

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*
실험적 감염에 의한 대장염 동물모델로서
몽골리안 저빌의 유용성 평가

연세대학교 보건환경대학원
의생명과학과
임 세 진

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*
실험적 감염에 의한 대장염 동물모델로서
몽골리안 저빌의 유용성 평가

지도 이 기 종 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2012년 12월

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학과

임 세 진

임세진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 보건환경대학원

2012년 12월

그가 이르되 여호와와 말씀이 이 골짜기에 개천을 많이 파라 하셨나이다. 여호와께서
이르시기를 너희가 바람도 보지 못하고 비도 보지 못하되 이 골짜기에 물이 가득하여
너희와 너희 가축과 짐승이 마시리라 하셨나이다. (열왕기하 3장 16-17장)

감사의 글

항상 부족하고 모자란 저를 받아주시고, 하나부터 열까지 지도해 주신 이기종 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험에 있어서 도움을 주시고 가르침을 주신 김종배 교수님과 김윤석 교수님, 미생물방과 혈액학방 선생님들께 감사드립니다. 밤 늦은 시간까지 몇 명의 학생을 위해 열정적으로 강의해 주신 오옥두 교수님, 박용석 교수님, 이해영 교수님, 김태우 교수님께도 감사드립니다.

2년간, 밤 늦게 혹은 새벽에 수업이 끝날 때도 있었습니다. 비가 오는 날도 있었고 눈이 오는 날도 있었습니다. 그런 나날들을 저보다 더 잠 못 들고 행여나 졸음운전을 하진 않을까 배는 고프지 않을까 뜬 눈으로 걱정하고 잠 못 이루신 할아버지(임장호), 할머니(차국화)께 깊은 감사와 사랑을 전합니다. 그리고 귀가할 때까지 기다려주시고 배고픈 조카에게 따뜻한 밥을 차려주신 고모(임인재)와 아빠, 엄마, 언니, 유진이, 희진이, 셋째 고모께도 감사와 사랑을 전합니다.

2년이 넘는 시간 동안 동생이지만 늘 언니같이 함께하고 챙겨준 사랑스러운 동기 김유나 고맙고, 힘들지만 즐거운 학교 생활을 만들어준 이동현 선생님, 이종욱 선생님, 임진아 선생님, 전선희 선생님, 도승욱 선생님, 김도균 선생님, 김미경 선생님, 박화성 선생님, 양정윤 선생님, 이재왕 선생님, 강주원 선생님, 안지선 선생님께 감사드립니다.

우리 실험실에 귀염둥이 동생들!! 황순재, 권선영!! 교수님 말씀 잘 듣고 실험실을 부탁해!! 김내현, 네가 있어서 너무 즐거웠어. 고마워.

지난 2년 중에 논문을 준비하는 기간은 특히 지쳐서 도망가고 싶을 때도 있었고 스스로에게 실망하여 자괴감에 빠지기도 하였으며 소중한 사람들과 나 자신을 잃기도 했습니다. 졸업과 동시에 모든 것을 멈추려 하였습니다. 하지만 멈추지 않고 끝없이 도전하는 삶을 살고자 합니다. 또 제가 받은 사랑과 격려를 나눠주는 사람이 되고자 합니다. 지금은 미숙하지만 그런 사람으로 점점 되어가겠습니다. 진심으로 감사합니다.

2013년 1월 3일 임세진 드림

내가 사망의 음침할 골짜기를 다닐지라도 해를 두려워하지 않을 것은 주께서 나와 함께 하심이라 (시편 23편)

목 차

그림 목차	iii
표 요약	iv
약 기 호 표	v
국 문 요 약	vi
I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	6
1. 실험동물 및 ETBF의 감염	6
2. 대변 내 ETBF의 감염 측정	7
3. 해부	7
4. 대장 조직의 lysates 준비	8
5. Western blot 분석	8
6. 대장 조직의 H&E 염색	11
III. 결과	12
1. 몽골리안 저빌 장내의 ETBF 감염	12
2. ETBF 접종에 의한 몽골리안 저빌의 몸무게 변화	14

3. ETBF 접종에 의한 몽골리안 저빌의 장염 발생	16
4. 몽골리안 저빌 실험에서 ETBF에 의한 E-cadherin의 분절 여부	23
5. 장상피세포 epithelial cell junction 단백질 분석	25
IV. 고찰	27
V. 결론	31
참 고 문 헌	32
Abstract	39

그림 목차

Figure 1. ETBF colonization in infected gerbil	13
Figure 2. Body weight change and intestinal morphology in gerbils inoculated with ETBF (5×10^9 CFU) for 6 days	15
Figure 3. Histological evaluation of colitis induced by ETBF.....	17
Figure 4. Western blot analysis of E-cadherin in ETBF- infected gerbils.....	24

표 목 차

Table 1. List of primary antibodies..... 10

Table 2. Western blot analysis of junctional proteins..... 26

약 기 호 표

ETBF : enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

BFT : *Bacteroides fragilis* toxin

IBD : inflammatory bowel disease

LPS : lipopolysaccharide

iNOS : inducible nitric oxide synthase

COX-2 : Cyclooxygenase-2

NO : Nitric oxide

PG : prostaglandin

PBS : phosphate-buffered saline

BHIA : brain heart infusion agar

RIPA : radioimmunoprecipitation assay

ECL : enhanced chemiluminescence

DC : distal colon

MC : middle colon

PC : proximal colon

DC : distal small colon

국 문 요 약

ETBF는 장독소를 분비하는 *B. fragilis* 종으로 비록 일부(10-30%) 정상인에서도 검출되지만 감염 시 주로 대장염과 설사를 유발하는 원인균으로 알려져 있다. 사람과 마우스 연구를 통해 ETBF가 분비하는 장독소인 BFT가 20 kDa 크기의 metalloprotease이며 이 단백질이 감염부위조직 내 장상피세포 간 결합에 관여하는 E-Cadherin을 분절함으로써 대장염을 유발한다는 사실이 확인되었다. 또한 최근에 정상인에 비해 염증성장질환(IBD) 환자와 대장암 환자에서 ETBF 검출빈도가 높다는 사실이 보고되면서 ETBF가 대장암을 유발하는 원인균일 가능성이 제시되고 있다. 본 실험에서는 비교적 수명이 길어 대장암 발병연구에 유용할 것이라 기대되는 몽골리안 저빌에 ETBF 감염 시 대장염이 유발되는 지를 연구하였다. ETBF에 감염된 몽골리안 저빌은 정상 대조군에 비해 몸무게가 급격하게 감소하였고 설사와 탈수증세를 나타내었다. 또한 대변에서는 감염 후 수일동안 지속적으로 높은 수치로 ETBF가 검출되었다. 이를 통해 몽골리안 저빌에 ETBF가 감염되며, 감염이 지속됨을 확인하였다. 감염된 몽골리안 저빌의 장을 적출, 조직학적 검사를 통하여 염증여부를 확인한 결과 장염이 유발된 소견을 관찰할 수 있었다. 특히적으로 대장과 맹장에만 염증이 유발되고 소장에는 염증이 유발되지 않음을 확인하였다. 이를 통해 몽골리안 저빌에 ETBF 감염 시 대장염이 유발됨을 알 수 있었다. 다음으로 ETBF감염에 의한 몽골리안 저빌의 대장염 발생기전을 조사하기 위해 E-Cadherin

