

*Orientia tsutsugamushi*에 감염된 인간 피부 미세혈관 내피세포의 산화 활성화

고영상*

제주대학교 의과대학 미생물학교실

Scrub typhus의 원인병원체인 *Orientia tsutsugamushi*에 감염된 인간 피부 미세혈관 내피세포(HMEC-1)에서 superoxide dismutase 유전자의 발현이 증가하였다. *O. tsutsugamushi* 접촉 후 5 시간 이내에 감염된 세포에서 세포내 peroxide 존재를 유세포 분석을 통하여 관찰할 수 있었다. 또한 감염된 세포는 세포내 glutathione이 심하게 고갈됨을 관찰하였다. 이 결과들은 이 절대세포내 기생세균에 감염된 숙주세포가 산화-매개 손상 반응을 시사한다.

Key words □ HMEC-1, intracellular peroxide, *Orientia tsutsugamushi*, oxidative injury

*Orientia tsutsugamushi*는 절대세포내 기생세균으로서 한국에서 발생하는 주요 열성질환 중 하나인 scrub typhus(쯔쯔가무시병)의 원인 병원체이다(4). 이 세균은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 대식세포, 다형핵백혈구(PMN), 림프구 및 내피세포 등의 다양한 숙주세포에 감염한 후 탐식세포에서 세포질로 빠져나와 증식한다(11, 13). 쯔쯔가무시병은 열, 발진, 가피, 폐렴, 수막염 및 파종성 혈관내응고 등의 임상적 특징을 지니며 치료하지 않을 경우 다기관장애를 유발한다(2, 5). *O. tsutsugamushi* 감염 질환의 경우, 다른 리케차 질환에 비하여 혈관의 병리학적 변화는 심하지 않지만(2), 혈관내피세포가 *O. tsutsugamushi* 감염의 주된 표적세포로 보고되고 있다(9, 12, 16). *O. tsutsugamushi* 감염에 의하여 야기되는 혈관손상의 명확한 기전은 규명되지 않았으나, 감염의 병태생리학적 결과의 원인은 소혈관을 둘러싸고 있는 내피세포의 파괴 및 이에 수반되는 염증반응이라고 생각되고 있다(2, 10). 인간 내피세포 감염 시 미세구조의 변화를 관찰하면, 숙주세포의 세포내 소기관의 변화가 뚜렷하다. 리보솜이 부착된 endoplasmic reticulum 수의 감소, 골지체 활성 감소, 미토콘드리아의 팽창, 세포질 내 액포의 증가 등이 유발된다(11). 이러한 변화는 orientiae의 세포 내 증식에 의한 산화-매개 세포 손상에 기인할 가능성이 있으며(7, 15) 이는 아마도 산소라디칼의 축적에 의하여 세포 내막에 존재하는 지질의 과산화에 기인한다고 생각되어지고 있다(14). 그러나, 현재까지 *O. tsutsugamushi* 감염의 경우, 숙주세포의 항산화 체계와 자유라디칼 및 혈관 내피세포 손상 간의 상호관계에 대하여 규명되어 있지 못하다.

Superoxide dismutase (SOD)는 슈퍼옥사이드 라디칼을 과산화수소로 분해하는 효소이다. 이때 생성되는 과산화수소는 주로

catalase 및 glutathione peroxidase (GPx)에 의하여 처리되며 특히 이 과정에서 GPx는 환원된 glutathione을 이용하여 독성 과산화물을 무해한 산물로 변환시킨다. 정상적인 세포 대사에서는 이들 세 효소가 균형을 이루어 산화 손상에 대하여 세포를 보호한다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD)는 hexose monophosphate 경로에서 생성되는 NADPH를 이용하여 glutathione을 환원하는데 중요하다. 본고에서는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 유세포분석기를 이용하여 HMEC-1에 orientiae 감염 시 숙주세포 내 peroxide가 생성됨을 관찰하였으며, Mn 및 CuZnSOD 유전자 발현이 감염에 의하여 증가하였음을 관찰하였다. 또한 감염에 의하여 숙주세포 내 환원된 glutathione 수준이 현저히 감소함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

세포 및 리케차 배양

인간 피부 미세혈관 내피세포에서 유래한 HMEC-1(1)은 Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)에서 분양받았다. 이 세포주는, 15% fetal bovine serum (Life Technologies, Grand Island, USA), hydrocortisone (1 mg/ml; Sigma Chemical, St. Louis, USA), epidermal growth factor (10 ng/ml; Life Technologies), penicillin (100 U/ml; Life Technologies), streptomycin (100 µg/ml; Life Technologies)이 포함된 MCDB 131 배지(Life Technologies)에서 배양하였다. 내피세포는 직경 100 mm 배양용기(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)에서 배양하였다.

