

세균 초항원에 의해 활성화된 대식세포에서 Toll-like receptor의 발현양상

연세대학교 원주의과대학 내과학교실¹, 미생물학교실²
김효열¹ · 조현철² · 김수기² · 신계철¹

Expression of Toll-like Receptors on the Macrophages Activated by Bacterial Superantigens

Hyo Youl Kim, M.D.¹, Hyun Chul Cho, M.S.², Soo Kie Kim, M.D.², and Kye Chul Shin, M.D.¹

Department of Internal Medicine¹, Department of Microbiology², Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea

Background : Staphylococcal enterotoxin B (SEB) as a prototype superantigen is known to play a pivotal role in toxic shock syndrome and severe sepsis. However, the precise mechanism initiating the activation of innate effector cells by SEB is unclear. Recently, Toll-like receptors (TLRs), the sensor of pathogen associated molecular pattern (PAMP), have been reported to be expressed abundantly in monocytic lineage-cells. The purpose of this study is to investigate whether TLRs are involved in the SEB-induced immune cell activation and to prove the differential TLRs expression in response to SEB and/or lipopolysaccharide (LPS).

Materials and Methods : SEB was purified by dye ligand affinity chromatography. The mRNA expression of TLR1–9 in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and human monocyte-like THP-1 cell line stimulated by SEB and/or LPS was detected by RT-PCR.

Results : The treatment of PBMC with SEB elicited significant changes in the expression of several TLRs. Interestingly, the mRNAs of TLR1 and TLR5 were clearly up-regulated in PBMC, whereas mRNA of TLR4 was down-regulated in the very early period of stimulation within 1–2 hours, and subsequently up-regulated 3 hours later after the stimulation. The up-regulation of mRNA of TLR4 was detected in PBMC stimulated by LPS. The up-regulation was more prominent in the cells exposed concomitantly to SEB and LPS. The mRNA expression pattern of TLR4 in THP-1 cell line stimulated by SEB or LPS was comparable to those of PBMC.

Conclusion : This study indicates that SEB triggers inflammatory signals on macrophages and PBMC by engaging TLRs, particularly TLR4. The combination of LPS and SEB synergistically modulates TLR4 signaling.

Key Words : Toll-like receptor, Superantigen, Staphylococcal enterotoxin B

서 론

세균에서 분비되는 외독소 중 초항원(superantigen)은 항원전달세포(antigen presenting cell)의 MHC class II 분자와 T 림프구의 T 세포 수용체(T cell receptor) V β

부위와 비특이적으로 결합하여 강력하게 대식세포와 T 림프구를 활성화하고, 이로 인해 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), IL-1, interferon- γ 등의 사이토카인이 독성 농도로 과량 분비되어 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다(1,2). 이로 인해 발생하는 대표적 질환인 독소충격증후군(toxic shock syndrome)은 사람에서 가장 위험한 증후군의 하나로 사망률이 높으며, 아직까지 효과적인 치료 방법이 없는 실정이다. 또한 초항원은 그램음성세균의 내독소인 지질다당질(lipopolysaccharide, LPS)에 의한 폐혈증에서 상승작용으

접수: 2004년 7월 16일, 승인: 2004년 9월 24일
본 논문은 2002년 연세대학교 학술연구비 지원에 의해 연구됨.
교신저자: 김효열, 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 감염내과
Tel: 033)741-1206, Fax: 033)748-1206
E-mail: hyksos@wonju.yonsei.ac.kr

로 더욱 강력한 염증반응을 유도하는데 관여한다(3). 세균 초항원의 종류로는 *Staphylococcus aureus*에서 만들어지는 포도알균 창자독소 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB), 독소충격증후군 유발독소-1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)과 *Streptococcus pyogenes*에서 만들어지는 연쇄구균 발열외독소 A (streptococcal pyrogenic exotoxin A, SPEA) 등이 대표적이며, 이외에도 그람음성세균, 바이러스, 미코플라스마, 기생충 등에서도 만들어진다(2). 이중 SEB가 초항원에 의한 면역세포 활성화 기전 연구에 많이 사용되어 왔다(4).

그러나 아직 초항원에 의해 면역세포가 활성화되는 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 비록 초항원에 의한 T 세포의 활성이 MHC class II 분자에 의존하는 것으로 알려져 있지만 어떤 항원전달세포에서는 MHC class II 분자의 발현이 초항원에 의한 T 세포 반응을 유도할 정도로 충분하지 않은 경우도 있어 MHC class II 분자 이외에 다른 보조 수용체(coreceptor)가 있을 것이라는 추측이 있었으며, 실제로 사람 단핵구에서 CD38이 MHC class II 분자와 함께 초항원에 의한 T 세포 활성에 보조 수용체로 관여한다는 연구보고가 있어(5) 아직 밝혀지지 않은 새로운 신호전달 경로가 존재할 수 있을 것으로 추정된다.

