

## *Vibrio Vulnificus* Induces the Inflammation of Mouse Ileal Epithelium: Involvement of Protein Kinase C and Nuclear Factor-Kappa B

Gi Yeon Han<sup>1</sup>, Young Hyun Jung<sup>2</sup>, Kyung Ku Jang<sup>2</sup>, Sang Ho Choi<sup>2</sup> and Sei-Jung Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Seoul High School, Seoul 137-871, Korea

<sup>2</sup>Center for Food Safety and Toxicology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Received March 6, 2014 / Revised May 14, 2014 / Accepted May 22, 2014

In the present study, we investigate the role of *V. vulnificus* in promoting the inflammation of mouse ileal epithelium and its related signaling pathways. ICR mice were infected orally with *V. vulnificus* ( $1 \times 10^9$  CFU) for 16 h as a representative model of food-borne infection. To find the major portal of entry of *V. vulnificus* in mouse intestine, we have measured the levels of bacterial colonization in small intestine, colon, spleen, and liver. *V. vulnificus* appeared to colonize in intestine and colon in the order of ileum >> jejunum > colon, but lack in the duodenum, spleen, and liver. *V. vulnificus* in ileum caused severe necrotizing enteritis and showed shortened villi heights accompanied by an expanded width and inflammation, compared with the control mice. *V. vulnificus* induced ileal epithelium inflammation by activating phosphorylation of PKC and membrane translocation of PKCa. *V. vulnificus* induced the phosphorylation of ERK and JNK, but did not affect p38 MAPK phosphorylation. Notably, *V. vulnificus* stimulated the I- $\kappa$ B-dependent phosphorylation of NF- $\kappa$ B in mouse ileal epithelium. Finally, the ileal infection of *V. vulnificus* resulted in a significant increase in expression of proinflammatory cytokines and Toll-like receptors, respectively, compared to the control. Collectively, our results indicate that *V. vulnificus* induces ileal epithelium inflammation by increasing NF- $\kappa$ B phosphorylation via activation of PKC, ERK, and JNK, which is critical for host defense mechanism in food-borne infection by *V. vulnificus*.

**Key words** : Inflammation, mouse ileal epithelium, nuclear factor kappa-B, protein kinase C, *Vibrio vulnificus*

### 서 론

비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 호염성의 그람음성 식중독 균으로서 오염된 어패류 등의 식품 섭취를 통해 인체에 유입되거나, 또는 기존에 존재하던 상처나, 해양생물을 다룰 때 발생하는 외상성 손상(traumatic injury) 부위를 통해 침입하여 위장염(gastroenteritis) 및 패혈증(septicemia)을 일으키는 유해균으로 알려져 있다[7]. 특히 비브리오균의 감염에 의해 유발되는 패혈증은 발병의 특성이 매우 공격적이고(invasive), 숙주에 현저하고 심각한 조직손상을 유도하기 때문에, 숙주의 치사율이 매우 높고(> 50%), 질병의 첫 증상이 관찰된 후 하루나 이틀 안에 사망할 정도로 신속하게 진행 된다[9].

피부 침입구(portal of entry)를 통한 창상 감염과는 다르게, 식도를 통해 위장염을 동반한 일차성 패혈증은 대개 명확한

감염병소가 없는 균혈증으로, 침입구는 주로 소장의 회장(ileum)부위로 추정되고 있다[4]. 특히 소장의 상피세포층을 통과한 비브리오균은 혈관계(blood circulation system)를 통해 침투하여, 혈소판 감소 및 과중성 혈관 내 응고(Disseminated Intravascular Coagulation, DIC)를 유도할 뿐만 아니라[2], 숙주의 보체(complement)와 반응하고 백혈구 동원(recruitment)하여 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 증가시켜 패혈증을 일으킬 수 있다고 보고 되었다[15]. 또한 혈류를 타고 다양한 조직이나 그 구성 세포로 침투할 경우, 조직의 괴사성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[12]. 따라서 소장에서 비브리오균 침입구의 위치를 알아보고, 이곳에서 일어나는 염증 반응 기작의 규명을 통해, 숙주의 면역능력을 높이는 치료법을 개발하는 것은 비브리오균으로부터 야기된 식중독으로부터 숙주 방어기작을 극대화할 수 있는 최소한의 방법을 제시 할 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 패혈증 비브리오균의 감염으로 인한 사망은 면역체계가 저하된 질환을 가진 환자에게 발생하는 경우가 대부분이다 [9].