분절 여부를 확인한 결과 사람과 마우스 연구결과와는 상이하게 ETBF감염에 의한 E-Cadherin 분절은 확인되지 않았다. 본 연구를 통해 몽골리안 저빌도 ETBF에 감염되고 그 결과 대장염이 유발한다는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 마우스에 비해 수명이 긴 몽골리안 저빌을 ETBF 연구의 동물모델로 사용할 수 있음을 제시하였고, 향후 본 동물모델 시스템을 이용하여 ETBF 만성감염과 대장암 유발관계에 관한 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심용어: ETBF, *B. fragilis* toxin, 몽골리안 저빌, 대장암, 대장염, 염증성대장질환, E-cadherin

I. 서론

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)는 *B. fragilis* 중에 장독소 (*Bacteroides fragilis* toxin)(BFT)를 분비하는 종으로 1984년 양의 설사에서 처음 분리 되었으며 그 후 1992년 사람에게서 분리 되었다(1, 2). ETBF는 대장 내 상주균으로서 일부(10 - 30 %) 정상인에서도 검출된다(2). 특정 상황에서 사람과 동물에 대장염 (colitis)을 유발하는 것으로 알려져 있으며 설사를 동반한다(19, 20). 정상인에 비해 대장암과 활동성 염증성대장질환 (inflammatory bowel disease)(IBD) 환자에서 ETBF의 검출빈도가 높다는 보고가 있어(3, 4, 5), ETBF 감염이 염증성대장질환 발병과 연관성이 있다는 가설이 대두되고 있다(5). 현재 우리나라는 정상인의 ETBF 보유율조차 조사되어 있지 않은 상태이다.

IBD는 일종의 난치성 소화기 계통의 장 질환으로 병인과 병태생리 및 효과적인 치료는 여전히 불분명한 상태이다(33, 34). IBD는 임상에서는 흔히 복통, 설사 및 농혈 점액변이 주요한 증상이며 병변은 점막 및 점막 하층에서 주로 나타나고 병리학적으로 볼 때 궤양이 형성되고 농양돌기가 되고 작은 혈관염증, 배상세포의 감소 및 각종 유형의 염증 세포가 생성되는 비특이성 증상이 있다. 특히 궤양이 형성된 후 IBD

환자의 13% 정도가 대장암으로 진행되는 것으로 보고되고 있다(35, 38).

World Health Organization (WHO) 에서 암을 일으키는 세균으로 지정한 *Helicobacter pylori* 는 전세계적으로 인구의 50%가 감염 되어 있으며 감염 인구의 일부가 위염을 앓고, 위염환자의 일부가 위암으로 발전한다(7, 8). 이와 비슷하게 ETBF 보유자의 일부가 대장염을 앓고, 장기간 대장염 이 지속된 환자의 일부에서 대장암이 발생할 가능성이 있다고 사료된다.

염증은 외부로부터의 자극에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 조직변질, 순환장애와 조직증식의 세 가지를 병발하는 생체의 변화이다(36,37). 생체에서 염증반응이 개시되면 다양한 염증매개물질들이 생성되어 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다(36). 선천면역(innate immunity)은 박테리아나 바이러스 감염, 스트레스에 대해 방어 할 수 있도록 다양하고 효과적인 작용기전을 통하여 빠르게 활성화 되는 고전적 숙주방어이다. 그러나 지속적이며 과도한 면역반응은 조직손상을 촉진하여 일부에서는 패혈증과 만성염증을 유도한다(37). 염증반응에 핵심적인 역할을 담당하고 있는 대식세포(macrophage)는 선천면역뿐만 아니라 적응면역(adaptive immunity)등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(38). 대식세포는 내독소, mitogen,

virus 등에 의해서 활성화 된다(40). 또한 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 외부의 자극에 의해 염증반응을 조절하는 핵심적인 전사인자를 활성화 시키며, 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 등과 같은 효소를 발현시켜 nitric oxide (NO), prostaglandin (PG)E2 및 염증성 사이토카인(cytokine) 등의 염증매개물질들을 생성한다(39, 40). 이러한 염증매개물질들은 감염초기에 세균을 죽이거나 종양을 제거시키는 역할을 담당하지만, 염증매개물질들의 과도한 형성은 만성염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(41). 감염과 연관된 염증 과정들은 그 영향을 받는 종양 형성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 인간에서 만성 간염 (hepatitis B virus 이나 hepatitis C virus)은 간암을 유도하고 만성 *Helicobacter pylori* 감염은 위암의 발생과 연관되어 있다고 알려져 있다(9, 18). 역학조사에 의하면 정상인에서 ETBF가 12% 검출된 것에 비해 장암환자에서 38%로 더 높게 검출된다는 보고도 있다(6). 또한 대장에 기생하는 세균들은 염증반응들이 상피세포의 항상성을 파괴하기 때문에 대장암에서 감염과 염증 과정들은 연구의 상당한 관심의 대상이 되고 있는 가운데(11) ETBF가 인간의 장 조직에 영향을 미쳐 작게는 장염에서 크게는 장암 발병에 관여할 가능성이

제기되고 있어서 ETBF가 장조직에 어떠한 기작을 통하여 영향을 미쳐 대장염을 유발하는지, 또한 이렇게 유발된 염증이 지속되어 일부는 장암으로까지 발달하는 기전을 연구하는 것은 중요하다고 사료된다.

BFT는 ETBF가 분비하는 독성인자로 2가 양이온과 결합하는 histidine 3개가 배열되어 있는 20 kDa 크기의 metalloprotease 이다(13, 21, 22). BFT는 3가지의 isoforms (*bft-1*, *bft-2*, *bft-3*) 을 갖으며 3가지의 isoform 모두 유사한 생물학적 활성을 나타낸다(12, 13, 14). BFT의 crystal structure을 분석해 본 결과 BFT는 사람의 metalloprotease와 구조적으로 가장 유사하고 미생물세계에서는 유사한 protease가 없다(15). BFT는 in vitro와 in vivo에서 항상 분비되는 독소로서 인접한 장상피세포간의 결속을 유지시키는 세포결합단백질의 하나인 E-cadherin의 분해를 유도하여 (23, 24, 31) 상피세포층에 손상을 야기한다는 가설과 장상피세포 (intestinal epithelial cell) 막에 존재하는 수용체와 결합하여 장상피세포 내단백분해효소를 활성화하여 E-cadherin의 분해를 유도하여 상피세포층의 손상을 유발하여 대장염을 발병 시킨다는 두 개의 가설이 있다. BFT는 β -catenin, tyrosine kinase, NF- κ B 및 MAPK를 활성화하여 interleukin-8 (IL-8) 분비를 유도하며 BFT 처리 초기에는 상피세포증식이 일어나지만 나중에는 상피세포의

자가세포사(apoptosis)가 일어난다는 보고가 있다(16, 17).

현재 국내에서 염증성 대장질환을 가진 환자가 크게 증가하는 추세이나 예방보다는 치료에 초점을 맞추고 있는 실정이다. 대장암 연구도 국내외에서 활발하게 진행되고 있으나 진단 및 치료에 높은 비중을 두고 있으며 그 예방에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 ETBF가 대장염, 대장암 유발 원인의 하나일 것 이라는 가설을 기초로 한다. C57BL/6 마우스의 경우 ETBF가 분비하는 BFT에 의해 장염을 일으킨다고 보고된 바 있다. 그러나 C57BL/6 마우스에서는 최장 16개월까지 관찰하였으나 대장암을 발견하지 못하였으나 장암모델인 Min 마우스(*APC^{+/+}*)에서는 ETBF가 용종수와 크기를 증가시켰다(25-30).