최근 세포막 수용체인 Toll-like receptor (TLR)가 미생물 병독인자의 특정 구조인 pathogen associated molecular pattern (PAMP)을 인지하여 사이토카인 생성 신호체계를 촉발함으로써 선천면역(innate immunity)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다(6). 원래 Toll은 초파리(*Drosophila*)의 초기 배아발생 과정에서 dorsal-ventral axis를 결정하는 중요한 구성요소로 미생물 감염에 반응하여 초파리의 선천면역에 중요한 항균 펩티드의 생산을 조절하는 것으로 알려졌다(7). 1997년에 Toll의 사람 동족체로 TLR이 처음 발견된(8) 이후 현재까지 사람에는 10개의 TLR(TLR1-TLR10)이 밝혀져 있으며, 최근 TLR11이 마우스에서 발견되었으나 사람에서 존재하는지는 아직 확실하지 않다(9). 현재 TLR10과 TLR11을 제외한 TLR1-TLR9와 결합하는 여러 배위자(ligand)가 밝혀져 있으며(10), 이 중 특히 TLR4는 그람음성세균의 당지질 성분인 LPS에 의해 활성화되고, TLR2는 그람양성세균의 세포벽 성분에 의해 활성화되는 주요 수용체로 알려져 있다(11). TLR은 사람 말초혈액 단핵구에서 높게 발현되는데, TLR2와 TLR4의 mRNA 발현은 단핵구에서 높게 발현되고, TLR10의 mRNA 발현은 B 림프구에서 높게 발현된다(12). LPS와 마찬가지로 SEB도 단핵구 세

포의 활성에 의해 유사한 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있어 SEB와 TLR의 연관성에 대한 연구가 필요하나 최근까지 이에 대한 실험적 증거들은 매우 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 대표적인 세균 초항원인 SEB에 의한 사람 말초혈액 단핵구와 대식세포의 활성에 TLR의 관련성을 알아보았다. 또한 기존에 알려진 그람음성세균 내독소인 LPS에 의한 TLR의 발현양상과 어떤 차이점이 있는지 알아보고, SEB와 LPS를 동시에 자극하였을 때 관찰되는 상승적 염증반응이 TLR 발현에 어떤 영향을 주는지도 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. SEB의 생산 및 정제

실험에 사용할 세균 초항원은 창자독소 B를 생산하는 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 균주를 진탕 배양하여 이미 알려져 있는 dye ligand affinity chromatography법(13, 14)으로 분리 정제하여 사용하였다. 분리된 SEB는 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하여 순수 정제됨을 확인하였고, 정제된 SEB의 초항원 효과를 증명하기 위해 BALB/c 마우스의 비장세포를 이용한 ³H-thymidine 흡착 시험을 시행하였다. 또한 분리 정제된 SEB의 내독소 함량을 *Limulus amebocyte lysate assay* (Endosafe®, Charles River laboratories, Wilmington, MA, USA)로 측정하였다.

2. 세포 분리 및 배양

사람 대식세포주인 THP-1 세포와 건강한 성인에서 채혈한 혈액으로부터 분리된 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 SEB와 LPS에 의한 TLR mRNA의 발현양상을 확인하는데 이용하였다.

사람 말초혈액 단핵구는 건강한 성인에서 채혈한 혈액의 백혈구 연층(buffy coat)으로부터 Ficoll-Hypaque 중층원심법으로 분리하였다. 말초혈액과 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 동량으로 혼합한 뒤 Ficoll hypaque (Pharmacia LKB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ, USA)로 1,500 rpm, 20분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후 단핵구만을 수확하였으며, 남아있는 적혈구는 0.85% NH₄Cl를 이용하여 용해시키고 PBS로 세척하였다. 세포침전물에 PBS를 넣어 부유시킨 후 hemocytometer chamber에 10 μl를 넣고 trypan blue로

염색하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 세포를 10% 우테아 혈청이 함유된 RPMI 1640 배지에 부유하였으며, SEB와 LPS로 자극하기 전까지 5% CO₂가 함유된 37°C 배양기에서 배양하였다.

실험에 사용된 사람 대식세포주인 THP-1은 American Type Culture and Collection (ATCC)에서 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포 배양은 RPMI 1640 배지에 10% 우테아 혈청과 페니실린 100 IU/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml을 첨가하여 사용하였다.

