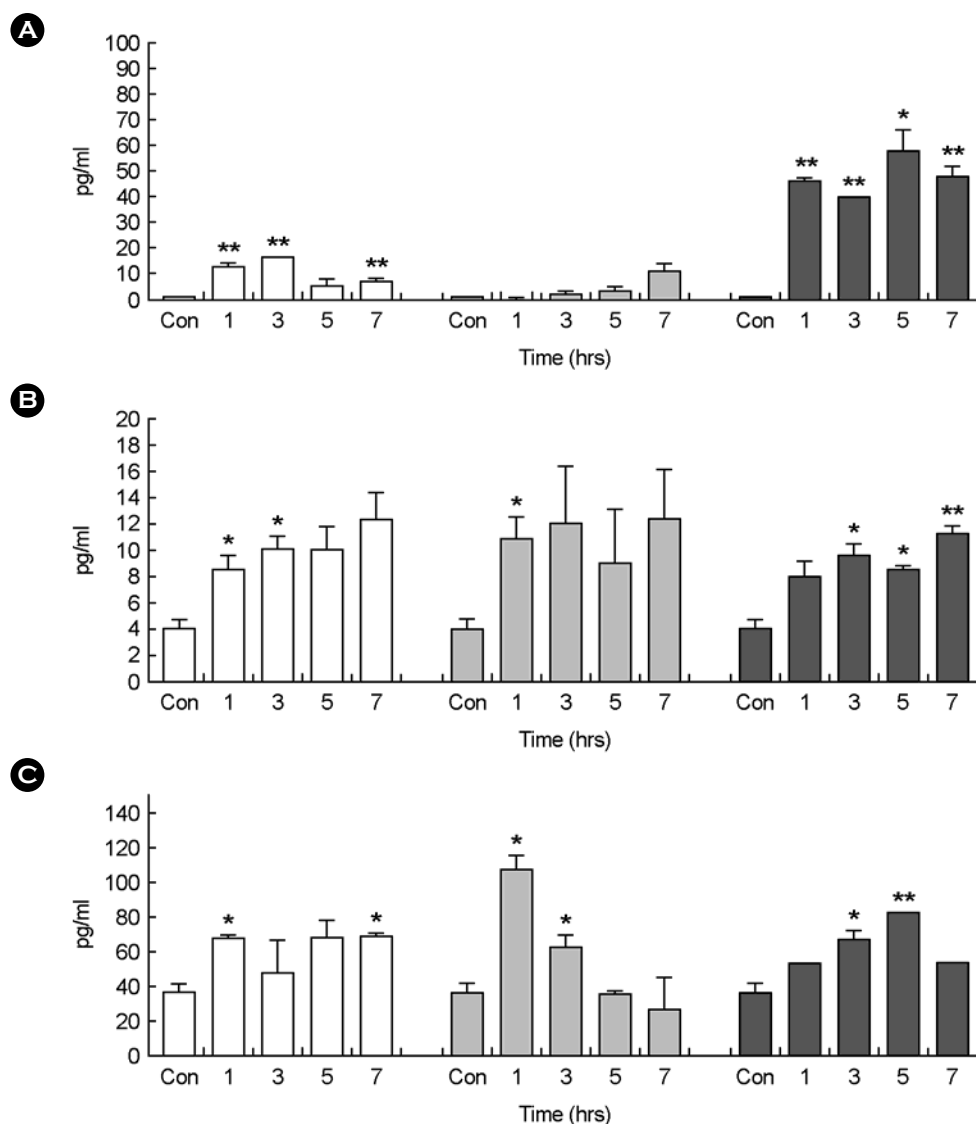
**Figure 1.** Cytokine analysis in murine macrophage RAW264.7 cells infected with spores of *B. anthracis* Sterne at 1, 3, 5, and 7 hours using ELISA method. Control was murine macrophage RAW264.7 cells treated with PBS buffer. The concentration of 2 cytokines in the supernatants collected from murine macrophage RAW264.7 cells infected with formalin-inactivated spores (white bars), spores (gray bars), and vegetative cells (black bars) of *B. anthracis* Sterne at the indicated time points are shown for TNF- $\alpha$  (A), and IL-12 (B). Three experiments were performed, and the results of a representative experiment are shown. Each value reported is the average of three samples. Error bars represent 1 standard deviation. Statistical significance was determined by Student's t test analysis. In all cases, means were compared to control group only treated with PBS buffer. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ 