ETBF가 대장암을 일으킬 수 있는지 알아보기 위해 몽골리안 저빌에 ETBF를 접종하였다. 몽골리안 저빌은 마우스에서 발병하지 않는 *Helicobacter pylori*에 의한 위암의 바로 전단계인 위축성 위염을 일으키는 동물이기 때문에 마우스에서 확인 할 수 없었던 대장암을 확인 할 수도 있을 것이라는 예상하에 몽골리안 저빌을 선택 하였고 몽골리안 저빌에 ETBF를 접종하여 몽골리안 저빌의 ETBF 감염여부와 감염기전에 대해 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 ETBF의 감염

실험 동물은 Central Lab Animals (Seoul, Korea)에서 구입한 몽골리안 저빌(1년령, 암컷)을 사용하였다. 사육에 필요한 사료와 깔짚, cage는 모두 멸균처리하여 사용하였으며, 23℃, 습도 55%, 12시간 간격으로 소등과 암전이 되는 환경에서 멸균된 공기가 공급되도록 사육하였고 시판되는 rat diet (Central Lab Animals)과 멸균된 물을 자유롭게 섭취하도록 공급하였다. 본 연구에는 돼지에서 분리된 ETBF strain 86-5443-2-2(*bft-2*)를 사용했다(31). ETBF는 37℃, 혐기성 상태에서 vitamin K (0.5 ug/ml), hemin (5 ug/ml), clindamycin (6 ug/ml), gentamicin (50 ug/ml)이 첨가된 brain heart infusion broth에 배양했다(13, 14). ETBF 접종 일주일 전, 멸균된 물(500 ml)에 항생제 clindamycin (50 ug/ml), gentamicin (150 ug/ml)을 공급하였다. 저빌에 ETBF 5×10^9 colony forming units (CFU)를 구강으로 투여하였다. ETBF를 접종한 저빌과 ETBF를 접종하지 않은 저빌을 구분하여 cage에 넣어 사육하였으며 매일 저빌의 무게와 상태를 관찰하였다.

2. 대변 내 ETBF의 감염 측정

저빌을 빈 cage에 잠시 분리해 두어 대변을 얻었다. 대변은 1.5 ml tube에 받아 무게를 측정하였다. Fecal pellet에 500 ul의 phosphate-buffered saline (PBS)을 첨가한 후 pestle을 이용하여 갈아주고, vortex 한 후 PBS로 계대희석하여 vitamin K (0.5 ug/ml), hemin (5 ug/ml), clindamycin (6 ug/ml), gentamicin (50 ug/ml)이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) plate (Research Products International Corp, USA)에 접종하였다. 대변을 접종한 plate는 anaerobic jar에 넣어 37℃ incubator에서 48시간 배양하여 대변 내의 ETBF의 CFU를 측정하였다.

3. 해부

밀폐된 상자에 저빌을 넣고 CO₂를 주입하여 질식사 시켰다. 저빌을 배를 보이게 눕히고, 핀으로 각 다리를 펼쳐놓은 상태로 고정 한 후, 70% alcohol을 뿌려 털이 날리지 않게 적셔주었다. 표피를 항문 쪽에서부터 목까지 가른 후, 내피를 항문 쪽에서부터 목까지 가르고 위에서부터 항문까지의 소화기관을

조심해서 드러냈다. 소장을 차가운 saline으로 3회 세척한 후, proximal, middle, distal으로 구분하여 3등분하였다. 대장도 차가운 saline으로 3회 세척한 후, proximal, middle, distal으로 구분하여 3등분하고 다시 2 등분하여 위에 가까운 윗쪽은 cassette에 넣어 10% formalin에 담가 고정했다. 다른 한쪽은 1.5 ml tube에 넣어 -80℃ 에 보관했다. 맹장 (cecum)은 차가운 saline으로 3회 세척한 후, 2등분하여 반은 1.5 ml tube에 -80℃ 에 보관하고 나머지 부분은 cassette에 넣어 10% formalin에 담가 고정했다.

4. 대장 조직의 lysates 준비

대장 조직을 protease inhibitor cocktail (Calbiochem, USA)이 포함된 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Millipore, USA) 300 µl로 잘 으갠 후, ice에서 30 분간 lysis 했다. 그 후 lysates를 14,000 rpm, 4℃ 에서 20 분간 원심분리하고 NanoQuant spectrophotometer (TECAN, Switzerland) 으로 lysate의 단백질을 정량했다.

5. Western blot 분석

Protein (7.5 ug)에 total volume 10 ul가 되게 lysates을 5× SDS-PAGE loading buffer [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 2.5% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue] 에 혼합한 후 각 well에 10% SDS-PAGE gel [1.0 mm, separating gel 10%, stacking gel 3.7%, 10 well]에서 120V로 1시간 30분간 전기영동했다. 그 후 단백질을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)로 70V로 1 시간 transfer하고 transfer된 nitrocellulose membrane 를 5% skim milk (Becton-Dickinson, USA)에서 1시간 동안 blocking 한 후 primary Ab (Table 1)를 5% skim milk로 1:1000 희석하여 4℃에서 12시간 반응시키고 PBST [PBS, Tween-20 05%(v/v)]에 5분간 3회 washing 하였다. Secondary Ab를 후 5% skim milk로 1:10,000로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBST에 5회 washing 하였다. Nitrocellulose membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Thermo, USA)로 반응시키고 X-ray film (Denville Scientific, USA)으로 현상하였다.

Table 1. List of primary antibodies

	Antibody	Clone	Company	Cat #
Adherens junction	Rabbit anti-E-cadherin	H-108	Santa Cruz	sc-7870
	Rat anti-mouse-E-cadherin	ECCD2	Zymed	13-1900
	Rat anti-mouse-E-Cadherin	ECCD1	Zymed	13-1800
	Mouse anti-E-cadherin	C36	BD	610182
	Mouse anti-N-cadherin	3B9	Zymed	33-3900
	Rabbit anti-pan-cadherin	-	Zymed	71-7100
Tight junction	Mouse anti-occludin	OC-3F10	Zymed	33-1500
	Rabbit anti-occludin	-	Zymed	71-1500
	Rabbit anti-claudin-5	-	Invitrogen	34-1600
Desmosomal junction	Mouse anti-desmoglein-1	27B2	Zymed	32-6000
	Mouse anti-desmoglein-2	6D8	Zymed	32-6100
	Mouse anti-desmoglein-3	5G11	Zymed	32-6300

6. 대장 조직의 H&E 염색

10% formalin에 고정 한 조직을 수돗물에 약 4시간 가량 충분히 수세 한 후 ethanol 70%, 90%, 95%, 100% 순으로 각각 1시간 탈수를 진행하고 100% ethanol에서 1시간 30분간 2회 담귀 탈수하였다. Xylene에 1시간 30분간 2회 담귀 투명과정을 진행하였다. Paraffin을 침투시켜 포매하고 5 um 두께로 박절하였다. Xylene에 3분간 2회 담근 후, ethanol 100%, 95%, 95%, 80% 순으로 각각 15회 침전한 후, 수돗물에 수세하고 Harris hematoxylin에 2분간 염색한 후, 수돗물에 2회 수세하고 1% HCl-alcohol에 2회 침전하였다. 수돗물에 2회 수세하고 eosin에 1분간 염색한 후, ethanol 95%, 95%, 100%, 100%, 100% 순으로 각각 15회 침전하고 ethanol-xylene에 15회, xylene에 15회씩 2회 침적하고 봉입하였다.

