

Research for Intestinal Mucosal Immunity Induced by *Salmonella enteritidis* Infection

Kang-Hee Lee¹, Se-Hui Lee¹ and Jin-Young Yang^{1,2*}

¹Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received September 8, 2021 / Revised September 18, 2021 / Accepted September 24, 2021

Mucosal immunity is a well-designed defense system that builds precise and dynamic relationships against pathogens, and the gastrointestinal tract is the most important organ with this system, acting as a guardian at the forefront of its activity. *Salmonella* spp. cause food poisoning, entering the body orally and mainly invading the Peyer's patches of the small intestine. Although *Salmonella* strains share similar mechanisms for inducing innate immunity, different serotypes may have different effects on the intestinal mucosa due to host specificities and pathogenicity. In this study, we evaluated the effects of *Salmonella enteritidis* infections in mouse intestine and observed significantly reduced dose-dependent survival rates in a challenge test. Flow cytometry data showed no significant differences in intestinal immune cell populations, although histology indicated increased mucin production and decreased goblet cell counts in the *Salmonella*-treated groups. Furthermore, *Claudin* expression was significantly decreased in the samples with *Salmonella*. To investigate the relationship between *S. enteritidis* infection and inflammatory response, dextran sodium sulfate (DSS) was administered after infection and the results indicate lower survival rate after DSS treatment. In conclusion, we were able to identify the optimal concentration of *S. enteritidis* to modulate the intestinal mucosal immunity of mice and inflammatory response.

Key words : Dextran sodium sulfate (DSS), intestinal inflammation, non-typhoid *Salmonella*, mucosal immunity, *Salmonella enteritidis*

서 론

식중독을 유발하는 원인균 중 살모넬라는 우리나라에서 병원성 대장균 다음으로 가장 높은 발병률을 기록하는 세균이다. 물과 음식을 통해 가축과 사람에게 감염하는 살모넬라는 그람음성의 통성 혐기성 균으로 지질다당류(Lipopolysaccharides, LPS)의 O항원과 플라젤린의 H항원의 종류를 기반으로 현재까지 2,500개 이상의 혈청형이 밝혀져 있다. 살모넬라는 파충류에만 감염하는 *Salmonella* (*S.*) *bongori*와 사람을 포함하여 다양한 종을 숙주로 삼는 *S. enterica*로 분류되어 있다[5, 9]. *S. enterica*는 다시 장티푸스를 일으키는 *S. typhi*와 장티푸스를 일으키지 않는 비장티푸스성 살모넬라(non-typhoidal *Salmonella*)로 분류된다. 장티푸스에 걸리면 고열과 함께 가슴에 붉은 반점이 생기고 장출혈이 발생하기도 한다. 비장티푸스성 살모넬라는 장티푸스를 일으키지는 않지만 장염과 설사 및

고열을 유발하며 태어나 말라리아에 감염된 면적이 저하된 사람에게서 균혈증을 일으킨다[1, 8, 10, 15]. 비장티푸스성 살모넬라에는 대표적으로 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*가 있으며 전 세계적으로 연간 3.4백만건의 발병건수와 60만명 이상의 사망자가 발생하고 주로 위생이 취약한 아프리카에서 발생한다[1].

살모넬라가 물과 음식을 통해 숙주내로 들어왔을 때 숙주는 다양한 면역반응으로 이를 방어하려 한다. 세균이 장에 도착하기 전에 숙주가 발동하는 방어기작은 타액에 존재하는 라이소자임과 위산이다[23]. 숙주는 라이소자임으로 세균 세포벽의 펩티도글리칸층 합성을 막고 그 다음 위에서 강한 산성으로 세균을 죽인다. 그 다음 방어기작은 장내 점막층에서 일어난다. 점막은 배상세포(goblet cell)에 의해 분비되어 상피세포를 덮고 이를 흘러 보내 외부 항원이 상피세포에 감염하는 것을 막는다[12]. 소장 점막은 MUC2 당단백질을 주 성분으로 하는 느슨한 단일 점막층으로 이루어져 있으며, 파넬트 세포(Paneth cell)에 의해 분비되는 항균 물질을 포함하여 항원을 포획하거나 죽임으로써 상피세포를 보호한다[13, 16]. 점막과 더불어 숙주는 파이어 판을 덮고 있는 M세포를 통해 항원을 제거한다. M세포는 항원을 림프소낭으로 운송하여 선천성 면역반응을 일으킨다. 활성화된 선천성 면역세포는 감염의 초기에 사이토카인과 케모카인을 생성하고 염증성 세포들을 감염이 일어난 부위로 운반하여 살모넬라의 증식을 억제한다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2286, Fax : +82-51-581-2962