아있거나 불활성화 되어있는 것에 관계없이 TNF- $\alpha$ 는 거의 분비되지 않았으나, 탄저균 영양세포를 처리한 인간 대식세포의 경우, 처리 후 1시간에서는 46 pg/ml, 3시간에서는 39 pg/ml, 5시간에서는 57 pg/ml, 7시간에서는 47 pg/ml을 분비하였다. IL-1 $\beta$ 의 경우 분비량은 다른 사이토카인에 비하여 매우 적었으나, PBS만 처리한 대조군과 비교했을 때 살아있는 아포, 불활성화된 아포, 영양세포를 처리한 실험군 모두가 약간의 증가를 보였다. IL-12의 경우 불활성화된 아포를 처리한 경우와 영양세포를 처리한 경우에는 거의 변화가 없었으며, 살아있는 아포를 처리한 인간 대식세포는 IL-12

분비에 있어서 시간에 특이적인 약간의 변화를 보였다. 인간 대식세포에 살아있는 아포 처리 후 1시간에서는 106 pg/ml을 분비하였으나, 다른 시간에서는 별다른 변화가 없었다 (Fig. 2).

## 2. 세포사멸 측정

정상 세포에서 포스파티딜세린 (phosphatidylserine)은 세포 내막에 존재하고 세포사멸이 유도되면 세포 외막으로 이동하여 노출된다. Annexin V는 포스파티딜세린과 강한 친화력을 가진 단백질로서 세포사멸로 인해 노출된 포스파티딜세