따라서 본 연구의 목적은 패혈증 비브리오균의 숙주 표적부위를 알아보고 숙주세포내에서 일으키는 염증반응과 그 작용기전을 파악하여, 이를 바탕으로 숙주 세포와의 상호작용을 포괄하는 염증반응 조절기작을 제시하는데 있다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-2-887-2732, Fax : +82-2-885-2732

E-mail : seijung1@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 wild type *Vibrio vulnificus* MO6-240는 서울대학교 식품분자독성센터에서 보관중인 균주를 사용하였고, 사용 균주의 배양은 LBS (LB broth modified with 3% NaCl) 배지에 접종하여 30°C의 진탕 배양기(220 rpm)에서 배양한 후 사용하였다.

### 시약

시약 중, Hematoxylin, Eosin, Rifampicin 등은 Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며, Phospho-ERK1/2, ERK, phospho-JNK/SAPK, JNK/SAPK, phospho-p38 MAPK, p38 MAPK,  $\beta$ -actin에 대한 항체는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, phospho-NF- $\kappa$ B (p65), NF- $\kappa$ B, PKC, PKCa에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였고, 그 외 사용된 시약은 순도가 높은(순도 99% 이상) 등급을 구입하여 사용하였다.

### 비브리오균 생쥐 경구 투여 모델

이 연구에서 실행한 모든 동물 실험은 서울대학교 생물안전위원회(SNUIBC, 허가번호 SNUIBC-R131226-1)와 동물실험윤리위원회(IACUC, 허가번호 SNU-140108-4)의 절차에 맞게 실험하였다. 7주령의 수컷 마우스에 wild type *V. vulnificus* (WT)를  $1 \times 10^9$ 의 농도로 경구 투여하였고, 대조군(Control)의 경우, 100°C에서 가열된 WT균을 투여하였다. 경구투여 16시간 후에 마우스를 희생시키고, 조직을 7가지 부분(Duodenum, Jejunum, ileum, proximal colon, distal colon, spleen, liver)으로 나누어 조직 특이적인 군집 형성률(Colonization rate)을 관찰하였고, 가장 많은 군집을 이루는 부분만을 선별하여, 다음 실험을 진행하였다.

### Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색

비브리오균이 감염된 마우스의 손상된 소장 조직을 관찰하기 위하여 감염 후 16시간 후에 회맹부 주변의 1 cm정도 크기의 회장 조직을 즉시 얻은 후 10% neutral phosphate buffered formaldehyde solution (Sigma, St. Louis, MO)에 16시간 동안 고정을 한다. 이후 파라핀 포매(paraffin embedding)를 하고 H&E 염색을 한 후, 용모의 길이 및 폭, 염증 정도를 광학 현미경을 통해 관찰하였다.

### 비브리오 균집 형성 측정

접종한 균이 생체 내에서 독성효과를 나타내기 위해서는 군집을 이루는 것이 필수적이다. 접종 후 계획된 시간이 지난

후 회맹부 주위 회장말단 부위의 조직을 분리하여 조직 검사를 하고, 간, 비장, 나머지 소장 부위를 잘라서 PBS에서 유제(homogenization)한다. 이 후 연속적으로 희석한 후 Rifampicin을 포함하는 LB plate에서 배양하고, 각 소장 조직에 대한 colony number를 계수하였다.

### Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Kyungki, Korea)을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 각 유전자의 프라이머(Table 1)를 이용하여 증폭시켰으며, 증폭된 RT-PCR 산물은 1% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

### Western blot을 이용한 조직 단백질 분석

Western blot 실험을 수행 하기 위하여, 회장 부위만을 protease inhibitor cocktail (Boehringer, Mannheim)이 포함된 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF in isopropanol, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 25% glycerol, 0.5% NP-40)에서 유제(homogenization)하였고, Bradford 방법[3]을 이용하여 단백질의 농도를 확인하였다. 한편 membrane과 cytosol에서 PKCa의 이동 변화를 알아보기 위해, 비브리오균이 감염된 회장조직을 protease inhibitor cocktail 포함된 300  $\mu$ l의 buffer A [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA]에 녹이고 10분간 정치한 다음, 100,000 $\times$  g 에서 1시간동안 원심 분리하여 상층액을 cytosol 단백질로, 침전물을 membrane 단백질로 정의한다. 침전물의 경우 protease inhibitor cocktail 포함된 100  $\mu$ l의 buffer B [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA]를 더 처리한 후 100,000 $\times$  g 에서 15분 동안 원심분리하여 최종 membrane 단백질로 사용한다. 정량된 단백질들을 10% polyacrylamide gel에 100 V, 30 mA에서 2.5시간 동안 전기영동 하였고, PVDF membrane에 transfer시킨 후, 5% 탈지분유가 함유된 TBS-Tween 용액(25 mM Tris base, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)으로 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 3000배 희석된 primary antibody 들과 10,000배 희석된 secondary antibody를 적당한 시간 동안 순차적으로 처리하고, chemiluminescence 기계(Amersham Pharmacia Biotech, Buckingham shire, UK)를 이용해 각 단백질들의 발현 및 인산화 확인하였다