3. SEB와 LPS를 이용한 세포자극

말초혈액 단핵구와 THP-1 세포주는 세균 초항원인 SEB와 내독소인 LPS (*Escherichia coli* 055:B55, Sigma)로 자극 후 TLR mRNA 발현을 보는데 사용하였다. SEB와 LPS의 자극 농도와 시간은 반복적인 예비실험을 통해 결정하였다. 배양된 말초혈액 단핵구와 THP-1 세포는 6 well plate에 well 당 5×10⁶개의 세포를 넣고 4시간이 지난 후 배지를 제거하고 새 배지와 함께 SEB 50 ng/ml이나 LPS 50 ng/ml, 또는 SEB 20 ng/ml와 LPS 20 ng/ml를 동시에 처리하고 시간 경과에 따른 TLR mRNA의 발현양상을 확인하는 데 이용하였다.

4. RNA 분리 및 cDNA 합성

Trizol 용액(Life technologies, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 그 과정으로는 배양접시를 PBS로 세척하고 Trizol 용액을 넣어 세포를 깬 후 상온에서 5분간 두었다가 시료 당 0.1 ml씩의 chloroform을 첨가한 후 15초간 진탕하였다. 원심분리 후에 RNA가 포함된 상층액을 tube로 옮겨 담은 후 isopropanol 0.3 ml 첨가하고 tube를 한번 뒤집어 섞은 후 상온에 10분간 두었다가 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 RNA 침전물을 제외한 나머지 용액

을 제거하고 나서 75% 에탄올을 500 µl 첨가하여 혼들어 준 후 4°C에서 7,000 g로 5분간 원심분리 하였다. 이후에 상층액은 제거하고 RNA 침전물은 공기 중에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate로 처리한 증류수 30 µl를 첨가하여 RNA를 녹이고 나서 RNA 정량과 역전사반응에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. RNA 정량은 증류수에 녹아 있는 RNA 용액 5 µl에 증류수 400 µl를 첨가하여 잘 섞은 다음 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. cDNA를 합성하기 위해 1-2 µg의 RNA와 완충용액, 500 ng의 oligo-dT primer, 15 U의 avian myeloblastosis virus 역전사효소, 20 U의 RNase inhibitor (RNasin), 1 mM의 dNTP, 5 mM의 MgCl₂를 얼음 위에서 혼합하여 20 µg의 반응액을 만들었다(Reverse transcription system A3500: Promega, Madison, WI, USA). 이 반응액을 PCR thermal cycler (Hybaid, Franklin, MA, USA)를 이용하여 42°C에서 30분간 반응시킨 후 9°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화시키고 5°C에서 10분간 두었다가 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

5. 중합효소연쇄반응

역전사 반응의 결과로 만들어진 cDNA는 각각의 실험 목적에 맞게 TLR1~TLR9, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 primer를 사용하여 증폭하였다. 중합효소연쇄반응을 수행하기 위하여 cDNA 합성액 1-2 µl, 완충용액, 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), primer 1 µl, 2 mM MgCl₂를 넣어서 50 µl의 반응액을 만든 후 thermal cycler에 넣고 적절한 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응에 사용된 primer 서열과 증폭조건은 Table 1과 Table 2에 제시하였다.

중합효소연쇄반응의 산물은 ethidium bromide가 함유

Table 1. Primer Sequences for PCR of Toll-like Receptor

	Forward	Reverse	Base Pairs
TLR1	CTATACACCAAGTTGTCAGC	GTCTCCAACCTCAGTAAGGTG	219
TLR2	GCCAAAGTCTTGATTGATT	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG	346
TLR3	GATCTGTCTCATATAATGGCTTG	GACAGATTCCGAATGCTTGTG	304
TLR4	TGGATACGTTCCCTTATAAG	GAAATGGAGGCACCCCTTC	506
TLR5	CTAGCTCTTAATCCTGATG	CCATGTGAAGTCTTGCTGC	437
TLR6	TAGGTCTCATGACGAAGGAT	GGCCACTGCAAATAAGTCG	1108
TLR7	AGTGTCTAAAGAACCTGG	CTTGGCCTTACAGAAATG	545
TLR8	CAGAATAGCAGGCCGTAAACACATCA	AATGTCACAGGTGCATTCAAAGGG	637
TLR9	GTGCCCTTCACTTCTCCATG	GGCACAGTCATGATGTTGTTG	260
GAPDH	ACCACAGTCCATGCATCAC	TCCACCACCCCTGTTGCTGTA	452

All sequences are presented in the 5'→3' direction. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

된 2% agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 관찰하였다. 각각의 시료에서 GAPDH 발현정도를 densitometer로 읽은 후에 이 값을 가지고 TLR의 발현정도를 보정하여 상대적 발현정도를 그래프로 나타내었다.

