

마우스의 변화된 장내 미생물
군집이 *Vibrio cholerae* 감염에 대한
감수성에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

윤 유 진

마우스의 변화된 장내 미생물
군집이 *Vibrio cholerae* 감염에 대한
감수성에 미치는 영향

지도교수 윤 상 선

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

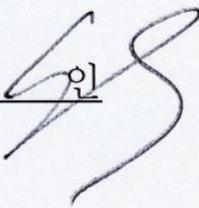
2014년 6월

연세대학교 대학원

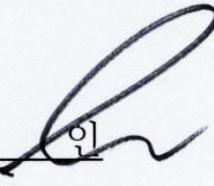
의과학과

윤 유 진

윤유진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 윤 상 선  인

심사위원 박 순 정  인

심사위원 유 지 환  인

연세대학교 대학원

2014년 6월

차 례

| | |
|--|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 9 |
| 1. 사용 균주 및 미생물 배양 | 9 |
| 2. 마우스 항생제 투여 및 감염 | 9 |
| 3. 시료 준비 및 DNA 추출 | 10 |
| 4. 장내 미생물 군집분석 | 11 |
| 5. 통계적 분석 방법 | 12 |
| III. 결과 | 14 |
| 1. 항생제 처리에 의한 장내미생물의 총 균 군집변화 | 14 |
| 2. 항생제 처리에 의한 장내미생물 두 문 (phylum)의 군집변화..... | 16 |
| 3. 항생제 처리에 의한 장내미생물의 대표적인 과 (family)의 군집변화 | 19 |
| 4. 항생제 처리에 의한 장내미생물 속 (Genus)의 군집변화 | 23 |
| 5. <i>V. cholerae</i> N16961 감염 후 소장의 장내미생물 총 균 군집분석 | 26 |
| 6. <i>V. cholerae</i> N16961 감염 후 소장의 장내미생물 두 문 (phylum)의 군집분석..... | 28 |
| 7. <i>V. cholerae</i> N16961 감염 후 소장의 장내미생물의 대표적인 | |

| | |
|--|----|
| 과 (family)의 군집분석 | 31 |
| 8. <i>V. cholerae</i> N16961 감염 후 소장내 장내미생물 속 (Genus)의 군집분석..... | 35 |
| 9. 항생제에 의한 장내미생물 군집 변화가 <i>V. cholerae</i> N16961의 정착에 끼치는 영향 | 38 |
| IV. 고찰 | 41 |
| V. 결론 | 46 |
| 참고문헌 | 48 |
| 영문요약 | 51 |

그림 차례

| | |
|--|----|
| 그림 1. The effect of the antibiotics on the total fecal bacteria..... | 15 |
| 그림 2. The effect of the antibiotic on the two dominant phylum of the fecal bacteria | 18 |
| 그림 3. The effect of the antibiotic on the various family of the fecal bacteria | 22 |
| 그림 4. The effect of the antibiotic on the several genus of the fecal bacteria | 25 |
| 그림 5. The effect of the N16961 infection on the total small intestinal microbiota | 27 |
| 그림 6. The effect of the N16961 infection on the phylum of small intestinal microbiota | 30 |
| 그림 7. The effect of the N16961 infection on the several Family of small intestinal microbiota | 34 |
| 그림 8. The effect of the N16961 infection on the several genus of small intestinal microbiota | 37 |
| 그림 9. The effect of the altered gut microbiota composition by antibiotics on the colonization of N16961..... | 40 |

표 차례

| | |
|--|----|
| 표 1. 16s rRNA-targeted primers and conditions for real-time PCR..... | 13 |
|--|----|

감사의 글

우선 석사 과정이라는 기간을 통해서 많은 것을 느끼고 배울 수 있게 은총 내려주신 주님께 감사 드립니다.

연구에 대한 호기심과 흥미로 실험실을 찾아온 지가 벌써 2년이 넘었습니다. 어디에 가서도 겪을 수 없었던 소중한 경험과 지식들을 얻게 해주시고 무사히 졸업 할 수 있도록 도움을 주신 많은 분들께 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

우선 지도교수님이신 윤상선 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 교수님께서서는 부족한 저를 받아주셨고 흥미로운 연구주제를 선정해주셨으며 좋은 환경에서 연구하고 공부 할 수 있게 많은 것을 베풀어주셨습니다. 교수님께 배운 모든 것들이 앞으로 제가 새로이 나아가고, 살아가는 데 큰 도움이 될 것 입니다.

그리고 바쁘신 중에도 귀중한 시간을 내주시어, 논문을 완성하는 데 중요한 조언과 충고를 해주시고, 복도에서

마주치면 밝은 미소로 인사해주셨던 심사위원 박순정 교수님과 유지환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 미생물학교실 박전한 교수님, 조상래 교수님, 최인홍 교수님, 김종선 교수님, 신전수 교수님, 이재면 교수님, 유제욱 교수님, 신성재 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

그 동안 많은 도움을 주시고 의지가 되었던 실험실 분들께도 깊은 감사를 전합니다. 우선 저와 함께 고생해주시고, 저를 이끌어주시며, 제가 정말 많이 의지했던 윤미영 박사님께 너무 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 박사님 덕분에 제가 장내 미생물이라는 흥미롭고 비전있는 주제로 졸업을 할 수 있었던 것 같습니다. 또 항상 모든 실험실식구에게 조언해 주시고 웃음과 격려를 주시는 이강무 박사님, 오영택 박사님께도 감사 드립니다. 처음 실험실에 왔을 때 어색해하던 저에게 많은 것을 알려주시고 격려와 위로를 아끼지 않고 해주신 박용진 선생님과 고준혁 선생님께도 감사 드립니다. 먼저 졸업한 바리와 잠깐이지

만 금방 친해질 수 있었던 윤지언니, 매번 흔쾌히 큰 도움 주셨던 정수진 선생님께도 감사합니다. 그리고 저에게 매번 조건 없이 큰 도움과 위로를 주셨던 이기훈 선생님께도 감사 드립니다. 절망에 빠졌을 때 위로를 주고, 함께 아파해주었던 혹은 즐거운 일이 있으면 같이 웃어주었던 혜진이와 혜린이, 정말 고맙습니다. 석사 과정 동안 많이 티격태격 거리고, 때로는 의지와 도움이 되었으며, 저에게 동기부여를 하게 해 준 유일한 동기 경배에게도 졸업을 축하하며 감사를 전합니다. 이미 졸업한 예쁘고 착한 혜미언니에게도 늘 걱정해주고 위로해주어서 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 사랑하는 나의 가족에게 감사의 마음을 전합니다. 지금까지 옳은 길로 나아갈 수 있도록 저를 믿고, 기도해주시고, 돌보아주신 어머니, 아버지께 진심 어린 감사와 사랑을 전하고 싶습니다. 또한 든든하고 똑똑하고 예쁘기까지 한 예진언니와 세진이에게도 감사와 사랑을

전합니다. 덧붙여 제 삶의 큰 기쁨인 과일삼종세트, 빠침
인 테라, 루멘 및 사랑하는 나의 친구들에게도 고마움과
사랑함을 전하고 싶습니다.

‘평생 삶의 결정적인 순간을 찍으려 발버둥 쳤으나 삶
의 모든 순간이 결정적 순간이었다.’ 라는 사진작가 앙
리 까르띠에 브레송의 말처럼 석사 과정 동안의 모든 순
간순간이 제 삶의 가장 결정적인 순간이었던 것 같습니다.
제 결정적 순간에 함께 해 주신 모든 분들께 다시 한 번
감사의 말씀을 전하며, 아직은 많이 부족한 제 자신 앞에
펼쳐질 또 다른 결정적 순간에서 이 곳에서 보고, 듣고,
배운 것을 마음껏 펼쳐 보이겠습니다. 다시 한 번 모든
분들께 진심으로 감사드립니다!

2014년 8월

윤유진 올림

국문요약

마우스의 변화된 장내 미생물 군집이 *Vibrio cholerae* 감염에 대한 감수성에 미치는 영향

*Vibrio cholerae*는 사람의 장에 감염 되면 발열, 설사, 구토, 탈수 등의 증상을 유발하는 그람음성 균이다. 그러나 *V. cholerae*가 정상 마우스에 감염되었을 때 사람과 같은 증상을 보이지 않고 그 이유가 불분명하므로 장내 감염 동물 모델을 설립하여 이 현상을 이해하고 감염 기전을 연구하는 데에 이바지 하기 위해 많은 연구들이 진행되고 있다.

이 논문에서 정상 마우스의 장내 미생물 군집을 서로 다른 살균 혹은 정균 기전을 지닌 항생제를 처리하여 변화시킨 뒤 *V. cholerae*의 장내 감염에 대한 마우스의 민감도가 어떻게 변화하는지에 대하여 연구하고자 하였다. 장내 미생물 군집에 변화를 주기 위하여 광범위하게 균을 살균할 수 있는 항생제와 좁은 범위로 살균할 수 있는 항생제 혹은 정균제를 4주령 female Balb/c 마우스

에 일주일간 경구 투여하였다. 항생제에 의한 장내 미생물 군집 변화를 분석하기 위하여 마우스의 분변에서 DNA를 추출하여 quantitative real time PCR (qRT-PCR)로 군집분석을 실행하였다. 그 결과 *Enterobacteriaceae* 과와 *Enterococcus* 속이 대조군 보다 항생제 처리군에서 유의적으로 더 많다는 것을 확인하였다.

장내 미생물 군집의 변화를 준 뒤에 *V. cholerae*의 한 균주인 N16961을 마우스에 감염시켜주고 24시간 뒤에 희생하였다. 소장에 남아있는 *V. cholerae*의 양과 장내 미생물 군집을 분석하기 위하여 살아있는 N16961의 수를 측정을 하였고 DNA를 추출하여 qRT-PCR로 군집 분석을 실행하였다. 그 결과 *Enterobacteriaceae*와 *Enterococcus* 속이 현저하게 많았던 Vancomycin 처리군에서 *V. cholerae* N16961이 가장 많이 남아있었던 것을 확인하였고 감염 후에도 *Enterobacteriaceae*와 *Entrococcus* 속이 여전히 많은 것을 확인하였다. 이를 통하여 장내 미생물과 *V. cholerae* 의 감염이 밀접한 관련이 있음을 확인하였고 잘 알려지지 않은 *V. cholerae* 의 감염에 대한 장내 미생물의 역할을 명확하게 이해하기 위하여 본 연구를 진행하였다.