E-mail : jyyang99@pusan.ac.kr

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.

수지상세포와 대식세포 그리고 호중구의 수 또한 빠르게 증가하여 TNF α 를 생산하고 자연살해세포와 T 세포는 IFN γ 를 분비해 대식세포를 활성화시켜 살모넬라의 증식을 막는다[11, 14, 26]. 장 내의 공생균 또한 항원을 방어하는데 중요한 역할을 한다. 공생균은 장 내에서 항원과 영양분을 두고 경쟁을 하면서 항원의 증식을 억제하고 동시에 면역세포의 분화에 중요한 역할을 한다[29]. 선천성 림프구 세포(Innate lymphoid cells, ILCs)나 Th17세포에 의한 사이토카인의 생산을 촉진하고 호중구의 활성화와 면역글로불린G를 유도해 감염을 막는다[17, 27].

하지만 살모넬라는 숙주의 이러한 면역체계를 회피하는 다양한 기작을 가지고 있다. 음식을 통해 들어온 살모넬라는 숙주의 첫 방어기작으로서 라이소자임을 접하지만 그람음성의 살모넬라는 외막이 펩티도글리칸층을 덮고 있어 라이소자임으로부터 이를 보호할 수 있다[21]. 그리고 살모넬라는 식도를 통해 위에 들어와 강한 산성과 접하게 된다. 하지만 살모넬라는 RpoS, Fur, PhoQ/PhoP 그리고 EnvZ/OmpR을 통해 산성충격단백질을 조절하고 3가지 이상의 산 내성반응을 유도해 살아남는다[3]. 그 후 장으로 들어간 살모넬라는 숙주의 장 내점막층에 도착하지만, *in vitro*에서 수행된 최근 연구는 살모넬라가 점막을 따라 흘러가지 않고 장 상피세포와 M 세포에 침투하기 위한 감염 기작으로 *Salmonella* pathogenicity island-4 (SPI-4)에 암호화된 비펩브리아성 부착 단백질인 SiiE를 이용하여 상피세포의 세포 외 도메인 MUC1과 결합해 T3SS를 통한 감염가능성을 높일 수 있다고 밝혔다[18]. 점막층을 극복한 살모넬라는 상피세포와 수지상세포를 통해 감염할 수도 있지만 주로 M 세포를 통해 침입한다[20]. 침투에 성공한 살모넬라는 항원의 증식을 막기 위해 숙주에서 생산되는 대식세포안에서 증식을 할 수 있어 면역체계를 효과적으로 극복할 수 있다[30]. 살모넬라는 공생균으로부터 살아남기 위한 기작 또한 알려져 있다. 살모넬라 감염시 IL-22의 발현이 높아지는데 IL-22는 미생물로부터 금속이온을 격리시켜 공생균의 성장을 억제한다. 하지만 살모넬라는 철 이온이 고갈된 환경에서 대체기작을 통해 살아남을 수 있어 장내 공생균으로부터 효율적으로 살아남을 수 있다[2]. 더불어 최근 연구에서 살모넬라가 분비하는 SiiE 단백질이 마우스 골수에서 유래한 면역글로불린G를 분비하는 형질세포의 유지를 방해한다고 밝히며 살모넬라가 체액성 면역에서도 효과적으로 살아남을 수 있음을 밝혔다[19].

