

분리장소에 따른 황색 포도구균의 철흡수기전의 활성

조선대학교 의과대학 미생물학교실, 신경과학교실*

신성희 · 임 용 · 김진호*

Activity of Iron-uptake System of *Staphylococcus aureus* According to the Isolation Sites

Sung-Heui Shin, M.D., Yong Lim, M.D. and Jin-Ho Kim, M.D.*

Department of Microbiology and Neurology, Chosun University Medical School, Kwangju, Korea

Objective : We tried to investigate the activity of iron-uptake system (IUS) of *Staphylococcus aureus* according to the isolation sites and thus the relatedness between IUS and virulence.

Methods : Seventy clinical isolates were classified into the isolates from patients (56), from doctors and nurses (7) and from hospital environments (7). The isolates from patients (56) were sub-classified into the isolates from hospitalized patients (40; HP) and from outpatients (16; OP). Siderophore activity was measured CAS agar diffusion assay and transferrin-binding protein (tbp) was detected by receptor-ligand binding assay.

Results : There was no difference of siderophore production among the isolates from patients, doctors

and nurses, and hospital environments ($P>0.05$). However, the isolates from patients expressed more tbp than the isolates from doctors and nurses and hospital environments ($P<0.05$). The isolates from OP produced more siderophore and expressed more tbp than the isolates from HP ($P<0.05$).

Conclusion : These results suggested that *Staphylococcus aureus* with more active IUS is more virulent and more easily causes infection even in patients with relatively good general condition. (Korean J Infect Dis 34:34~38, 2002)

Key Words : *Staphylococcus aureus*, Iron-uptake system, Siderophore, Transferrin-binding protein

서 론

원핵세포인 세균에 있어 철은 에너지 생산과정의 최종 전자수용체로서 작용하며, DNA 합성 등 대사과정에 조효소로서 작용하는 필수 영양소이다. 또한 철은 세균의 독소생산과 같은 병원성인자와 밀접한 관련이 있다¹⁻³⁾. 그러나 세균감염 시에 세균이 인체에서 이용할 수 있는 철의 양은 극히 제한되어 있다. 즉, 사람을 비롯한 포유동물내의 약 20 M의 철

은 대부분 hemoglobin내에 있으며 또한 세포내에서는 ferritin에, 혈액을 비롯한 체액내에서는 transferrin, lactoferrin과 같은 철에 친화성을 보이는 단백질에 결합된 상태로 존재하기 때문이다⁴⁻⁸⁾. 세균이 인체 감염을 일으키기 위해서는 자신의 증식에 필요한 철을 획득하는 것이 중요하다. 인체내의 상대적으로 낮은 철농도 세균의 철획득을 조절하는 조절유전자 즉 fur gene을 자극하는 외부신호(environmental signals)로서 역할을 하고, 세균은 여러 철획득기전(iron uptake system)을 발현하여, 자신의 증식에 필요한 철을 얻을 수 있다⁹⁾. 이러한 세균의 철획득기전은 저친화성 기전(low-affinity system)과 고친화성 기전 (high-affinity system)으로 나눌 수 있다⁴⁾. 세균의 병원성과 관련이 깊은 잘 알려져 있는 고친화성 철획득기전으로는 siderophore 생산⁸⁻¹⁰⁾과 transferrin-bind-

* 본 논문은 2001년도 조선대학교병원 선택진료 학술연구비의 지원하에 이루어졌음.

접수: 2001년 10월 4일, 승인: 2001년 11월 29일
교신저자: 김진호, 조선대학교 의과대학 신경과학교실
Tel: 062)220-3128, Fax: 062)
E-mail: jhkim@mail.chosun.ac.kr

ing proteins (tbp) 즉 트랜스페린 수용체의 발현이다¹⁰⁻¹²⁾.