핵심 되는 말: 장내 미생물 (Gut microbiota), *Vibrio cholerae* N16961 , Quantitative real time PCR (qRT-PCR), 항생제

마우스의 변화된 장내 미생물 군집이 *Vibrio cholerae*
감염에 대한 감수성에 미치는 영향

<지도교수 윤 상 선>

연세대학교 대학원 의과학과

윤 유 진

I. 서론

장내 미생물은 십이지장에서 직장까지 분포되어 있는 미생물을 총칭하며 세균 (bacteria) 과 고세균 (archaea), 진균 (fungi), 바이러스 (viruses) 등으로 구성되어 있다¹. 건강한 사람의 경우 개인간 차이를 보이는 하지만 약 1,000여 종 이상으로 구성되어있으며 균 수는 약 1×10^{11} 에서 10^{14} CFU/g정도 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 이는 사람을 구성하고 있는 체세포의 수보다는 10배 정도 많고 유전 정보량으로는 약 100배 이상에 달하는 규모이다². 이러한 장내 미생물은 장에서 공생하면서 영양분 흡수, 면역 체계의 발달 등 여러 역할을 하는

것으로 알려져 있다. 첫째로 장내 미생물은 사람이 스스로 분해할 수 없는 탄수화물을 분해하여 사람이 흡수할 수 있는 형태로 만들어준다³. 또한 장의 면역체계의 형성 및 발달에 영향을 주며 면역에 대한 항상성을 조절하는 것으로 알려져 있는데 장내 미생물이 결핍된 무균 (germ free) 마우스는 장내 미생물이 정상적으로 존재하는 마우스에 비해 면역력이 감소되어 있다는 보고를 통해 면역력과 장내 미생물이 밀접한 관계가 있다는 것이 입증되었다^{4,5}. 이 밖에 장내 미생물이 비만에 미치는 영향에 대해서도 연구가 진행 되었다. Ley RE, Bäckhed F, 등의 보고에 의하면(2005), 비만 마우스의 장내 미생물 군집을 정상 마우스에 이식 (transplantation) 시켰을 때 정상 마우스에서도 비만이 유도되었으며 이 결과는 장내 미생물에 의한 숙주의 에너지 대사와 관련이 있음을 시사한다⁶. 마지막으로 장내 미생물은 외부에서 침입한 병원균과 부착 및 성장 영역과 영양분 등을 두고 경쟁하고 직접적으로는 항생물질을 분비하여 병원균이 장내에 감염되는 것을 막아 병원균으로부터 숙주를 보호하는 역할을 한다는 결과가 보고된 바 있다^{7,8}. 특정 미생물 부재 마우스 Specific pathogen free (SPF) 마우스와 무균 마우스의 장에 침투하여 장내질환을 유발하는 *Citrobacter rodentium*을 감염시켜 관찰한 결과 SPF 마우스에서는 21일 후에 *C. rodentium*이 완전히 제거되었으나 무균 마우스에서는 실험 종료일인 42일까지도 균 수의 감소가 확인되지 않았다. 반면에 대표적 면역물질인 호중구와 대식세포, CD3+ T 세포 등의 면역 반응뿐 만

아니라 항균 펩타이드들의 발현도 유의적인 차이를 나타내지 않아 무균 마우스에서 *C. rodentium* 균이 제거된 것은 면역체계에 의존한 결과가 아니고 장내 미생물의 영향일 수 있다는 것을 입증하였다⁹.

본 연구는 이러한 다양한 장내 미생물의 역할 중에서 병원균과의 상호작용에 초점을 두어 장내 미생물과 세균성 장 질환간의 관련성을 동물 모델을 이용하여 규명하고자 하였다. 세균성 장 질환은 다양한 균에 의해 발병하는데 장내 감염균이 사람에게 감염되면 초기에는 발열, 구토, 설사 등의 급성 징후를 동반한다. 그람 음성 병원균인 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)는 장에 침투하여 숙주를 공격하는 것으로 알려진 대표적인 병원성 미생물이다¹⁰. 이 균의 병인 기전을 효과적으로 연구하기 위해 다양한 동물 모델이 제시되고 있으며 특히 무균마우스가 유용한 것으로 알려져 있다¹¹. 또한 높은 농도의 항생제를 처리하여 장내 미생물을 제거한 뒤 그들과의 경쟁에서 EHEC이 군락을 이루는 것을 유리하게 하여 EHEC의 감염을 효과적으로 유도한 마우스모델도 보고되었다¹². 이러한 무균마우스 모델, 항생제 처리 마우스 모델은 신생 마우스 모델과 함께 조건부 혐기성 그람 음성 병원균인 *V. cholerae* 감염 모델로도 많이 사용되고 있다^{13,14}.

다양한 세균성 장 질환 중에서도, 본 실험에서는 *V. cholerae* 감염과 항생제 투여가 마우스 모델의 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 여러 연구들을 통해 *V. cholerae*의 감염이 정상 쥐의 장내 미생물에 의해 조절된다고 가정할 수 있었기 때문이다.

현재까지 *V. cholerae* 감염과 장내 미생물의 군집 변화에 대한 연구는 다음과 같다. *V. cholerae*에 감염된 사람의 장내 미생물의 군집을 metagenomics를 통해 감염 직후부터 회복기까지 분석한 결과 *V. cholerae*에 감염된 직후에 특정 장내 미생물 종의 수가 증가했다가 회복기에 들어서 다시 줄어들었다는 연구가 보고된 바 있다¹⁵. 또 사람이 *V. cholerae*에 감염되었을 때 설사나 구토, 탈수 증세를 보이는 데에 비해 정상 마우스에 감염되면 마우스에서는 별다른 증상을 보이지 않고 장에서 빠른 시간 내에 균이 사라진다. 하지만 장내 미생물이 미비한 항생제 처리 마우스 모델, ileal loop 모델 혹은 신생 마우스의 경우에는 정착이 성공적으로 이루어지고 그에 따른 증상으로 탈수와 설사 등과 같이 사람과 비슷한 병증을 보인다^{11-14,16}.

그리고 항생제의 과다투여 또는 지속적인 투여 또한 장내 미생물의 군집 변화에 영향을 미치는 요소이다. *Clostridium difficile*에 의한 pseudomembranous colitis는 항생제에 의한 장내 미생물의 감소로 인해 *Clostridium difficile*이 과다 증식하여 일어나는 장 질환으로 이해되고 있다¹⁷. 이를 통해 항생제의 투여나 특정 병원체의 감염 등이 장내 미생물 군집에 변화를 주는 것을 알 수 있다.

이렇듯 다양한 연구 결과들이 장내 병원균의 감염에 있어서 장내 미생물의 역할의 중요성을 보여주고 있지만 장내 미생물과 숙주, 숙주와 병원균, 외부 병원균과 장내 미생물간의 상호작용뿐만 아니라 장내 미생물 군집의 다양성과 복잡성 때문에 장내 환경에서 이루어지는

총체적인 방어 기전을 이해하는 것은 매우 어렵다. 이러한 이유로 *V. cholerae* 감염에 관여하는 특정 장내 미생물의 존재 및 역할을 규명하는 것은 향후 *V. cholerae* 의 병원 기전 연구를 위한 마우스 모델을 제시할 수 있게 한다. 그뿐만 아니라 특정 미생물의 과다 증식과 그에 따른 감염의 관련성을 입증하여 질병 예측 모델을 만들 수 있다는 점에서도 중요하다. 따라서 본 연구의 목적은 장내 미생물과 *V. cholerae* 의 상호작용을 이해하는데 있으며 특히 *V. cholerae* 의 장내 정착 및 증식에 도움을 주는 특정 미생물의 존재를 검증하고자 한다.

본 연구를 위하여 사용한 마우스 모델은 *V. cholerae* 의 정착을 유도하기 위해 항생제를 경구투여 한 모델이다. 정상적인 장내 미생물 군집을 갖는 마우스의 경우 *V. cholerae* 가 정착 및 증식하지 않으므로 장내 미생물 군집 변화 차이의 다양성을 유도하기 위해 다양한 작용기전 및 스펙트럼을 가진 항생제 (Aminoglycoside 계열의 streptomycin, β -lactam 계열의 ampicillin, Glycopeptides 계열의 vancomycin, Lincosamides 계열의 clindamycin)를 선별하였으며 장내 미생물을 완전하게 제거하지 않고 군집 변화에 영향을 줄 수 있는 농도를 설정하여 마우스에 투여하고 미생물 군집 분석을 하였다. 이후 *V. cholerae* 를 감염시켜 정상 마우스와 항생제 처리 마우스의 *V. cholerae* 감염 및 발병에 대한 반응의 차이를 확인하고자 하였다.

항생제 처리 후 각 항생제 별로 장내 미생물의 군집이 다른 양상으로 변화하는 것을 확인하였고 그 중에서 대조군과 비교하였을 때 특정 과

(family) 혹은 속 (genus)이 유의적으로 큰 차이를 보이며 늘어난 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 특정 균이 늘어났을 때 마우스에 *V. cholerae* N16961 을 감염시켜 주었고 그 결과 특정 균이 늘어난 항생제 처리군의 소장에서 *V. cholerae* 가 대조군과 비교하였을 때 더 오랫동안 정착하고 있음을 확인하였다. 이를 통하여 *V. cholerae* 의 감염에 특정 장내 미생물이 관여하고 있는 것을 확인하였고 향후 실험을 통하여 특정 미생물의 증가가 어떠한 기전으로 *V. cholerae* 의 정착에 관여하였는지 연구할 필요가 있음을 시사하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 미생물 배양

마우스의 장에 감염 시킬 균주로 *V. cholerae* N16961을 사용하였다. *V. cholerae* N16961를 streptomycin이 첨가된 Luria Bertani broth (LB: 1.0 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1.0 % sodium chloride)에 1% 접종 한 후 37 °C shaking 배양기에서 overnight 배양하였다. N16961 배양에 사용 된 streptomycin은 200 µg/ml의 농도로 첨가하였다. Tryptone, yeast extract는 Difco (Franklin Lake, NJ USA) 제품을, sodium choride는 덕산제품을 사용하였고, 항생제는 Duchefa Biochemie (Haarlem, The Netherlands) 제품을 사용하였다.