현재 장티푸스성 살모넬라는 효과적인 약독화 균주가 백신으로써 개발되어 사용되고 있지만(Ty21a) 비장티푸스성 살모넬라는 체액성 면역을 억제하는 특성으로 인하여 백신 개발에 어려움을 겪고 있다[26]. 비장티푸스성 살모넬라 중에서도 *S. typhimurium*은 다양한 논문에서 마우스모델을 이용하여 감염 기작과 방어기작이 활발히 연구되어 있는 반면, *S. enteritidis*는 비교적 연구가 되어있지 않다. 따라서 본 논문은 *S. enteritidis*

의 경구감염과 그에 대한 숙주의 방어기작을 숙주와 미생물의 관점에서 관찰해보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육 조건

실험 동물은 생후 6주령의 암컷 BALB/c마우스(Samtako)를 일주일간 동물실험실의 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 마우스는 온도 24-26 $^{\circ}$ C와 습도 45-55%로 유지된 동물실험실에서 실험용 쥐사료 SAM#31 (Samtako)와 1차증류수를 공급 받았으며 외부로부터의 공기가 차단된 MSRSII cage (Orient bio)에서 사육되었다. 살모넬라에 감염시키기 4시간 전에 사료와 물의 공급을 중단하였으며 감염시킨 후 4시간 뒤에 재공급 해주었다. 실험동물은 그룹당 3 마리를 사용하였으며 생존율을 측정하는 실험에서 4 그룹을 사용하였다. 모든 실험동물은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 사전승인 하에 동물실험윤리 기준에 따라 취급하였다(PNU-2021-2862).

박테리아의 배양 및 투여용량 설정

균주는 부산대학교 병원미생물학 연구실에서 분양 받은 *Salmonella enteritidis* PT1을 사용하였다. 전 배양을 위해 LB배지 2 ml에 살모넬라 단일콜로니를 접종하였으며 진탕배양기에서 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm으로 16시간 배양한 뒤 배양액 100 μ l를 LB배지 10 ml에 전배양과 같은 조건으로 본 배양을 실시하였다. 대수증식기에 있는 균을 실험에 사용하기 위하여 본 배양 후 1시간 단위로 O.D.값을 측정하여 성장곡선을 그렸다. 본 배양 후 2시간 50분째의 균을 사용하였으며 생균수 측정을 통해 측정된 집락형성단위(Colony forming units, CFUs)는 2.0×10^8 CFUs/ml였다. 살모넬라의 적정 투여량을 결정하기 위해 3 그룹(PBS, 3.2×10^8 CFUs/ml, 3.2×10^6 CFUs/ml)을 설정하고, 이를 PBS로 희석하여 100 μ l를 마우스에 경구투여하여 반수 치사량(Lethal dose 50, LD₅₀)을 측정하였다.

조직에서 살모넬라의 집락형성단위 측정

혈액에서 살모넬라의 집락형성단위를 측정하기 위해서 안와체혈을 통해 100 μ l의 혈액을 추출하였고 이를 100 배 희석하여 MacConkey agar배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 16시간 배양하였다. 소장에서는 회장만을 분리한 후 파이어패치를 절단하고 이를 PBS에 젠타마이신(50 mg/ml, Gibco)을 넣은 용액에서 상온에 1시간 동안 반응시켜 공생균을 제거하였다. 표면에 잔존하는 젠타마이신을 제거하기 위해서 PBS로 3 차례 세척한 뒤, 조직 무게 당 일정한 PBS를 넣고 homogenizer (DAIHAN Scientific Co, HG-15A)로 1분간 갈아주어 희석하여 MacConkey agar에 도말하였다. 비장은 젠타마이신을 처리하는 과정 없이 소장과 동일하게 진행하였다.