황색 포도구균은 siderophore를 생산하며 세포벽에 TBP를 발현하는 두가지 고친화성 철획득기전이 동시에 존재한다^{10, 13)}. 이러한 황색 포도구균의 철획득기전에 대한 연구는 배지내 철농도를 달리한 조건에서 활성을 조사하는 측면에 국한되어 있으며 황색 포도구균의 생리적 특성에 영향을 미칠 수 있는 기타 다른 조건에서 철획득기전의 활성의 변화를 관찰한 보고는 없다. 이에 본 연구자는 임상상의 몇몇 환경에서 분리된 황색 포도구균이 분리된 환경에 따라서 철획득기전 활성에 어떠한 차이점이 보이는 지를 살펴보고 병원성과 철획득기전의 활성이 어떠한 관련성이 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주

실험에 사용한 황색 포도구균은 광주시내의 종합병원에서 분리된 균주로서 외래에 내원한 환자의 병변에서 분리된 균주 16주, 그리고 입원중인 환자의 병변에서 분리된 40주, 의사 및 간호사 모두 40명의 의료인의 손과 비강 전방부에서 분리된 7주, 그리고 수술실, 중환자실 및 응급실에서 분리된 7주와 표준 균주인 *S. aureus* ATCC 6538를 포함하여, 총 71주를 실험에 사용하였다. 총 70주를 임상 분리주(clinical isolates)라 하였으며, 임상 분리주 중에서 입원환자 병변에서 분리된 균주를 입원환자 분리주(isolates from hospitalized patients HP isolates), 외래환자에서 분리된 균주를 외래환자 분리주(isolates from out-patients : OP isolates)라 지칭하였다. 또한 의료인에서 분리된 균주를 의료인 분리주(isolates from doctors and nurses), 그리고 공기, 병원 기구 등 병원 환경에서 분리된 균주를 병원환경 분리주(hospital environmental isolates)로 명명하였다. 실험에 사용한 균주들은 Brain Heart Infusion (이하 BHI, Difco) 액체배지에 하룻밤 배양하여 얻은 균침사체를 20% glycerol 이 함유된 BHI 액체배지로 현탁한 다음, 일정액으로 나눠 -80°C에 보관하면서, 필요할 때마다 꺼내어 실험에 사용하였다.

2. 용기 처리 및 철결핍 배지 제작

실험에 사용한 모든 유리기구는 6 N HCl에 2일간 담궈 놓은 다음, 탈이온수로 10회 세척하여 실험에 사용하였다. 피펫은 일회용 플라스틱 제품을 사용하여 실험 용기 내로 외부로부터 철이 유입되는 것을 배제하였다. BHI 액체배지

를 기본 배지로 사용하였으며 기본 배지내의 철을 결핍시킨 소위, 철결핍 배지(deferrated BHI)는 Leong과 Neilands방법¹⁴⁾으로 제작하였는데 그 방법을 기술하면 다음과 같다. 2배 농축된 2% NaCl을 함유한 BHI 액체배지 500 mL과 3% (W/V) 8-hydroxyquinoline이 포함된 chloroform 500 mL을 섞고 2일 동안 교반하였다. 배지 층과 chloroform층이 분리 되도록 실온에 정지한 하였다. 분리된 상층부의 BHI 액체배지만을 다른 용기에 옮긴 후, 8-hydroxyquinoline이 포함되지 않은 동량의 chloroform과 2시간 동안 교반하였다. 다시 정지하여 상층부의 BHI 액체배지만을 회수하여 멸균한 뒤 철결핍 배지로서 본 실험에 사용하였다. Atomic emission spectrophotometer (JY70PLUS, France)를 사용하여 BHI 액체배지와 철결핍 배지 내의 철농도를 측정하여서 각각 44.4 g/dL와 0.2 g/dL임을 확인하였다.

3. Siderophore 측정

Siderophore을 측정하는 새로운 방법으로 Shin 등¹⁵⁾이 보고한 CAS 한천배지 확산법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 제작된 CAS 한천 배지에 직경 5 mm 크기의 작은 구멍을 무균적으로 뚫는다. 이 구멍에 철결핍 배지의 배양 상청액 200 L를 넣은 후, 37°C 항온기에서 하룻밤 배양한다. 다음 날 구멍 주위에 생긴 오렌지색 환의 직경을 측정하고, 생산되는 siderophore의 활성을 그 직경의 제곱 값으로 표시하였다. 잘 알려진 siderophore의 일종인 Desferal (Ciba Geigy)을 계단 희석하여 오렌지색 환의 직경의 제곱이 Desferal의 양 또는 활성과 잘 비례함을 확인하였다.

