

## 쥐의 큰포식세포주에서 자가포식현상에 의한 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium의 감염 조절

이선헤<sup>1†</sup> · 김주영<sup>2†</sup> · 이효지<sup>2</sup> · 정유진<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 의료·바이오신소재융복합연구사업단

<sup>2</sup>강원대학교 자연과학대학 생명과학과

### Induced Autophagy Regulates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Infection in Murine Macrophage

Sunhye Lee<sup>1†</sup>, Ju-Young Kim<sup>2†</sup>, Hyo-Ji Lee<sup>2</sup>, and Yu-Jin Jung<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical and Bio-Materials Research Consortium, <sup>2</sup>Department of Biological Sciences,  
Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea

(Received February 6, 2014 / Accepted March 6, 2014)

Autophagy is one of the lysosomal degradation pathways to maintain cellular homeostasis. The damaged proteins or organelles are uptaken through extra- and intra-cellular stress, starvation and infected pathogens, subsequently, autophagosomes are fused with lysosomes to break down the molecules. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), intracellular bacteria, cause acute gastroenteritis and food poisoning. Given that autophagy induced by *S. Typhimurium* plays an important role in the cells to control the infection, we identify whether the induction of autophagy with rapamycin, chemical inducer of autophagy, before infection regulates *S. Typhimurium* infection. After treatment of rapamycin or 3-methyladenine (3-MA), autophagy inhibitor, RAW264.7 cells were infected with *S. Typhimurium*. Pretreatment of rapamycin decreased the growth rate of *S. Typhimurium* in the cells; otherwise, pretreatment of 3-MA increased the growth rate of *S. Typhimurium*. The expression of autophagy-related genes was significantly increased in the *S. Typhimurium*-infected cells pretreated with rapamycin. To examine whether induced autophagy by rapamycin control the infection with increase the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), antibacterial radical substrates were measured in infected cells followed by the treatment with either rapamycin or 3-MA. NO production increased in RAW264.7 cells; otherwise, ROS production remained unchanged during the infection. These findings suggest that inducing autophagy with rapamycin reveals antimicrobial activity as producing NO against *S. Typhimurium* infection in mouse macrophages.

**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium, autophagy, macrophage, rapamycin

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)는 장내세균과(Enterobacteriaceae)에 속하는 그람 음성 간균으로 편모를 가지고 있으며, 세포 내 기생세균이다(de Jong *et al.*, 2012). 사람에게 감염되는 *S. typhi*의 돌연변이인 *S. Typhimurium*은 국내에서 발병빈도가 높으며 마우스에서 사람의 장티푸스와 장열 같은 유사한 질병을 유발한다. 그 때문에 장티푸스에 관한 실험동물 모델로 연구가 활발하게 진행되고 있다(Wenkoff, 1973; Ramos-Morales, 2012; Ajene *et al.*, 2013). *S. Typhimurium*은 숙주세포 내에 침입하고 증식하기 위해 특이적인 구획을 형성하여 숙주세포의 면역반응을 피할 수 있는데, 이 특이적인 막 구조

물을 *Salmonella*-containing vacuole (SCV)라 부른다(Lindgren *et al.*, 1996). *S. Typhimurium*은 SCV 내부에 존재하다가, 숙주세포로 균의 병원성 인자를 주입시켜 숙주세포를 교란시킨다. 그 이후에는 막 구조물을 탈출하여 좀 더 효과적으로 숙주세포에서 증식할 수 있고 강력한 병원성을 나타낼 수 있다(Salcedo and Holden, 2003; Smith *et al.*, 2005; Garcia-del Portillo *et al.*, 2008).

숙주세포는 *S. Typhimurium*에 대항하여 세포사멸 기전을 유도한다. 세포 예정사(programmed cell death, PCD)는 크게 두 가지 유형으로 나뉘어진다. 세포질, 염색체의 응축, DNA 분절화 등의 현상이 나타나는 세포자멸사(apoptosis)는 제 1형 PCD라고 부르고, 자가포식현상에 의한 세포사멸은 제 2형 PCD라고 부른다(Codogno and Meijer, 2005; Bergmann, 2007; Bosch *et al.*, 2008). 최근에는 *S. Typhimurium*에 대한 이러한 사멸기전 중 자가포식현상에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 자가포식

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*For correspondence. E-mail: yjjung@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8533; Fax: +82-33-259-5665

