

<원 저>

골수세포에 대한 *Bordetella bronchiseptica* 항원의 자극 효과 및 면역기억반응

임설화 · 주홍구*

제주대학교 수의과대학 수의약리학실

(접수: 2014년 6월 26일, 수정: 2014년 10월 8일, 게재승인: 2014년 10월 13일)

Stimulatory effects of *Bordetella bronchiseptica* antigen on bone marrow cells and immune memory responses

Seol-Hwa Yim, Hong-Gu Joo*

Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Received: June 26, 2014; Revised: October 8, 2014; Accepted: 13 October, 2014)

Abstract : Bone marrow is a hematological and immunological organ that provides multiple immune cells, including B lymphocytes, and thus plays a critical role in the efficacy of vaccine. We previously demonstrated that *Bordetella (B.) bronchiseptica* antigen has high immunogenicity in spleen cells, a peripheral immune organ. In this study, we investigated the immunogenicity of *B. bronchiseptica* antigen in bone marrow cells, a central immune organ. *B. bronchiseptica* antigen increased the cellular activity of bone marrow cells and significantly enhanced the production of nitric oxide, IL-6, and TNF- α . Bone marrow cells primed with *B. bronchiseptica* antigen *in vivo* were harvested and stimulated with the same antigen *in vitro*. The stimulation of *B. bronchiseptica* antigen significantly increased the cellular activity and proliferation rate of the primed cells. *B. bronchiseptica* antigen also greatly induced the production of antigen-specific antibody in the primed cells. Taken together, the present study demonstrated that *B. bronchiseptica* antigen can stimulate bone marrow cells, a central immune organ, and recall the immune response of the primed bone marrow cells.

Keywords : antigen, *Bordetella bronchiseptica*, immune memory responses, stimulatory effects, vaccine

서 론

골수는 조혈작용을 담당하는 red marrow와 지방세포로 구성된 yellow marrow로 이루어진 복합적인 구조물이다. Hematopoietic cell은 골수에서 만들어진 뒤 혈관으로 들어가 전신에 분포된다. 또한 골수는 B cell의 생산과 분화가 이루어지는 장소이다. 미성숙 B cell은 골수에서 lymphoid progenitors로부터 발생하여 분화되며, 이때 골수의 stromal cell은 B cell과 직접적으로 상호작용하고 발달에 필요한 여러 가지 cytokine을 분비한다 [8].

항원을 인식한 B cell은 여러 단계의 활성화 과정을 거쳐 memory B cell로 분화된다. 또한 항체를 생산하는 plasma cell이 되며, 이들이 분비하는 항체는 면역체계에서 중요한 역할을 수행한다. 병원성 미생물에 노출된 숙주는 항원 특이적인 항체를 일정 기간 생산하여, 병원성 미생물의 재침입 시

효율적인 방어를 할 수 있다. 이러한 면역방어기전에서 단기 및 장기 기억능력을 갖춘 memory B cell과 plasma cell이 결정적인 역할을 하게 된다. 이들 세포는 골수가 주요 저장 부위인 것으로 알려졌다 [3, 9].

*Bordetella(B.) bronchiseptica*는 돼지에서 위축성 비염을 일으키는 주된 병원체 중 하나이다. 단독으로 감염되는 경우에는 위축성 병변을 일으키지 않지만, *Haemophilus parasuis* 또는 *Pasteurella multocida*와 복합 감염되면 심각한 진행성 위축성 비염과 성장장애를 일으킨다 [4, 5]. 이 때문에 돼지 농가에서는 체중증가를 감소와 성장을 저하로 말미암은 막대한 경제적 손실을 보고 있다. 따라서 많은 연구자는 *B. bronchiseptica*를 효과적으로 예방할 수 있는 백신을 개발해 왔지만 [7], 항원 자체의 면역원성에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