O. tsutsugamushi Karp (American Type Culture Collection, Manassas, USA) 균주는 L929 단층배양세포에 감염시켜 배양하였다(6). 세균의 감염력 정량은 Cho 등의 방법을 이용하였다(6).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 064-754-3851, Fax: 064-702-2687
E-mail: yskoh7@cheju.ac.kr

Total RNA를 수확하기 위하여 1.4×10^6 - 1.4×10^7 infected-cell counting unit (ICU)의 *O. tsutsugamushi*를 six-well plate에서 배양된 HMEC-1에 감염하였다. 감염 후 2 시간째에 간접면역형광법(4)을 이용하여 세포에 세균이 감염하였음을 확인하였다. 세포 당 2-5 개의 세균이 관찰되었다.

Total RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA는 SV total RNA isolation system (Promega, Madison, USA)을 이용하여 분리하였다. Total RNA 시료(1 - 2 μ g)를 주형으로 하여 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 1 mM dNTP mixture, 1 U RNasin per μ l, 0.5 μ g of oligo(dT)₁₅ primer, 10 U avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega)이 포함된 반응액을 42°C에서 15 분간 반응하여 first-strand cDNA 합성을 수행하였다. 합성된 cDNA (100 ng)를 주형으로 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 95°C에서 30 초간 변성, 55°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 확장하는 cycle을 수행하였다. PCR 산물을 전기영동하여 그 밴드 위치 및 intensity를 Gel Doc 2000 Gel Documentation System과 Quantity One Software (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 분석하였다. 특정 유전자 밴드와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자 밴드의 densitometric intensity를 비교·정량하여 분석하였다. PCR 증폭은 Table 1에 표기된 primer 쌍을 이용하여 선형구간에서 분석될 수 있는 횟수만큼 수행하였다.

세포 내 peroxide 정량

감염된 세포 및 대조 세포의 세포 내 peroxide 정량은 carboxylated form (C-400)의 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes, Eugene, USA)를 이용하여 Carter 등의 방법으로 수행하였다(3). Orientae 감염(1 ICU *Orientia*/HMEC-1) 후 일정한 시간대에 HMEC-1에 이 염색시약을 1 μ M 농도로 처리하여 37°C에서 15 분간 반응하였다. 세포를 트립신 처리하여 기저면에서 수확한 후 1% paraformaldehyde에 현탁하여 EPICS-XL FACScan flow cytometer (Coulter, Miami, USA)로 분석하였다. Excitation은 488-nm, emission은 530/30-nm로 고정하여 분석하였다.

Table 1. Primer sequences used in this study

Primer	Sequences ^a	PCR product size (bp)	No. of PCR cycles
MnSOD	5'-CAT CAA CGC GCA GAT CAT GCA GCT-3' 5'-CTG AAG GTA GTA AGC GTG CTC CCA-3'	454	25
CuZnSOD	5'-CGA GCA GAA GGA AAG TAA TGG ACC-3' 5'-CGA CTT CCA GCG TTT CCT GTC-3'	369	25
GPx	5'-AGT CGG TGT ATG CCT TCT CGG CGC-3' 5'-ACA TCG TTG CGA CAC ACC GGA GAC-3'	450	30
GAPDH	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3' 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	598	25

^aFor each primer pair, the sense primer is given above the antisense primer.