현상은 기본적으로 세포질에 존재하는 구성 물질 또는 손상된 단백질을 리소솜으로 이동시켜 세포 내에서 분해하는 과정이지만, 외부적인 환경의 변화 즉, 영양분의 고갈, 병원균의 침입으로 유도되기도 한다(Rabinowitz and White, 2010). 자가포식현상에 의한 세포사멸의 가장 큰 특징은 세포 내에서 특이적인 이중막 구조의 독특한 세포 내 소기관인 자가포식 소체의 축적이 일어나고, 리소솜이 자가포식 소체와 결합하여 자가포식 소체 내의 표적 물질들을 분해한다는 것이다(Levine and Klionsky, 2004; Yang and Klionsky, 2009). 하지만 자가포식현상에 의한 세포사멸 기전의 직접적 유도는 아직 불명확하다. 일반적으로 낮은 수준의 자극으로 인한 자가포식현상의 유도는 세포 내의 항상성을 유지하거나, 생존에 필요한 기전으로 이해되고 있으나, 과부하의 자극은 자가포식현상으로 인하여 제 2형 PCD로 연결된다고 이해되고 있다. 그리고 제 1형, 또는 제 2형 PCD에서 서로 공유하는 부분과 그들만의 독특한 조절 기전들에 대하여 아직까지 연구되어야 할 많은 부분들이 남아 있다(Yang et al., 2005; Bergmann, 2007; Mizushima, 2007). 최근 여러 연구들에서 자가포식현상 신호전달 경로를 통해 세포 내로 감염되는 다양한 병원체들을 선택적으로 제거할 수 있다고 밝혀졌다(Dorn et al., 2002). 하지만, 그 기전은 명확하지 않은 채로 남아있다. 따라서, 본 연구에서는 자가포식현상이 쥐의 큰포식세포 내에 감염된 *S. Typhimurium*을 제어할 수 있는지 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

자가포식현상 억제제인 3-MA와 자가포식현상 유도제인 rapamycin은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하였다. 또한 anti-LC3B, anti-Atg12, anti-Atg16L1, anti-Beclin-1은 Cell signaling Technologies (USA)에서, 그리고 anti- $\beta$ -actin은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)에서 구매하였다.

### 세포 배양

본 실험에서 사용된 세포 주는 쥐의 대식세포인 RAW 264.7를 사용했다. 이 세포는 RPMI 1640에 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, USA), 1% PS (Penicillin-Streptomycin, Gibco-BRL, USA)을 혼합한 후, 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 균주 배양

본 실험에 사용된 *S. Typhimurium*은 LB agar (Tryptone; BD Biosciences, USA, Yeast extract powder, USA, Sodium Chloride; Bio Basic Inc., Agar powder; DAEJUNG, Korea) 배지에 접종하여 37°C 배양기에서 배양 한 후 사용하였다. 배양한 *S. Typhimurium*은 다시 LB 액체배지에서 진탕 배양하여 흡광도 값을 측정하였다. OD<sub>600</sub>=0.9 Å에 들어 있는 균의 수를 정확히 계산하기 위하여, LB 액체배지에 존재하는 균을 희석하여 LB agar 배지에 접종한 후 20시간 후에 colony의 수를 세어 CFU (colony-forming unit)를 확인하였고 흡광도 값이 OD<sub>600</sub>=0.9 Å 일 때 10<sup>9</sup> CFU/ml 균을 포함한다.

### *S. Typhimurium* 감염과 집락 형성 단위 분석(colony-forming unit assay) 방법

쥐의 큰포식세포주인 RAW 264.7 cell을 1×10<sup>4</sup> cells/ml 농도로 부유시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2일 동안 24-well 세포배양 접시(SPL #30006; SPL lifesciences, Korea)에 배양하였다. 부착되지 않은 세포는 PBS (phosphate buffered saline; Gibco BRL Life Technologies, USA)를 이용하여 세척한 후 제거하였고 부착된 세포만 취하여 실험에 사용하였다. *S. Typhimurium*을 각 배양 조건 별로 준비하여 MOI (multiplicity of infection)가 10:1이 되도록 감염시켰다. 30분 동안 감염시킨 후 상층액 내의 균을 PBS로 2번 세척하여 제거하였고 gentamicin (Gibco BRL Life Technologies)을 배지에 첨가하여 세포에 24시간 동안 처리하였다. 세포 내 *S. Typhimurium*의 생존율을 비교하기 위하여, PBS로 세척한 후 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)을 10분 동안 처리하여 세포막을 파괴하였다. 그 후 세포 내 생존 균 수를 알아보기 위해 LB agar 배지에 접종하여 20시간에 균의 집락을 측정하였다.