결 과

1. 정제된 SEB의 초항원 효과

분리된 SEB의 정제 정도를 알아보기 위해 시행한 SDS-PAGE에서 단일밴드가 관찰되어 순수 정제되었음을 확인하였다. 정제된 SEB에 대한 릴프구 증식반응을 조사하기 위해 마우스 비장세포를 정제된 SEB로 자극 후 ^3H -thymidine 흡착을 본 결과 SEB의 용량이 증가함에 따라 세포 DNA에 흡착된 ^3H -thymidine 농도가 증가

Table 2. PCR Conditions for the Detection of Toll-like Receptors

Primer	cDNA (μl)	Annealing temperature	Cycle number
TLR1	2	52°C	32
TLR2	2	54°C	32
TLR3	2	52°C	32
TLR4	2	54°C	32
TLR5	2	52°C	32
TLR6	2	55°C	32
TLR7	2	55°C	32
TLR8	2	55°C	32
TLR9	2	55°C	32
GAPDH	1	55°C	25

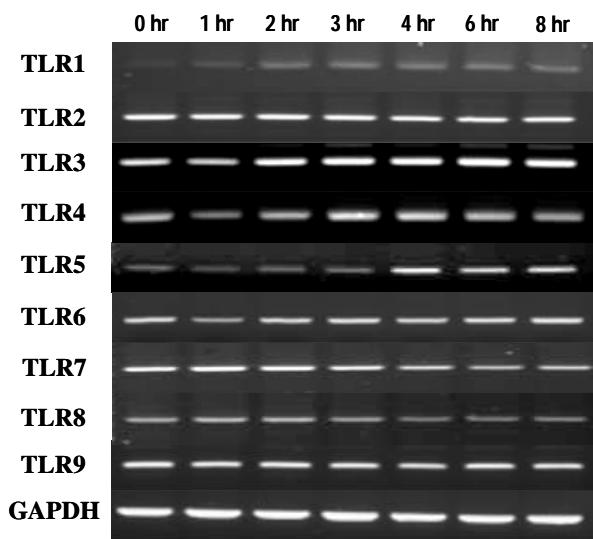


Figure 1. mRNA expression of human Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells in response to 50 ng/ml SEB was detected by RT-PCR.

하여 초항원 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 분리 정제된 SEB의 내독소 함량을 *Limulus amebocyte lysate assay*로 측정한 결과 SEB 1 μg 당 0.0000098 μg 의 LPS가 함유된 것을 확인하였다.

2. 사람 말초혈액 단핵구에서 SEB 자극에 의한 TLRs mRNA의 발현양상

Figure 1은 건강한 성인에서 분리한 말초혈액 단핵구에 SEB 50 ng/ml를 처리하고 시간별로 TLR1~TLR9 mRNA 발현을 관찰한 것이다. 그 결과 TLR1, TLR4, TLR5에서 의미 있는 변화가 관찰되었다. TLR1과 TLR5는 SEB를 처리하지 않았을 때는 거의 발현되지 않았으나 SEB 자극 후 점진적으로 발현이 증가하였다. TLR4는 SEB를 처리하기 전에도 높게 발현되어 있었으며, SEB 처리 후 1시간째는 발현이 감소되었다가 이후 증가하여 3시간째 가장 높은 발현을 보이고 서서히 감소하여 처리 전 상태로 회복되었다. 말초혈액 단핵구에서 TLR2, TLR3, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9의 mRNA 발현은 SEB 처리전과 비교해 SEB 처리 후 변화 없이 거의 일정한 발현 양상을 보였다.

3. 사람 말초혈액 단핵구에서 SEB와 LPS 자극에 의한 TLR4 mRNA의 발현의 비교

Figure 2는 사람 말초혈액 단핵구에 SEB 50 ng/ml이나 LPS 50 ng/ml, 또는 SEB 20 ng/ml와 LPS 20 ng/ml