4. Transferrin-binding protein (SA-tbp) 확인

1) 세포벽 단백질의 분리

실험 균주의 세포벽 단백질을 분리하기 위한 방법은 Cheung과 Fischetti 방법¹⁶⁾에 의하여 시행하였다. 그 방법을 기술하면 다음과 같다. 약 1×10^6 CFU/mL의 실험 균주들을 0.2 mM dipyridyl이 포함된 BHI배지에 접종하였다. 하룻밤 동안 진탕 배양하여 철결핍 배지에 순응하는 절차를 거쳤다. 다음날 역시 같은 크기의 접종 양을 철결핍 배지에 접종하여 항온기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 각각의 배양액을 약 5,000 g에서 10분 동안 원심분리 하여 세균 침사를 식염수로 2회 세척하였다. 30% raffinose가 포함된 50 mM Tris (pH 7.5)와 145 mM NaCl용액 0.6 mL에 최종 농도 100 g/mL의 lysostaphin, 10 g/mL의 DNase, 1 mg/mL의 iodoacetamide, 그리고 1 mM/mL의 phenylmethylsulfonyl fluoride가 되게 준비한 분리액(digestion buffer)을

사용하여 현탁한 다음, 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 현탁액을 8,000 g에서 10분간 원심분리 하여 protoplast를 제거하고 상청액 내에 존재하는 세포벽 단백질을 정량하였다.

2) Western blotting

분리된 실험 균주들의 세포벽 단백질 약 60 g을 SDS-PAGE완충액에 넣은 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 10% acrylamide gel을 준비하여 20 mA하에서 전기영동을 시행하였다. 이 후 nitrocellulose paper (NC-paper)에 25 V하에서 전이한 다음, blocking액(1% Skim milk, 3% new-born calf serum, 150 mM NaCl, Tris, pH 7.5)에 1시간 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 표지된 사람 transferrin을 가한 다음, 37℃에서 90분 동안 가볍게 진탕하면서 반응시켰다. 다시 NC-paper를 TNT액(2% Tween-20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5)으로 10분씩 3회 세척한 다음, diaminobenzidine와 hydrogen peroxide를 가하여 발색하였다.

결과 및 고찰

황색 포도구균 임상 분리주 총 70주를 환자 분리주, 의료인 분리주, 병원환경 분리주로 나누고 또 환자 분리주를 입원환자 분리주와 외래환자 분리주로 나누어 철획득기전의 발현율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 총 70 주의 임상 분리주의 철획득기전 발현율을 보면 siderophore생산은 57.1%에서 검출되었으며, SA-tbp의 발현은 71.4%의 균주에서 발현되었다. 환자 분리주 56균주만을 대상으로 확인한 결과도 전체 임상 분리주를 대상으로 한 결과와 비슷한 양상을 보였다. Siderophore생산은 33주(58.9%)에서 검출되었으며, SA-tbp의 발현은 44주(78.6%)에서 발현되었다. 환자 분리주 중 외래환자 분리주를 제외한 입원환자 분리주 40주를 대상으로 조사한 결과 siderophore생산은 20주(50%)에서 검출되었으며, SA-tbp의 발현은 28주(70.0%)에서 발현되어 앞의 결과들과 비슷한 양상을 보였다. 그러나 환자 분리주 중에

서 외래환자 분리주 16주만을 대상으로 조사한 결과 14주(87.5%)가 siderophore를 생산하였고, SA-tbp 발현은 외래환자 분리주 16주 모두에서 발현되었다. 외래 환자에서 분리된 황색 포도구균은 입원 환자에서 분리된 황색 포도구균보다 더 높은 철흡수기전의 발현율을 보였다. 의료인 분리주 7주를 대상으로 조사한 결과 siderophore생산은 4주(57.1%), SA-tbp의 발현은 3주(42.9%)에서 발현되었다. 환경 분리주 7주를 대상으로 조사한 결과 siderophore생산은 3주(42.9%), SA-tbp의 발현은 3주(42.9%)에서 발현되었다.

전체 임상 분리주를 환자 분리주, 의료인 분리주, 환경 분리주와 같이 3가지로 분류하여 철획득기전의 발현정도를 양적으로 비교한 결과는 Table 2와 같다. Siderophore 생산을 결과와는 다르게 환자 분리주, 의료인 분리주, 환경 분리주를 대상으로 siderophore 생산량의 차이점을 통계학적으로 비교하기 위해서 one way RM ANOVA test를 시행한 결과, 통계학적인 의미는 찾을 수 없었다. SA-tbp의 발현은 양적으로 판단하기 어려운 점이 있어 SA-tbp 발현율의 차이를 환자 분리주, 의료인 분리주, 환경 분리주로 나누어 Fisher exact test로 검증한 결과, 환자 분리주의 경우 의료인 혹은 환경 분리주에 비해서 더 많이 발현되었으며 통계학적으로 의미가 있었다($P<0.05$).