### 세포 성장률 측정

세포는 6-well 세포 배양접시(SPL #30006; SPL life-sciences, Korea)에 4×10<sup>5</sup> cell/ml로 분주하였다. 2일 동안 안정화한 후 자가포식현상 저해제인 3-MA와 자가포식현상 유도제인 rapamycin을 처리하였다. 0, 4, 8, 24시간에 세포를 수확하여 세포 수를 세어 진행하였다. 각각의 시간에 수확한 세포를 trypan blue (Sigma-Aldrich)로 염색한 후, 혈구계(hemocytometer) 상에서 염색된 세포 수를 세었다. 대조구는 자극물질이 포함되지 않은 배양액을 처리한 균이다.

### Western blot assay

시료에 RIPA buffer [10 mM Tris HCl; pH 8.0, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 0.1% DOC (deoxycholate), 0.1% SDS, 0.1% triton X-100]를 넣고 10분마다 보텍스 교반기로 혼합시킨다. 4회 반복 후, 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 분리한 다음 Bradford Assay Kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 분리를 위해 SDS-PAGE를 수행하였으며, 30% Acrylamide, 1 M Tris HCl (pH 8.8, pH 6.8), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED, 증류수, 6× SDS gel loading buffer, 1× SDS running buffer가 사용되었다. 전기영동 기구에 장치하고 100 V로 전기영동 한 다음 4°C에서 120 V로 1시간 동안 단백질을 PVDF Transfer Membrane (Millipore, USA)에 이동시켰다. 단백질이 이동된 Membrane은 5% skim milk의 blocking 용액으로 1시간 동안 실온에서 처리한 다음 TBST buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 1% Tween 20)로 10분간 3번 세척하고 1차 항체를 포함하는 항체희석용액(5% skim milk)을 실온에서 2시간 이상 처리하였다. 다시 TBST buffer로 10분간 3번 세척한 후, 각각의 2차 항체가 함유된 항체희석용액(5% skim milk)으로 실온에서 1시간 30분 동안 처리하였다. TBST buffer로 3번 세척하여 과량의 2차 항체를 제거한 뒤, ECL 용액(Animal Genetics Inc., Korea)으로 감광시킨 Membrane은 암실에서 필름에 노출시켜 인화하였다.

### Fluorescence microscopy

RAW 264.7 세포를 18 mm 직경의 둥근 Coverslip (SPL lifesciences, Korea)을 넣은 12-well 세포 배양접시에  $5 \times 10^4$  cell/ml로 분주 한 후, 2일 동안 안정화하였다. 자가포식현상의 조절 물질인 3-MA와 rapamycin을 처리하였고, *S. Typhimurium*을 감염시킨 후 4% Para-formaldehyde/PBS로 15분간 실온에서 고정하였다. 그 후, 15분간 0.2% triton X-100이 함유된 PBS로 세포의 투과성을 높였다. Anti-LC3-human (MBL, Japan)를 포함하는 1차 항체로 두 시간 동안 실온에서 염색하였고, PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 세척 후 FITC-anti-rabbit 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, USA)를 한 시간 동안 실온에서 염색한 다음 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 마지막으로 핵을 염색하기 위해 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich)를 이용하여 5분 동안 염색한 후 PBS로 5회 세척하여 분광형 공초점 레이저 현미경(Olympus, FV1000 SPD)을 통해 세포를 관찰하였다.

### Reactive oxygen species (ROS) production

RAW 264.7 세포에 자가포식현상 조절 물질인 3-MA와 rapamycin을 처리한 후 *S. Typhimurium*으로 감염시켰다. 감염 후 10분에 DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate) 1  $\mu$ l/ml을 20분 동안 처리하고 PBS로 세척한 후 수확하였다. 원심분리 후, 상층액을 제거한 뒤 PBS를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 세포는 유세포 분석기(FACS Calibur, Biosciences)를 통해 형광 정도에 따른 세포를 분석하여 전체적인 세포 내 활성산소 수준을 측정하기 위하여 사용되었다.

### Nitric oxide (NO) production

산화질소는 공기 중에서 수 초 내에 아질산염 이온(nitrite ion)으로 산화되기 때문에, 산화질소의 생산을 아질산염 이온의 농도로 측정하였다. 아질산염 이온의 측정은 Intron-bio사의 nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology Inc., Korea)을 사용하였다. RAW 264.7 세포에 3-MA와 rapamycin을 2시간 전 처리하였고, *S. Typhimurium*을 감염시킨 후 24시간에 상층액을 1 ml씩 수거하였다. 수거한 시료를 96-well microplate (SPL lifesciences, Korea)에 100  $\mu$ l씩 옮긴 다음 sulfanilamide 50  $\mu$ l와 실온에서 10분 동안 방치하여 반응시킨 후, naphthylethylenediamine 50  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨다. 그 후 흡광도는 microplate reader (Biotek Instruments Inc., USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 측정 하였다. 표준곡선은 정제된 아질산염으로 희석하여 작성하였다.