III. 결과

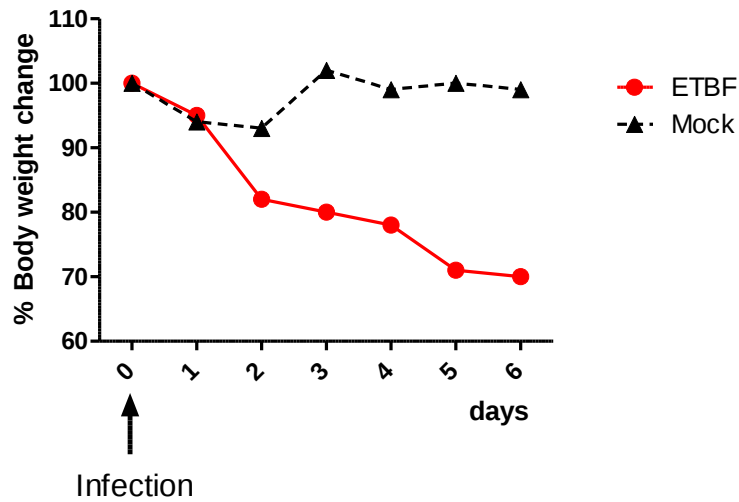
1. 몽골리안 저빌 장내의 ETBF 감염

ETBF가 저빌의 장내에서 증식할 수 있는지 알아보기 위해서 ETBF 접종 후 저빌의 대변을 PBS로 계대희석하여 BHIA plate에 접종하여 anaerobic jar에 넣어 37℃ incubator에서 48시간 배양하였다. 몽골리안 저빌에 clindamycin, gentamicin을 멸균 증류수를 통해 공급하였고 BHIA plate 내에도 clindamycin, gentamicin이 포함되어 있어 저빌의 대변 내의 ETBF만 선택적으로 배양하여 CFU를 측정했다. ETBF를 접종한 몽골리안 저빌 모두 대변 내에 ETBF가 5×10^9 - 6×10^{10} CFU/gram stool로 검출되었다(Figure 1). ETBF를 접종하지 않은 몽골리안 저빌에서는 ETBF가 검출되지 않았다. 이 실험을 통해 ETBF가 몽골리안 저빌을 감염시킬 수 있다는 것을 최초로 확인하였다.

2. ETBF 접종에 의한 몽골리안 저빌의 몸무게 변화

ETBF를 접종한 저빌의 경우 접종 후 2일 후부터 무기력하며 움직임이 감소하고 웅크린 자세를 취하고 있었다. 대변은 축축하고 항문은 젖어 있었으며 설사를 하였다. ETBF를 접종한 저빌의 무게는 접종 후 일시적으로 감소하였고 PBS만 접종한 저빌(MOCK)의 경우 6일 내내 항상 건강한 활동성을 보였고 무게 감소를 보였다 (Figure 2a). ETBF를 접종한 저빌의 경우 접종 6일 후에 맹장의 크기가 MOCK 저빌의 맹장의 크기보다 작았다(Figure 2b).

(a)



(b)



Figure 2. Body weight change and intestinal morphology in gerbils inoculated with ETBF (5×10^9 CFU) for 6 days.

(a) Body weight change. The daily body weight of individual gerbils was normalized to the starting body weight. N=5, mock. N=7, ETBF. (b) Gross morphology of the intestine. S:stomach, Si:small intestine, C:cecum, Li:large intestine, R:rectum. Scale bars, 1 cm.

3. ETBF 접종에 의한 몽골리안 저빌의 장염 발생

ETBF를 저빌에 접종하였을 경우 저빌의 대장 내부에서 ETBF 감염에 의해 염증을 일으키는지 알아보기 위해서 저빌을 해부하여, 맹장과 대장, 소장을 분리했다. 분리한 대장과 소장을 proximal, middle, distal으로 등분하여 대장의 등분된 proximal, middle, distal부분과 소장의 등분된 distal 부분을 H&E 염색을 하여 광학현미경을 이용하여 40배율, 100배율, 400배율로 관찰하였다. ETBF를 접종한 몽골리안 저빌에서는 MOCK 저빌에 비해 맹장과 대장의 모든 부분에서 염증을 관찰 할 수 있었다. 그러나 소장에서는 염증을 관찰 할 수 없었다(Figure 3).

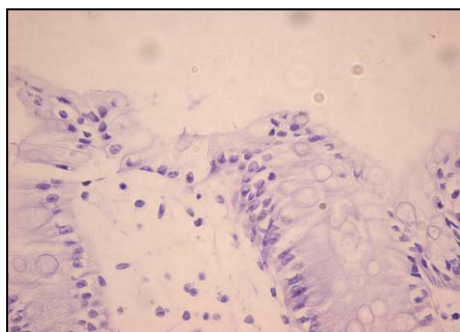
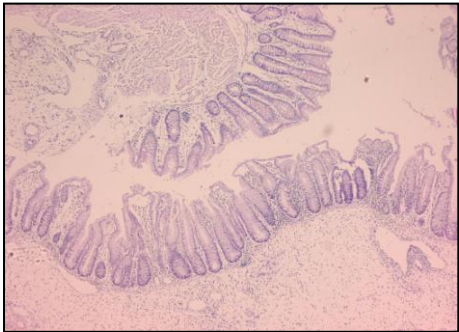
(a)

X40

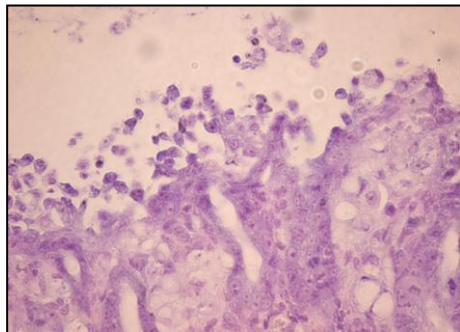
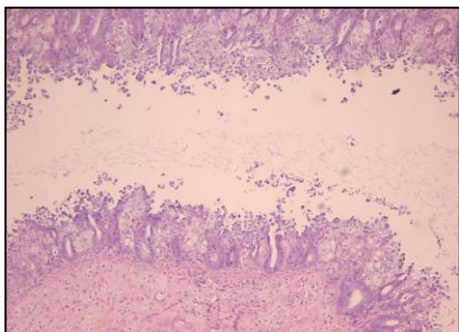
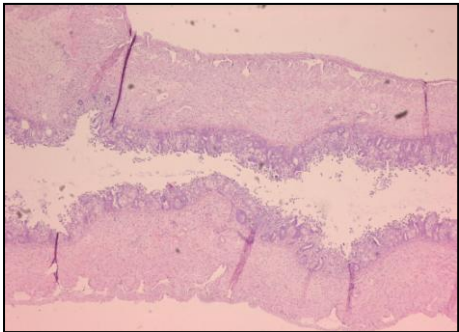
X100