본 연구팀에서는 말초 면역기관인 비장에서 *B. bron-*

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3379, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: joo@jeju.ac.kr

chiseptica 항원에 대해 일어나는 면역반응을 연구하였다 [6, 12]. 앞서 수행된 연구를 바탕으로, 이번 연구에서는 B 세포의 분화기관인 골수의 세포에서 *B. bronchiseptica* 항원에 대한 면역반응을 확인하였으며, 특히 백신 효과와 밀접한 면역기억반응에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

실험동물과 백신항원

실험동물은 제주대학교 수의약리학 실험실의 8~12주령 사이의 C57BL/6 마우스와 BALB/c 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 제주대학교 동물실험윤리 지침을 준수하여 시행되었다(승인번호 2013-0024). *B. bronchiseptica*는 (주)고려비엔피에서 사균을 공급받아 단백질 정량을 시행한 후 실험에 사용하였다.

골수세포의 준비, 배양 및 실험

골수세포는 마우스에서 분리하여 얻었다. CO₂ gas로 마우스를 안락사시킨 뒤 외과적으로 대퇴골과 경골을 적출하였다. 이들의 양측 골단을 절단하여 골수강을 노출하고, 골수강 내의 골수 조직을 phosphate buffered saline(PBS)으로 flushing 하여 채취하였다. 이 세포들을 10분간 ammonium chloride-potassium lysis buffer로 처리하여 적혈구를 제거하였다. 이후 40 µm cell strainer(BD Bioscience, USA)에 걸러 내어 골수세포를 획득하였다. 이 세포를 96-well 배양 용기에 1 × 10⁶ cells/mL의 농도로 배양하여 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해 우태아혈청 5%, 페니실린/스트렙토마이신 100 U/mL, L-glutamine 2 mM이 포함된 RPMI-1640배지를 사용하였다.

골수세포의 활성화 및 생존율의 측정

B. bronchiseptica 항원에 의한 골수세포의 활성화 정도를 측정하기 위해 세포를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma, USA) 용액을 이용하여 분석하였다. 96-well plate에 골수세포를 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 2일간 배양하였다. MTT 용액을 0.5 µg/mL 농도로 넣은 후 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 배양하고, 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 well 당 100 µL씩 넣었다. 배양기에서 2시간 더 배양하고 microplate reader(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA를 이용한 cytokine의 측정

골수세포에서 *B. bronchiseptica* 항원에 의한 cytokine 생성변화를 알아보기 위하여 ELISA를 실시하였다. 96-well plate에 골수세포를 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 3일간 배양하였다. 세포배양 상층액을 얻은 후 IL-6 Cytoset과 TNF-α Cytoset(Invitrogen, USA)을 이용하여 회사에서 제공하는 방법에 따라 cytokine 양을 측정하였다.

Nitric oxide (NO) assay

B. bronchiseptica 항원을 처리한 골수세포에서 NO의 생성변화를 알아보기 위해 NO detection kit(iNTRON, Korea)을 사용하여 NO assay를 실시하였다. 96-well plate에 골수세포를 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 2일간 배양하였다. 배양된 상층액을 분리하여 N1 buffer 50 µL/well을 섞어준 뒤 10분간 반응시키고, 다시 N2 buffer 50 µL/well을 섞어 10분간 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard로는 sodium nitrate를 0~100 µM 농도로 만들어 사용하였다.

마우스에 *B. bronchiseptica* 항원 접종

BALB/c 마우스를 사용하였으며, 대조군에는 PBS만을, 항원접종군에는 *B. bronchiseptica* 항원을 접종하였다(10 µg/mouse). 접종 후 2~4주 사이에 안락사시켜 혈청과 골수세포를 채취하여 실험에 이용하였다. 골수세포의 활성화 및 생존을 측정을 위해 앞서 제시된 방법으로 MTT assay를 진행하였다.

Carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE) cell proliferation assay

B. bronchiseptica 항원이 접종된 마우스에서 채취한 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 증식반응을 알아보고 CFSE assay를 실시하였다. 골수세포에 CFSE 용액을 5 µM 농도로 처리하였다. 이후 골수세포를 계수하여 96-well plate에 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 4일간 배양하였다. 배양된 세포를 1% paraformaldehyde 용액으로 고정된 뒤 FACSCalibur(BD Biosciences)를 이용해 분석하였다.