### Densitometry

염색계측(densitometry)은 시료의 농도를 측정함에 있어 필름이나 사진 등에서 나타나는 시각적인 밀도를 정량적으로 측정하는 방법이다(Rodriguez-Mallon *et al.*, 2009). 본 논문에서는 Western blot에 나타나는 밴드들의 밀도를 측정하여 밴드들 사이의 정량적인 비교를 하기 위해 Image J Program (National Institutes of Health)을 이용하여  $\beta$ -actin과 LC3-II의 필름상의 밀도를 측정하였고 이들의 비율을 계산하였다.

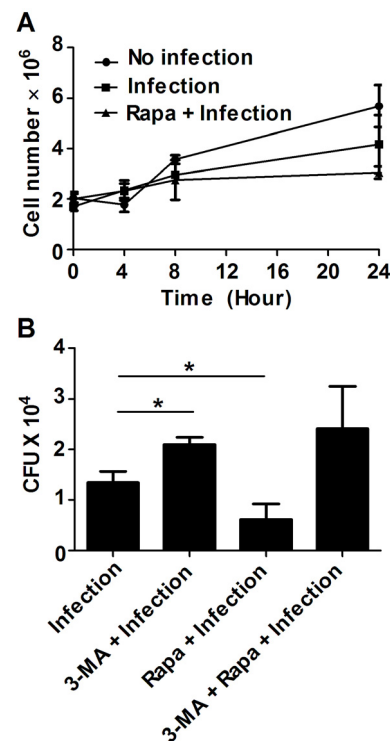
### 통계 분석

각각의 독립된 실험에서 얻어진 데이터에서 통계적 유의성은 GraphPad Prism 5 (GraphPad software)을 사용한 unpaired Student's t-test에 의해 측정되었다(\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , and n.s., not significant).

### 결과

#### 자가포식현상 조절에 따른 세포 및 *S. Typhimurium*의 성장 차이 측정

RAW 264.7 세포에서 *S. Typhimurium* 감염 시 자가포식현상 조절에 따른 숙주 세포 성장률의 변화를 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에 자가포식현상 유도제인 rapamycin (1  $\mu$ M)을 2시간 전 처리한 후, *S. Typhimurium*을 10 MOI로 30분 동안 감염 뒤 시간에 따른 세포 성장률을 측정하였다. 각 시간에 세포 수를 측정한 결과, 감염 후 24시간에 감염만 시킨 그룹과 rapamycin을 전 처리 한 그룹에서 세포 성장률이 감소하는 듯 보였으나 각 그룹 사이에서의 유의성은 없었다(Fig. 1A). 따라서



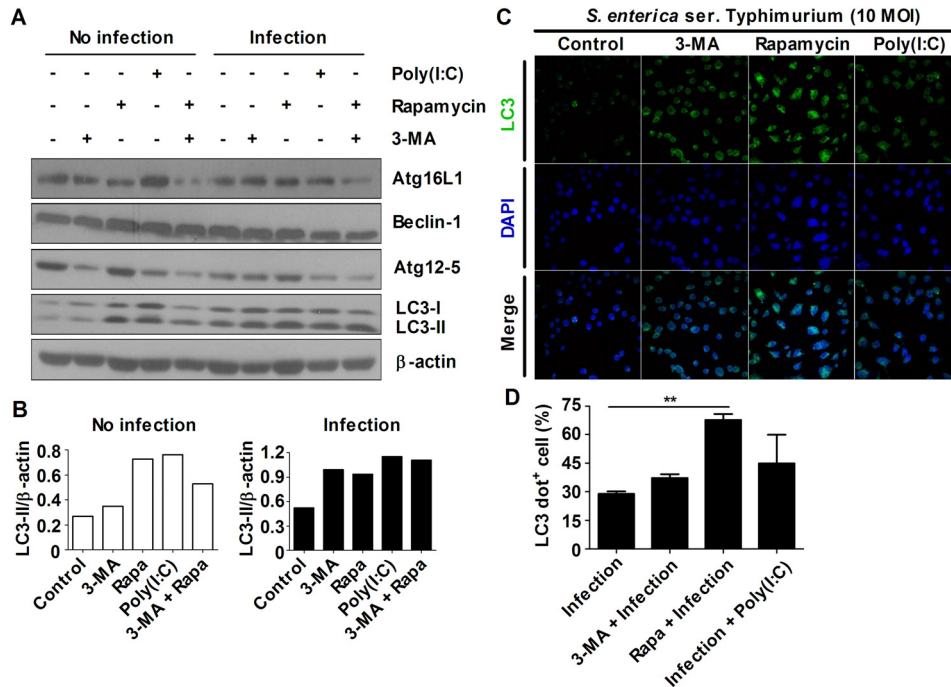
**Fig. 1.** Induced autophagy decreased the growth of *S. Typhimurium*. (A) RAW264.7 cells were stimulated with rapamycin for 2 h. Subsequently, cells were infected with *S. Typhimurium* (at MOI of 10) for 30 min. After infection, the cell growth of RAW264.7 cells measured by cell counting at indicated time. (B) RAW264.7 cells were pretreated with either 3-MA or rapamycin or both at 2 h before infection ( $1 \times 10^4$  CFU/ml). Colony forming unit (CFU) assay was used to determine the bacterial growth. Experiments were performed in triplicate, and error bars represent the standard deviation (SD). Significant differences were indicated as \*  $P < 0.05$ .