### 통계처리

모든 실험은 최소 4회 이상 반복 하였으며, 실험결과는 means  $\pm$  SE로 표현 하였다. 통계적 유의적 차이는 Student's

Table 1. Primers used for polymerase chain reaction

Gene	Identification	Primer sequence, 5' - 3'	Size (bp)
<i>IL-1β</i>	Sense	GGGCTGCTTCCAAACCTTTG	287
	Antisense	GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT	
<i>IL-6</i>	Sense	ACCACTTCACAAGTCGGAGG	296
	Antisense	TCTCTCTGAAGGACTCTGGCT	
<i>IL-8</i>	Sense	CCATGGGTGAAGGCTACTGT	205
	Antisense	TAGGCATCACTGCCTGTCAA	
<i>TNF-α</i>	Sense	CACAGAAAGCATGATCCGCG	211
	Antisense	ACTGATGAGAGGGAGGCCAT	
<i>TLR-2</i>	Sense	CGTTGTTCCCTGTGTTGCTG	167
	Antisense	CAGAGCTGGCGTCTCCATAG	
<i>TLR-4</i>	Sense	GCTTTCACCTCTGCCTTCAC	259
	Antisense	AGGCGATACAATTCCACCTG	
<i>TLR-5</i>	Sense	CCTTTC AAGGTCTGCCCCAT	256
	Antisense	GACAGTGT TTTGCCCTGCAG	
<i>TLR-9</i>	Sense	TCGCTTTGTGGACTTGT CAG	266
	Antisense	GGCTCAGGCTAAGACACTGG	
<i>β-actin</i>	Sense	AGCCATGTACGTAGCCATCC	228
	Antisense	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	

Abbreviations: interleukin, IL; tumor necrosis factor-α, TNF-α; toll like receptor, TLR

test 및 one-way analysis of variance (ANOVA) 이용하여 결정하였으며, p-values <0.05의 값들을 유의적인 결과로 고려하였다.

결과 및 고찰

비브리오균의 군집형성 위치 및 소장 염증 반응에 미치는 효과

오염된 식품 섭취를 통해 유입되는 비브리오균의 소장 염증 반응기작을 알아보기 위해, 7주령의 수컷 마우스에 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)을 16시간 동안 경구 투여하였다. 본 실험에서 사용된 비브리오균의 처리 농도와 시간은 이미 보고된 바와 같다[8]. Fig. 1A에서 보는 것처럼, 비브리오균(WT)이 침입하였을 때, 소장의 회장(ileum) 부분에 현저한 염증반응이 일어나고 이로 인해 조직의 괴사 및 괴사부위에 다량의 혈액이 침착되어 붉은색을 띠는 것이 관찰되었다. 세균에 있어서 군집형성은 세균이 숙주의 면역체계를 공격하기 위한 필수적인 과정으로써, 세균들간 및 숙주 환경간의 의사소통(quorum sensing)을 통해 충분한 군수를 확보하고, 결국 다수의 군집을 형성하여 집단적으로 동일한 신호에 의한 유전자 발현의 조절을 통해 숙주를 효율적으로 공격하는데에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[11]. Fig. 1B는 소장(duodenum, jejunum, ileum), 대장(proximal colon, distal colon), 비장(spleen), 그리고 간(liver) 조직들에서 나타나는 군집 형성 현상을 보여주는 결과이다. 경구 투여 16시간 후에, 주로 회장(ileum) 부위에서 비브리오균(WT)수가  $33 \pm 11 (\times 10^6)$ 으로 가장 많이 증가하였고,

공장(Jejunum), 근위부대장(proximal colon), 원위부 대장(distal colon)에도 유의적으로 군집형성이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 첨가적으로 경구 투여 4시간 후에, 회장에서 측정된 비브리오균의 측정된 군수는  $0.6 \pm 0.1 (\times 10^6)$ 이었다(data