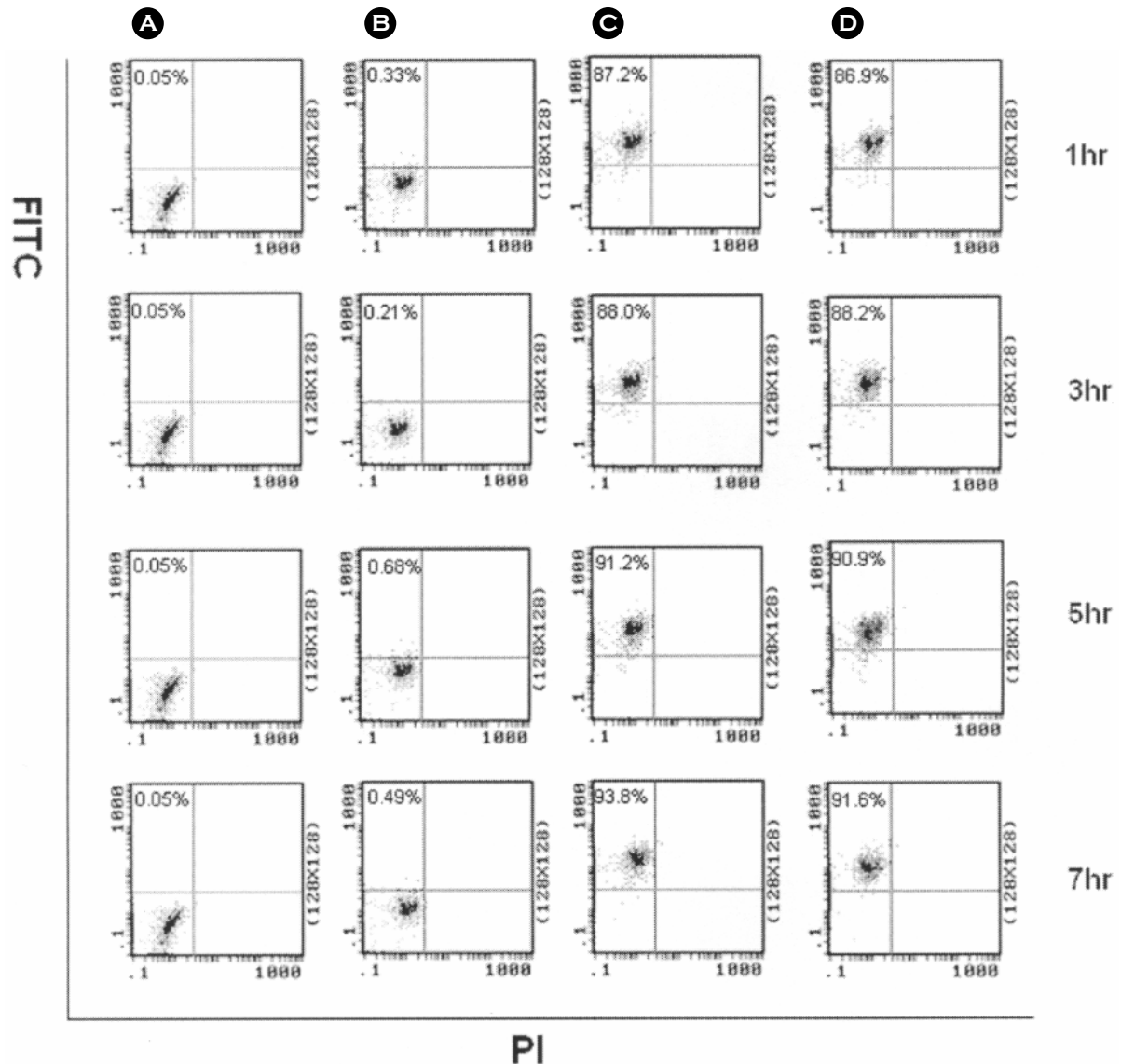


**Figure 2.** Cytokine analysis in primary human macrophage infected with spores of *B. anthracis* Sterne at 1, 3, 5, and 7 hours using ELISA method. Control was murine macrophage RAW264.7 cells treated with PBS buffer. The concentration of 3 cytokines in the supernatants collected from primary human macrophage infected with formalin-inactivated spores (white bars), spores (gray bars), and vegetative cells (black bars) of *B. anthracis* Sterne at the indicated time points are shown for TNF- $\beta$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-12 (C). Three experiments were performed, and the results of a representative experiment are shown. Each value reported is the average of three samples. Error bars represent 1 standard deviation. Statistical significance was determined by Student's t test analysis. In all cases, means were compared to control group only treated with PBS buffer. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

린과 결합한다. 본 연구에서 사용한 Annexin V는 fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)가 표지 (label)되어 있어 형광으로 초기 단계의 세포사멸을 측정할 수 있도록 하였다. 세포사멸 정도는 유세포 분류기 (FACS)를 사용하여 측정하였다. 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포의 사멸은 아무것도 처리하지 않은 대식세포를 기준으로 하여 20,000개의 세포를 카운트하였다. 실험군의 대식세포 사멸 정도는 전체 세포수 대비 세포사멸이 일어날 것이라고 예상하는 부분에 분포한 세포들의 수를

백분율로 나타내었다.