B. bronchiseptica 항원을 접종한 마우스의 골수세포에서 항원 특이적 IgG 생산

B. bronchiseptica 항원이 접종된 마우스에서 채취한 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 항원 특이적인 IgG의 생산 정도를 측정하였다. 96-well plate에 골수세포를 넣고 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 3일간 배양하였다. F8 Maxisorp Nunc-Immuno module(Thermo Fisher Scientific)에 *B. bronchiseptica* 항원을 5 µg/mL 농도로 4°C에서 overnight 처리하여 코팅하였다. Assay buffer I(Invitrogen)로 blocking 한 뒤, 배양 상층액을 처리하였다. 이후 goat anti mouse IgG-horseradish peroxidase, tetramethyl-benzidine 용액(SouthernBiotech, USA)을 차례로 처리하여 발색시켰다. 1 N Hydrogen chloride 용액으로 반응을 정지시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유의성 분석

대조군과 실험군에서 얻은 결과 사이의 유의차는 ANOVA 분석 후에 tukey 검정으로 유의성을 확인하였다. 대조군에 대한 실험군의 유의성은 **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001로 나타내었다.

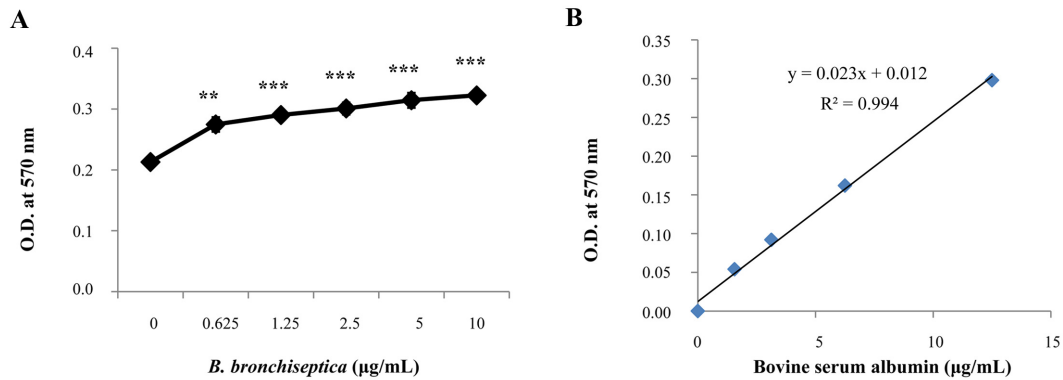


Fig. 1. Enhanced cellular activity of bone marrow cells by the treatment of *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica* antigen. The cellular activity was measured by MTT assay. Bone marrow cells were cultured in 96-well culture plates for 2 days in the presence of *B. bronchiseptica* antigen. Data are mean \pm SD from four individual wells (A). For the determination of protein amount, a standard curve made by bovine serum albumin was used for protein assay (B).

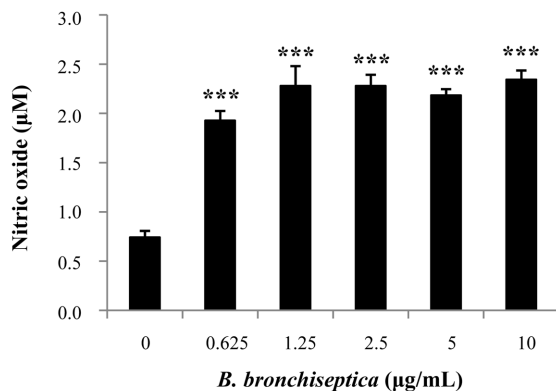


Fig. 2. *B. bronchiseptica* antigen significantly enhances the production of nitric oxide (NO). Bone marrow cells were cultured in 96-well culture plates with *B. bronchiseptica* treatment for 2 days. After then, the culture supernatants were harvested and the amounts of NO were determined. All values are represented as mean \pm SD.