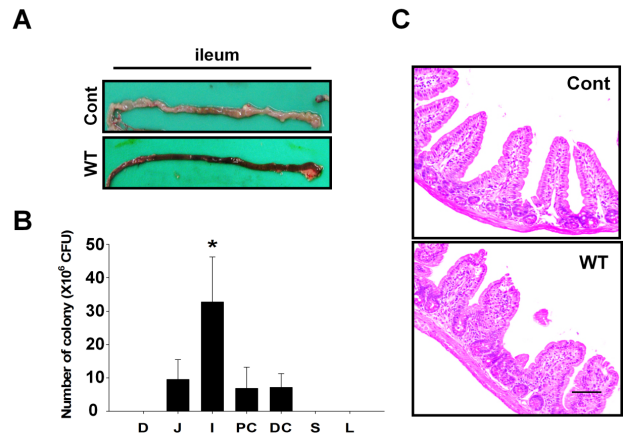


Fig. 1. The effect of *V. vulnificus* on intestinal colonization and inflammation. (A) Gross morphologies of mice ileum given oral administration of wild type *V. vulnificus* (WT,  $1 \times 10^9$  CFU) for 16 hr are shown. (B) The number of colony of *V. vulnificus* was determined in mice duodenum (D), jejunum (J), ileum (I), proximal colon (PC), distal colon (DC), spleen (S), and liver (L). Error bars represent the means  $\pm$  SE from five independent experiments involving triplicates. \*,  $p < 0.05$  versus jejunum, proximal colon, or distal colon. (C) Representative ileum tissues stained with H&E are shown. n=5.

not shown). 따라서 이와같은 결과는 비브리오균이 남아 있는 것이 아니라 원래의 주었던 균이 시간에 따라 점차 증식한 것으로 미루어 짐작 할 수 있다. 비브리오균이 집중적으로 군집을 형성하는 곳인 회장부위에 미치는 조직학적 손상정도를 파악하기 위해, 소장의 회장부위를 6 μm의 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 통해 관찰해 보았다. 그 결과, 비브리오균(WT)의 경우 용모안으로 다량의 염증세포들이 유입되었고, 용모의 폭이 넓어지고 길이가 짧아지는 전형적인 조직학적 염증 반응을 보여주었다(Fig. 1C). 종합적으로 이와 같은 결과는, 비브리오균이 상처가 아닌, 오염된 음식물로부터 감염되었을 때, 그 표적기관은 회장(ileum)이며, 이곳에서 여러 독성인자를 분비함으로써 생쥐의 염증반응을 유도할 수 있음을 시사한다.

### 비브리오균이 소장 상피세포 Protein Kinase C 활성화에 미치는 효과

염증 반응 기작에 있어서 Protein Kinase C (PKC)는 다양한 수용체들(주로 G-protein coupled receptor)의 염증 반응신호를 전달하는 단백질로서 전염증성 사이토카인(proinflammatory

tory cytokine)의 발현에 관여하는것으로 알려져 있다[10]. Fig. 2는 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)이 16시간 동안 처리된 회장상피조직 단백질에서 PKC의 활성을 확인해 본 결과이다. 흥미롭게도 비브리오균(WT)은 대조군과 비교하여  $2.3 \pm 0.2$ 배만큼 인산화된 PKC 단백질 발현을 유의적으로 증가 시켰다(Fig. 2A). 특히 conventional PKC isoform중에 하나인 PKC $\alpha$ 의 발현이 비브리오균(WT)의 감염으로 인해 세포질(cytosol) 단백질에서는  $0.4 \pm 0.1$ 배만큼 감소한 반면, 세포막(membrane)에서는  $3.3 \pm 0.3$ 배만큼 증가함 알 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 이와 같은 결과는 비브리오균의 감염은 회장 조직의 염증 반응을 유도하고 이때 PKC의 인산화가 전체적으로 증가할 뿐만 아니라, PKC $\alpha$ 가 세포질에서 세포막으로의 이동을 통해서, 숙주세포의 PKC 활성이 유도된다는 것을 말해 주는 결과이다. 인간 장관 감염증의 원인이 되는 병원성 대장균인 장관병원성 대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli*)의 경우, 비브리오균과 다르게 소장상피세포에서 PKC $\zeta$ 의 활성을 유도하여 염증 반응을 유도하는것으로 알려져있다[14]. 따라서 PKC $\alpha$ 의 활성을 조절하는 비브리오균은 특이적으로 소장내 염증 반응 신호전달기작에 관여한다는것을 암시한다.