rapamycin 처리 및 *S. Typhimurium* 감염은 최대 24시간까지 숙주 세포에 큰 독성을 나타내지 않는다. 그러나 Raw 264.7 세포에 감염된 박테리아의 성장은 자가포식현상 유도제인 rapamycin이나 자가포식현상 저해제인 3-MA 처리에 따라 다르게 관찰되었다. Rapamycin을 전처리한 세포에서는 *S. Typhimurium*을 감염시켰을 때 박테리아의 성장이 2배 이상 저해되었으나, 3-MA (10 mM)를 전처리한 세포에서는 *S. Typhimurium*의 성장이 아무것도 처리하지 않은 그룹에 비해 1.5배 증가하였다(Fig. 1B). 또한 3-MA와 rapamycin을 함께 처리하였을 때 박테리아 성장은 감염만 시킨 그룹과 차이가 없었다(Fig. 1B).

### *S. Typhimurium*에 감염된 RAW 264.7 세포에서 자가포식현상 조절에 따른 자가포식현상 관련 단백질의 발현 변화

*S. Typhimurium*의 성장 저해가 자가포식현상에 의한 것인지 알아보기 위하여, 자가포식현상 관련 단백질인 Atg16L1, beclin-1, Atg12-5 complex, LC3의 발현을 western blot을 통해 관찰하였다. 자가포식현상과 관련된 단백질의 발현은 *S. Typhimurium* 감염에 의해 전반적으로 증가되었고, 특히 rapamycin 처리 시 자가포식현상의 표지자로 중요하게 여겨지는 LC3가 LC3-I에서 LC3-II로 전환된 비율이 높게 관찰되었으며, Atg12-5 complex의

발현 역시 증가하였다(Fig. 2A). 최근 톨-유사 수용체 3(toll-like receptor 3, TLR3)에 대한 리간드(ligand)인 poly (I:C)를 *S. Typhimurium*으로 감염된 큰포식세포에 자극시켰을 경우 *S. Typhimurium*의 성장이 제어된다는 보고에 따라(Wong et al., 2009), poly (I:C)의 처리 그룹은 양성 대조군으로 사용하였다. *S. Typhimurium* 감염 후 poly (I:C)를 처리하였을 때에도 LC3-I에서 LC3-II로 전환된 비율이 높게 관찰되었으며, Atg12-5 complex의 발현 역시 증가하였다. 그에 반해 3-MA의 처리는 rapamycin에 의해 증가된 LC3-II의 발현뿐만 아니라, Atg12-5 complex의 발현을 감소시켰다(Fig. 2A). Densitometry로 각 밴드의 밀도를 측정해본 결과, rapamycin 전 처리 후 *S. Typhimurium*으로 감염시켰을 경우  $\beta$ -actin 대비 LC3-II의 비율이 증가함을 입증하였다(Fig. 2B). 면역형광염색법으로 세포 내 LC3의 발현을 확인해본 결과, RAW 264.7 세포에 rapamycin을 전 처리한 후 *S. Typhimurium*을 감염시켰을 때, LC3의 세포 내 발현이 감염만 시킨 그룹에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 2C). 분광형 공초점 레이저 현미경으로 관찰한 결과를 DAPI로 염색된 세포 중에 LC3를 발현하는 세포의 비율로 나타내었을 때, 감염만 시킨 그룹에 비해 rapamycin을 전 처리한 후 *S. Typhimurium*을 감염 시킨 그룹에서 LC3를 발현하는 세포의 비율이 2.3배 증가하였다(Fig. 2D).