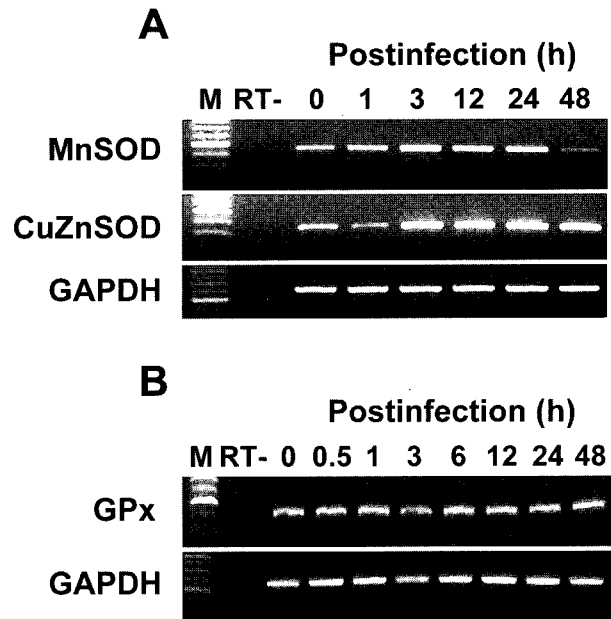


Fig. 1. Gene expression of antioxidant enzymes in HMEC-1 after infection with *O. tsutsugamushi* Karp strain. At various times after infection, total RNA was extracted and mRNA expression was determined by semiquantitative RT-PCR. M, 100-bp DNA ladder. RT-, absence of reverse transcriptase in the reaction.

세포 내 glutathione 정량

감염된 세포 및 대조 세포의 세포 내 glutathione 정량은 glutathione reductase와 2-vinylpyridine을 사용하여 Griffith의 방법으로 수행하였다(8). 세포 내 GSH 함량은 nanomoles per mg of protein 단위로 계산하였다.

결과 및 고찰

HMEC-1에 *O. tsutsugamushi*를 감염한 후 일정 시간대 별로 SOD와 GPx 유전자 mRNA 수준을 semiquantitative RT-PCR로 분석하였다(Fig. 1). 감염 후 1 시간 내에 감염된 세포에서 manganese-containing SOD (MnSOD)의 mRNA를 검출할 수 있었다. MnSOD 유전자의 mRNA는 세균 처리하지 않은 대조군보다 감염된 세포에서 증가하였으며 3 시간 때 최고 수준에 도달

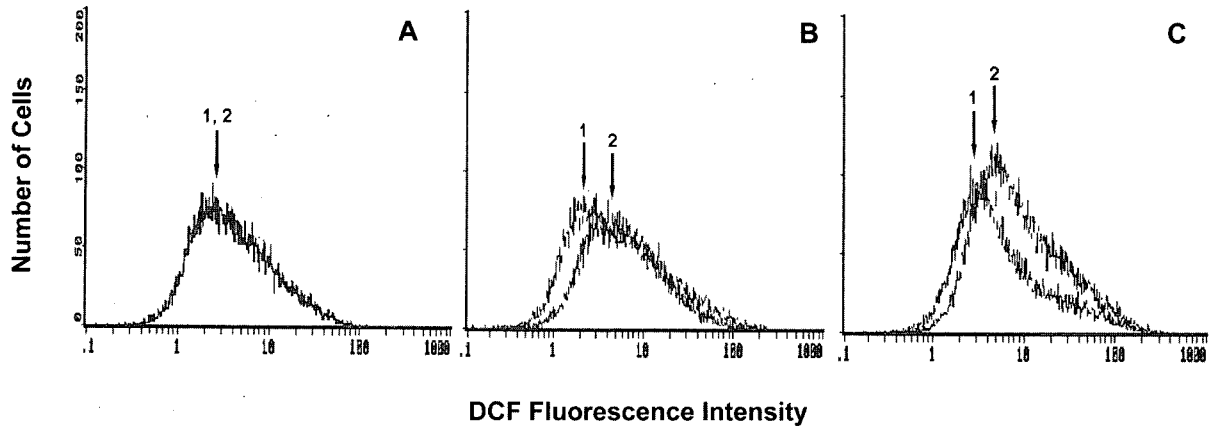


Fig. 2. Representative FACSscan fluorescence histograms constructed from HMEC-1 loaded with DCFH-DA and analyzed at 1 (A), 5 (B) and 24 hr (C) after infection with *O. tsutsugamushi*. Peak 1, endothelial cells stained with DCFH-DA; Peak 2, *O. tsutsugamushi*-infected endothelial cells stained with DCFH-DA. Each panel is a composite of separate runs, and the histogram represents the DCFH fluorescence of approximately 20,000 cells.