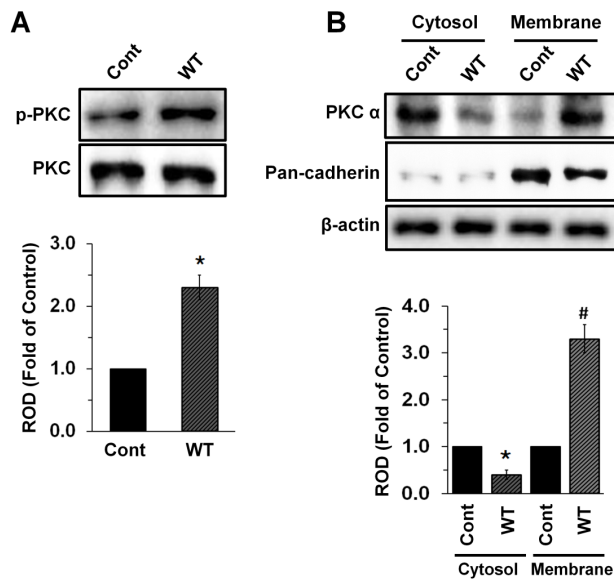


Fig. 2. The effect of *V. vulnificus* on activation of PKC in mouse ileum tissue. (A) Phosphorylation of PKC in mouse ileum tissues infected with *V. vulnificus* is shown. Error bars represent the means  $\pm$  SE from five independent experiments involving triplicates. \*,  $p < 0.01$  versus control. (B) Membrane translocation of PKC $\alpha$  isoforms in mouse ileum tissues infected with *V. vulnificus* was determined by Western blot analysis. Error bars represent the means  $\pm$  SE from five independent experiments involving triplicates. \*,  $p < 0.05$  versus cytosol control. #,  $p < 0.01$  versus membrane control. ROD, relative optical density.

### 비브리오균이 소장 상피세포 Mitogen-activated protein kinase 활성화에 미치는 효과

염증 반응 기작에 있어서 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 단백질은 대표적인 PKC의 하위신호전달자로서, 세포핵내의 염증 특이적인 여러 전사인자를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다[10]. Fig. 3은 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)이 16시간 동안 처리된 회장상피세포 단백질에서 MAPK의 활성을 확인해 본 결과이다. 흥미롭게도 비브리오균(WT)은 대조군과 비교하여 유의적으로 인산화된 ERK1/2 (phospho-ERK1/2) (Fig. 3A)와 JNK (phospho-JNK/SAPK) (Fig. 3B)의 단백질 발현을 각각  $3.8 \pm 0.2$ 과  $2.0 \pm 0.3$ 배 만큼 증가시킨 반면, 인산화된 p38 MAPK (phospho-p38 MAPK) (Fig. 3C)의 단백질 발현에는 아무런 효과가 없었다. 한편, 장관병원성 대장균의 경우, 소장상피세포에서 ERK1/2, JNK, 그리고 p38 MAPK의 모든 MAPK의 활성을 조절할 수 있는 것으로 보고 되었다[5]. 따라서 이와 같은 결과는 비브리오균은 선택적으로 MAPK의 활성을 조절하고 이를 통해 소장상피세포내에 염증 반응을 일으키는 것으로 미루어 짐작할 수 있다.

### 비브리오균이 소장 상피세포 Nuclear Factor-kappa B 활성화에 미치는 효과

Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)는 대표적인 염증반응매개 전사인자로서, Inhibitor-kappa B (I- $\kappa$ B)의 인산화에 의해 활성이 되며, 대표적인 PKC와 MAPK의 하위신호전달자로서 전염증성 사이토카인의 발현에 관여하는것으로 알려져 있다[6, 10]. Fig. 4는 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)이 16시간 동안 처리된 회장상