X400

MOCK



ETBF



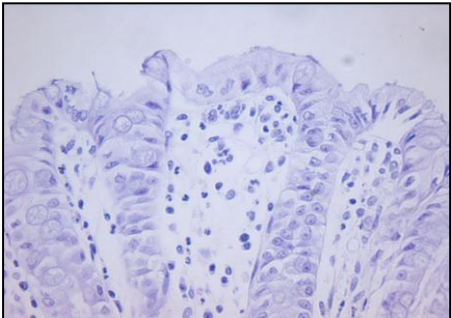
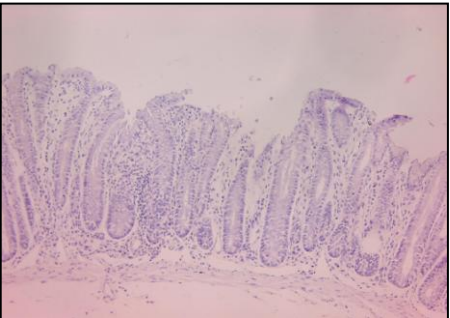
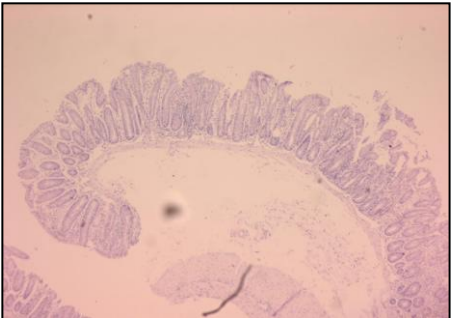
(b)

X40

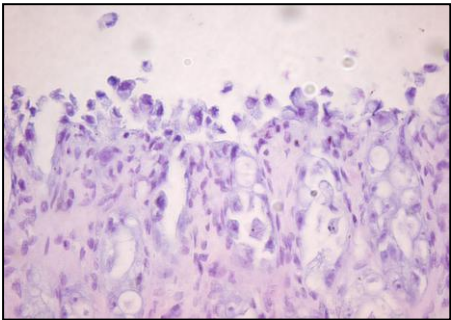
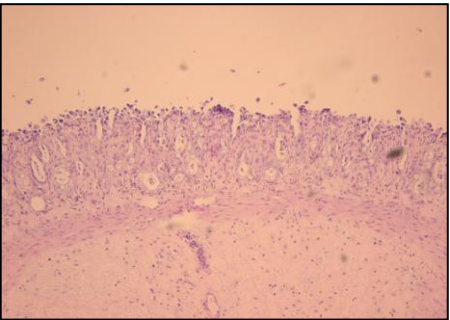
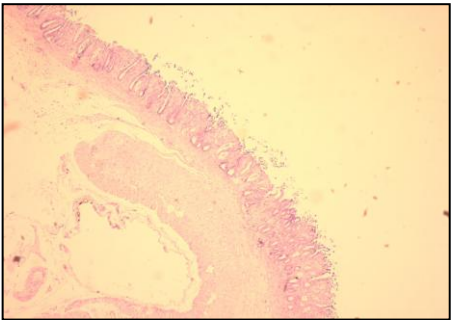
X100

X400

MOCK



ETBF



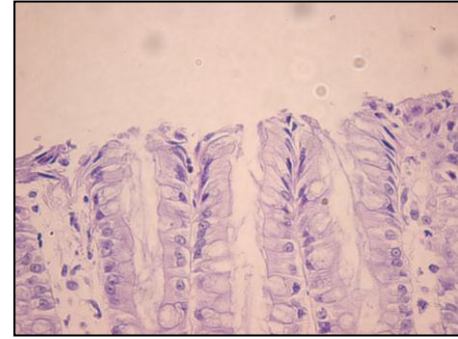
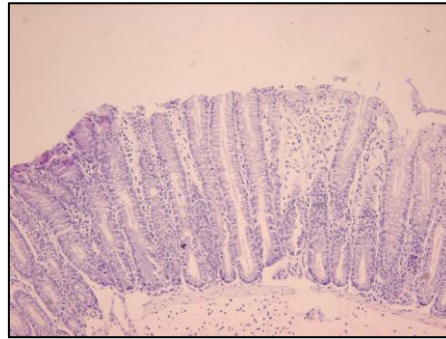
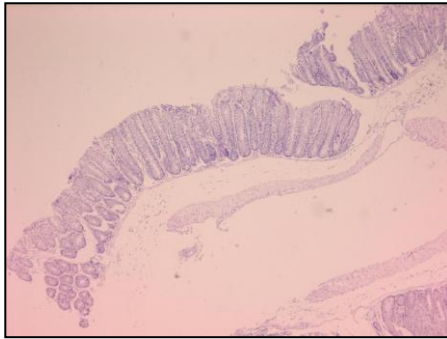
(c)

X40

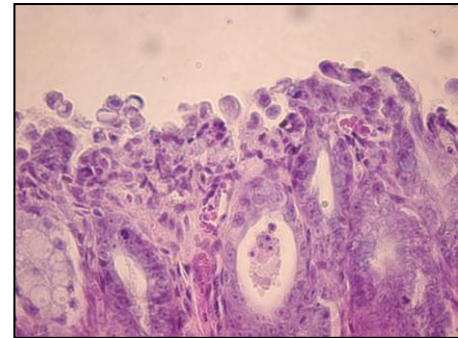
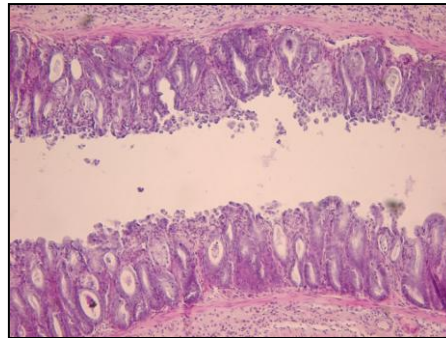
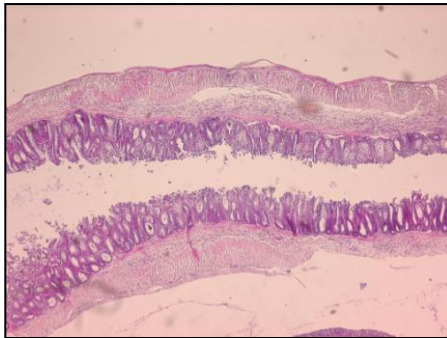
X100

X400

MOCK



ETBF



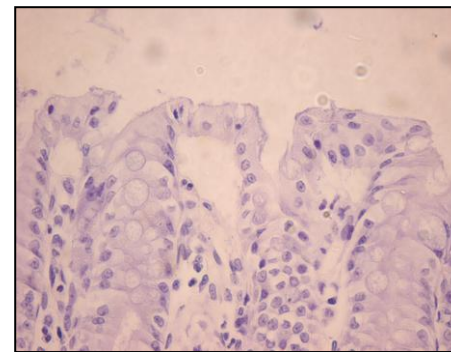
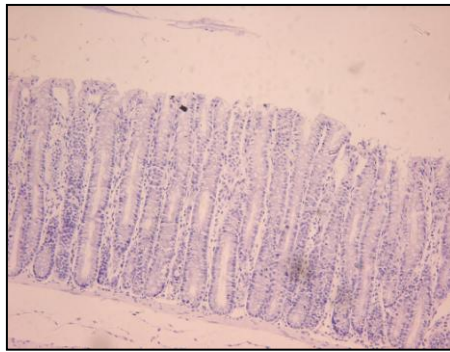
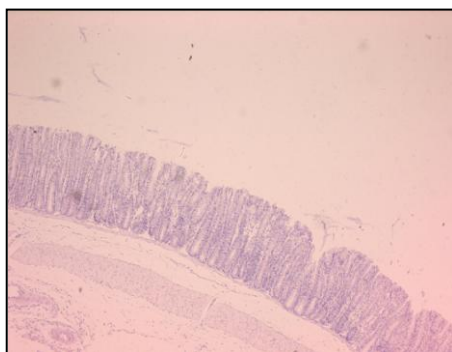
(d)