불활성화된 탄저균 아포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW-264.7 세포의 사멸 정도는 1시간에서는 0.33%, 3시간에서는 0.21%, 5시간에서는 0.68%, 7시간에서는 0.49%로 대조군의 0.05%와 비슷한 수준임을 확인하였다. 이에 비하여 살아있는 아포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포는 1시간에서는 87.2%, 3시간에서는 88.0%, 5시간에서는 91.2%, 7시간에서는 93.8%로 대부분의 세포가 세포사멸을 일으킨 것을 확



**Figure 3.** Apoptosis analysis in murine macrophage RAW264.7 cells infected with spores of *B. anthracis* Sterne at 1, 3, 5, and 7 hours by flow cytometry with annexin-PI double-labeled cells. The annexin-positive population corresponding to apoptotic cells, PI-positive population corresponds to necrotic cells, and the double-positive position corresponds to necrotic and/or late apoptotic cells. Murine macrophage RAW264.7 cells were treated with PBS buffer (A), formalin-inactivated spores (B), spores (C), and vegetative cells (D) of *B. anthracis* Sterne.

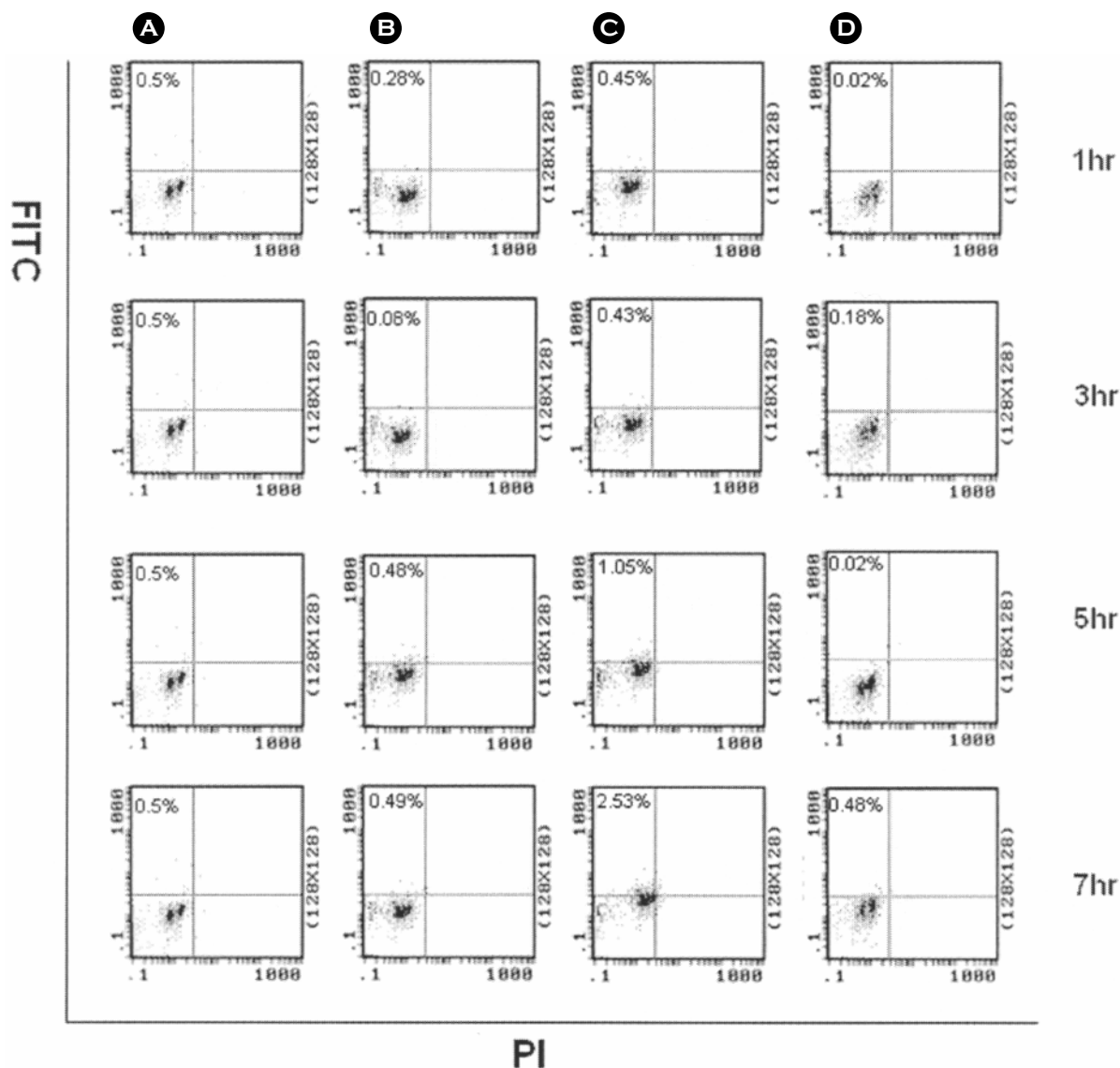
인하였다 (Fig. 3). 영양세포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW-264.7 세포는 1시간에서는 86.9%, 3시간에서는 88.2%, 5시간에서는 90.9%, 7시간에서는 91.6%를 나타내었다 (Fig. 3). 영양세포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포는 살아있는 아포를 처리한 경우에 비해 세포사멸의 정도가 낮게 증가했음을 확인하였다.