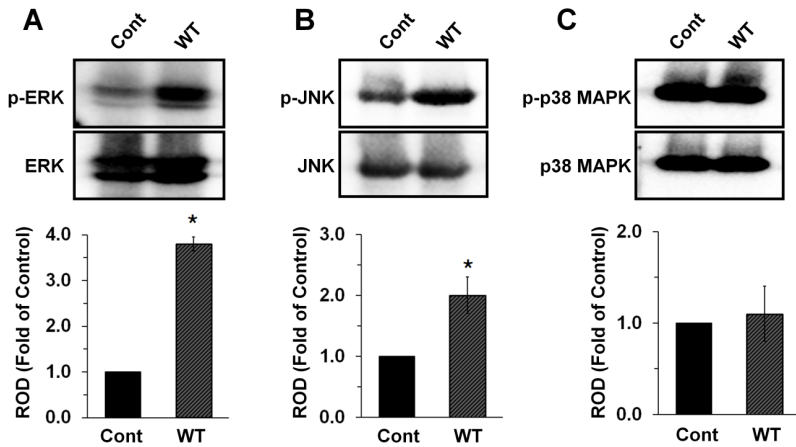


Fig. 3. The effect of *V. vulnificus* on activation of MAPK in mouse ileum tissue. Phosphorylation of ERK1/2 (A), JNK (B), and p38 MAPK (C) in mouse ileum tissues infected with *V. vulnificus* is shown. Error bars represent the means  $\pm$  SE from five independent experiments involving triplicates. \*,  $p < 0.01$  versus control. ROD, relative optical density.

피세포 단백질에서 I- $\kappa$ B 및 NF- $\kappa$ B의 활성을 확인해 본 결과이다. 흥미롭게도 비브리오균(WT)은 대조군과 비교하여 인산화된 I- $\kappa$ B (phospho- I- $\kappa$ B) (Fig. 4A)와 NF- $\kappa$ B (phospho- NF- $\kappa$ B) (Fig. 4B)의 단백질 발현을 각각  $2.3 \pm 0.2$ 과  $2.4 \pm 0.4$ 배만큼 유의적으로 증가시켰다. 따라서 이와 같은 결과는 비브리오균은 상위신호전달 단백질인 PKC $\alpha$  및 MAPK의 인산화 조절을 통해 I- $\kappa$ B 및 NF- $\kappa$ B의 활성을 조절하고 이로 인해 회장상피 세포 내에 염증 반응을 일으키는 것으로 미루어 짐작할 수 있다. 한편 비브리오균과 비슷하게, 장관병원성 대장균의 경우 또한 소장상피세포내에 염증 반응을 일으키기 위해 NF- $\kappa$ B의 인산화를 유도하지만, 이것은 PKC $\zeta$ 의 활성에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다[14]. 따라서 비브리오균은 선택적으로 상위신호전달체계의 활성을 유도하지만, 염증 반응의 유도를 위해서는 공통적으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 매개한다는 것을 알 수 있다.

**비브리오균이 소장 상피세포 염증성 cytokine과 Toll like receptor 발현에 미치는 영향.**

염증성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의해 매개되는 염증성 cytokine들과 Toll like receptor들의 유전자 발현 패턴을 분석하기 위해, 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)이 16시간 동안 처리된 조직으로부터 RNA를 분리하여 cDNA를 제작하였다. Fig. 5A에서 보는 것처럼, 비브리오균(WT)에 감염된 회장 조직의 경우, 정상마우스에 비해 전염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 mRNA 수준이 유의적으로 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. 염증매개 수용체인 toll like receptor (TLR)-4, TLR-5, TLR-9의 mRNA의 발현 또한 비브리오균 처리에 의해 증가되었다(Fig. 5B). 그러나 IL-1 $\beta$ 와 TLR-2의 mRNA 발현 수준은 비브리오균 감염에 의해 변화되지 않았다. 이러한 결과는 bacterial cell wall product가 NF- $\kappa$ B에 작용하여 염증성 cytokine 및 toll like receptor 발현시킨다는 보고에 더욱 신빙성이 더해질 수 있다[1]. 한편, 장관병원성 대장균의 경우, 소장상피세포에서 TNF- $\alpha$ 에 독립적으로 염증 반응을 일으키는 반면[14], 황색포도상균(*Staphy-*

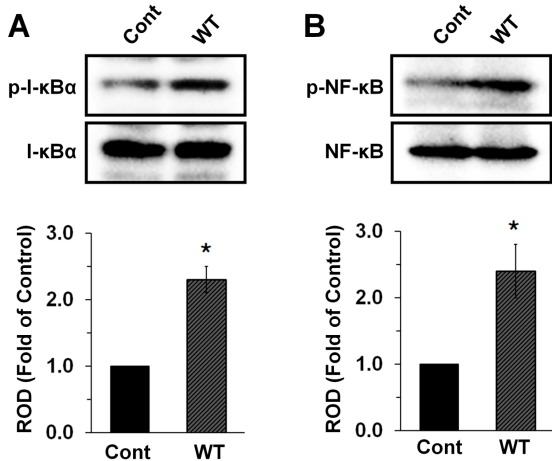


Fig. 4. The effect of *V. vulnificus* on activation of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B in mouse ileum tissue. Phosphorylation of I- $\kappa$ B (A) and NF- $\kappa$ B (B) in mouse ileum tissues infected with *V. vulnificus* is shown. Error bars represent the means  $\pm$  SE from five independent experiments involving triplicates. \*,  $p < 0.01$  versus control. ROD, relative optical density.