결 과

*B. bronchiseptica*에 의한 골수세포의 활성화

골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 2일간 배양한 후, MTT assay를 통해 세포의 활성화 정도를 측정하였다(Fig. 1). MTT assay에서, *B. bronchiseptica* 항원에 의해 골수세포의 활성화 정도가 유의하게 증가했다.

B. bronchiseptica 항원에 의한 골수세포의 NO 생산량 변화

NO는 세포 내에 침입한 병원성 미생물을 제거하는 기능이 있어, 세포 매개성 면역을 담당하는 주된 요소 중 하나이다 [10]. *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 2일간 배양한 후, NO assay를 통해 세포배양 상층액에 있는 NO 농도를 측정하였다(Fig. 2). *B. bronchiseptica* 항원 처리에 따라 골수세

포의 NO 생산량은 유의하게 증가하였지만, 농도 의존적으로 증가하지는 않았다. 0.625 µg/mL의 항원으로도 골수세포에서 충분한 NO를 생산시키는 사실을 알 수 있었다.

B. bronchiseptica 항원 처리에 의한 골수세포의 cytokine 생산량 변화

골수세포는 다양한 종류의 cytokine을 생산하여 면역반응을 담당한다. 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 후 IL-6와 TNF- α 생산에 미치는 영향을 알아보았다. 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 3일간 배양한 후, ELISA를 통해 세포배양액의 cytokine 생산량을 측정하였다(Fig. 3). 대조군에서는 두 cytokine의 생산이 나타나지 않았으나, *B. bronchiseptica* 항원을 처리한 경우 농도 의존적으로 IL-6 및 TNF- α 의 생산량이 증가했다.

B. bronchiseptica 항원이 접종된 마우스에서 골수세포의 항원 재감작에 대한 반응

세포 활성화 및 분열 증가: PBS 또는 *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 2일간 배양한 후, MTT assay를 통해 세포의 활성화 정도를 측정하였다(Fig. 4A). 대조군보다 *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서 *B. bronchiseptica* 항원에 의해 세포의 활성화 정도가 증가했다. 특히 실험에서 가장 낮은 농도였던 1.6 ng/mL의 경우 대조군보다 항원접종군의 골수세포가 높은 세포활성도를 보였다. 하지만 골수세포 활성화도의 증가가 *B. bronchiseptica* 항원의 농도에 비례하지는 않았다. 또한 세포 단위의 분열 측정을 위해, PBS 및 *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포를 형광물질의 한 종류인 CFSE로 염색한 뒤 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 4일간 배양한 후, FACSCalibur를 이용해 분석하였다(Fig. 4B). 대조군과 비교하면 *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서 세포분열이 증가했다.

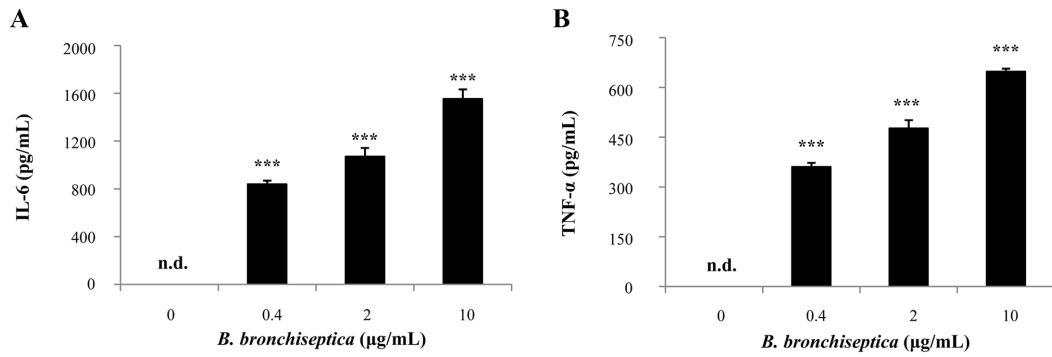


Fig. 3. *B. bronchiseptica* antigen significantly enhances the production of IL-6 and TNF- α of bone marrow cells. The cells were cultured and treated with *B. bronchiseptica* antigen for 3 days in 96-well culture plates. The culture supernatants were used for the determination of IL-6 (A) and TNF- α (B). All values are represented as mean \pm SD. n.d.: not detectable.