**Fig. 2.** The expression of autophagy-related protein increased in rapamycin-treated RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with either rapamycin or 3-MA or both. Subsequently, the cells were infected with *S. Typhimurium* (at MOI of 10) for 30 min. Total cell lysates were analyzed using western blot for the detection of autophagy-related proteins. Poly(I:C) stimulation was used as a positive control. (B) Results obtained from (A) were quantified by densitometry using the ImageJ software and were expressed as ratio of the respective controls. Western blot bands obtained from three independent experiments and three independent experiments represented the similar data. (C) RAW 264.7 cells pretreated with either 3-MA or rapamycin for 2 h before infection with *S. Typhimurium* for 24 h. *S. Typhimurium*-infected RAW 264.7 cells were fixed, stained with DAPI to visualize the nuclei (blue), and immunolabeled with the anti-LC3 antibody, followed by the addition of FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (green). (D) Quantitative analysis was performed to determine the percentages of cells with LC3<sup>+</sup> punctae. Experiments were performed in triplicate, and error bars represent the standard deviation (SD). Significant differences were indicated as \*\*  $P < 0.01$ .



**RAW 264.7 세포에서 자가포식현상 조절물질 처리에 의한 활성산소종(ROS) 및 산화질소(NO) 생성 측정**

이전 연구 결과에 따르면, *S. Typhimurium* 감염 시 MAPK 신호전달 과정을 통해 활성산소종(ROS)과 산화질소(NO)를 유도한다고 보고된 바 있다(Rosenberger and Finlay, 2002). 따라서 자가포식현상 조절물질 처리 시 *S. Typhimurium*에 감염된 RAW 264.7 세포에서 ROS와 NO의 변화를 측정하고자 하였다. RAW 264.7 세포에 *S. Typhimurium*을 감염 시킨 후 30분에 ROS와 반응하여 형광을 나타내는 DCFH-DA를 처리 한 뒤 세포 내의 ROS 수준을 유세포 분석기(FACS)로 간접적으로 측정 한 결과, 자가포식현상 조절물질의 처리에 따른 ROS의 생성은 각 그룹 사이에 별다른 차이가 없었다(Fig. 3A). 유세포 분석기를 통해 얻은 결과를 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI)로 수치화한 결과 역시 자가포식현상 조절물질의 처리 유무에 따른 ROS 생산 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 3B). 그에 반해, RAW 264.7 세포에 *S. Typhimurium*으로 감염만 시킨 그룹에 비해 rapamycin을 전 처리 한 후 *S. Typhimurium*을 감염시킨 그룹에서 NO의 생성이 2.1배 증가함을 관찰하였다(Fig. 3C).

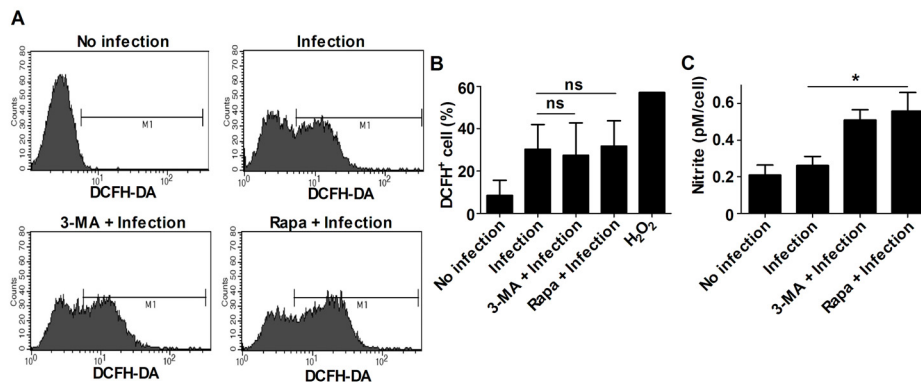
**고찰**

*Salmonella*는 전 세계적으로 급성 위장염과 식중독을 유발하는 대표적인 세포 내 병원균으로 잘 알려져 있다(de Jong *et al.*, 2012). *S. Typhimurium*는 표피세포와 큰포식세포 등 다양한 면역세포에 감염될 수 있고, 이러한 병원균은 TLR과 같은 패턴 인지 수용체(pattern-recognition receptors, PRRs)에 의해 인지된다(Palladino *et al.*, 2007; Trinchieri and Sher, 2007). *S. Typhimurium*의 인지는 세포 내 신호전달 물질들을 활성화시킴으로써 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 그리고 IL-6 같은 염증성 시토카인(pro-inflammatory cytokine)을 생성할 뿐만 아니라, 활성산소종과 산화질소와 같은 살균 분자(microbicidal molecules)들을 생성