인간 대식세포의 사멸 정도 측정은 생쥐 대식세포의 것과 동일한 방법으로 수행하였다. 살아있는 아포, 불활성화된 아포, 및 영양세포를 인간의 대식세포에 처리한 경우 거의 비

슷한 분포를 이루고 있었다. 대부분의 인간 대식세포가 0.5% 내외로 세포사멸이 유도된 것으로 확인하였으나, 살아있는 아포를 처리한 경우 5시간에서는 1.05%, 7시간에서는 2.53%의 세포사멸이 일어났다 (Fig. 4).

## 고 찰

사이토카인은 생체 여러 조직의 세포로부터 유래하고, 면역응답 반응이나 조절 등 세포 간 상호작용에 관여하는 생물



**Figure 4.** Apoptosis analysis in primary human macrophages infected with spores of *B. anthracis* Sterne at 1, 3, 5, 7 hours by flow cytometry with annexin-PI double-labeled cells. The annexin-positive population corresponding to apoptotic cells, PI-positive population corresponds to necrotic cells, and the double-positive position corresponds to necrotic and/or late apoptotic cells. Primary human macrophages were treated with PBS buffer (A), formalin-inactivated spores (B), spores (C), and vegetative cells (D) of *B. anthracis* Sterne.

활성인자이다. 대부분 림프구나 대식세포에 의해 생성되는데 낮은 농도 ( $10^{-9}$  M 이하)의 사이토카인이 분비되면 숙주세포의 면역반응을 유도하지만, 높은 농도 ( $10^{-7}$  M 이상)로 분비되면 세포사멸과 같이 숙주세포에게 치명적인 피해를 입히기도 한다 (31).

이중, TNF- $\alpha$ 는 세포사멸과 관련된 수용체를 자극하여 세포사멸을 일으킨다 (33). 단핵세포에서 생성되어 염증반응에 관여하는 IL-1 $\beta$ 는 세포사멸이 유도되면 IL-1 $\beta$  전환효소 (interleukin-1 $\beta$  converting enzyme, ICE)라는 프로테아제에 의해 절단되어 세포 밖으로 분비된다 (3). 분비된 IL-1 $\beta$ 는 IL-1

수용체에 결합하여 p38, JNK, 및 NF- $\kappa$ B 등의 신호전달 작용을 유도하여 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있다 (34). IL-12는 선천적 면역반응을 증가시키고, helper T cell의 활성화 등 후천적 면역반응을 유도한다 (19).