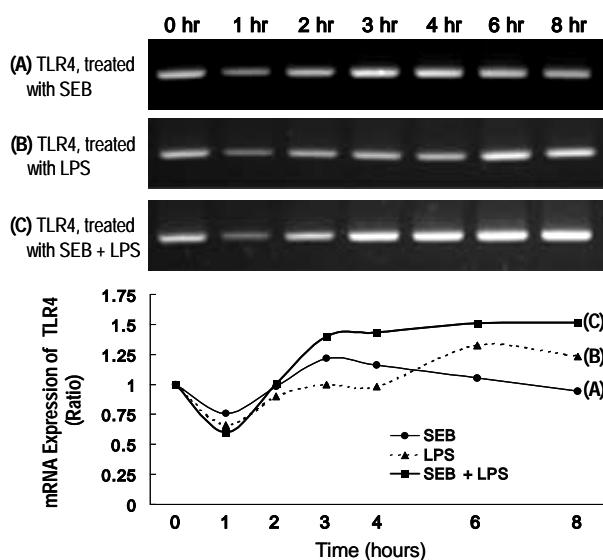


Figure 2. mRNA expression of human TLR4 in peripheral blood mononuclear cells in response to (A) 50 ng/ml SEB, (B) 50 ng/ml LPS, and (C) combination of 20 ng/ml SEB and 20 ng/ml LPS was detected by RT-PCR.

를 병합하여 각각 처리하고 시간별로 TLR4 mRNA의 발현을 비교하여 본 것이다. 사람 말초혈액 단핵구를 LPS로 자극하였을 때에도 SEB 자극에 의한 TLR4 mRNA 변화와 유사한 발현양상을 보였는데 LPS 처리 후 1시간째 발현이 감소하였다가 이후 증가하여 6시간째 최고의 발현을 보였다. SEB와 LPS를 병합하여 동시에 말초혈액 단핵구를 자극하였을 때는 TLR4 mRNA 발현의 변화가 더 현저하게 관찰되었다. SEB와 LPS를 병합하여 자극 후 TLR4 mRNA는 1시간째 발현이 감소하고 이후 증가하여 SEB와 LPS를 단독으로 처리하였을 때보다 더 뚜렷하고 상승적으로 발현이 증가하였다.

4. THP-1 세포주에서 SEB 또는 LPS 자극에 의한 TLR2와 TLR4 mRNA의 발현양상

Figure 3은 사람 대식세포주인 THP-1을 SEB 50 ng/ml 또는 LPS 50 ng/ml로 자극하고 TLR2와 TLR4 mRNA의 발현을 시간별로 관찰한 것이다. TLR2 mRNA의 발현은 SEB나 LPS 자극 후에 현저한 변화가 관찰되지 않았다. TLR4 mRNA 발현은 SEB 자극 후 6시간째 현저하게 증가하였고, LPS 자극 후에는 2시간째 발현이 감소하였다가 이후 증가하여 8시간째 최고로 증가하였다. SEB와 LPS 모두 THP-1 세포주에서 TLR4 mRNA 발현에 유사한 변화를 유도하였고, LPS 보다 SEB 자극 후 TLR4 mRNA 발현이 더 빠르게 최고치로 증가하였다.

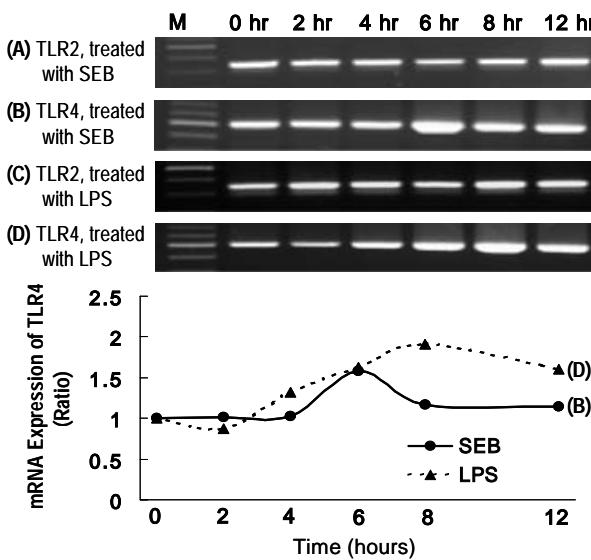


Figure 3. mRNA expression of human TLR2 and TLR4 in monocyte-like THP-1 cells in response to 50 ng/ml SEB or 50 ng/ml LPS was detected by RT-PCR. mRNA expression of TLR2 was constant regardless of the treatment with SEB (A) or LPS (C). mRNA expression of TLR4 was increased with SEB (B) or LPS (D) treatment. M indicates molecular marker.

고 찰

황색포도알균에서 분비되는 SEB는 식중독을 일으키는 원인물질로 초항원에 의해 유발되는 의학적 질환 연구에 많이 사용되어 왔다. 본 실험에서는 SEB를 dye ligand affinity chromatography법으로 직접 정제하여 사용하였는데, 이 방법은 적은 비용으로 많은 양의 단백질을 손쉽게 정제할 수 있는 방법으로 알려져 있다(13, 14). 본 실험에서는 정제된 SEB가 순수 분리되었음을 SDS-PAGE로 확인하였고, 마우스 비장세포를 이용하여 초항원 효과를 증명하였다. 또한 내독소 함량을 측정한 결과 정제된 SEB에는 무시해도 될 정도의 미량의 내독소가 함유되어 있음을 확인하였다. 이 결과로 오염된 LPS에 의한 영향은 거의 배제할 수 있었다.