하여 침입한 병원균을 사멸시킨다(Bogdan *et al.*, 2000; Vazquez-Torres and Fang, 2001; Mizel *et al.*, 2003). 최근에 발표된 연구에 따르면 병원균의 성장을 제어하는 숙주의 방어기작 중 병원균 감염 시 유도되는 자가포식현상이 병원균 감염에 중요한 역할을 수행한다고 한다(Monastyrska and Klionsky, 2006). 따라서, 본 실험에서는 쥐의 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에서 자가포식현상 조절 시 *S. Typhimurium* 감염을 제어할 수 있는지 알아보려고 하였다.

RAW264.7 세포에 *S. Typhimurium*으로 감염만 시켰을 경우와 자가포식현상 유도제인 rapamycin을 전 처리하였을 경우, RAW 264.7 숙주 세포에는 최대 24시간까지 독성을 나타내지 않았다. 그러나 RAW 264.7 세포에 자가포식현상 억제제인 3-MA를 전 처리하였을 경우, *S. Typhimurium*의 성장이 1.5배 증가한 반면에, 자가포식현상 유도제인 rapamycin 전 처리 시 *S. Typhimurium*의 성장이 2배 이상 저해되었다. 이러한 *S. Typhimurium* 성장 제어가 자가포식현상에 의한 것인지 확인해 본 결과, rapamycin을 전 처리 후 *S. Typhimurium* 감염 시켰을 경우 자가포식현상 표지자인 LC3-II의 전환이 증가함과 함께 LC3를 발현하는 세포 또한 증가한 것을 관찰하였다. 이를 통해 rapamycin 전 처리에 의한 *S. Typhimurium* 성장 저해는 자가포식현상에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 이 뿐만 아니라, rapamycin을 전 처리하고 *S. Typhimurium*으로 감염 시켰을 때 ROS의 생성에는 차이가 없었지만 NO의 생산은 2.1배 증가하였다. 이상의 결과를 통해, rapamycin에 의해 유도된 자가포식현상은 ROS의 유도를 통해서 라기보다는 NO에 의한 것임을 입증하였다.

따라서 이상의 결과를 통해 쥐의 큰포식세포에서 자가포식현상의 조절은 NO의 생산을 유도함으로써 *S. Typhimurium* 성장을 저해시킨다는 것을 입증하였다. 이러한 결과는 자가포식현상 유도제가 차후 감염성 병원균의 치료제로 개발될 가능성이 있음을 시사한다.



**Fig. 3.** Induced Autophagy with rapamycin increased NO production in *S. Typhimurium*-infected RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells pretreated with either 3-MA or rapamycin for 2 h and then cells were infected with *S. Typhimurium*. Flow cytometry with DCFH-DA staining for measuring ROS production in *S. Typhimurium*-infected RAW 264.7 cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells was introduced as a positive control Numbers indicate the percentage of the DCFH-DA<sup>+</sup> cells. (C) The production level of nitric oxide (NO) was measured using nitric oxide detection kit. After treatment of either 3-MA or rapamycin RAW 264.7 cells were infected with *S. Typhimurium* (at MOI of 10) for 24 h. Experiments were performed in triplicate, and error bars represent the standard deviation (SD). Significant differences were indicated as \*  $P < 0.05$  and n.s., not significant ( $P < 0.05$ ).

## 적요

자가포식현상(autophagy)은 세포 내 또는 세포 외의 스트레스나 영양분의 고갈, 그리고 병원체 감염에 의해 유도되는 기전으로, 병원균, 손상된 단백질이나 세포 소기관을 autophagosome으로 격리하여 리소좀(lysosome)과 융합하여 분해시키는 기전이다. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)은 세포 내로 감염되는 세균으로 급성 위장염과 식중독을 야기한다. *S. Typhimurium* 감염 시 세포 내에서 자가포식현상이 유도되며 이는 감염을 제어하는데 중요하다는 연구 논문들을 통해 본 연구에서는 자가포식현상 유도제인 rapamycin으로 자가포식현상을 유도했을 때, *S. Typhimurium*의 감염을 조절할 수 있는지 알아보고자 하였다.