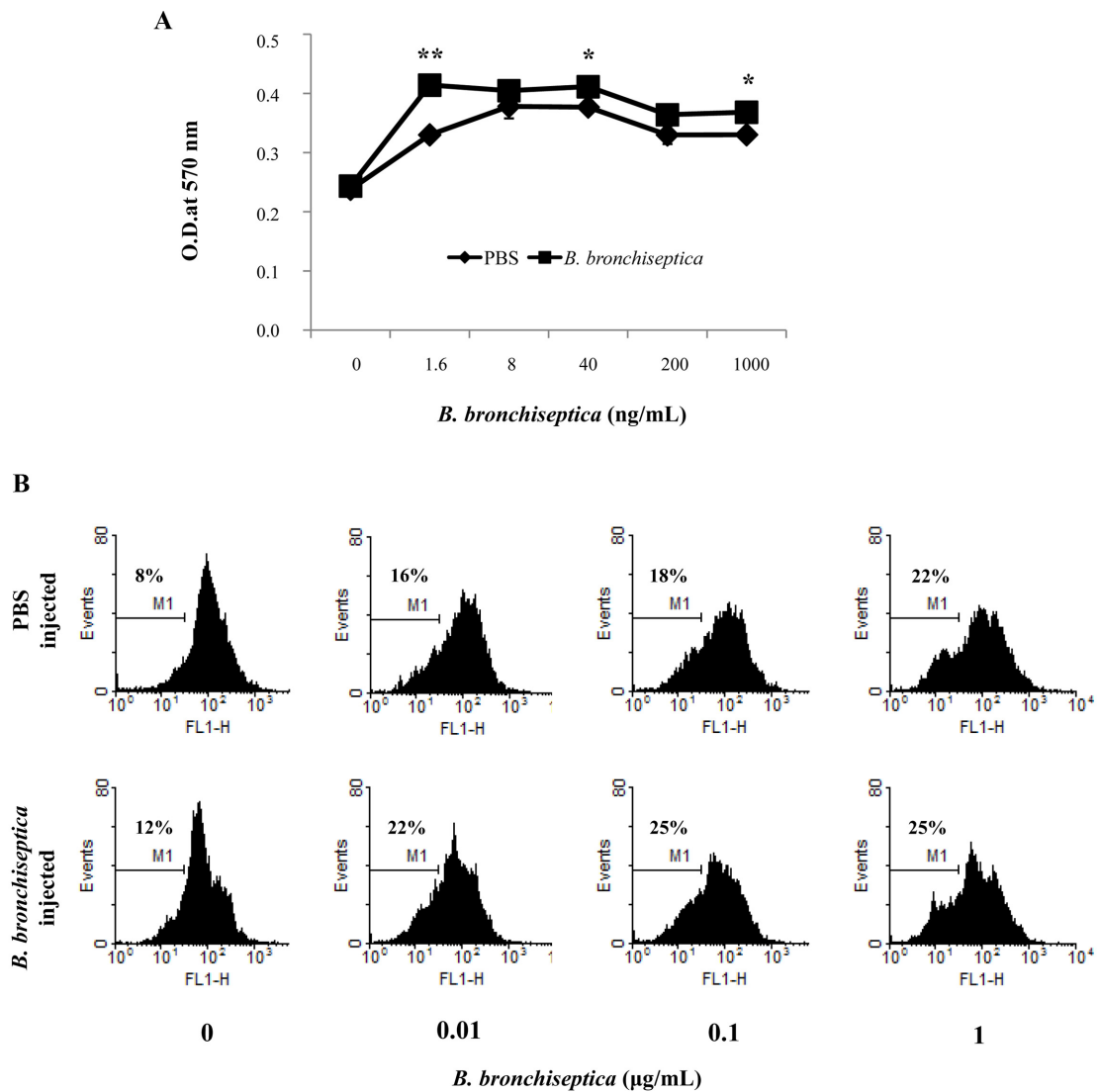


Fig. 4. Enhanced cellular activity and proliferation of the bone marrow cells primed with *B. bronchiseptica* upon the same antigen stimulation *in vitro*. The cellular activity and proliferation rate were measured by MTT assay (A) and CFSE assay (B), respectively. The cells were cultured in the presence of *B. bronchiseptica* antigen at indicated concentrations for 2 days (A) or 4 days (B). Data are mean \pm SD from four individual wells (A). The number in histogram indicates the percentage of proliferating cells with low fluorescence intensity (B).

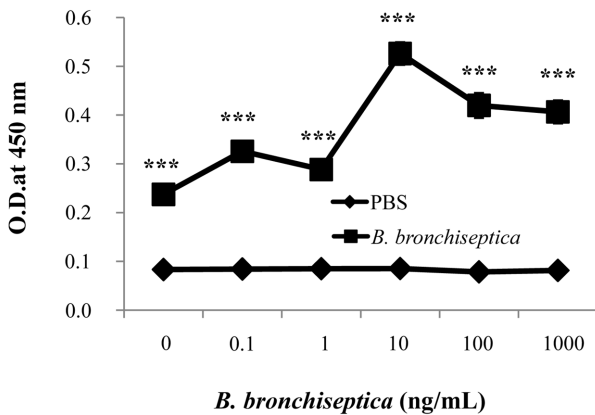


Fig. 5. Production of *B. bronchiseptica* antigen-specific IgG antibody of bone marrow cells primed with *B. bronchiseptica* antigen. Mice were injected with PBS or *B. bronchiseptica* antigen (10 μ g/mouse). After 2~4 weeks, the bone marrow cells were cultured and stimulated with the same antigen for 3 days. The culture