본 연구에서 TLR과 초항원의 연관성을 알아보기 위해 사용한 말초혈액 단핵구는 단핵구(monocyte)만 분리된 것이 아니고 림프구를 포함한 다른 세포분획도 섞여 있을 가능성이 높다. 그러므로 초항원 자극으로 유도된 말초혈액 단핵구의 TLR4 mRNA의 변화는 어느 세포분획에 의해 유도되었는지 정확히 알 수 없었다. 이를 보완하기 위해 단핵구 유사 대식세포주인 THP-1을 초항원으로 자극하여 TLR4 mRNA의 변화를 확인하여 보았다. 그 결과 말초혈액 단핵구와 THP-1에서 동일한 변화를 관찰할 수 있었고, 이로써 TLR4 mRNA의 의미 있는 변화는 주로 단핵구/대식세포에서 유도되는 것으로 추측할 수 있었다. 사람 TLR의 조직 내 발현은 다양한 Zaremba와 Godowski(15)는 TLR mRNA를 실시간 RT-PCR로 확인한 결과 대부분의 실험 조직에서 적어도 하나 이상의 TLR이 발현되었고, 비장과 말초혈액 백혈구는 거의 모든 TLR이 발현되었다. 백혈구 내에서도 전문적인 식세포에서 매우 다양하게 TLR mRNA가 발현되었다. 대식세포 유사 THP-1 세포는 LPS나 세균의 lipoprotein, 살아있는 세균, 사이토카인 등 다양한 자극에 반응하여 TLR mRNA 발현이 조절됨이 관찰되었다.

본 연구에서 말초혈액 단핵구와 THP-1 세포를 SEB나 LPS로 자극하였을 때 초기 1-2시간 동안은 자극하지 않은 상태보다 TLR4 mRNA 발현이 저하되었다가 이후 TLR4 mRNA의 발현이 상승되는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 TLR4 mRNA 발현의 변화는 SEB가 TLR4 활성에 연관성이 있다는 하나의 증거가 될 수 있을 것이다. 아직 문헌에서 SEB가 LPS와 같은 TLR4의 배위자라는 직접

적인 증거는 찾아볼 수 없으며, SEB와 TLR4의 연관성에 관한 연구도 매우 적다. 최근 Calkins 등(16)은 TLR4가 돌연변이인 C3H/HeJ 마우스와 TLR4가 정상인 C3H/HeN 마우스에 SEB 또는 LPS를 기관지내로 투여하여 폐의 다형핵 백혈구 축적과 기관지 폐포 세척액의 세포 수, macrophage inflammatory protein (MIP-2)의 양을 측정하여 본 결과 TLR4가 보존된 마우스에서는 LPS와 SEB 각각 단독 자극 시에 폐의 다형핵 백혈구의 축적과 MIP-2 생산의 증가가 관찰되었다. 반면에 TLR4 돌연변이 마우스에서는 LPS와 SEB 모두에서 폐의 다형핵 백혈구의 축적과 MIP-2 생산의 증가 등의 현상을 볼 수 없었다. 이는 TLR4 신호전달이 LPS 외에 SEB와 같은 다른 종류 PAMP의 반응에도 관여한다는 간접적인 증거라고 볼 수 있겠다.