자가포식현상 유도제인 rapamycin과 저해제인 3-methyladenine (3-MA)를 각각 처리한 후 쥐의 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에 *S. Typhimurium*을 감염시켰다. rapamycin을 전처리한 후 *S. Typhimurium*을 감염시켰을 때, 세포 내에서 *S. Typhimurium*의 성장률이 감소한 반면 3-MA의 전처리하는 *S. Typhimurium*의 성장을 촉진시켰다. 또한, RAW 264.7 세포에 rapamycin을 처리 후 감염시켰을 때, 자가포식현상 관련 단백질의 발현이 유의하게 증가하였다. Rapamycin에 의하여 유도된 자가포식현상이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 활성 산화질소종(nitric oxide, NO)의 생성을 통해 감염을 제어하는지를 확인하기 위하여 이 두 물질을 측정하였다. 감염 전 rapamycin 처리 시 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성은 증가하였으나 ROS의 생성에는 별다른 차이가 없었다. 이상의 결과는 쥐의 큰포식세포주에서 rapamycin 처리로 유도된 자가포식현상은 NO 생성을 통해 항박테리아능을 나타낸다고 할 수 있다.

## 감사의 말

본 연구는 2013년도 강원대학교 학술연구조성비(과제번호 C1010245-01-01)와 이공분야기초연구사업(NRF-2012R1A1A200634)의 지원을 받아 수행하였음

## 참고문헌

- Ajene, A.N., Fischer Walker, C.L., and Black, R.E. 2013. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *J. Health Popul. Nutr* **31**, 299-307.
- Bergmann, A. 2007. Autophagy and cell death: no longer at odds. *Cell* **131**, 1032-1034.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 64-76.
- Bosch, M., Poulter, N.S., Vatovec, S., and Franklin-Tong, V.E. 2008. Initiation of programmed cell death in self-incompatibility: role for cytoskeleton modifications and several caspase-like activities. *Mol. Plant* **1**, 879-887.
- Codogno, P. and Meijer, A.J. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell. Death. Differ.* **12 Suppl 2**, 1509-1518.
- de Jong, H.K., Parry, C.M., van der Poll, T., and Wiersinga, W.J. 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS. Pathog.* **8**, e1002933.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A.Jr., and Progulsk-Fox, A. 2002. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell. Microbiol.* **4**, 1-10.
- Garcia-del Portillo, F., Nunez-Hernandez, C., Eisman, B., and Ramos-Vivas, J. 2008. Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 46-52.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* **6**, 463-477.
- Lindgren, S.W., Stojiljkovic, I., and Heffron, F. 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella* Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4197-4201.
- Mizel, S.B., Honko, A.N., Moors, M.A., Smith, P.S., and West, A.P. 2003. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J. Immunol.* **170**, 6217-6223.
- Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes. Dev.* **21**, 2861-2873.
- Monastyrska, I. and Klionsky, D.J. 2006. Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol. Aspects Med.* **27**, 483-494.
- Palladino, M.A., Johnson, T.A., Gupta, R., Chapman, J.L. and Ojha, P. 2007. Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol. Reprod.* **76**, 958-964.
- Rabinowitz, J.D. and White, E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science* **330**, 1344-1348.
- Ramos-Morales, F. 2012. Acidic pH: enemy or ally for enteric bacteria? *Virulence* **3**, 103-106.
- Rodriguez-Mallon, A., Cardenas, Y., Lugo, J.M., Oliva, A., Morales, A., and Estrada, M.P. 2009. Competitive RT-PCR strategy for quantitative evaluation of the expression of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth hormone receptor type I. *Biol. Proced. Online* **11**, 79-98.
- Rosenberger, C.M. and Finlay, B.B. 2002. Macrophages inhibit *Salmonella* Typhimurium replication through MEK/ERK kinase and phagocyte NADPH oxidase activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 18753-18762.
- Salcedo, S.P. and Holden, D.W. 2003. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J.* **22**, 5003-5014.
- Smith, A.C., Cirulis, J.T., Casanova, J.E., Scidmore, M.A., and Brumell, J.H. 2005. Interaction of the *Salmonella*-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J. Biol. Chem.* **280**, 24634-24641.
- Trinchieri, G. and Sher, A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179-190.
- Vazquez-Torres, A. and Fang, F.C. 2001. Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol.* **9**, 29-33.
- Wenkoff, M.S. 1973. A review and case report. *Salmonella* Typhimurium septicemia in foals. *Can. Vet. J.* **14**, 284-287.
- Wong, C.E., Sad, S., and Coombes, B.K. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits Toll-like receptor signaling during the host-pathogen interaction. *Infect. Immun.* **77**, 4750-4760.
- Yang, Z. and Klionsky, D.J. 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **335**, 1-32.
- Yang, Y.P., Liang, Z.Q., Gu, Z.L., and Qin, Z.H. 2005. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta. Pharmacol. Sin.* **26**, 1421-1434.