2. 마우스 항생제 투여 및 감염

장내 미생물 균집 분석과 *V. cholerae* N16961 감염 실험을 위하여 pathogen-free 4 주령 female Bab1/c 마우스에 항생제를 다음과 같은 농도로 일주일간 경구투여 하였다: streptomycin (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), 1 mg/day; vancomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 250 µg/day; clindamycin (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), 1 mg/day; ampicillin (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), 2.5 mg/day. 대조군 마우스에는 멸균처리 된 3차 증류수를 경구투여 하였다. 마우스는 각 균 별로 5마리씩 실험에

사용하였다. 항생제 처리 후 7일째 되는 날 마우스의 분변을 수집하였다. 수집한 분변은 -80°C 에 보관하였다가 마우스 장내 미생물 군집 분석을 위한 genomic DNA (gDNA)를 추출할 때 사용하였다. *V. cholerae* N16961 감염과 마지막 항생제 처리 사이에 24시간을 두어 마우스의 장에서 항생제가 제거되도록 하였다. 감염하기 전에 4시간 동안 절식시키고 8.5 % sodium bicarbonate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 $50\ \mu\text{l}$ 씩 경구투여 하였다. *V. cholerae* N16961의 600 nm 흡광도를 1.0이 되도록 맞춘 뒤 13,000 rpm에서 1분간 원심분리시켜 pellet을 얻었다. 이 pellet을 PBS (*Phosphate buffered saline*)로 두 번 washing하고 10배 농축시켜 $50\ \mu\text{l}$ 씩 intragastric tube를 이용하여 마우스에 감염시켰다. 감염된 균 수를 확인하고자 streptomycin이 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가된 LB plate에 viable cell counting을 실행하였다. 감염시킨 뒤부터 절식시키고 24시간 후에 마우스를 희생하였다.

3. 시료 준비 및 DNA 추출

각 군 별 마우스의 분변을 각각의 $50\ \text{ml}$ conical tube에 수집하여 PBS와 함께 homogenizer (WiseTis)로 분쇄하였다. 분쇄한 뒤 4°C 에서 1,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 분변 찌꺼기와 상층액을 분리하였다. 상층액을 $1\ \text{ml}$ 취하여 4°C 에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 그 pellet을 gDNA를 추출하는 데 사용하였다. gDNA의 추출은

QIAmp DNA stool Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 를 제조사의 지침에 따라 진행하였다.

마우스를 희생한 뒤 소장을 적출하여 50 ml conical tube에 넣고 PBS 3 ml 와 함께 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄과정 중 tube는 얼음에 넣어 저온 상태를 유지하며 분쇄속도는 50 rpm 으로 하였다. 분쇄된 소장이 들어있는 tube 를 얼음에 넣어 저온상태를 유지해주며 소장찌꺼기를 가라 앉히고 상층 액 100 μ l 를 streptomycin이 첨가 된 LB plate 에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 정체 배양기에 overnight 배양하였다. 상층액 중 1 ml 은 gDNA를 추출 하는 데 사용하고 나머지 상층액은 glycerol stock을 만들어 -80 $^{\circ}$ C에 보관 하였다. 상층액 1 ml 을 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 rpm 으로 5분간 원심 분리하여 그 pellet을 gDNA를 추출하는 데 사용하였다. gDNA의 추출은 QIAmp DNA stool Mini kit (Qiagen) 를 제조사의 지침에 따라 진행하였다.

4. 장내 미생물 균집 분석

장내 미생물 균집 분석을 위해 분변과 소장으로부터 추출한 gDNA로 quantitative real time PCR (qRT-PCR)을 실행하였다. 실험에서 사용한 프라이머 세트는 표 1에 나타내었다. qRT-PCR은 0.1mL 96-well plate (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 에 final volume 20 μ l 로, 한 well 당 다음과 같은 구성으로 진행하였다: SYBR green premix Ex Taq (Takara) 10 μ l , 3차 증류수 5.6 μ l , 10 pmol forward primer 0.5

$\mu\ell$, 10 pmol reverse primer 0.5 $\mu\ell$, Rox dye 0.4 $\mu\ell$, 10배 희석된 template DNA 3 $\mu\ell$. PCR 반응은 95 °C 에서 10분 그리고 95 °C에서 15초 후 annealing 온도 및 시간을 프라이머 조건으로 각각 조정하여 40 cycles 동안 반복하고 melting curve stage 로 95 °C에서 15초 후 60 °C에서 1분간 반응 후 95 °C 15초로 진행하였다. qRT-PCR 반응에 Step one plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 을 사용하였다.

5. 통계적 분석 방법

마우스의 분변에서 장내 미생물 군집을 분석한 실험 결과는 세 번의 실험에서 얻은 표준편차를 오차막대로 만들어 나타내었다. 마우스 소장에서의 장내 미생물 군집 분석은 마우스 5마리 (n=5)의 개체간의 차이를 오차막대로 만들어 나타내었다. 얻어진 실험 결과는 Student-t-test로 분석하였고, $P < 0.05$ 일 때 통계적 의미가 있는 것으로 판단하였다. 통계적 분석은 graph pad prism5를 사용하여 진행하였다.

☒ 1. 16s rRNA-targeted primers and conditions for real-time PCR

| Primer | Sequence (5'-3') | target | Annealing T _m (°C) | Reference |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| Uni_16s_F | GTG STG CAY GGY TGT CGT CA | total bacteria | 60 | 18 |
| Uni_16s_R | ACG TCR TCC MCA CCT TCC TC | | | |
| Fir_F | GTC AGC TCG TGT CGT GA | Firmicutes | 54.8 | 19 |
| Fir_R | CCA TTG TAK YAC GTG TGT | | | |
| Bact_F | GGA RCA TGT GGT TTA ATT CGA TGA T | Bacteroidetes | 51.6 | 20 |
| Bact_R | AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG | | | |
| Entbac_F | GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA | <i>Enterobacteriaceae</i> | 60 | 21 |
| Entbac_R | ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT | | | |
| RumiF | ACT GAG AGG TTG AAC GGC CA | <i>Ruminococcaceae</i> | 59 | 22 |
| RumiR | CCT TTA CAC CCA GTA AWT CCG GA | | | |
| Prevotellaceae_F | CCA GCC AAG TAG CGT GCA | <i>Prevotellaceae</i> | 56 | 23 |
| Prevotellaceae_R | TGG ACC TTC CGT ATT ACC | | | |
| Ccocc1F | CGGTACCTGACTAAGAAGC | <i>Lachnospiraceae</i> | 55 | 24 |
| Ccocc1R | AGTTYATTCTTGCGAACG | | | |
| Entco_F | CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT | <i>Enterococcus</i> spp. | 60 | 24 |
| Entco_R | ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT | | | |
| Lacto_F | AGC AGT AGG GAA TCT TCC A | <i>Lactobacillus</i> spp. | 55.2 | 24 |
| Lacto_R | CAC CGC TAC ACA TGG AG | | | |
| Bifido_F | TCGCGTCYGGTGTGAAAG | <i>Bifidobacterium</i> spp. | 55 | 24 |
| Bifido_R | CCACATCCAGCRTCCAC | | | |
| VC_16s_F | CTG GAA CTG AGA CAC GGT CC | <i>Vibrio cholerae</i> | 61 | This study |
| VC_16s_R | CAT GCG CTT TAC GCC CAG TA | | | |

III. 결과

1. 항생제 처리에 의한 장내 미생물의 총 균 군집의 변화

여러 계열의 항생제를 4주된 female Balb/c 마우스에 일주일간 경구투여 한 뒤 마우스의 분변에서 장내 미생물의 군집분석을 실행하였다. 항생제를 경구투여 한 마우스의 총 장내 미생물 군집에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 16s rRNA의 conserved region을 증폭하는 프라이머로 qRT-PCR을 실행하였다 (그림 1). Ct 값이 대조군의 경우 16.36, SM 처리군의 경우 13.13, VAN 처리군의 경우 13.02, CL 처리군의 경우 14.12, AMP 처리군의 경우 14.29로 대조군과 비교하였을 때 항생제 처리군에서 Ct 값이 낮게 나왔다. 대조군과 각각 항생제 처리군의 P-value 값은 SM 처리군에서 $P=0.0002$, VAN 처리군에서 $P=0.0002$, CL 처리군에서 $P=0.0003$, AMP 처리군에서 $P=0.0012$ 로 모든 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 대조군과 비교하였을 때 SM, VAN, CL, AMP 처리군의 Ct 값에 유의적인 차이가 있음을 알 수 있었다. 이는 항생제 처리시에 장내 미생물의 총 균 수가 유의적으로 많은 것을 의미한다. 이 결과를 통해 특정 장내 미생물이 항생제처리에 의해서 늘어났음을 확인하였다.

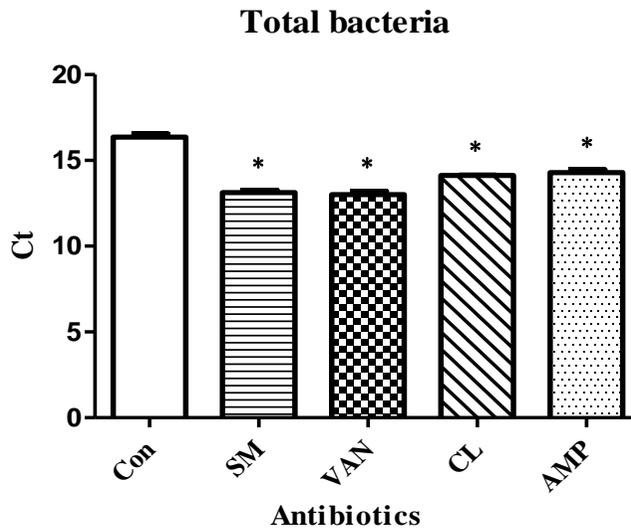


그림 1. The effect of the antibiotics on the total fecal bacteria

Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed with primers that amplify the conserved region of 16s rRNA genes. Annealing temperature was (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin).

2. 항생제 처리에 의한 장내 미생물 두 문 (phylum)의 군집 변화

장내 미생물은 Firmicutes 문과 Bacteroidetes 문이 대부분을 차지한다고 알려져 있다³. 실제로 이 두 문의 군집 차이에 의해 장내 미생물이 생산하는 대사산물의 종류와 양이 달라지고 이로 인해 비만이 유도된다는 연구가 존재한다⁶. 그렇기 때문에 이 두 문의 군집분석이 중요하다고 생각되어 두 문의 군집분석을 실행하였다 (그림 2).

Firmicutes 문의 경우 (그림 2A) Ct 값이 대조군의 경우 15.56, SM의 경우 12.32, VAN의 경우 12.88, CL의 경우 14.03, AMP의 경우 14.84로 모든 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군 보다 낮게 나왔다. P-value 값은 SM 처리군에서 $P=0.0004$, VAN 처리군에서 $P=0.0011$, CL 처리군에서 $P=0.0037$, AMP 처리군에서 $P=0.0442$ 로 모든 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 항생제 처리군과 대조군의 Ct 값에 유의적인 차이가 있음을 확인하였다. 이를 통해 대조군과 비교하였을 때 SM, VAN, CL, AMP 처리군에서 Firmicutes 문이 더 많이 존재한다는 것을 확인하였다.