소장과 비장에서 세포추출법

소장으로부터 분변, 지방 그리고 파이어패치를 깨끗이 제거하였고 약 1 cm로 잘라 RPMI에 0.5 mM의 EDTA를 넣은 media에 280 rpm으로 stirring하며 25분간 반응시켜 주었다. 그 후 조직을 37°C PBS로 3 차례 씻어주고 위 과정을 한번 더 반복하였다. Lamina propria층을 정제하기 위하여 RPMI에 DNase와 collagenase를 넣고 37°C 인큐베이터에서 700 rpm으로 30분간 stirring하였다. 50 ml 튜브 위에 cell strainer (100 µm)를 올리고 상층액을 거른 후 RPMI를 채워 4°C, 1,200 rpm에 5분간 원심분리하여 펠렛을 얻은 후, 효소 처리 과정을 한번 더 반복하였다. 그리고 획득한 펠렛을 40% percoll 4 ml에 현탁하여 75% percoll 2 ml 위에 로딩한 후, 원심분리해 세포층을 분리하여 수확하였다. 수확한 세포는 RPMI 1 ml에 현탁하여 사용하였다. 한편, 비장은 RPMI (Gibco)에 FBS를 10% 채운 media 5 ml에서 충분히 으개 준 후, cell strainer에서 걸러 모아준다. 15 ml 튜브에 모아 RPMI에 FBS를 2% 채운 media를 채워준 후 1,200 rpm 4°C에 5분간 원심분리를 해주고 상층액을 버린다. 적혈구의 용해를 위해서 ACK buffer를 2 ml 넣고 ice에서 2분간 반응시켜 주었다. 림프구를 얻기 위해 RPMI 10 ml 채워준 뒤 4°C, 1,200 rpm에 5분간 원심분리 해준다. 이후 상층액을 버리고 펠렛을 1 ml의 RPMI에 현탁하여 사용하였다. 이후 소장과 비장의 세포수 측정은 세포 현탁액과 trypan blue를 1:1로 혼합한 뒤, 10 µl를 hemocytometer에 로딩하여 측정하였다.

유세포 분석

소장과 비장 조직에서 획득한 세포를 CD45, CD4, CD8, CD11b, CD11c에 각각 FITC (BD bioscience), efluor450 (Invitrogen), PE (BD bioscience), Pe-Cy7 (BD bioscience), APC (BD bioscience)가 부착된 항체와 반응시켜 유세포분석에 사용하였다. 세포는 4°C, 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 미리 준비한 50 µl의 항체 cocktail과 반응시켰다. 항체 cocktail은 RPMI에 FITC (1:100), efluor450 (1:200), PE (1:200), Pe-Cy7 (1:400), 그리고 APC (1:200)를 혼합하여 사용하였다. 이를 차광한 상태로 4°C에서 20분간 항체와 반응시킨 다음, RPMI 1 ml을 넣어 4°C, 3000 rpm으로 4분간 원심분리하여 마지막으로 세포를 세척하였다. 상층액을 버린 후 펠렛을 200 µl의 PBS로 현탁하여 유세포 분석을 위한 샘플을 준비하였다.

조직염색을 위한 전처리

소장에서 살모넬라에 의해 유도된 염증반응을 조직학적으로 확인하기 위해 감염된 마우스에서 파이어패치를 포함하여 회장을 약 1 cm 절단한 후 지방과 분변을 제거하였다. 이를 4% 포르말린용액으로 하루 고정한 후 자동조직처리기(Leica, TP 1020)를 이용해 탈수를 진행하였다. 이후 파라핀 침투과정

을 통해 파라핀블록을 제작한 후 표본가공기(Leica, 149AUTO 00C1)을 사용해 5 µm 두께로 절편을 제작하였다. 이를 45°C 항온수조(Sunil science, SL-WBE-B)에 담근 후 슬라이드글라스에 옮기고, 50°C의 슬라이드워머(Ted pella Inc, XH-2001)에서 한시간 말려주었다.

Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

전처리한 조직을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하기 전에 파라핀을 제거하고 수분을 공급하기 위하여 슬라이드글라스를 두 번에 걸쳐서 자일렌으로 제거해주고 100%, 90%, 80%, 70%의 에탄올로 1분씩 처리한 후 흐르는 수돗물에 5분간 담구어 두었다. 이후 세포핵의 염색을 위하여 헤마톡실린을 1분간 처리하였고, 흐르는 물에 5분간 담구어 충분히 씻어 주었다. 대조염색을 위하여 에오신을 30초 처리한 후, 10초간 흐르는 물에서 씻어 주었다. 그 후 조직의 탈수를 위해 95% 에탄올을 20초 처리해주고, 100% 에탄올을 1분간 처리해주었다. 그리고 자일렌을 1분 처리하고 permount (Fisher chemical)를 사용해 커버글라스를 덮어주었다.

Periodic acid-Schiff (PAS) 염색

전처리한 조직을 Periodic acid와 Schiff용액으로 염색하기 위해 H&E염색과 동일하게 수분을 공급해주는 과정을 진행한 뒤 Periodic acid를 5분간 처리해 주고 Schiff용액을 15분간 처리해 주었다. 이후 30초간 헤마톡실린으로 대조염색을 실시하였으며 H&E염색과정과 동일하게 에탄올과 자일렌을 처리하고 permount를 사용해 커버글라스를 덮어주었다.

실시간 종합효소연쇄반응(Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

RNA를 얻기 위해 맹장과 가까운 회장조직을 잘라 트리졸(Ambion) 500 µl에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 µg로부터 cDNA를 합성하였고, 밀착연접에 관련된 유전자의 발현은 Table 1에 제시한 primer와 함께 SYBR Green master mixture (Applied biosystems, USA)를 사용하여 CFX

Table 1. Primers lists used for real-time PCR [31]

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
<i>β-actin</i>	Forward	CGTGAAAAGATGACCCAGATCA
	Reverse	CACAGCCTGGATGGCTACGT
<i>E-cadherin</i>	Forward	CACCTGGAGAGAGGCCATGT
	Reverse	TGGGAAACATGAGCAGCTCT
<i>Occludin</i>	Forward	CCTCCAATGGCAAAGTGAAT
	Reverse	CTCCCCACCTGTCGTGTAGT
<i>ZO-1</i>	Forward	CCACCTCTGTCCAGCTCTTC
	Reverse	CACCGGAGTGATGGTTTTCT
<i>Claudin</i>	Forward	TATGTTGGTGCCAGCATTGT
	Reverse	TCATGCCACCACAGAGATA

Connect Real-Time System (BioRAD, Singapore)에서 확인하였다.

통계처리

본 실험의 모든 실험결과는 평균±표준 오차로 나타내었으며, Graph pad prism (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA)을 이용하였다. 마우스의 생존율에 관한 실험결과는 Log-rank test를 통해 검증하였으며 마우스의 몸무게 감소율에 관한 실험결과는 multiple t test를 실시한 후 Holm-Sidak test로 검증하였다. 살모넬라의 집락형성능에 관한 실험결과는 two-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였으며 실시간 중합효소연쇄반응에 관한 실험결과는 two-tailed paired t test로 분석하였다.

결과 및 고찰

마우스 감염실험을 위한 반수치사량 측정

살모넬라(*Salmonella* (S.) *enteritidis* PT1)의 마우스 감염 실험에 선행하여 적정 농도를 정하기 위해 반수치사량(Lethal Dose 50, LD₅₀)을 측정하는 실험을 우선적으로 실시하였다. 그룹 당 6 마리의 BALB/c 마우스에 해당 살모넬라 현탁액을 4×10⁶ CFUs/ml과 4×10⁸ CFUs/ml의 다른 농도로 각각 100 μl씩 경구투여하고, 14 일간 생존율과 몸무게 변화를 모니터링하였다. Fig. 1A의 4×10⁶ CFUs/ml 농도를 경구 투여한 그룹에서는 6 마리의 마우스에서 감염 후 8일차에 2 마리, 그리고 10일차에 1 마리가 죽었으며 죽기 전날의 마우스들의 몸무게는 감염 전에 비해 약 10% 감소하였다. 동일한 그룹에서 감염 후 14일차까지 살아남은 세 마우스 중 한 마리의 몸무게는 약 13% 감소하였으나, 나머지 두 마리의 몸무게는 각각 3.27%, 10.64% 증가하였다. Fig. 1B의 몸무게 변화율 그래프에서 마우스가 죽은 날에는 몸무게가 감소한 마우스가 전체에서 제외되어 평균 체중변화 그래프가 다소 증가하는 양상을 보인다. 따라서 이 농도로 마우스에 투여한 살모넬라가 그룹 내 모든 마우