X40

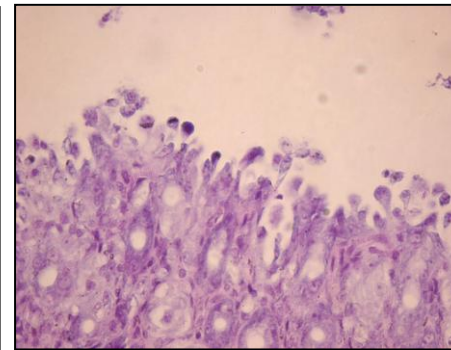
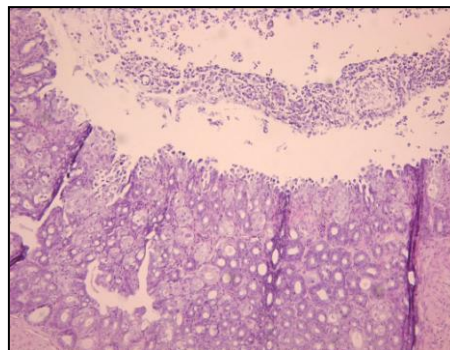
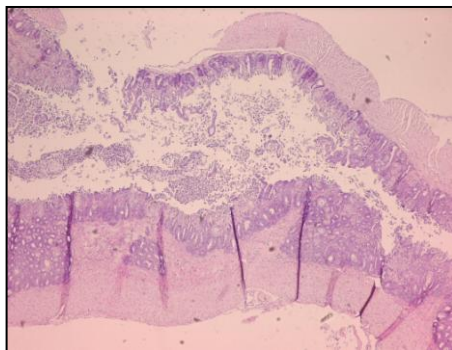
X100

X400

MOCK



ETBF



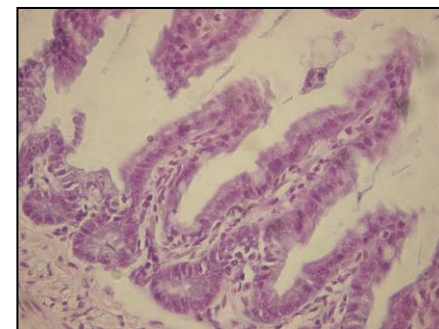
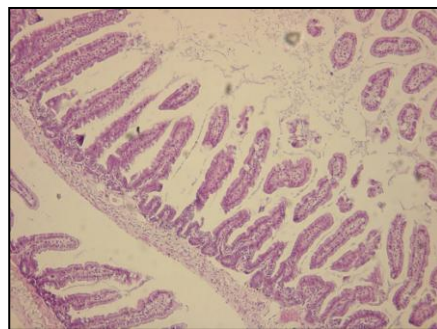
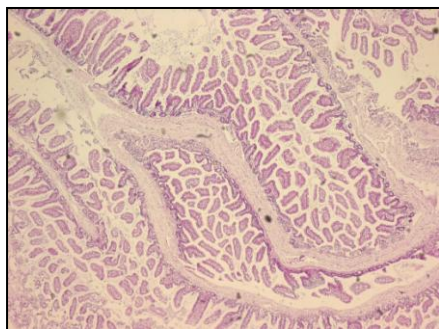
(e)

X40

X100

X400

MOCK



ETBF

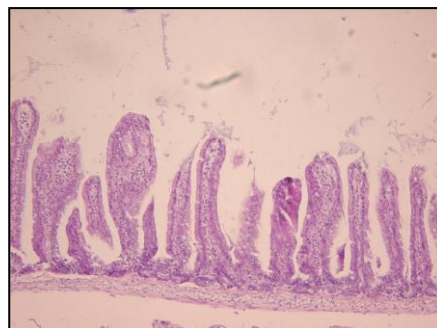
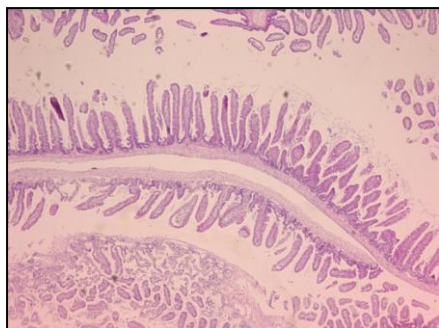


Figure 3. Histological evaluation of colitis induced by ETBF.

Histopathology was examined by H&E staining. H&E-stained tissue sections of mock- and ETBF-infected gerbils for 6 days post-infection. (a) cecum (b) distal colon (c) middle colon (d) proximal colon (e) distal small intestine. Magnification (x40, x100, x400)

4. 몽골리안 저빌 실험에서 ETBF에 의한 E-cadherin의 분절 여부

ETBF는 사람과 마우스에서 E-cadherin을 분절시켜 장염을 야기시킨다고 알려져 있다(17). 몽골리안 저빌에서도 염증이 일어난 기전이 마우스와 사람에서와 같이 E-cadherin의 분절에 의한 것인지 알아보기 위해 Western blot을 통해 E-cadherin을 검출하였다. ETBF 접종 후, 6일 후에 distal colon과 middle colon의 상피세포층에서 E-cadherin (~120 kDa)을 western blot을 통해 확인해 본 결과 E-cadherin가 분절되지 않았고 ETBF를 접종한 저빌과 MOCK 저빌에서의 차이가 발견되지 않았다 (Figure 4). 그러므로 사람과 마우스에서는 달리 ETBF가 저빌의 E-cadherin을 분절하지 않고 다른 기작으로 인해 장염을 일으킨다고 사료 된다.

A)

B)

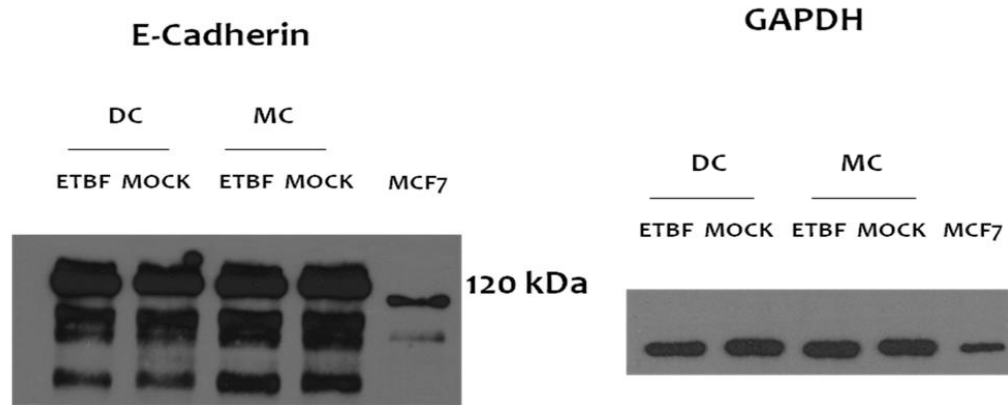


Figure 4. Western blot analysis of E-cadherin in ETBF-infected gerbils.