Bacteroidetes 문의 경우 (그림 2B) Ct 값이 대조군의 경우 15.45, SM 처리군의 경우 12.13, VAN 처리군의 경우 12.22, CL 처리군의 경우 13.24, AMP 처리군의 경우 13.32로 모든 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군 보다 낮게 나왔다. P-value 값은 SM 처리군에서 $P=0.0003$, VAN 처리군에서 $P=0.0004$, CL 처리군에서 $P=0.0007$, AMP 처리군에서 $P=0.0007$ 로 모든 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 항생제 처리군과 대조군의 Ct 값에 유의적인 차이가 있음을 확인하였다. 이를 통해

대조군과 비교하였을 때 항생제 처리군에서 Bacteroidetes 문이 많이 존재한다는 것을 확인하였다.

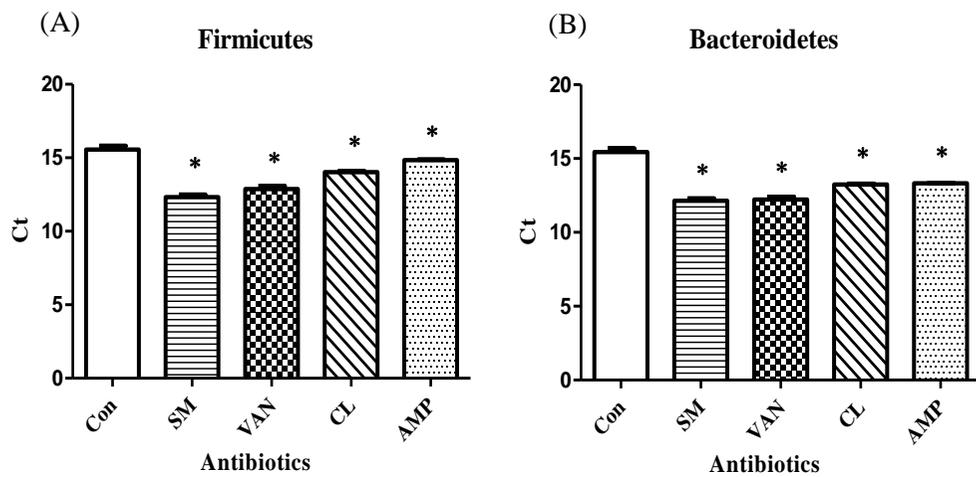


그림 2. The effect of the antibiotic on the two dominant phylum of the fecal bacteria

qRT-PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each phylum, (A) Firmicutes and (B) Bacteroidetes. (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin).

3. 항생제 처리에 의한 장내 미생물의 대표적인 과 (family)의 군집변화

앞서 진행 한 실험에서 Firmicutes 문과 Bacteroidetes 문의 결과가 대조군과 큰 차이가 없었기 때문에 문보다 더 세부적이고 특이적인 과를 증폭할 수 있는 프라이머로 qRT-PCR을 사용하여 군집분석을 실행하였다. 장내 미생물 군집에 속하는 과가 다수 존재하므로 모든 과를 실험해보지 못하고 잘 알려진 *Enterobacteriaceae* 과, *Prevotellaceae* 과, *Lachnospiraceae* 과, *Ruminococcaceae* 과 이 네 가지를 대상으로 장내 미생물 군집 분석을 qRT-PCR을 통해 실시하였다 (그림 3). Proteobacteria 문에 속해 있는 *Enterobacteriaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 24.35, SM 처리군의 경우 20.93, VAN 처리군의 경우 10.41, CL 처리군의 경우 11.20, AMP 처리군의 경우 15.74로 모든 항생제 처리군이 대조군과 비교하였을 때 Ct 값이 낮았다 (그림 3A). P-value는 모든 항생제 처리군에서 $P < 0.0001$ 였으므로 항생제 처리군과 대조군과의 Ct 값에 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 각각의 항생제를 경구 투여한 마우스의 분변에서 *Enterobacteriaceae* 과가 대조군에서 보다 유의적으로 많이 존재한다는 것을 확인하였다.

Bacteroidetes 문에 속하는 *Prevotellaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 28.56, SM 처리군의 경우 19.04, VAN 처리군의 경우 26.24, CL 처리군의 경우 35.08, AMP 처리군의 경우 35.31로 SM, VAN 처리군은 대조군과 비교하였을 때 Ct 값이 낮은 반면 CL, AMP 처리군은 Ct 값이

높았다 (그림 3B). P-value는 SM 처리군에서 $P < 0.0001$, VAN 처리군에서 $P = 0.0052$, CL 처리군에서 $P = 0.0019$, AMP 처리군에서 $P < 0.0001$ 로 모든 항생제 처리군에서 $P < 0.05$ 였으므로 항생제 처리군과 대조군과의 Ct 값에 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 SM, VAN 처리군에 대조군보다 더 많은 *Prevotellaceae* 과가 존재하는 반면에 CL, AMP 처리군에서는 대조군에 비하여 더 적은 *Prevotellaceae* 과가 존재함을 확인하였다.

Firmicutes 문에 속하는 *Lachnospiraceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 14.78, SM 처리군의 경우 12.84, VAN 처리군의 경우 13.85, CL 처리군의 경우 20.36, AMP 처리군의 경우 29.54로 SM, VAN 처리군의 Ct 값은 대조군보다 낮은 반면 CL, AMP 처리군의 Ct 값은 대조군보다 높았다 (그림 3C). P-value는 SM 처리군에서 $P = 0.1638$, VAN 처리군에서 $P = 0.3027$, CL 처리군에서 $P = 0.0002$, AMP 처리군에서 $P = 0.0007$ 로 SM, VAN 처리군에서는 $P > 0.05$ 이고 CL, AMP 처리군에서 $P < 0.05$ 였으므로 SM, VAN 처리군과 대조군의 Ct 값 차이에는 유의성이 없는 반면에 CL, AMP 처리군과 대조군의 Ct 값 차이는 유의적인 것으로 확인하였다. 이를 통해 CL, AMP 처리군에 대조군보다 더 많은 *Lachnospiraceae* 과가 존재하는 것을 확인하였다.

Ruminococcaceae 과 역시 Firmicutes 문에 속하며 잘 알려진 과 중 하나이다. *Ruminococcaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 16.83, SM 처리군의 경우 15.63, VAN 처리군의 경우 16.49, CL 처리군의 경우

16.87, AMP 처리군의 경우 19.01로 SM 처리군을 제외한 나머지 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군보다 높았다 (그림 3D). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0274$, VAN 처리군에서 $P=0.6025$, CL 처리군에서 $P=0.9167$, AMP 처리군에서 $P=0.0013$ 로 VAN, CL 처리군에서 $P>0.05$ 이고 SM, AMP 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 VAN, CL 처리군과 대조군의 Ct 값 차이에는 유의성이 없는 반면에 SM, AMP 처리군과 대조군의 Ct 값 차이는 유의적인 것으로 확인하였다. 이를 통해 SM, AMP 처리군에 대조군보다 더 많은 *Ruminococcaceae* 과가 존재하는 것을 확인하였다.

이 실험으로 각각의 항생제가 장내 미생물에 다른 영향을 끼치고 그에 따른 군집 변화가 항생제 별로 달라지고 있음을 알 수 있었다. 또한 항생제 처리시 *Enterobacteriaceae* 과가 급격하게 증가하는 양상을 확인할 수 있었다.

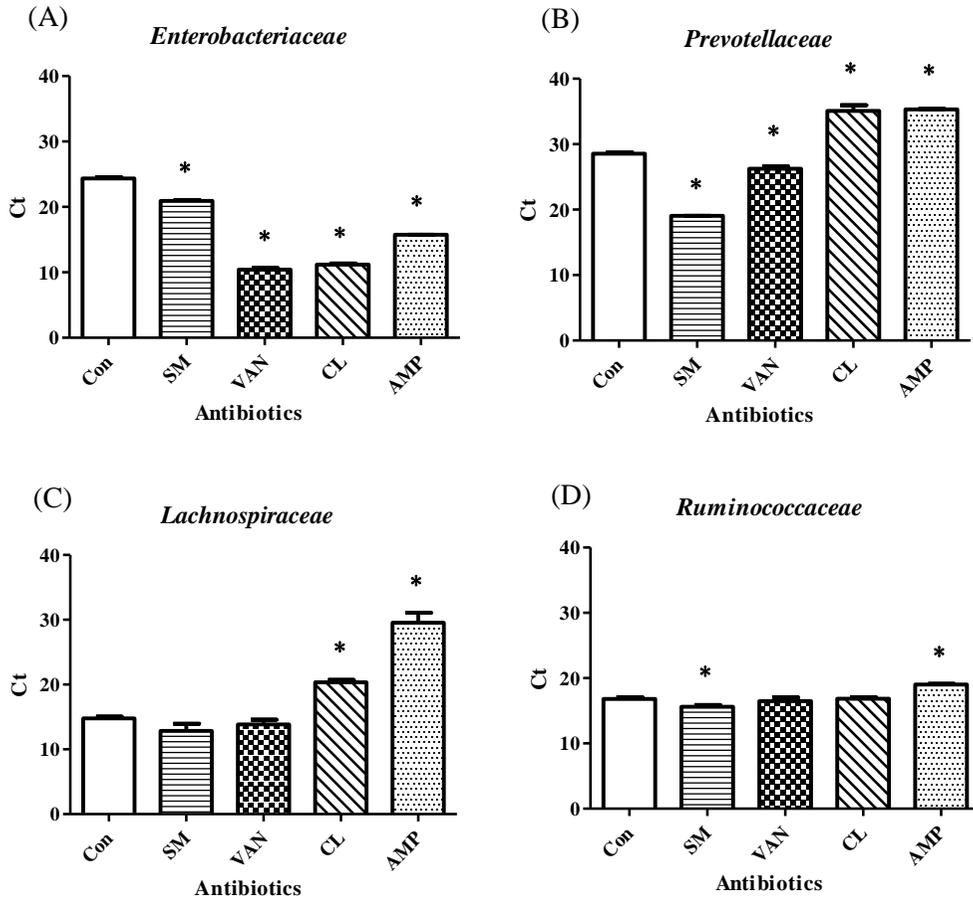


그림 3. The effect of the antibiotic on the various family of the fecal bacteria

qRT-PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each family, (A) *Enterobacteriaceae*, (B) *Prevotellaceae*, (C) *Lachnospiraceae*, (D) *Ruminococcaceae*. (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin).