스 개체에 동일하게 작용하고 있지는 않다는 것을 의미한다. 이 실험을 통해 *S. enteritidis*의 반수치사량은 4×10⁶ CFUs/ml임을 알 수 있었다. 반면 4×10⁸ CFUs/ml 농도(100 LD₅₀)를 경구 투여한 그룹에서는 감염 후 4일부터 9일까지 매일 한 마리씩 죽었으며, 이들의 몸무게 감소율은 평균 16.64%이었다. 따라서 고농도의 *S. enteritidis*의 경구투여를 통해 마우스의 심각한 체중감소 현상과 유의적인 치사량을 확인할 수 있었다. Non-typhoidal *Salmonella*의 대표적인 균주인 *S. typhimurium*의 장 점막을 통한 감염 메커니즘은 잘 알려져 있다[7]. 본 실험을 통해 *S. enteritidis* 역시 구강경로를 통한 감염 메커니즘은 다른 혈청형의 살모넬라와 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다.

살모넬라 감염에 따른 조직 내 면역세포 측정

Fig. 1A에서 확인하였듯이 경구 투여한 *S. enteritidis*의 농도와 숙주 생존능은 밀접한 관련이 있기 때문에, *S. enteritidis* 감염 이후 나타나는 장점막 환경의 변화를 관찰하기 위해서는 반수치사량보다 더 낮은 농도를 측정할 필요가 있었다. 이를 위해 반수치사량의 절반(½LD₅₀; 2×10⁶ CFUs/ml)을 100 μl 경구투여하고 마우스 개체별 체중변화를 세밀하게 모니터링하면서, 일주일 뒤 각 그룹 개체의 소장 및 비장, 그리고 혈액을 각각 채취에서 선택배지를 통해 CFU를 측정하였다. *S. enteritidis*를 투여하고 일주일 뒤 4 마리 중 한 마리만이 5% 정도의 체중감소를 보였고(data not shown), 그 개체의 소장 및 비장, 그리고 혈액에서만 살모넬라가 검출되었다(Fig. 2A). 단순히 감염시킨 *S. enteritidis* PT1의 투여량의 감소가 감염능 자체에 영향을 끼치지 않는지를 재차 확인하기 위하여 두 그룹의 마우스에 각각 복강과 경구를 통해 반수치사량 절반의 현탁액 (2×10⁶ CFUs/ml) 100 μl을 투여하고 하루 뒤 소장, 비장 그리고 혈액에서 선택배지를 통해 CFU를 측정하였다. 흥미롭게도 복강 내 투여를 한 그룹에서는 24시간 만에 각 조직에서 살모넬라가 검출되는 것에 비해, 경구투여를 한 그룹에서는 콜로니가 전혀 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이를