말초혈액 단핵구와 THP-1 세포를 SEB나 LPS로 자극하였을 때 처음부터 TLR4 mRNA 발현이 증가되지 않고 초기 1~2시간 동안은 자극하지 않은 상태보다 TLR4 mRNA 발현이 저하되는 것이 관찰되었다. 이런 현상은 다른 문헌에서도 관찰되는데, 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 TLR4 mRNA 발현이 일시적으로 강하게 억제되는 것과 유사하다(17, 18). 이들 문헌에서는 이런 TLR4 mRNA 발현의 감소가 내독소에 대한 관용현상(tolerance)에 기여하는 것으로 설명하였다. LPS에 먼저 노출된 후에 두 번째 LPS 자극을 주면 감수성이 저하되는데 이런 현상을 LPS 관용현상, 또는 LPS 반응저하(hyporesponsiveness)라고 한다(19). 이런 현상은 SEB에서도 관찰되는데 사람 말초혈액 단핵구가 두 번째 SEB에 노출되면 농도가 처음 유발 용량의 10~100배 낮더라도 또는 SEB 노출 후 2시간 이내라 하더라도 즉각적이고 거의 완벽하게 IL-2와 IFN- γ mRNA 발현을 차단하게 되는 중단(shutoff) 반응이 관찰된다(20). 즉 초항원에 의한 신호전달이 T helper 1 사이토카인 유전자를 강력하게 유도함과 동시에 초항원에 다시 노출되었을 때 이들의 발현을 중단시키도록 유도하게 되는 것이다. LPS 자극 후 마우스 대식세포에서 TLR4 mRNA 발현이 일시적으로 감소하는 현상이 관찰되는데, LPS 자극이 TLR4-MD2의 세포 표면 발현을 감소시키고 동시에 사이토카인 생성을 감소 시켰으며, LPS로 전처치 한 마우스 대식세포에서 이후의 LPS 자극에 대해 NF- κ B 활성을 비롯한 신호전달물질의 활성이 억제되었다(18). 그러나 본 연구에서 보인 SEB 또는 LPS 자극 후 일시적인 TLR4 mRNA 발현의 감소가 다른 문헌에서처럼 관용현상으로 나타난 것인지 아니면 TLR4 mRNA 발현이 증

가되기 전에 보이는 단순한 일시적 현상인지는 앞으로 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

본 연구에서 말초혈액 단핵구 세포를 LPS나 SEB 단독으로 자극하였을 때보다 LPS와 SEB를 동시에 자극하였을 때 TLR4 mRNA 발현의 변화가 더 현저해지는 것을 관찰할 수 있었다. 내독소와 초항원이 실험동물에서 상승적으로 폐혈ショ크를 유발하여 사망에 이르게 한다는 것은 이미 알려져 있다(3). 예를 들면 초항원인 TSST-1을 전처치한 토끼는 LPS에 의해 사망에 이르는 감수성이 50,000배 더 증가된다(21). 폐혈ショ크 환자에서 카테터 등을 통해 그람양성세균 감염이 그람음성세균 감염에 동반되는 경우가 흔히 일어날 수 있다(22). 이런 경우 그람음성세균의 LPS와 그람양성세균의 초항원 사이에 상승작용으로 치명적인 쇼크가 발생할 수 있으며, Bannan 등(23)은 이를 'two-hit' 가설이라 요약하고 폐혈증 발생의 기전으로 설명하였다. 이와 같은 현상이 나타나는 기전에는 초항원에 의해 활성화된 T 림프구에서 interferon- γ 의 생성 증가가 관련이 있는 것으로 추측하고 있다(24). 본 연구에서 SEB와 LPS를 동시에 처리하였을 때 말초혈액 단핵구에서 관찰되는 TLR4 mRNA 발현의 상승적 변화가 'two hit' 가설을 뒷받침할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 보인 SEB에 의한 TLR 발현의 변화는 반정량적 RT-PCR 법으로 관찰한 것으로 좀 더 정확한 변화를 보기위해서는 실시간 RT-PCR, northern blot, western blot 등 좀 더 정량적인 방법을 사용하는 것이 필요하겠다. 또한 말초혈액 단핵구에 섞여 있는 림프구나 대식세포주에서 분비되는 사이토카인의 영향을 완전히 배제하지 못했다는 것도 본 실험의 제한점이라고 생각한다. 향후 TLR들이 발현되지 않는 세포로 TLR을 핵산전달감염(transfection)하여 실험한다면 좀 더 객관적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

목 적 : 대표적인 세균 초항원인 포도알균 창자독소 B(SEB)에 의한 면역세포 활성에 Toll-like receptor (TLR)의 관련성을 알아보고, 지질다당질(LPS)에 의한 TLR의 발현양상과 비교하여 보았다.

재료 및 방법 : 세균 초항원인 SEB를 dye ligand affinity chromatography법으로 순수분리정제한 뒤 사람 말초혈액 단핵구와 사람 대식세포주인 THP-1을 자극하여 이들 세포에서 TLR1-9의 mRNA의 발현을 역전사중합효소반응법으로 확인하였고, 또한 LPS 자극에 의한 발현

양상과 비교하여 보았다.

결과: SEB로 사람 말초혈액 단핵구세포를 자극하였을 때 TLR1과 TLR5 mRNA 발현의 상승이 관찰되었고, TLR4 mRNA의 발현은 SEB 처리 후 1, 2시간째는 발현이 억제되다가 3시간 이후에 상승되는 양상을 보였다. 이런 TLR4 mRNA 발현의 변화는 말초혈액 단핵구를 LPS로 자극하였을 때도 유사하게 관찰되었고, SEB와 LPS를 동시에 자극하였을 때 더 현저한 변화를 보였다. 사람 대식세포주인 THP-1을 SEB 및 LPS로 자극하였을 때 TLR2 보다는 TLR4의 mRNA 발현에 현저한 변화를 관찰할 수 있었다.