4. 항생제 처리에 의한 장내 미생물 속 (Genus)의 군집변화

항생제 처리 후 장내 미생물 군집에 어떠한 변화가 있었는지 더 세부적으로 분석하기 위하여 장내 미생물 속 중 잘 알려진 *Enterococcus* 속과 probiotics로 알려진 *Lactobacillus* 속을 증폭하여 qRT-PCR로 군집분석을 실행하였다 (그림 4). *Enterococcus* group에서 Ct 값이 대조군의 경우 27.02, SM 처리군의 경우 27.66, VAN 처리군의 경우 22.66, CL 처리군의 경우 19.92, AMP 처리군의 경우 16.88로 SM 처리군을 제외한 나머지 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군보다 낮았다 (그림 4A). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.1382$, VAN 처리군에서 $P=0.0002$, CL 처리군에서 $P<0.0001$, AMP 처리군에서 $P<0.0001$ 로 SM 처리군을 제외한 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 VAN, CL, AMP 처리군과 대조군과의 Ct 값 차이가 유의적인 것을 확인하였다. 이를 통해 VAN, CL, AMP 처리 그룹에서 *Enterococcus* group이 대조군에서 보다 많이 존재하고 있음을 확인하였다.

Lactobacillus group에서 Ct 값이 대조군의 경우 18.95, SM 처리군의 경우 18.61, VAN 처리군의 경우 19.72, CL 처리군의 경우 27.30, AMP 처리군의 경우 17.63로 CL 처리군을 제외한 나머지 항생제 처리군과 대조군과의 Ct 값에는 큰 차이가 없었다. P-value는 SM 처리군에서 $P=0.4165$, VAN 처리군에서 $P=0.0341$, CL 처리군에서 $P<0.0001$, AMP 처리군에서 $P=0.0150$ 로 SM 처리군을 제외한 모든 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 VAN, CL, AMP 처리군과 대조군의 Ct 값에 유의적인

차이가 있음을 확인하였다. 이를 통해 VAN, CL 처리군에 *Lactobacillus* group이 대조군 보다 더 적게 존재하고 있고, 특히 CL 처리군에서 *Lactobacillus* group이 많이 줄었다는 것을 확인하였다. AMP 처리군은 대조군 보다 더 많은 *Lactobacillus* group이 존재하며 유의적인 차이를 보였지만 그 차이가 크지는 않았다.

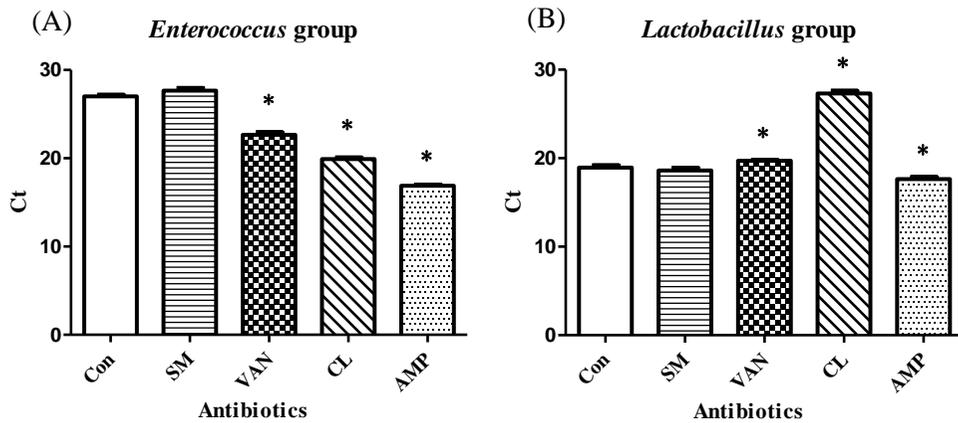


그림 4. The effect of the antibiotic on the several genus of the fecal bacteria

Quantitative real time PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each genus, (A) *Enterococcus* group, (B) *Lactobacillus* group. (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin).

5. *V. cholerae* N16961 감염 후 소장내 장내 미생물 총 균 군집 분석

항생제를 일주일간 경구투여 한 female Balb/c 마우스의 장내 미생물 군집을 분변으로 qRT-PCR로 분석한 결과 항생제 별로 장내 미생물군집의 변화양상이 다르다는 것을 확인하였다. 마지막 항생제 투여를 하고 24시간 뒤에 *V. cholerae* N16961을 감염시켰다. 이후 마우스의 감염부위인 소장에서 장내 미생물 군집 분석을 qRT-PCR로 실행하였다. 우선, N16961 감염 시에 소장의 장내 미생물 총 균에 어떠한 변화가 있는 지 알아보기 위하여 16s rRNA의 conserved region을 증폭하는 프라이머로 qRT-PCR을 실행하였다 (그림 5). Ct 값이 대조군의 경우 24.56, SM 처리군의 경우 22.73, VAN 처리군의 경우 19.65, CL 처리군의 경우 22.14, AMP 처리군의 경우 23.24로 모든 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군보다 낮았다. P-value는 SM 처리군에서 $P=0.1904$, VAN 처리군에서 $P=0.0019$, CL 처리군에서 $P=0.1221$, AMP 처리군에서 $P=0.4062$ 로 SM, CL, AMP 처리군은 $P>0.05$ 이고 VAN 처리군은 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 VAN 처리군과 대조군과의 Ct 값 차이만 유의적인 것을 확인하였다. 이를 통해 VAN 처리군에 대조군보다 많은 균이 존재하고 있음을 확인하였다.

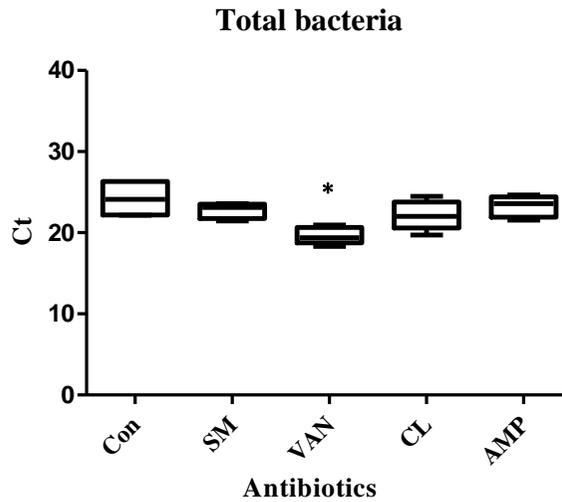


그림 5. The effect of the N16961 infection on the total small intestinal microbiota

qRT-PCR was performed with primers that amplify the conserved region of 16s rRNA genes. * $P < 0.05$ (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin). n=5.

6. *V. cholerae* N16961 감염 후 소장외의 장내 미생물 두 문 (phylum)의 군집 분석

N16961 감염 후 소장외에서 Firmicutes문과 Bacteroidetes 문의 군집 분석을 qRT-PCR로 실행하였다 (그림 6). 앞서 언급했던 것과 같이 Firmicutes 문과 Bacteroidetes 문이 장내 미생물의 대부분을 차지하는 문이기 때문에 총 균의 군집변화와 비슷한 양상을 보였다.

Firmicutes 문에서 Ct 값이 대조군의 경우 23.95, SM 처리군의 경우 22.11, VAN 처리군의 경우 19.72, CL 처리군의 경우 21.83, AMP 처리군의 경우 23.48로 나왔다 (그림 6A). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.1394$, VAN 처리군에서 $P=0.0052$, CL 처리군에서 $P=0.1472$, AMP 처리군에서 $P=0.7027$ 로 SM, CL, AMP 처리군에서 $P>0.05$ 이고 VAN 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 VAN 처리군과 대조군의 Ct 값 차이가 유의적인 것을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후 대조군에서보다 VAN 처리군에 Firmicutes 문이 유의적으로 많이 존재하는 것을 확인하였으나 그 차이가 크지 않았던 것을 확인하였다.

Bacteroidetes 문에서 Ct 값이 대조군의 경우 22.27, SM 처리군의 경우 21.49, VAN 처리군의 경우 18.66, CL 처리군의 경우 20.80, AMP 처리군의 경우 22.04로 나왔다 (그림 6B). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.4444$, VAN 처리군에서 $P=0.0064$, CL 처리군에서 $P=0.2497$, AMP 처리군에서 $P=0.8358$ 로 SM, CL, AMP 처리군에서 $P>0.05$ 이고 VAN 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 VAN 처리군과 대조군의 Ct

값 차이가 유의적인 것을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후 대조군에서보다 VAN 처리군에서 Bacteroidetes 문이 유의적으로 많이 존재하는 것을 확인하였으나 그 차이가 크지는 않았던 것을 확인하였다.

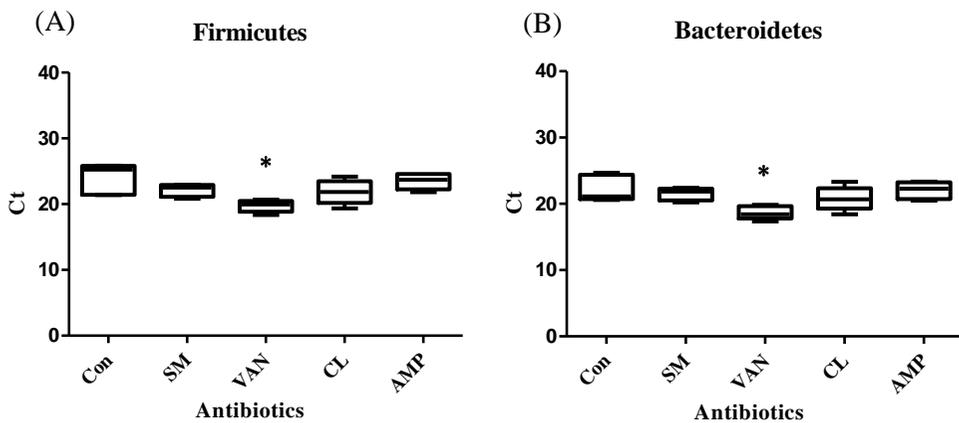


그림 6. The effect of the N16961 infection on the phylum of small intestinal microbiota

qRT-PCR was performed with primer that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each phylum, (A) Firmicutes and (B) Bacteroidetes. * $P < 0.05$ (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin). n=5.

7. *V. cholerae* N16961 감염 후 소장외 장내 미생물의 대표적인 과 (family)의 군집 분석

더 정확하고 세부적인 장내 미생물 군집의 변화를 관찰하기 위하여 앞서 실험했던 *Enterobacteriaceae* 과, *Prevotellaceae* 과, *Lachnospiraceae* 과, *Ruminococcaceae* 과 이 네 가지를 대상으로 qRT-PCR을 실행하였다 (그림 7).

N16961 감염 후 *Enterobacteriaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 27.86, SM 처리군의 경우 22.19, VAN 처리군의 경우 16.80, CL 처리군의 경우 17.86, AMP 처리군의 경우 21.09로 모든 항생제 처리군이 대조군보다 Ct 값이 낮았다 (그림 7A). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0012$, VAN 처리군에서 $P<0.0001$, CL 처리군에서 $P<0.0001$, AMP 처리군에서 $P=0.0005$ 로 모든 항생제 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 모든 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군과 유의적으로 차이가 있었음을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후에도 *Enterobacteriaceae* 과가 대조군에 비하여 항생제 처리군에 더 많은 것을 확인하였다.