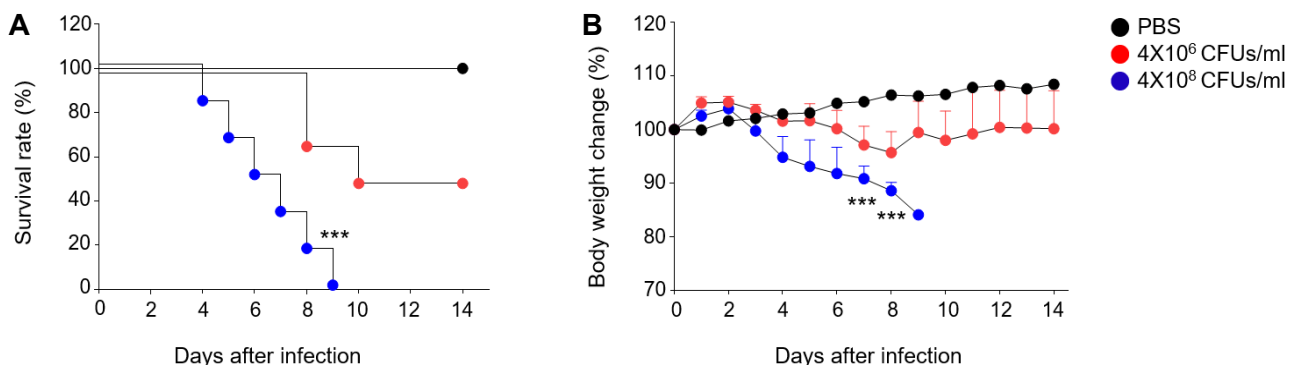


Fig. 1. Measuring Lethal Dose for mouse experiments. (A) Mice orally infected with *S. enteritidis* were monitored daily for survival to determine LD50 of *S. enteritidis* (4×10⁶ or 4×10⁸ CFUs/ml). (B) Body weight changes were monitored daily. Statistical analyses were performed with Log-rank test (A) and multiple t tests using Holm-Sidak method (B). ***p<0.001.