TNF- $\alpha$ 의 분비량은 살아있는 탄저균 아포의 감염에 의해 대식작용이 유도된 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포에서 급격하게 증가하였으나, 불활성화된 탄저균 아포를 처리한 경우에는 뚜렷한 변화가 없었다. 또한 살아있는 탄저균 아포를 처리한 약 90%의 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포에서 세포사멸이 유도되었으나, 불활성화된 탄저균 아포를 처리한 생

쥐 대식세포 RAW264.7 세포는 1% 미만이 세포사멸하였다. 이는 TNF- $\alpha$ 의 분비량과 세포사멸이 서로 상관관계가 있으며 (19) 저농도의 치사독소는 세포사멸을 일으킨다는 보고 (11)와 일치한다.

McHugh 등은 생쥐 대식세포에 독성 *Legionella pneumophila*와 무독성 *L. pneumophila*를 감염시켜 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등 사이토카인 분비에 있어서 차이가 존재함을 관찰하였다 (19). 독성 *L. pneumophila*는 대식세포 내에서 빠르게 증식할 수 있으나 무독성 *L. pneumophila*는 증식할 수 없다고 알려져 있다. 세포 내 박테리아의 독성 물질 생성 유무는 대식세포에 의한 proinflammatory 사이토카인 분비에 영향을 미치는 중요한 요소로 생각된다.

Table 1에서 보는 바와 같이, 몇몇 연구들에 의해 탄저균 치사독소는 대식세포의 사이토카인 분비를 억제한다고 보고된 바 있다 (7, 25). 이들 연구에서의 치사독소는 대식세포에 직접 작용한 것으로 보인다. 그러나 본 연구에서는 치사독소를 만들 수 있는 탄저균 아포를 처리하여, 감염 초기 단계에 식균작용을 유도하여 시간이 흐름에 따라 점차적으로 치사독소가 생성되도록 하였다. 또한 살아있는 탄저균 아포를 처리한 것이기 때문에 증식 과정이나 발아 과정에 있어서 생긴 다양한 요소들이 사이토카인 분비에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다 (25). Pickering과 Merkel의 보고에서 탄저균 치사독소를 만들 수 있는 탄저균 아포는 일정 시간 후에 대식세포를 사멸시켰고, 그렇지 못한 탄저균 아포는 대식세포를 사멸시키지 못하였다 (25). 사이토카인의 분비량에 있어서 차이가 있었으나 두 실험군 모두에서 TNF- $\alpha$ 가 분비되었다. 이는 치사독소가 세포사멸과 관련된 TNF- $\alpha$ 의 분비량과 연관성이 있기는 하나, 절대적인 요소가 아니라는 가능성을 제시한다.

살아있는 탄저균 아포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포의 경우, 시간이 지남에 따라 IL-12의 분비량이 증가함을 관찰하였다. 영양세포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포의 경우 살아있는 아포를 처리한 생쥐 대식세포 RAW-264.7 세포의 분비량에 비해 IL-12의 분비량이 적게 분비되는데 이는 탄저균 영양세포에 의해 분비된 치사독소가 IL-12의 분비를 억제한 것으로 사료된다. Agrawal 등은 수지상 세포에 고농도의 치사독소를 처리하여 IL-12의 분비량이 억제됨을 관찰하였다 (1). 일반적으로 IL-12는 선천적 면역반응을 증가시키고 후천적 면역반응을 유도한다고 알려져 있으며, 본 연구에서는 탄저균 영양세포에 의해 분비된 치사독소는 IL-12의 분비량을 억제하여 숙주세포의 후천적 면역반응이 유도되지 않도록 작용하는 것으로 보인다.

Popov 등은 고농도의 치사독소 (치사요소 0.5  $\mu$ g/ml, 방어항원 0.5  $\mu$ g/ml)를 생쥐 대식세포인 RAW264.7 세포와 인간 대식세포에 각각 처리하여, 생쥐 대식세포는 세포사멸이 일