N16961 감염 후 *Prevotellaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 28.91, SM 처리군의 경우 24.64, VAN 처리군의 경우 23.64, CL, AMP 처리군에서는 증폭 신호가 잡히지 않았다 (그림 7B). SM, VAN 처리군의 Ct 값은 대조군보다 낮았다. P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0056$, VAN 처리군에서 $P=0.0343$ 로 모두 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 SM, VAN

처리군의 Ct 값이 대조군과 유의적으로 차이가 있었음을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후 *Prevotellaceae* 과가 대조군에 비하여 SM, VAN 처리군에서 많고, CL, AMP 처리군에서는 감지가 되지 않을 정도로 적다는 것을 확인하였다.

N16961 감염 후 *Lachnospiraceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 25.65, SM 처리군의 경우 20.93, VAN 처리군의 경우 23.69, CL 처리군의 경우 28.29로 나왔다 (그림 7C). AMP 처리군의 경우 melting peak에서 벗어났기 때문에 결과에 신지 않았다. P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0070$, VAN 처리군에서 $P=0.2027$, CL 처리군에서 $P=0.2488$ 로 VAN, CL 처리군에서는 $P>0.05$ 이고 SM 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 SM 처리군의 Ct 값이 대조군과 유의적으로 차이가 있었음을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후 *Lachnospiraceae* 과가 SM 처리군에서 유의적으로 감소한 반면 다른 처리군에서는 변화가 없었다.

N16961 감염 후 *Ruminococcaceae* 과에서 Ct 값이 대조군의 경우 25.23, SM 처리군의 경우 21.15, VAN 처리군의 경우 22.34, CL 처리군의 경우 23.08, AMP 처리군의 경우 24.69로 모든 항생제 처리군의 Ct 값이 대조군보다 낮았다 (그림 7D). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0008$, VAN 처리군에서 $P=0.0044$, CL 처리군에서 $P=0.0701$, AMP 처리군에서 $P=0.3505$ 로 SM, VAN 처리군은 $P<0.05$ 이고 CL, AMP 처리군은 $P>0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 SM, VAN 처리군과 대조군의 Ct 값에는 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후

Ruminococcaceae 과가 대조군에 비하여 SM, VAN 처리군에 더 많이 존재하고 있으나 그 차이가 크지는 않다는 것을 확인하였다.

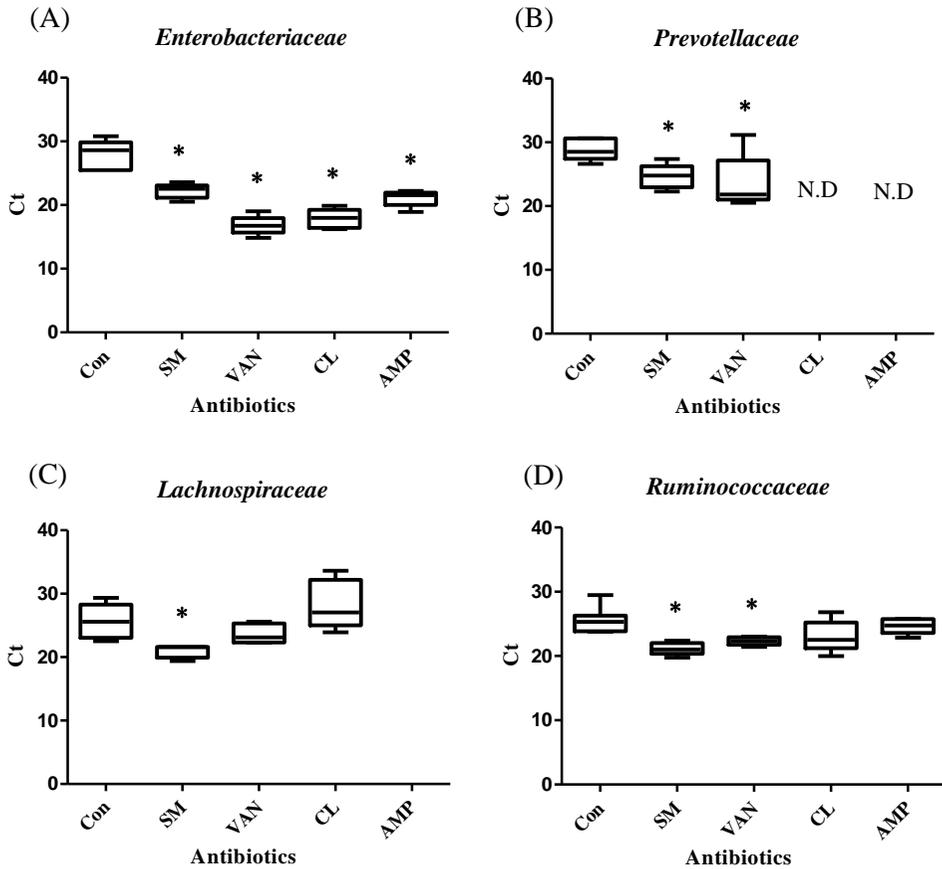


그림 7. The effect of the N16961 infection on the several Family of small intestinal microbiota

qRT-PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each family, (A) *Enterobacteriaceae*, (B) *Prevotellaceae*, (C) *Lachnospiraceae*, (D) *Ruminococcaceae*. * $P < 0.05$ (Ct; threshold cycle cycle threshold, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin). n=5.

8. *V. cholerae* N16961 감염 후 소장외의 장내 미생물 속 (Genus)의 군집 분석

N16961 감염 후 장내 미생물 군집 분석을 더 세밀하게 하기 위하여 특정 속을 증폭하는 프라이머로 qRT-PCR을 실행하였다. N 16961 감염 후 *Enterococcus* group에서 Ct 값이 대조군의 경우 29.72, SM 처리군의 경우 25.32, VAN 처리군의 경우 20.96, CL 처리군의 경우 23.22, AMP 처리군의 경우 22.01로 모든 항생제 처리군이 대조군의 Ct 값보다 낮았다 (그림 8A). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.0106$, VAN 처리군에서 $P<0.0001$, CL 처리군에서 $P=0.0035$, AMP 처리군에서 $P<0.0001$ 로 모두 $P<0.05$ 였으므로 N16961 감염 후 모든 항생제 처리군과 대조군의 Ct 값에는 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후에도 *Enterococcus* group이 대조군에 비하여 항생제 처리군에 더 많이 존재하고 있음을 확인하였다.

N16961 감염 후 *Lactobacillus* group에서 Ct 값이 대조군에서 28.49, SM 처리군에서 28.82, VAN 처리군에서 31.33, CL 처리군에서 32.35, AMP 처리군에서 31.60로 모든 항생제 처리군이 대조군의 Ct 값보다 낮았다 (그림 8B). P-value는 SM 처리군에서 $P=0.7654$, VAN 처리군에서 $P=0.0200$, CL 처리군에서 $P=0.0171$, AMP 처리군에서 $P=0.0143$ 로 SM 처리군을 제외한 VAN, CL, AMP 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 VAN, CL, AMP 처리군과 대조군의 Ct 값에는 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 N16961 감염 후에 *Lactobacillus* group에는 유의적인 차이가

있었지만 큰 변화는 없는 것을 확인하였다.

N16961 감염 후 probiotics로 잘 알려진 *Bifidobacterium* group의 군집 분석을 qRT-PCR로 실행하였다. Ct 값이 대조군의 경우 25.20, SM 처리군의 경우 25.30, VAN 처리군의 경우 26.29, CL 처리군의 경우 24.15, AMP 처리군의 경우 29.09로 나왔다. P-value는 SM 처리군에서 $P= 0.9521$, VAN 처리군에서 $P= 0.5209$, CL 처리군에서 $P= 0.5464$, AMP 처리군에서 $P= 0.0602$ 로 모두 $P>0.05$ 였으므로 모든 항생제 처리군과 대조군의 Ct 값에는 유의적인 차이가 없다는 것을 확인하였다.

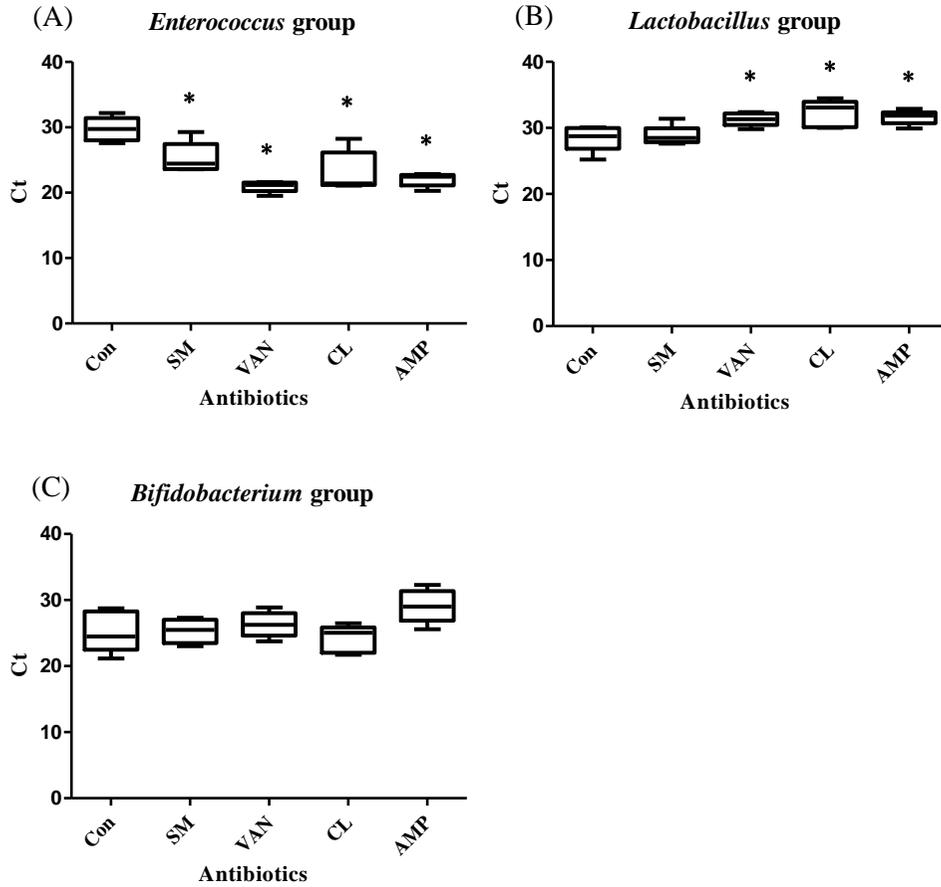


그림 8. The effect of the N16961 infection on the several genus of small intestinal microbiota

qRT-PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of each genus, (A) *Enterococcus* group, (B) *Lactobacillus* group, (C) *Bifidobacterium* group. * $P < 0.05$ (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin). n=5.