또한 환자 분리주를 외래환자 분리주 그리고 입원환자 분리주로 나누어 철획득기전의 발현정도를 비교한 결과는 Table 3과 같으며 Fisher exact test와 Mann-Whitney Rank

Table 2. Comparison of Iron-uptake Systems of *Staphylococcus aureus* According to the Isolation Sites

	Patients	Doctors & nurse	Hospital environment	P-value
Siderophore (Mean, mm ²)	6.61	6.49	14.59	0.346*
SA-tbp (%)	78.6	42.9	42.9	0.032 [†]

*One way RM ANOVA test, [†]Chi-test or Fisher exact test

Table 1. Expression (%) of the Iron-uptake System of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates

	Siderophore (%)	SA-tbp (%)
Total isolates (70)	40 (57.1)	50 (71.4)
Patients (56)	33 (58.9)	44 (78.6)
OPD (16)*	14 (87.5)	16 (100.0)
HP (40) [†]	20 (50.0)	28 (70.0)
Doctors and nurses (7)	4 (57.1)	3 (42.9)
Hospital environments (7)	3 (42.9)	3 (42.9)

*OPD : Outpatients, [†]HP : Hospitalized patients

Table 3. Comparison of the Iron-uptake Systems between the *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from Outpatients (OP) and from Hospitalized Patients (HP)

	OP	HP	P-value
Siderophore (Mean, mm ²)	9.93	5.28	0.010*
SA-tbp (%)	100	70.0	0.012 [†]

*Mann-Whitney Rank Sum test, [†]Chi-test or Fisher exact test

Sum test로 각각 검증한 결과 입원환자에 비해 외래환자 분리주에서 더 많이 SA-tbp를 발현하였으며 더 많은 siderophore를 생산하였다($P<0.05$). 특징적으로 외래환자 분리주의 경우 비교군 중에서 가장 높은 siderophore 생산율 (87.5%)을 보였고 모든 균주에서 SA-tbp를 발현하여 본 실험에서 확인한 고친화성 철획득기전의 활성이 가장 높은 균주 집단으로 확인되었다.

SA-tbp의 발현율이 siderophore 생산율 보다 높게 조사된 것에 대한 임상적 의의는 현재까지의 연구결과로서는 알 수 없다. 환자나 의료인 그리고 병원환경이 아닌 다른 자연환경으로부터 분리된 황색 포도구균의 철흡수기전의 발현율이 조사되지 않은 상태에서 본 연구결과만을 토대로 임상적 의미를 찾는다는 것은 바람직하지 못하다고 생각한다. 계속적인 연구를 통해 자연계에서 분리된 황색 포도구균의 철흡수기전에 관한 많은 정보들이 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

환자 분리주들의 철획득기전 발현 정도보다 환경 분리주나 의료인 분리주에서 철획득기전 발현 정도가 낮은 것은 환경 분리주나 의료인 분리주가 인체와의 접촉이 상대적으로 덜 이루어졌거나 인체 내에서 증식이 이루어지지 않고 단순히 일과성으로 분포하고 있었기 때문인 것으로 생각된다. 인체 내에서 증식이 이루어질 경우 철획득기전의 활성이 상대적으로 결여되어 철획득 능력이 낮은 균들은 인체 면역방어기체에 의해 제거되며 철획득 능력이 높은 균은 인체 면역방어기체를 극복하고 증식할 수 있을 것으로 생각되며 이러한 균들이 환자들에게서 분리된 것으로 생각된다. 그러므로 환자의 병변에서 분리된 황색 포도구균은 의료인이나 병원환경에서 분리된 황색 포도구균에 비해 철획득 능력이 비교적 높은 균들일 것으로 생각된다. 또한 외래 환자의 경우 대부분 전신적인 상태는 양호하며 입원환자의 경우는 면역결핍 등 전신적인 상태가 상대적으로 불량한 환자들 이 대부분임을 감안하면 전신적 건강상태가 양호한 외래환자에서 분리된 황색 포도구균은 상대적으로 높은 철획득기전의 활성으로 가지고 있어야 증식하여 병적상태에 도달할 수 있으며 전신적 건강상태가 불량한 입원환자의 경우 상대적으로 낮은 철획득기전을 가지고 있더라도 환자의 감수성이 증가된 까닭에 보다 쉽게 감염을 일으킬 수 있었을 것으로 생각된다. 외래환자 분리주들에서 철획득기전의 활성이 높게 조사된 이유 중 다른 한가지는 외래환자 분리주의 경우 16주 모두가 OXAC에 감수성이 있으며 기타 다른 항균제에 대해서도 감수성이 매우 높은데 원인이 있다고 판단된다¹⁷⁾. 즉 항생제 감수성이 있는 균주는 항생제 노출이 적거나 없었다는 것을 의미하며 이러한 균주의 경우 철획득