supernatants were used for the measuring the production of *B. bronchiseptica*-specific IgG antibodies by ELISA. The antibody titer was determined with O.D. at 450 nm.

항원 특이적 항체 생산량의 증가: PBS 또는 *B. bronchiseptica* 항원을 접종한 마우스의 골수세포에 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 3일간 배양한 후, 항원 특이적인 항체 생산량을 측정하였다(Fig. 5). PBS를 접종한 대조군 마우스는 항원 특이적인 항체가 거의 측정되지 않았던 반면, *B. bronchiseptica* 항원 접종군에서는 항원 특이적인 항체의 생산량이 많게 나타났다. 특히 *B. bronchiseptica* 항원의 재감작 농도가 10 ng/mL일 때 항원 특이적 항체가 가장 많이 생산되었다.

고 찰

골수는 전반적인 면역반응을 담당하는 림프구의 초기 생산기관이며, 특히 백신의 효능을 측정하는 항체생산과 매우 밀접하다. 면역기억은 면역시스템이 동일한 항원에 재감작 되었을 때 이전보다 강력한 면역반응이 일어나게 되는 생체 방어기전이다. Memory B cell은 naive B cell이 최초 면역반응에서 생산하는 것보다 높은 역가의 항원 특이적 항체를 생산함으로써 항원을 보다 효율적으로 제거한다 [1]. 본 연구에서는 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해, *B. bronchiseptica* 항원에 의해 골수세포에서 일어나는 면역반응을 알아보았다. 먼저 *B. bronchiseptica*에 대한 골수세포의 활성화 정도를 알아보았다. MTT assay 결과 *B. bronchiseptica*는 골수세포를 활성화하는 것을 알 수 있었다.