결론: 이상의 결과로 SEB에 의한 사람 말초혈액 단핵구세포와 대식세포의 활성에 TLR의 연관성을 확인할 수 있었으며, 적어도 TLR4가 SEB에 대식세포 활성에 관여되었다. 또한 SEB와 LPS는 동시에 병용하여 단핵구세포를 자극하였을 때 상승적으로 TLR4 발현을 촉진할 것으로 추정된다. 향후 SEB 자극에 의한 대식세포 활성에 TLR의 관여 여부를 더 상세히 밝히는 것이 초항원에 의해 유발되는 질환들을 해결하는 중요한 열쇠가 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2002년 연세대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었습니다. 창자독소 분리를 도와주신 관동대학교 의과대학 신운섭 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Llewelyn M, Cohen J: *Superantigens: microbial agents that corrupt immunity*. *Lancet Infect Dis* 2:156-62, 2002
- 2) Bernal A, Proft T, Fraser JD, Posnett DN: *Superantigens in human disease*. *J Clin Immunol* 19: 149-57, 1999
- 3) Blank C, Luz A, Bendigs S, Erdmann A, Wagner H, Heeg K: *Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock*. *Eur J Immunol* 27:825-33, 1997
- 4) Du C, Sriram S: *Induction of Interleukin-12/p40 by superantigens in macrophages is mediated by activation of nuclear factor- κ B*. *Cell Immunol* 199: 50-7, 2000
- 5) Zilber MT, Gregory S, Mallone R, eaglio S, Malavasi F, Charron D, Gelin C: *CD38 expressed on human monocytes: A coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation*. *PNAS* 97: 2840-6, 2000
- 6) Takeuchi O, Akira S: *Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system*. *Int Immunopharmacol* 1:625-35, 2001
- 7) Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV: *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. *Cell* 52:269-79, 1988
- 8) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr. CA: *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature* 388:394-7, 1997
- 9) Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S: *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. *Science* 303:1522-6, 2004
- 10) Akira S, Takeda K: *Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol* 4:499-511, 2004
- 11) Underhill DM, Ozinsky A: *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection*. *Curr Opin Immunol* 14:103-10, 2002
- 12) Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: *Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. *J Immunol* 168:4531-7, 2002
- 13) Brehm RD, Tranter HS, Hambleton P, Melling J: *Large-scale purification of staphylococcal enterotoxins A, B, and C2 by dye ligand affinity chromatography*. *Appl Environ Microbiol* 56:1067-72, 1990
- 14) 박선미, 정민호, 이상화, 서수영, 송진미, 김화숙, 이성태, 임영진: *Dye-ligand affinity chromatography를 이용한 Staphylococcus aureus의 장독소 B 분리*. *Korean J Immunol* 18:559-69, 1996
- 15) Zaremba KA, Godowski PJ: *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. *J Immunol* 168:554-61, 2002
- 16) Calkins CM, Barsness K, Bensard DD, Vasquez-Torres A, Raeburn CD, Meng X, McIntyre RC Jr: *Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to gram-positive bacterial enterotoxin*. *J Surg Res* 15:104: 124-30, 2002
- 17) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*.

Science 282:2085-8, 1998

- 18) Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K: *Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression.* *J Immunol* 164:3476-9, 2000
- 19) Greisman SE, Young EJ, Woodward WE: *Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin.* *J Exp Med* 124:983-1000, 1966
- 20) Arad G, Levy R, Kaempfer R: *Superantigen concomitantly induces Th1 cytokine genes and the ability to shut off their expression on re-exposure to superantigen.* *Immunol Lett* 82:75-8, 2002
- 21) Cohen J: *The immunopathogenesis of sepsis.* *Nature* 420:885-91, 2002
- 22) Rangel-Frausto MS: *The epidemiology of bacterial sepsis.* *Infect Dis Clin North Am* 13:299-312, 1999
- 23) Bannan J, Visvanathan K, Zabriskie JB: *Structure and function of streptococcal and staphylococcal superantigens in septic shock.* *Infect Dis Clin North Am* 13:387-96, 1999
- 24) Dinges MM, Schlievert PM: *Role of T cells and gamma interferon during induction of hypersensitivity to lipopolysaccharide by toxic shock syndrome toxin 1 in mice.* *Infect Immun* 69:1256-64,

2001