Epithelial cell lysates from distal colon (DC) and middle colon (MC) of Mock-infected or ETBF-infected gerbils were examined for A) E-cadherin and B) GAPDH expression. MCF7 (human breast cell line) was used as a control for E-cadherin expression.

5. 장상피세포 epithelial cell junction 단백질 분석

저빌의 경우 E-cadherin이 분절되지 않은 것으로 보아 adherens junction의 E-cadherin 이외의 다른 junction의 단백질에 의한 기작에 의해 염증이 일어나는 것으로 예상하였다. 따라서 몽골리안 저빌에서 염증이 일어난 기전을 알아보기 위해 각 junction의 단백질을 Western blot을 통해 검출하였다(10). Occludin과 claudin은 tight junction을 형성하는 단백질이며 desmoglein은 desmosomal junction을 형성하는 단백질이다. ETBF infection의해 이러한 단백질이 분절되는지 확인하였다. 그러나 본 실험에서 사용된 항체는 몽골리안 저빌에 cross reactivity가 없어 단백질 자체가 검출되지 않았다(Table 2). 그러므로 분절 여부를 확인 할 수 없었다.

Table 2. Western blot analysis of junctional proteins

	Antibody	Clone	Size (kDa)	Detection
Adherens junction	Rabbit anti-E-cadherin	H-108	120	X
	Rat anti-Mouse-E-cadherin	ECCD2	120	X
	Rat anti-Mouse-E-Cadherin	ECCD1	120	X
	Mouse anti-E-cadherin	C36	120	0
	Mouse anti-N-cadherin	3B9	–	X
Tight junction	Mouse anti-occludin	OC-3F10	220	X
	Rabbit anti-occludin	–	220	X
	Rabbit anti-claudin-5	–	22-65	X
Desmosomal junction	Mouse anti-desmoglein-1	27B2	165	X
	Mouse anti-desmoglein-2	6D8	165	X
	Mouse anti-desmoglein-3	5G11	140	X

IV. 고찰

ETBF는 대장 내 상주 균으로서 일부(10 - 30 %) 정상인에서도 검출된다(2). 특정 상황에서 사람과 동물에 대장염 (colitis)을 유발하는 것으로 알려져 있으며 설사를 동반한다(19, 20). 정상인에 비해 대장암과 활동성 염증성대장질환 (IBD) 환자에서 ETBF의 검출빈도가 높다는 보고가 있어(3, 4, 5), ETBF 감염이 염증성대장질환 발병과 연관성이 있다는 가설이 대두되고 있다(5).

이미 마우스 실험을 통해 ETBF의 장독소인 BFT가 E-cadherin을 분절함으로서 대장염을 유도 한다고 보고된 바 있다(17). 하지만 C57BL/6 마우스 실험을 통해서도 ETBF가 대장암을 유발하지는 않았다(17). 본 연구자는 ETBF가 대장암을 유발하는지 알아보기 위해 몽골리안 저빌에 ETBF를 접종하여 몽골리안 저빌에서의 ETBF 감염여부와 감염기전에 대해 연구하고자 하였다.

ETBF가 감염 되었는지를 알아보기 위해 저빌에서 대변을 얻어 대변 내 ETBF의 CFU를 측정한 결과 ETBF를 접종한 몽골리안 저빌에서는 대변 내에 ETBF가 5×10^9 - 6×10^{10} CFU로 일정하게 유지 되었고 ETBF를 접종하지 않은 MOCK-저빌의 대변에서는 ETBF가 검출되지 않았다. 따라서 몽골리안 저빌에 ETBF가

감염된다는 것을 알 수 있었다. 장염이 발병하면 설사와 함께 몸무게의 감소가 일어나게 된다. ETBF를 접종한 몽골리안 저빌은 관찰 기간 동안 설사를 하였고 무게 또한 접종 후 지속적으로 감소 하였고 MOCK-저빌의 경우 6일 내내 항상 건강한 활동성을 보였고 일시적인 무게 감소를 보였다. 마우스의 경우 ETBF 대변내의 수는 유지 됨에도 불구하고 체중은 감소됐다가 다시 회복 되는 양상을 보였다(13). 마우스에서 이토록 체중이 감소되었다가 다시 회복되는 이유는 두 가지를 예상하는데 한가지는 항체에 의해 중화되거나 BFT의 분비량이 감소되는 것을 예상한다. ETBF에 의한 장염의 발병을 알아보기 위해 몽골리안 저빌의 맹장과 대장을 H&E 염색 하여 본 결과 ETBF를 접종한 몽골리안 저빌 맹장과 대장에서 염증을 관찰 할 수 있었고 ETBF를 접종하지 않은 몽골리안 저빌에서는 염증이 관찰 되지 않았다. 이로써 ETBF는 몽골리안 저빌에서 장염을 일으킨다는 것을 알 수 있었다.

ETBF를 접종한 저빌이 결국 모두 죽었다. 마우스의 경우는 생존률이 높았지만 저빌이 죽은 이유는 마우스에 접종한 ETBF의 양보다 저빌에 접종한 양이 너무 많았던 것일 수도 있고 또는 저빌이 마우스 보다 ETBF에 더 예민하게 반응해서일 수도 있다. 예를 들어 패혈증을 유발하거나 쇼크로 인해서 혹은 설사에 의한 탈수에 의해서 발생 할 수도 있을 것으로 예상된다. 또한

ETBF를 접종한 저빌이 모두 죽은 것과 체중의 지속적인 감소는 어떠한 상관 관계가 있을 것으로 추측한다.

ETBF의 장독소인 BFT는 *in vivo*와 *in vitro* 에서 항상 분비되는 독소로서 장상피세포 막에 존재하는 수용체와 결합하여 장상피세포내 단백분해효소를 활성화하여 세포결합단백질의 하나인 E-cadherin을 분절을 유도하여 상피세포층에 손상을 야기함으로써 장염을 유발한다는 가설이 있다. 이미 보고된 바에 의하면 마우스와 사람의 경우 BFT에 의해 E-cadherin 이 분절되고 장염이 유발된다는 보고가 있다(13). 하지만 몽골리안 저빌의 경우 장염은 일어났으나 western blot 결과로 보았을 때 E-cadherin이 분절되지 않았다. 따라서 몽골리안 저빌의 경우 E-cadherin 이외의 다른 단백질의 분절에 의해 장염이 발병된다고 예상하였다. BFT가 몽골리안 저빌에서 장염을 유발시키는 기전을 알아보기 위해 tight junction에 존재하는 occluding, claudin-5 그리고 desmosomal junction에 존재하는 desmoglein-1, -2, -3가 분절되는지 western blot을 통해 확인했다. 그러나 항체가 cross reactivity가 없어 단백질 자체가 검출되지 않았다. 그래서 BFT가 저빌의 tight junction과 desmosomal junction에 영향을 주는지는 확인하지 못했다.

비록 이번 실험을 통해 저빌에서 대장암의 발생은 보지 못하였지만 저빌 또한 마우스와 같이 ETBF 접종에 의해 장염이

발생한다는 것을 알 수 있었으며 장염을 유발하는 기전은
마우스와 다를 수 있다는 것을 알 수 있었다. 추후에는 저빌에
접종한 ETBF의 CFU을 줄이거나 BFT-2 이외에 BFT-1, BFT-3를
분비하는 ETBF를 접종해 보는 것도 좋을 것 같다. 무엇보다도
저빌의 특이성이 있는 Ab의 수급이 시급하다.