항원에 의해 골수세포가 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 나타내는지 알아보기 위해 NO, IL-6의 생산량을 측정하였다. NO는 세포성 면역반응을 나타내는 대표적인 지표로서, 미생물이 체내에 침입하게 되면 대식세포와 호중구가

탐식된 미생물을 죽이기 위해 NO를 생산한다 [10]. NO assay에서 항원을 처리하였을 때 NO의 생산량이 증가하였다. 또한 IL-6는 체액성 면역반응을 나타내는 cytokine 중 하나이다. T cell과 대식세포 등에서 분비되며, 골수의 plasma cell의 생산과 항체 분비를 촉진하여 체액성 면역을 촉진하는 작용을 한다 [11]. ELISA 결과, 항원에 의해 농도 의존적으로 IL-6의 생산이 증가하였다. 결과적으로 *B. bronchiseptica* 항원에 의해 골수세포가 세포성 면역반응 및 체액성 면역반응을 일으키는 주요 활성 물질의 생산을 증가시키는 사실을 확인할 수 있었다.

염증성 cytokine인 TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포가 분비하며, 백신의 효능에 필수적인 면역반응을 유도한다. 항원 자체가 이러한 cytokine의 생산능력이 낮을 경우, 보조제를 함께 사용하여 그 역할을 보조한다 [2]. ELISA 결과, 항원에 의해 농도 의존적으로 TNF- α 의 생산이 증가하였다. *B. bronchiseptica* 항원으로 백신을 제조할 경우, 보조제 없이 항원 자체만으로도 충분한 백신효능을 나타낼 수 있다는 것을 예상할 수 있다.

항원이 미리 접종된 마우스에서 채취된 골수세포가 동일한 항원에 재감작 되었을 때 활성화 정도를 알아본 결과, 저농도의 항원을 처리하였을 때도 골수세포가 활성화되는 것을 알 수 있었다. 이는 *B. bronchiseptica* 백신을 접종한 경우 소량의 병원체에 노출되어도 충분한 골수 유래 면역반응을 유도할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 primed 골수세포는 항원 재감작 시 항원 특이적인 항체를 유의하게 생산하였다. 특히 10 ng/mL 부근에서 *B. bronchiseptica* 항원에 특이적인 항체를 높은 수준으로 생산하였다. 이는 항체생산에 필요한 최적의 항원농도가 있는 것을 의미한다.

결론적으로, *B. bronchiseptica* 항원은 자체적으로 골수세포를 활성화하고 면역을 유도할 수 있다. 또한 상당한 기간 숙주의 면역 기억을 유지할 수 있다는 사실을 확인했다. 이는 기존의 백신에서 사용하고 있는 보조제의 적절성과 효율성을 재고하여 새로운 *B. bronchiseptica* 백신을 개발하는데 유용한 자료가 될 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어졌습니다.

References

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. pp. 10, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2005.
2. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunol Today 1993, 14, 281-284.
3. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human

- memory B cells. *Science* 2002, **298**, 2199-2202.
4. **Chanter N, Magyar T, Rutter JM.** Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res Vet Sci* 1989, **47**, 48-53.
 5. **Horiguchi Y.** Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotic* toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012, **361**, 113-129.
 6. **Jo Y, Joo HG.** Immunostimulatory effects of *Bordetella bronchiseptica* antigen on mouse spleen cells. *J Prev Vet Med* 2013, **37**, 35-38.
 7. **Kang ML, Kang SG, Jiang HL, Guo DD, Lee DY, Rayamahji N, Seo YS, Cho CS, Yoo HS.** Chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* antigens as novel vaccine against atrophic rhinitis in pigs. *J Microbiol Biotechnol* 2008, **18**, 1179-1185.
 8. **Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA.** *Kuby Immunology*. 6th ed. pp. 42, W. H. Freeman and Company, 2007.
 9. **Lanzavecchia A, Sallusto F.** Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* 2007, **19**, 268-274.
 10. **MacMicking J, Xie Q, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997, **15**, 323-350.
 11. **Matsuda T, Yamasaki K, Taga T, Hirano T, Kishimoto T.** Current concepts of B cell modulation. *Int Rev Immunol* 1989, **5**, 97-109.
 12. **Woo SH, Moon SY, Byon YY, Joo HG.** Evaluation of the immunogenicity of *Bordetella bronchiseptica*, a vaccine antigen. *Korean J Vet Res* 2014, **54**, 75-79.