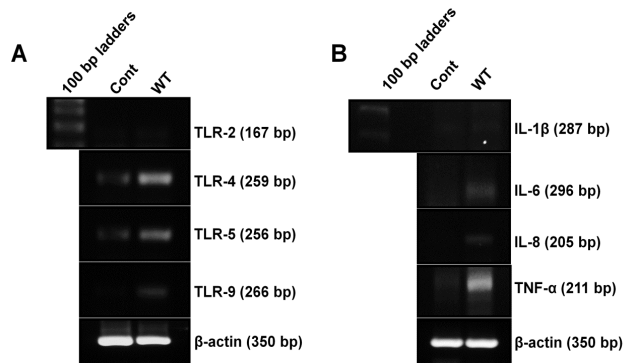


Fig. 5. The effect of *V. vulnificus* on expression of proinflammatory cytokines and toll-like receptors in mouse ileum tissue. Expression of mRNA for toll-like receptors (A) and proinflammatory cytokines (B) in mouse ileum tissues infected with *V. vulnificus* is shown. n=5.

*Staphylococcus aureus*)의 경우, 소장상피세포에서 TLR-2와 TLR-4의 발현을 조절할 수 없었다[13]. 따라서 이것은 비브리오균이 장관병원성 대장균이나 황색포도상균에 비해, 다양한 방법으로 효율적으로 숙주를 공격하므로 소장내 염증반응 일으키는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 이와 같은 결과는 비브리오균이 특이적이고 선택적인 신호전달 기작을 통해 회장상피조직에서 염증성 매개인자들의 유전자 발현을 증가시키는 것으로 이해할 수 있다.

지금까지의 연구를 종합해볼 때, 오염된 식품 섭취를 통해 유입되는 비브리오균의 주요 표적기관은 회장(ileum)이며, 이 부위에 군집을 형성하는 조직 특이적 공격성향을 보였다. 특히 숙주세포의 중추적 신호전달 단백질인 PKC, ERK1/2, 그리고 JNK의 인산화를 유도하였고, 염증 관련 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 촉진하였다. 결과적으로 이러한 염증 신호전달기작은 선택적으로 전염증성 사이토카인 및 TLR들의 발현에 영향을 주어 회장의 과사성 염증반응을 유발하였다. 향후 비브리오균의 침입구인 회장에서 일으키는 염증 반응 기작을 자세히 알아보기 위하여, 비브리오균에서 분비하는 독소인자(virulence factor)와 숙주세포에서 반응하는 수용체(receptor)를 동정하고 그 유해 메커니즘을 더욱 이해하는 연구가 필요하다. 또한 이 염증반응을 알맞게 조절하는 치료법을 개발하여, 숙주의 면역능력을 높임과 동시에 숙주 방어기작을 극대화할 수 있는 방법을 도출해내는 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 융복합연구센터지원사업에 의해 이루어진 것임.