하여 12 - 24 시간에 감소하기 시작하였다. 감염 후 3 시간대에는 감염된 세포의 MnSOD mRNA 수준이 세균 처리하지 않은 세포에 비하여 63% 증가하였다. Copper- and zinc-containing SOD (CuZnSOD) mRNA도 감염 후 증가하여 48 시간 후에도 상승된 수준이 유지되었다. 이 시간대에 CuZnSOD mRNA는 대조군보다 57% 증가하였다. 그러나, GPx mRNA 수준은 항상적으로 발현되었으며 감염 후 48 시간 동안 변하지 않았다. 48 시간 감염 기간 동안에 감염된 세포와 대조 세포군의 생존능(cell viability)에는 차이가 없었다.

형광 탐침인 DCFH-DA를 이용한 유세포 분석을 통하여 세포 내 peroxide 수준을 측정하였다(Fig. 2). 세포집단의 형광 세기와 세포 내에 생성되는 hydrogen peroxide 또는 그 외의 hydroperoxide 수준 간에는 비례 관계가 성립한다. Figure 2는 감염 후 1, 5, 24 시간 후에 세균 처리 세포군과 처리하지 않은 대조 세포군에서 산화된 DCFH의 형광 정도를 비교한 대표적인 히스토그램이다. 세균 처리 후 1 시간 때에 대조 세포군과 세균 처리 세포군의 평균 형광도는 각각, 4.18과 4.21로서 peak가 거의 일치하였다. 이는 두 세포군에서 peroxide 수준의 차이가 없음을 의미한다(Fig. 2A). 감염 5 시간 후에는, 대조 세포군과 세균 처리 세포군 간에는 평균 형광도가 유의하게 차이가 있음을 관찰할 수 있었다(대조군, 4.41 vs 감염군, 6.86)(Fig. 2B). 두 세포군의 peak 들은 크기와 모양이 단일하였으며 이는 두 세포군이 형광 분포가 유사함을 의미한다. 감염 24 시간 후에도, 두 세포군 간의 평균 형광도는 유의하게 차이가 있었다(대조군, 5.62 vs 감염군 8.85).

O. tsutsugamushi 감염에 의하여 숙주세포가 산화적 손상을 입을 경우 세포 내 환원된 glutathione이 고갈될 가능성이 있다. *O. tsutsugamushi* 감염 72 시간 후에 HMEC-1은 세포 내 GSH 수준이 상당히 감소하였다(Fig. 3). 이러한 감소는 감염 96 시간 후까지 지속되었다. 감염 후 숙주세포 내 orientiae 수의 증가와 더불어 glutathione 수준의 감소가 일어났다. 감염 24 시간 후에 감

염 세포 당 2 - 4 개의 orientiae가 세포 내에 존재하였으며 96 시간 후에는 15 - 22 개의 orientiae가 존재하였다(결과 미제시). 감염군과 대조군 사이에 숙주세포의 단백질 함량 차이는 없었다(결과 미제시).

본고에서는, *O. tsutsugamushi*가 HMEC-1에 침입한 직후에 SOD 유전자 mRNA의 수준이 재빨리 증가함을 보였다. 전형적으로 세포 내 슈퍼옥사이드 증가에 대한 반응의 일환으로 세포의 SOD 수준이 증가된다. 또한 유세포 분석을 통하여 세균의 숙주세포 침입 후 초기 시간대에 생성되는 peroxide를 검출할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 감염량(1 ICU of *Orientia*/HMEC-1)으로는 감염 1 시간 후에는 세포 내 peroxide 수준의 차이는 없었으나, 5 시간 후에는 대조군과 감염군 간에 유의한 수준의 형광도 차이가 있었으며, 이는 세포 내 peroxide의 차이를 반영한다. 이 활성산소가 내피세포 손상에 기여하는 역할에 대하여는 명확히 규명되어 있지 못하나, 감염된 세포에 peroxide가 증가된 수준으로 존재하며 또한 감염된 세포에서 glutathione 양이 고갈

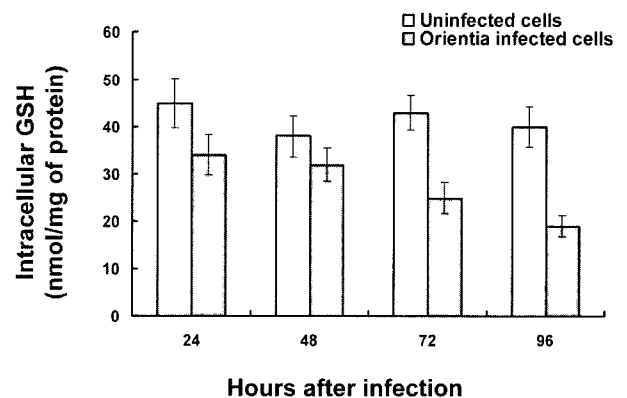


Fig. 3. Intracellular reduced glutathione levels in HMEC-1 infected with *O. tsutsugamushi*. The data represent the mean values \pm SD of at least three determinations per experimental variable.