9. 항생제에 의한 장내 미생물 군집 변화가 *V. cholerae* N16961의 정착에 끼치는 영향

항생제 처리에 의해서 장내 미생물 군집에 변화가 생긴 마우스에 N16961을 감염 시키고 24시간 뒤 마우스의 소장내 N16961이 얼마나 남아있는 지 확인하기 위하여 viable cell counting과 qRT-PCR을 실행하였다 (그림 9). Viable cell counting 결과 소장내 남아있는 N16961은 대조군에서 $4.50E+01$ CFU/ml, SM 처리군에서 $5.07E+03$ CFU/ml 이상, VAN 처리군에서 $1.06E+04$ CFU/ml 이상, CL 처리군에서 $9.66E+03$ CFU/ml 이상, AMP 처리군에서 $5.43E+03$ CFU/ml 이상으로 확인되었고, P-value는 SM 처리군이 $P=0.0595$, VAN 처리군이 $P=0.0345$, CL 처리군이 $P=0.1430$, AMP 처리군이 $P=0.1029$ 였다 (그림 9A). VAN 처리군에서 $P<0.05$ 였으므로 대조군에 비하여 VAN 처리군에 정착한 N16961이 유의적으로 많다는 것을 확인할 수 있었다. 단, viable cell counting 데이터는 VAN 처리군 중 한 마우스에서 다른 마우스와 상반되는 패턴이 확인되었으므로 통계 처리시에 데이터에서 제외시켰다.

소장에 남아있는 *V. cholerae* N16961을 qRT-PCR을 통해 분석한 결과 Ct 값이 대조군의 경우 29.56, SM 처리군의 경우 26.14, VAN 처리군의 경우 20.46, CL 처리군의 경우 21.65, AMP 처리군의 경우 24.54로 나왔고 P-value는 모든 항생제 처리군에서 $P<0.0001$ 로 나왔으므로 대조군과 모든 항생제 처리군의 Ct 값 차이는 유의적인 것을 확인하였다 (그림 9B). 앞서 실험한 viable cell counting 결과와 qRT-PCR 결과를

통해 VAN 처리군에서 N16961이 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 많이 남아있었던 것을 확인 할 수 있었다.

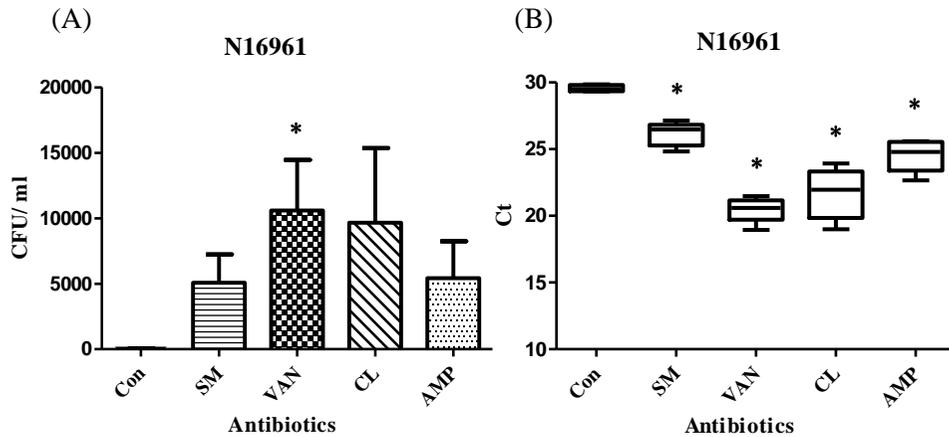


그림 9. The effect of the altered gut microbiota composition by antibiotics on the colonization of N16961

Quantitative analysis of remaining N16961 in the small intestine. The analysis was performed by (A) viable cell counting. (Con; n=5, SM; n=5, VAN; n=4, CL; n=5, AMP; n=5.) (B) qRT-PCR. qRT-PCR was performed with primers that amplify the variable region of 16s rRNA genes of *Vibrio cholerae* N16961. (n=5) * $P < 0.05$ (Ct; threshold cycle, Con; control, SM; streptomycin, VAN; vancomycin, CL; clindamycin, AMP; ampicillin).

IV. 고찰

장내 미생물은 십이지장에서 직장까지 분포되어 있는 공생 미생물을 총칭하며 숙주와 공생하면서 영양분의 흡수, 면역 체계의 발달, 병원균으로부터 숙주를 보호하는 기능 등 여러 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또 장내 환경에는 숙주와 장내 미생물, 숙주와 병원균, 병원균과 장내 미생물 그리고 장내 미생물 간의 상호작용 등이 매우 복잡하게 얽혀있다¹⁰. 본 논문에서는 병원균과 장내 미생물 사이의 상호관계에 대하여 연구하고자 마우스에 여러 계열의 항생제를 투여 한 후 장내 미생물 군집 변화와 그에 따른 *Vibrio cholerae* 군주 중 하나인 N16961 감염에 대한 마우스의 감수성을 관찰하였다. 장내 미생물을 완벽히 제거하는 것이 목적이 아니었기 때문에, 낮은 농도의 항생제를 이용하였다. 더 나아가 *V. cholerae* N16961의 동물 감염 모델을 새롭게 설립하는 데 도움이 되고자 연구를 진행하였다. 그 결과 각각의 항생제 처리군에서 장내 미생물 군집이 다른 양상을 보이며 변화하였고 (그림 1 - 그림 4), 대표적인 미생물 중에서도 *Enterobacteriaceae* 과 (그림 3A)와 *Enterococcus* group (그림 4A)이 대조군보다 대부분의 항생제 처리군에서 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 그 중에서도 vancomycin 처리군에서 *Enterobacteriaceae*과가, ampicillin 처리군에서 *Enterococcus* group이 가장 현저하게 증가하였다. 이렇게 항생제 처리에 의해 장내 미생물의 군집이 변화된 상태에서 *V. cholerae* N16961을

감염시켰을 때 *Enterobacteriaceae*과 나 *Enterococcus* group이 많았던 항생제 처리군에서는 감염 후에도 그 현상이 유지되었고 (그림 3A, 그림 4A), 이 같은 특정 균이 늘어난 항생제 처리군에서 *V. cholerae* N16961이 마우스의 소장내에 더 많은 수가 더 오랫동안 남아있는 현상을 확인하였다 (그림 9).

본 연구에서는 항생제 처리군에서 대조군보다 더 많은 장내 미생물 총균이 있다는 것을 확인 한 반면, Crowell A, Amir E, Tegatz P 등의 보고²⁵에 따르면 (2009) 항생제를 투여하여 장내 미생물 총균 수를 분석한 결과 총균 수는 일정하게 유지되었고 미생물의 군집에는 변화가 생겼음을 시사하였다. 이는 항생제 처리 농도와 기간, 시료 채취 및 준비, 마우스 종과 개체 간 차이, 실험 결과의 분석 방법 등이 결과에 극적인 영향을 줄 수 있으므로 두 실험 결과에 대한 차이를 보인다고 판단하였다.

본 연구에서는 항생제 처리에 의해서 장내 미생물의 총균 수가 줄어들고 그에 따라서 병원균과 장내 미생물 사이의 부착 자리에 대한 경쟁이 줄었기 때문에 *V. cholerae* N16961의 정착이 성공적으로 된 것이 아니라 낮은 농도의 항생제 처리에 의해 장내 미생물 총균 수가 늘어났음에도 불구하고 *V. cholerae* N16961의 정착이 성공적으로 일어난 것을 확인하였다. Willing, Benjamin P. Vacharaksa, Anjalee Croxen 등의 보고²⁶에 의하면 (2011) 병원균의 감염에 대한 감수성이 높은 마우스의 장내 미생물을 감염이 잘 되지 않는 마우스의 장에 이식시켜 주었을 때

병원균의 감염이 성공적으로 진행되었고 이러한 현상을 통하여 장내 미생물과 병원균 사이에 밀접한 관련이 있다고 시사하였다. 앞의 연구를 통하여 본 실험에서도 장내 미생물과 *V. cholerae* N16961 사이의 상호작용이 있을 것이라고 추측하였고 특히 특정 균이 늘어난 환경에서 *V. cholerae* N16961의 정착이 더 성공적으로 이루어진 것을 확인함으로써 다시 한 번 늘어난 장내 미생물과 *V. cholerae* 사이에 명백한 상호관계가 존재 할 것이라고 판단하였다.

이러한 결과를 토대로 마우스의 장에서 분리해낸 *Enterococcus faecalis*를 장내 미생물 군집이 아직 완벽히 형성되지 않은 신생 마우스의 장에 이식시켜 준 결과 *Enterococcus* group의 수는 유지되는 반면 *Enterobacteriaceae*과가 늘어나는 현상을 추후의 실험을 통하여 확인하였고 마우스의 장에서 분리해낸 *Enterobacteriaceae*과 중 현재 동정 중에 있는 한 종을 신생 마우스의 장에 이식시켜 주고 *V. cholerae* N16961을 감염시켜 준 결과 대조군에 비하여 *Enterobacteriaceae*과를 이식시켜 준 마우스의 장에 *V. cholerae* N16961이 더 많이 남아있는 현상을 확인하였다 (data not shown). 이와 같은 현상은 항생제를 처리하였을 때 *Enterobacteriaceae*과와 *Enterococcus* group의 수가 늘었고 그로 인해 *V. cholerae* N16961이 마우스의 장에서 더 많은 수가 더 오랫동안 지속되었던 본 연구의 타당성을 뒷받침 해준다. 또한 이를 통하여 *Enterobacteriaceae*과와 *Enterococcus* group이 단독적으로 *V. cholerae* N16961의 정착에 영향을 끼치는 것이 아니라 두 균 사이에도

상호관계가 존재하고 그 상호관계의 조절에 따라서 *V. cholerae* N16961의 정착에 영향을 끼치는 것이라고 추측하였다. 마우스에 항생제를 처리하였을 시에 특정 균이 늘어나면 *Salmonella enteric* serovar Thyphimurium 이나 *Clostridium difficile* 과 같은 병원균의 감염에 더 민감해진다는 연구가 보고된 바 있다²⁷. 이 연구에서는 항생제 처리에 의해 늘어난 특정 균이 장의 mucus 층에 존재하는 sialic acid를 mucus층으로부터 분리시켜 주고 그것을 탄소원 혹은 질소원으로 사용할 수 있는 병원균들의 증식이 증가하여 감염이 성공적으로 이루어 진다고 보고하고 있다. 이처럼 항생제와 장내 미생물 그리고 병원균과의 밀접한 상호작용에 관하여 많은 연구들^{25,28,29}이 진행되어왔고 본 연구 또한 항생제 처리에 의해 늘어난 *Enterobacteriaceae*과와 *Enterococcus* group이 *V. cholerae* N16961의 감염에 영향을 끼친다는 것을 입증하였다.