기전이 내성 균주에 비해 상대적으로 활성화되었기 때문으로 생각된다^{18, 19)}.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다. 임상 분리주를 환자 분리주, 의료인 분리주, 병원환경 분리주와 같이 세 그룹으로 분류한 다음 분리장소에 따른 철 획득 기전의 활성을 확인한 결과, siderophore 생산은 차이가 없었다($P>0.05$). 그러나 환자 분리주의 경우 의료인 분리주나 병원환경 분리주에 비해 높은 SA-tbp의 발현율을 보였다($P<0.05$). 환자 분리주를 외래환자 분리주와 입원환자 분리주로 나누어 철 획득 기전의 활성을 비교한 결과, 외래환자 분리주의 경우 입원환자 분리주에 비해 더 많은 siderophore를 생산하였고 더 많은 SA-tbp를 발현하였으며 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($P<0.05$). 이상의 결과를 토대로 볼 때, 보다 활발한 철획득기전을 가진 황색 포도구균이 보다 더 병원성이 강하여 전신적 건강상태가 양호한 사람에게도 감염을 일으킬 수 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Payne SM, Finkelstein RA : Siderophore production by *Vibrio Cholerae*. *Infect Immun* 20:310-311, 1978
- 2) Litwin CM, Rayback TW, Skinner J : Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect Immun* 64:2834-2839, 1987
- 3) Roth JA, Bolin CA, Brogden KA : Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2nd ed., Washington, DC : ASM press, p79-88, 1995
- 4) Neilands JB : Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* 50:715-731, 1981
- 5) Neilands JB : Siderophore : structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-26726, 1995
- 6) Weinberg ED : Iron and infection. *Microbiol Rev* 42:45-66, 1978
- 7) Weinberg ED : Iron withholding : A defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev* 64:65-102, 1984
- 8) Martinez JL, Delgado-Iribarren A, Baquero F : Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* 75:45-56, 1990
- 9) Bagg A, Neilands JB : Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* 51:509-518, 1987
- 10) Lim Y, Shin SH, Lee SI, Kim IS, Rhee JH : Iron-repressibility of siderophore and transferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 163:19-24, 1998

- 11) Lindsay JA, Riley TV : *Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression*. *Infect Immun* 62:2309-2314, 1994.
 - 12) Trivier D, Davril M, Houdret N, Courcol RJ : *Influence of iron-depletion on growth kinetics, siderophore production, and protein expression of Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 127:195-200, 1995
 - 13) Modun B, Kendall D, Williams P : *Staphylococci express a receptor for human transferrin: Identification of a 42-kilodalton cell wall transferrin-binding protein*. *Infect Immun* 62:3850-3858, 1994
 - 14) Leong SA, Neilands JB : *Siderophore production by phytopathogenic microbial species*. *Arch Biochem Biophys* 218:351-359, 1982
 - 15) Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, Rhee JH : *CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids*. *J Microbiol Methods* 44:89-95, 2001
 - 16) Cheung AL, Fischetti VA : *Variation in the expression of cell wall proteins of Staphylococcus aureus grown on solid and liquid media*. *Infect Immun* 56:1061-1065, 1998
 - 17) Lim Y, Lee KK, Shin SH : *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus according to the isolation sites*. *Med J Chosun Univer* 26:49-57, 2001
 - 18) Courcol RJ, Lambert PA, Fournier P : *Effects of iron depletion and sub-inhibitory concentrations of antibiotics on siderophore production by Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 28:663-668, 1991
 - 19) Kadurugamuwa JL, Anwar H, Brown MRW, Zak O : *Effect of subinhibitory concentrations of cephalosporins on surface properties and siderophore production in iron depleted Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 27:220-223, 1985
-