V. 결론

이번 실험을 통해 저빌도 ETBF에 감염되고 장염이 발병한다는 것을 알 수 있었다. 앞으로는 저빌에서 ETBF가 장염을 일으킬 수 있는지에 대한 연구를 위해 저빌에서 ETBF가 장기간 감염상태를 유지 할 수 있도록 할 필요가 있다.

참고 문헌

1. Sears CL. 2001. The toxins of *Bacteroides fragilis*. Toxicon 39:1737-1746.
2. Sack RB, Myers LL, Almeida-Hill J, Shoop DS, Bradbury WC, Reid R, Santosham M. 1992. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic studies of its role as a human diarrhoeal pathogen. J. Diarrhoeal Dis. Res. 10:4-9.
3. Coyne MJ, Kalka-Moll W, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. 2000. *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. Infect. Immun. 68:6176-6181.
4. Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. 2004. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? Dig. Dis. Sci. 49:1425-1432.
5. Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell NC, Silva J Jr. 2000. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. Emerg. Infect. Dis. 6:171-174.
6. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T,

- Soyletir T. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. Clin. Microbiol. Infect. 12:782-786.
7. Cover TL, Blank MJ. 2009. *Hericobabacter pylori* in health and disease. Gastroenterol. 136:1863-1873.
 8. Suerbaum S, Michetti P. 2002. *Hericobacter pylori* infection. N. Engl. J. Med. 347:1175-1186.
 9. El-Serag HB, Rudolph KL. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecularcarcinogenesis. Gastroenterology 132:2557-2576.
 10. Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N. Am. J. Med. Sci. 4:429-434.
 11. Cho JH. 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nat. Rev. Immunol. 8:458-466.
 12. Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, Sears CL. 1999. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. Infect. Immun. 67:4945-4949.
 13. Franco AA, Mundy LM, Trucksis M, Wu S, Kaper JB, and Sears CL. 1997. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. Infect. Immun. 65:1007-1013.

14. Kling JJ, Wright RL, Moncrief JS, Wilkins TD. 1997. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. FEMS Microbiol. Lett. 146:279-284.
15. Goulas T, Arolas JL, Gomis-Rüth FX. 2011. Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:1856-61.
16. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. 2003. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. Gastroenterology 124:392-400.
17. Rhee KJ, Wu S. 2009. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. Infect. Immun. 77:1708-1718.
18. El-Serag HB, Rudolph KL. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology 132:2557-2576.
19. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faruque AS, Salam MA, Shin J, Hecht D, Weintraub A, Sack RB, Qadri F. 2008. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. Clin. Infect. Dis. 47:797-803.
20. Myers LL, Shoop DS. 1987. Association of enterotoxigenic

- Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs. Am. J. Vet. Res. 48:774-775.
21. Moncrief JS, Obiso R Jr, Barroso LA, Kling JJ, Wright RL, Van Tassell RL, Lyerly DM, Wilkins TD. 1995. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. Infect. Immun. 63:175-181.
 22. Vines RR, Perdue SS, Moncrief JS, Sentz DR, Barroso LA, Wright RL, Wilkins TD. 2000. Fragilysin, the enterotoxin from *Bacteroides fragilis*, enhances the serum antibody response to antigen co-administered by the intranasal route. Vaccine 19:655-660.
 23. Chambers FG, Koshy SS, Saidi RF, Clark DP, Moore RD, Sears CL. 1997. *Bacteroides fragilis* toxin exhibits polar activity on monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) in vitro. Infect. Immun. 65:3561-3570.
 24. Obiso RJ Jr, Azghani AO, Wilkins TD. 1997. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. Infect. Immun. 65:1431-1439.
 25. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. Immunol. Rev. 206:260-276.

26. Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL. 2007. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13:1475-1483.
27. Lu Z, Yuan L, Zhou X, Sotomayor E, Levitsky HI, Pardoll DM. 2000. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8 cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 191:541-550.
28. Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, Sears CL. 1999. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* 67:4945-494.
29. Luperchio SA, Schauer DB. 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect.* 3:333-340.
30. Nakano V, Gomes DA, Arantes RM, Nicoli JR, Avila- Campos MJ. 2006. Evaluation of the pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* toxin gene subtypes in gnotobiotic mice. *Curr. Microbiol.* 53:113-117.
31. Wu S, Lim KC, Huang J, Sadidi RF, Sears CL. 1998. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:14979-14984.
32. Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T,

- Soyletir G. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. Clin. Microbiol. Infect. 12:782-786
33. Andrews J, Goulston K. 1994. Inflammatory bowel disease-its history, current status and outlook. Med. J. Aust. 160:219-223.
34. Elson CO. 1996. The basis of current and future therapy for inflammatory bowel disease. Am. J. Med. 100:656-662.
35. Yuan HD. 2006. The effect of curcumin on the dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. Cancer Prevention Research 11:137-143.
36. Chen GY, Nunez G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat. Rev. Immunol.10:826-837.
37. Kohl J. 2006. Self, non-self, and danger: a complementary view. Adv. Exp. Med. Biol. 586:71-94.
38. Weitzman SA. 1990. Inflammation and cancer, role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. Blood. 76:655-663.
39. Valledor AF, Comalada M, Santamaria-Babi LF, Lloberas J, Celada A. 2010. Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. Adv. Immunol. 108:1-20.
40. Fujiwara N, Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm. Allergy. 4:281-286.

41. **Zhang X, Mosser DM.** 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214:161-178.

ABSTRACT

Evaluation of the Mongolian gerbil as an experimental animal model for Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* induced colitis.

Yim, Sejin

Department of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) is a molecular subset of *B. fragilis* which secretes an enterotoxin. ETBF infection results in colitis and diarrhea but it can also be detected in 10~30% of asymptomatic individuals. Studies in humans and mice demonstrated that the secreted enterotoxin is a 20 kDa metalloprotease which induces ectodomain cleavage of the cell-cell junctional protein, E-cadherin, resulting in colitis. Recent results from several studies have shown that ETBF was found at a higher prevalence in inflammatory bowel disease (IBD) patients and colorectal cancer patients compared to normal

individuals. In previous studies, ETBF infection of mice induced a chronic colitis but not colon cancer. It is possible that ETBF infection may have induced colon cancer if the mouse life span had been longer. In this study, I tested whether the Mongolian gerbil would be susceptible to ETBF infection. I found that ETBF infected gerbils exhibited a dramatic decrease in body weight accompanied by diarrhea and dehydration. In addition, ETBF was present in the stool for the duration of the experiment suggesting that the Mongolian gerbil was successfully colonized by ETBF. I examined the histology of the colon and found that inflammation was limited to the large intestine. However, E-cadherin cleavage was not evident in the mucosal epithelial cells of infected gerbils suggesting that a different mechanism was involved in colitis in gerbils compared to humans and mice. This study demonstrates that the Mongolian gerbil could be used as model for ETBF infection. The longer life-span of the gerbil compared to the mouse provides an appropriate model to determine the long term effects of ETBF on chronic colitis and colon cancer.

Key words : ETBF, *B. fragilis* toxin, Mongolian gerbil, colorectal cancer, inflammatory bowel disease, E-cadherin