일반적으로 장내 미생물의 군집에 따라서 대사산물의 종류가 변화한다는 연구가 보고된 바 있다³⁰. 본 연구에서도 장내 미생물의 군집에 현저한 변화를 보였고 여러 연구들을 통하여 장내 미생물 군집 변화가 대사산물의 종류를 변화시킨다는 것이 확인되었으므로 *Enterobacteriaceae*과나 *Enterococcus* group이 늘어난 상황에서 장내 환경의 대사산물에 변화가 있었을 것이고, 변화된 대사산물이 *V. cholerae* N16961이 마우스의 장에 정착하는 것에 영향을 주었을 것이라고 추측하였다. 또 장내 미생물이 분비하는 신호물질이 병원균의 병원성을 조절한다고 보고하는 연구³¹처럼 장내 미생물 군집의 변화에

따라 장내 미생물이 분비하는 신호물질에 변화가 생겼기 때문에 병원균인 *V. cholerae* N16961의 정착에 영향을 주었을 것이라는 것도 배제할 수 없다.

장내는 여러 요인들이 얽혀있는 복잡한 환경을 유지하고 있으므로 복잡한 환경 안에서 장내 미생물과 병원균과의 상호관계에 대하여 명확하게 규명하는 일은 쉽지 않다. 그럼에도 불구하고 *V. cholerae* 감염에 관여하는 특정 장내 미생물의 존재 및 역할을 규명하는 것은 향후 *V. cholerae*의 감염 기전을 연구하기 위한 마우스 모델을 제시할 수 있게 할 뿐만 아니라 특정 미생물의 과다 증식과 그에 따른 감염의 연관성을 입증하여 질병 예측 모델을 만들 수 있다는 점에서도 중요하다. 본 연구에서는 마우스 장에서의 *V. cholerae* 정착과 장내 미생물과의 뚜렷한 상호관계가 있다는 것을 입증하였다. 그러나 그 상호관계에 대한 명확한 작용 기전이나 그에 따른 대사관계의 변화 혹은 면역물질의 변화 등을 분석하지는 못하였다. 앞서 말한 바와 같이 *V. cholerae*의 감염 기전을 연구하거나 동물 감염 모델을 설립하는 것은 중요한 연구 주제이므로 *V. cholerae*와 장내 미생물 간의 상호관계에 대해 구체적인 작용 기전을 연구하고 추가적으로 대사물질, 면역물질의 변화를 분석하는 것이 필요하다.

V. 결론

1. 다양한 계열의 항생제 (Aminoglycoside계; streptomycin, β -lactam계; ampicillin, Glycopeptides계; vancomycin, Lincosamides 계; clindamycin)를 마우스에 경구 투여 하여 장내 미생물의 균집을 변화시켰다.
2. 모든 항생제 처리군에서 장내 미생물 총 균의 수가 증가하였고 *Enterobacteriaceae* 과와 *Enterococcus* 속이 대조군에 비하여 현저하게 늘어난 것을 확인하였다.
3. 항생제 투여로 장내 미생물이 변화된 마우스에 *Vibrio cholerae* N16961을 감염시켜준 결과 *Enterobacteriaceae* 과와 *Enterococcus* 속이 대조군에 비하여 여전히 균이 늘어난 양상을 보였다.
4. *Enterobacteriaceae* 과와 *Enterococcus* 속이 늘어난 상황에서 *V. cholerae* N16961 의 정착이 더 성공적으로 이루어지는 것을 확인하였다.

이상의 연구 결과로 장내 미생물과 *V. cholerae* 의 감염과는 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. *V. cholerae* 감염에 관여하는 특정 장내 미생물의 존재 및 역할을 규명하는 것은 향후 *V. cholerae* 의 감염 기전을 연구하기 위한 마우스 모델을 제시할 수 있게 해 줄 뿐만 아니라,

특정 미생물의 과다 증식과 감염과의 관계를 입증하여 질병 예측 모델을 만들 수 있다는 점에서도 중요하다. 본 연구에서는 마우스 장에서의 *V. cholerae* 정착과 장내 미생물과의 뚜렷한 상호관계가 있다는 것을 입증하였다. 그러나 그 상호관계에 대한 명확한 작용 기전이나 그에 따른 대사관계의 변화 혹은 면역물질의 변화 등을 분석하지는 못하였다. 앞서 말한 바와 같이 *V. cholerae* 의 감염 기전을 연구하거나 동물 감염 모델을 설립하는 것은 중요한 연구 주제이므로 *V. cholerae* 와 장내 미생물 간의 상호관계에 대해 구체적인 작용 기전을 연구하고 추가적으로 대사물질, 면역물질의 변화를 분석하는 것이 필요하다.

참고 문헌

1. Clemente Jose C, Ursell Luke K, Parfrey Laura W, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.
2. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.
3. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 2003;361(9356):512-9.
4. Ishikawa H, Tanaka K, Maeda Y, Aiba Y, Hata A, Tsuji NM, *et al*. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;153(1):127-35.
5. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 2006-07-01 07:00:00 2006;7(7):688-93.
6. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. August 2, 2005 2005;102(31):11070-5.
7. Heczko U, Abe A, Brett Finlay B. Segmented Filamentous Bacteria Prevent Colonization of Enteropathogenic Escherichia coli O103 in Rabbits. *Journal of Infectious Diseases*. March 1, 2000 2000;181(3):1027-33.
8. Medellín-Peña MJ, Griffiths MW. Effect of Molecules Secreted by Lactobacillus acidophilus Strain La-5 on Escherichia coli O157:H7 Colonization. *Applied and Environmental Microbiology*. February 15, 2009 2009;75(4):1165-72.
9. Kamada N, Kim Y-G, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, *et al*. Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota. *Science*. June 8, 2012 2012;336(6086):1325-9.
10. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2010-07-27 23:35:54 2010;90(3):859-904.
11. TAGUCHI H, TAKAHASHI M, YAMAGUCHI H, OSAKI T, KOMATSU A, FUJIOKA Y, *et al*. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxicogenic enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, strain 6. *Journal of Medical Microbiology*. April 1, 2002 2002;51(4):336-43.
12. Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infection and Immunity*. August 1, 1990 1990;58(8):2438-45.
13. Buttermont JR, Ryan ET, Shahin RA, Calderwood SB. Development of a germfree mouse model of Vibrio cholerae infection. *Infection and Immunity*. October 1, 1996 1996;64(10):4373-7.
14. Angelichio MJ, Spector J, Waldor MK, Camilli A. Vibrio cholerae Intestinal Population Dynamics in the Suckling Mouse Model of Infection. *Infection and Immunity*. August 1, 1999 1999;67(8):3733-9.
15. Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, *et al*. Metagenomic profile of gut microbiota in children during cholera and recovery. *Gut Pathogens*. 2013;5(1):1.
16. Baselski V, Briggs R, Parker C. Intestinal fluid accumulation induced by oral

- challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. *Infection and Immunity*. March 1, 1977 1977;15(3):704-12.
17. Kim K-H, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J, *et al.* Isolation of *Clostridium difficile* from the Environment and Contacts of Patients with Antibiotic-Associated Colitis. *Journal of Infectious Diseases*. January 1, 1981 1981;143(1):42-50.
 18. *Altered de novo lipogenesis contributes to low adipose stores in cystic fibrosis mice*. Vol 3032012.
 19. Armougom F, Bittar F, Stremmer N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, *et al.* Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009/09/01 2009;28(9):1151-4.
 20. Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;47(5):367-73.
 21. Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. January 1, 2003 2003;149(1):269-77.
 22. Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, *et al.* Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiology Ecology*. 2012;80(3):624-36.
 23. Zaki MH, Man SM, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. January 7, 2014 2014;111(1):385-90.
 24. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;97(6):1166-77.
 25. Crosswell A, Amir E, Tegatz P, Barman M, Salzman NH. Prolonged Impact of Antibiotics on Intestinal Microbial Ecology and Susceptibility to Enteric Salmonella Infection. *Infection and Immunity*. July 1, 2009 2009;77(7):2741-53.
 26. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, Thanachayanont T, Finlay BB. Altering Host Resistance to Infections through Microbial Transplantation. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26988.
 27. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, *et al.* Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 10/03/print 2013;502(7469):96-9.
 28. Robinson CJ, Young VB. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2010;1(4):279-84.
 29. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, *et al.* Antibiotic-Induced Perturbations of the Intestinal Microbiota Alter Host Susceptibility to

- Enteric Infection. *Infection and Immunity*. October 1, 2008 2008;76(10):4726-36.
30. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, *et al*. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. February 12, 2008 2008;105(6):2117-22.
31. Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. December 21, 1999 1999;96(26):15196-201.

Abstract

The Effect of Altered Gut Microbiota Composition on susceptibility to *Vibrio cholerae* Infection in Adult Mice

Yujin Yoon

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sang Sun Yoon)

Many attempts have been made to establish intestinal infection models using adult mouse, no clear explanation has been proposed why intestinal infection by *Vibrio cholerae* O1 El tor N16961 does not occur with human-like symptoms. The role of gut microbiota in maintaining the intestinal homeostasis and successful defense against enteric infections has been long considered. In this study, we hypothesized that mice with altered gut microbiota population by various antibiotics may exhibit differential capabilities to respond to intestinal infections by *V. cholerae*

N16961. A broad spectrum antibiotics, streptomycin and ampicillin, or narrow spectrum antibiotics, vancomycin and clindamycin, were orally administrated to each Balb/c mice for 7 days to induce changes in gut microbiota population. Gut microbiota population of antibiotics-treated or water-treated adult murine models are analyzed. The murine models were infected with *V. cholerae* N16961. The fecal samples of mice were collected before infection and the mice were sacrificed after 24hours later. Quantitative real-time PCR and gut microbiota community analyses were performed to provide a comprehensive view of how gut microbe ecosystem affects against the *V. cholerae* N16961 infection. Our study will elucidate a previously undescribed role of commensal gut microbes in defense against enteric infections.

Key words: gut microbiota, *Vibrio cholerae* N16961 , quantitative real time PCR (qRT-PCR), antibiotics