되는 결과는 O. tsutsugamushi 감염 시 혈관내피세포가 산화-매개 손상을 받음을 시사한다.

참고문헌

- Ades, E.W., F.J. Candal, R.A. Swerlick, V.G. George, S. Summers, D.C. Bosse, and T.J. Lawley. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Investig. Dermatol.* 99, 683-690.
- Allen, A.C. and S. Spitz. 1945. A comparative study of the pathology of scrub typhus (tsutsugamushi disease) and other rickettsial disease. *Am. J. Pathol.* 21, 603-681.
- Carter, W.O., P.K. Narayanan, and J.P. Robinson. 1993. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukocyte Biol.* 55, 253-258.
- Chang, W.H., J.S. Kang, W.K. Lee, M.S. Choi, and J.H. Lee. 1990. Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 28, 685-688.
- Chi, W.C., J.J. Huang, J.M. Sung, R.R. Lan, W.C. Ko, and F.F. Chen. 1997. Scrub typhus associated with multiorgan failure: a case report. *Scand. J. Infect. Dis.* 29, 634-635.
- Cho, N.H., S.Y. Seong, M.S. Huh, T.H. Han, Y.S. Koh, M.S. Choi, and I.S. Kim. 2000. Expression of chemokine genes in murine macrophages infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect. Immun.* 68, 594-602.
- Freeman B.A. and J.D. Crapo. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47, 412-426.
- Griffith OW. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
- Kim, M.K., S.H. Kee, K.A. Cho, M.H. Chung, B.U. Lim, W.H. Chang, and J.S. Kang. 1999. Apoptosis of endothelial cell line ECV304 persistently infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Microbiol. Immunol.* 43, 751-757.
- Leving, D.H. 1946. Pathologic study of thirty-one cases of scrub typhus fever with special reference to the cardiovascular system. *Am. Heart J.* 31, 314-328.
- Ng, F.K., S.C. Oaks, Jr., M. Lee, M.G. Groves, and G.E. Lewis, Jr. 1985. A scanning and transmission electron microscopic examination of *Rickettsia tsutsugamushi*-infected human endothelial, MRC-5, and L-929 cells. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 38, 125-139.
- Pongponratn, E., Y. Maneerat, U. Chaisri, P. Wilairatana, B. Pongpoowong, P. Viriyavejakul, and M. Riganti. 1998. Electron-microscopic examination of *Rickettsia tsutsugamushi*-infected human liver. *Trop. Med. Int. Health* 3, 242-248.
- Rikihisa, Y. and S. Ito. 1979. Intracellular localization of *Rickettsia tsutsugamushi* in polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 150, 703-708.
- Silverman, D.J. and L.A. Santucci. 1988. Potential for free radical-induced lipid peroxidation as a cause of endothelial cell injury in Rocky Mountain spotted fever. *Infect. Immun.* 56, 3110-3115.
- Smuckler, E.A. 1976. Alterations produced in the endoplasmic reticulum by carbon tetrachloride. *Panminerva Med.* 18, 292-309.
- Yotsukura, M., N. Aoki, N. Fukuzumi, and K. Ishikawa. 1991. Review of a case of tsutsugamushi disease showing myocarditis and confirmation of Rickettsia by endomyocardial biopsy. *Jpn. Circ. J.* 55, 149-153.

(Received June 15, 2005/Accepted July 25, 2005)

ABSTRACT : Oxidant Activities in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Infected with *Orientia tsutsugamushi*

Young-Sang Koh (Department of Microbiology, College of Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea)

Transcripts levels of superoxide dismutases increase slightly following infection of human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) by the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi*, the causative agent of scrub typhus. In addition, fluorescence-activated cell sorter analysis demonstrates significant intracellular peroxide activity in infected cells within 5 hr after exposure to *O. tsutsugamushi*. Furthermore, infected cells experienced a significant depletion of glutathiones. These results support hypothesis that cells infected by this intracellular bacterium experience oxidant-mediated injury.