어나지만 인간 대식세포는 반응이 없음을 확인하였다 (25). 탄저균 치사독소가 아닌 탄저균 아포를 처리한 본 연구에서도 인간 대식세포의 세포사멸과 사이토카인 분비는 생쥐의 것과는 차이를 나타내었다. 살아있는 아포를 처리한 생쥐 대식세포에서 급격한 증가를 보였던 TNF- $\alpha$ 의 경우 인간 대식세포에서는 거의 분비되지 않았다. 영양세포를 처리한 인간 대식세포는 시간이 지남에 따라 TNF- $\alpha$ 가 분비되기는 하였으나 생쥐의 분비량보다 500배 이상 낮은 농도로 분비되었다. 인간 대식세포는 약 1%의 세포만이 세포사멸이 유도됨을 유세포 분류기로 측정하였고, TNF- $\alpha$ 의 분비량이 적어지면 세포사멸 또한 적게 일어남을 확인하였다. 이에 비해 IL-1 $\beta$ 와 IL-12의 분비량은 PBS만 단독으로 처리한 대조군에 비해 차이가 없어 탄저균 아포에 의한 세포사멸과 IL-1 $\beta$ 와 IL-12의 분비량과는 관련이 없음을 확인하였다.

생쥐 대식세포인 RAW264.7 세포와 인간 대식세포에서 탄저균 아포에 의한 특정 사이토카인의 분비에서 차이가 나는 것은 같은 생쥐의 대식세포라고 하더라도, 생쥐의 종에 따라서 탄저균 치사독소에 의한 감수성의 차이가 나기 때문인 것으로 짐작된다 (21,25). 본 연구에서는 연구자들마다 탄저균 치사독소의 분리 방법이나 정제도에 따라서, 조금씩 차이가 나는 사이토카인 분비량을 탄저균 아포를 사용하여 측정하였는데 의의를 갖고 있다. 또한 다른 생쥐의 대식세포에 따라서 탄저균 아포에 의한 사이토카인 발현의 차이를 유전체학 기술과 프로테오믹스 기술을 사용하여 본 연구실에서 현재 연구 중에 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Agrawal A, Lingappa J, Leppla SH, Agrawal S, Jabbar A, Quinn C, Pulendran B: Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* **424**: 329-334, 2003.
- 2) Beauregard, KE, Collier RJ, Swanson JA: Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol* **2**: 251-258, 2000.
- 3) Cerrtti D, Hollingsworth LT, Kozolosky CJ, Valentine MB, Shaprio DN, Morris SW, Nelson N: Molecular characterization of the gene for human interleukin-1-beta converting enzyme (IL1BC). *Genomics* **20**: 468-473, 1994.
- 4) Chopra AP, Boone SA, Liang X, Duesbery NA: Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem* **278**: 9402-9406, 2003.
- 5) Cordoba-Rodriguez R, Fang H, Lankford CS, Frucht DM:



- Anthrax lethal toxin rapidly activates caspase-1/ICE and induces extracellular release of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18. *J Biol Chem* **279**: 20563-20566, 2004.
- 6) **Dragon DC, Rennie RP**: Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *Lett Appl Microbiol* **33**: 100-105, 2001.
  - 7) **Erwin JL, DaSilva LM, Bavari S, Little SF, Friedlander AM, Chanh TC**: Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun* **69**: 1175-1177, 2001.
  - 8) **Fouet A, Mesnage S**: *Bacillus anthracis* cell envelope components. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**: 87-113, 2002.
  - 9) **Fritz DL, Jaax NK, Lawrence WB, Davis KJ, Pitt MLM, Ezzell J, Friedlander A**: Pathology of experimental inhalation anthrax in the rhesus monkey. *Lab Invest* **73**: 691-702, 1995.
  - 10) **Guidi-Rontani C, Mock M**: Macrophage interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**: 115-141, 2002.
  - 11) **Hanna PC, Acosta D, Collier RJ**: On the role of macrophages in anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10198-10200, 1993.
  - 12) **Jung KH, Seo GM, Kim SJ, Kim JC, Oh SM, Oh KG, Chai YG**: Proteome profiling of murine macrophages treated with the anthrax lethal toxin. *Kor J Microbiol* **41**: 262-168, 2005.
  - 13) **Kim SJ, Cho KS, Choi YK, Chai YG**: Production of *Bacillus anthracis* protective antigen by improvement of culture condition and purification methods. *Kor J Microbiol* **37**: 1-27, 2001.
  - 14) **Klein F, Walker JS, Fitzpatrick DF, Lincoln RE, Mahlandt BG, Jones WIJ, Dobbs JP, Hendrix KJ**: Pathophysiology of anthrax. *J Infect Dis* **116**: 123-138, 1966.
  - 15) **Krantz BA, Melnyk RA, Zhang S, Juris SJ, Lacy DB, Wu Z, Finkelstein A, Collier RJ**: A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science* **309**: 777-81, 2005.
  - 16) **Klimpel KR, Arora N, Leppla, SH**: Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* **13**: 1093-100, 1994.
  - 17) **Lacy DB, Collier RJ**: Structure and function of anthrax toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**: 61-85, 2002.
  - 18) **Ma X**: TNF- $\alpha$  and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect* **3**: 121-129, 2001.
  - 19) **McHugh SL, Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H**: Murine macrophages differentially produce proinflammatory cytokines after infection with virulent vs. avirulent *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* **190**: 953-962, 2000.
  - 20) **Milne JC, Furlong D, Hanna PC, Collier RJ**: Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *J Biol Chem* **269**: 20607-20612, 1994.
  - 21) **Moayeri B, Haines D, Young HA, Leppla SH**: *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF- $\alpha$ -independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* **112**: 670-682, 2003.
  - 22) **Mock M, Fouet A**: Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**: 647-671, 2001.
  - 23) **Pickering AK, Merkel TJ**: Macrophages release tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-12 in response to intracellular *Bacillus anthracis* spores. *Infect Immun* **72**: 3069-3072, 2004.
  - 24) **Pickering AK, Osorio M, Lee GM, Grippe VK, Bray M, Merkel TJ**: Cytokine response to infection with *Bacillus anthracis* spores. *Infect Immun* **72**: 6382-6389, 2004.
  - 25) **Popov SG, Villasmil R, Bernardi J, Grene E, Cardwell J, Popova T, Wu A, Alibek D, Bailey C, Alibek K**: Effect of *Bacillus anthracis* lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett* **527**: 211-215, 2002.
  - 26) **Popov SG, Popova TG, Grene E, Klotz F, Cardwell J, Bradburne C, Jama Y, Maland M, Wells J, Nalca A, Voss T, Bailey C, Alibek K**: Systemic cytokine response in murine anthrax. *Cell Microbiol* **6**: 225-233, 2004.
  - 27) **Seo, GM, Kim SJ, Chai YG**: Rapid profiling of the infection of *Bacillus anthracis* on human macrophages using SELDI-TOF mass spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 1236-1239, 2004.
  - 28) **Smith H**: Discovery of the anthrax toxin: the beginning of in vivo studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 199-200, 2000.
  - 29) **Smith H, Stoner HB**: Anthrax toxic complex. *Fed Proc* **26**: 1554-1557, 1967.
  - 30) **Tonello F, Ascenzi P, Montecucco C**: The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J Biol Chem* **274**: 40075-40078, 2003.
  - 31) **Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A**: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* **330**: 662-664, 1987.
  - 32) **Vitale G, Bernardi L, Napolitani G, Mock M, Montecucco C**: Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase

- family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* **352**: 739-745, 2000.
- 33) **Wallach D**: Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem Sci* **22**: 107-109, 1997.
- 34) **Wewers MD**: IL-1 beta: an endosomal exit. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10241-10242, 2004.
- 35) **Zaucha GM, Pitt LM, Estep J, Ivins BE, Friedlander A**: The pathology of experimental anthrax in rabbits exposed by inhalation and subcutaneous inoculation. *Arch Pathol Lab Med* **122**: 982-992, 1998.
-