## References

- An, H., Yu, Y., Zhang, M., Xu, H., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Guo, J., Qin, Z. and Cao, X. 2002. Involvement of ERK, p38 and NF  $\kappa$ B signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* **106**, 38-45.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C. 1979. Disease caused by a marine vibrio. *N Engl J Med* **300**, 1-5.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **7**, 248-254.
- Chen, Y., Satoh, T. and Tokunaga, O. 2002. *Vibrio vulnificus* infection in patients with liver disease: report of five autopsy cases. *Virchows Arch* **441**, 88-92.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B. and Rampal, P. 2001. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **69**, 1298-1305.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. and Piette, J. 2006. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**, 1493-1505.
- Jones, M. K. and Oliver, J. D. 2009. *Vibrio vulnificus* disease and pathogenesis. *Infect Immun* **77**, 1723-1733.
- Kim, S. M., Park, J. H., Lee, H. S., Kim, W. B., Ryu, J. M., Han, H. J. and Choi, S. H. 2013. LuxR Homologue SmcR Is Essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells. *Infect Immun* **81**, 3721-3730.
- Klontz, K. C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H. T., Baldy, L. M. and Gunn, R. A. 1988. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections; clinical and epidemiologic features in Florida cases. *Ann Intern Med* **109**, 318-323.
- Nakashima, S. 2002. Protein Kinase Ca (PKCa): regulation and biological function. *J Biochem* **132**, 669-675.
- Ng, W. L. and Bassler, B. L. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197-222.
- Paik, K. W., Moon, B., Park, C. W., Kim, K. T., Ji, M. S., Choi, S. K., Rew, J. S. and Yoon, C. M. 1995. Clinical characteristics of ninety-two cases of *Vibrio vulnificus* infections. *Korean J Infect Dis* **27**, 355-365.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H. M., Nürnberg, G. and Schuberth, H. J. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* **39**, 1-23.
- Savkovic, S. D., Ramaswamy, A., Koutsouris, A. and Hecht, G. 2001. EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, 890-898.
- Shin, S. H., Shin, D. H., Ryu, P. Y., Chung, S. S. and Rhee, J. H. 2002. Proinflammatory cytokine profile in *Vibrio vulnificus* septicemic patients' sera. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**, 133-138.



## 초록 : 회장 상피세포에서 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 염증 유도 기작 연구: protein kinase C와 nuclear factor kappa-B의 관련성

한기연<sup>1</sup> · 정영현<sup>2</sup> · 장경구<sup>2</sup> · 최상호<sup>2</sup> · 이세중<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>서울고등학교, <sup>2</sup>서울대학교 식품 안정성 및 독성 연구센터)

비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 심각하고 치명적인 감염을 일으킬 수 있는 호염성의 식중독균이지만, 숙주세포 내에서 염증반응을 일으키는 분자적 기작은 아직 잘 알려지지 않았다. 본 연구에서는 오염된 식품 섭취를 통해 유입되는 비브리오균의 소장 특이적 염증 반응 위치와 기작을 알아보기 위해, 7주령의 수컷 마우스에 비브리오균( $1 \times 10^9$  CFU)을 16시간 동안 경구 투여하였다. 그 결과 비브리오균은 주로 회장(ileum) 부위에서 비브리오균(WT) 수가 가장 많이 증가하였고, 공장(Jejunum), 근위부대장(proximal colon), 원위부 대장(distal colon)에도 유의적으로 군집현성이 이루어짐을 알 수 있었지만, 십이지장(duodenum)과 비장(spleen), 그리고 간(liver) 조직들에서는 관찰되지 않았다. 특히 비브리오균의 표적기관인 회장상피조직에서는 비브리오균(WT)이 침입 시 용모 안으로 다량의 염증세포들이 유입되었고, 용포의 폭이 넓어지고 길이가 짧아지는 전형적인 조직학적 염증 반응을 보여주었다. 비브리오균이 유도한 조직 특이적 염증반응기작을 알아보기 위해, 비브리오에 감염된 회장상피조직으로부터 단백질과 mRNA를 분리하였다. 비브리오균은 숙주세포의 중추적 신호전달 단백질인 protein kinase C (PKC)의 인산화 및 PKC $\alpha$ 의 세포막이동을 촉진시켰고, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 중 extracellular signal-regulated kinases (ERK)와 c-Jun N-terminal kinases (JNK)의 인산화를 유도하였지만, p38 MAPK 인산화에는 영향을 미치지 않았다. 특히 비브리오균은 inhibitory factor-kappa B (I- $\kappa$ B)의 활성을 촉진시킴으로써 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)의 인산화를 유도하였다. 마지막으로 비브리오균(WT)에 감염된 회장의 경우, 정상마우스에 비해 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 의 mRNA 수준이 유의적으로 증가되었다. 염증매개 수용체인 toll like receptor (TLR)-4, TLR-5, TLR-9의 mRNA의 발현 또한 비브리오균 처리에 의해 증가되어 있음이 관찰되었다. 종합적으로 오염된 식품 섭취를 통해 유입되는 비브리오균은 회장상피세포를 표적으로 염증반응을 일으키며, 그 기작은 PKC, ERK1/2, 그리고 JNK의 인산화를 통한 NF- $\kappa$ B 활성의 촉진이며, 이로 인한 다양한 염증 매개 단백질 발현의 증가를 통해 이루어진다고 할 수 있다.