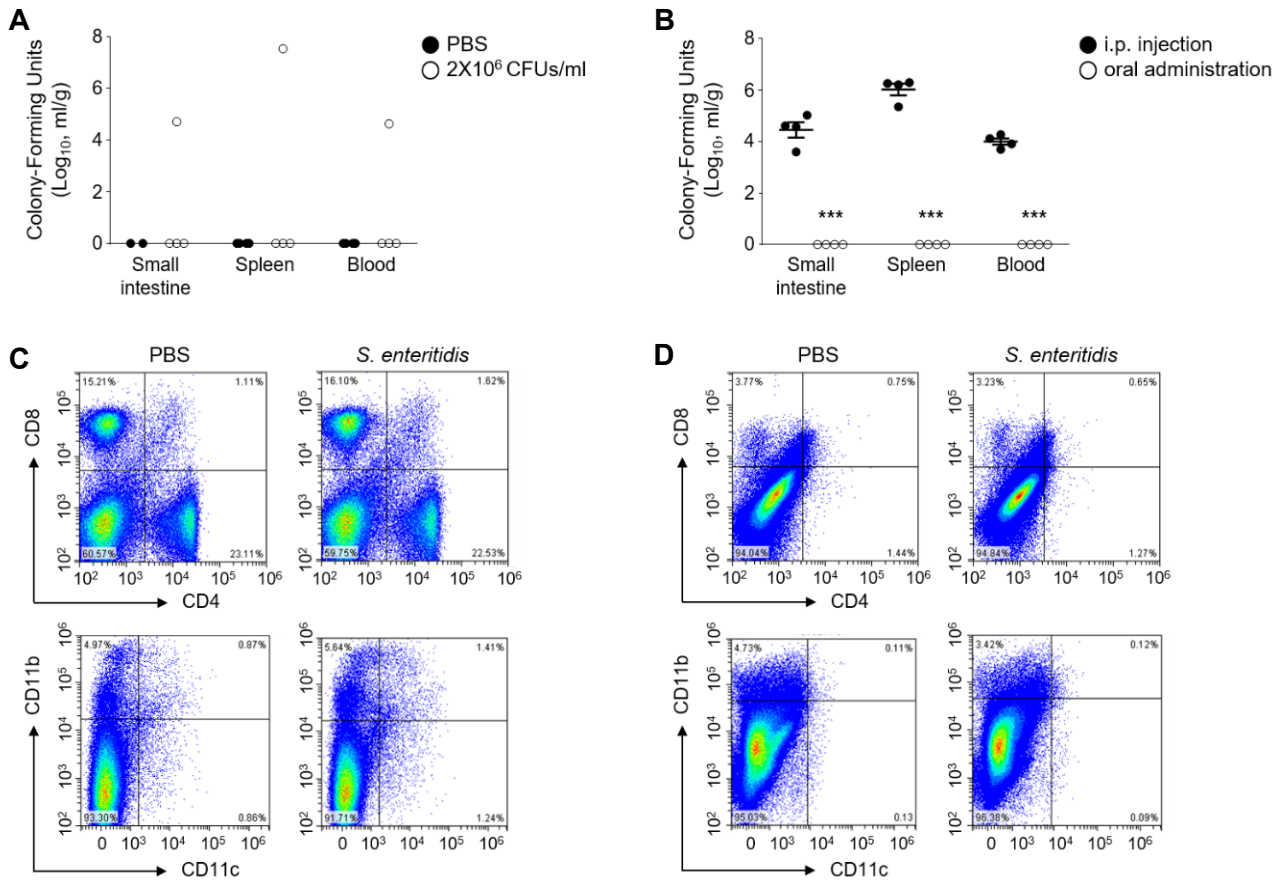


Fig. 2. $1/2$ LD₅₀ of *S. enteritidis* hardly penetrate intestinal epithelial cells. (A) CFUs were measured in small intestine, spleen and blood 7 days after infection. (B) CFUs were measured in same organs 1 days after infection through oral or intraperitoneal routes. T cells and dendritic cells were analyzed in spleen (C) and small intestine (D) 3 days after infection by FACS analysis. Statistical analyses were performed with regular two-way ANOVA (B). *** $p < 0.001$.

통해 *S. enteritidis* 역시 다른 살모넬라처럼 마우스에 감염되는 경로와 초기 투여농도가 소장뿐만 아니라 비장과 같은 2차 면역조직 내 살모넬라 증식에 큰 영향을 끼치는 사실을 알 수 있었다. 그렇다면 해당 농도의 *S. enteritidis*의 경구투여가 마우스 장내 세포들에 끼치는 영향을 살펴보기 위해 *S. enteritidis* 감염 3일차의 비장과 소장에서 T 세포와 수지상세포의 변화를 분석하였다(Fig. 2C - Fig. 2D). 유세포 분석을 통해 PBS그룹의 세포들과 비교해 보았을 때 *S. enteritidis* 감염 후 비장(Fig. 2C)과 소장(Fig. 2D), 모두에서 T 세포와 수지상세포 비율의 변화가 보이지 않았다. 선행된 연구에서는 살모넬라가 장내 방어막을 침투할 때 수지상세포와 T 세포는 이를 막기 위해 파이어 판에 몰려든다고 밝혔다[6, 22, 24]. 이로 미루어 볼 때, Fig. 2C와 Fig. 2D는 *S. enteritidis* 감염 초기에 점막과 상피세포에서 균의 방어에 성공한다면, 조직 내 T 세포와 수지상세포의 역할이 상대적으로 줄어들 수 있음을 제시하는 것이므로 우리는 *S. enteritidis* 감염이 마우스의 점막 환경, 특히 장 상피세포에 어떤 영향을 끼치는지 알아보았다.

H&E 염색과 PAS 염색을 통한 용모와 파이어판에서의 병변 확인

*S. enteritidis*의 경구투여 후 마우스의 소장에서 일어나는 병변을 조직학적으로 확인하기 위해서 감염 후 일주일 뒤에 마우스를 희생하여 회장의 용모와 파이어 판을 H&E 염색(Fig. 3A)과 PAS 염색(Fig. 3B)을 통하여 확인하였다. Fig. 3A 윗쪽 패널의 파이어 판에서는 PBS를 투여한 그룹과 *S. enteritidis*를 투여한 그룹 간에 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었지만, 아래쪽 패널의 상피세포층을 살펴보면 *S. enteritidis*를 투여한 그룹에서 용모의 끝부분이 쓸려나가고, 용모간의 경계가 흐려지는 모습을 확인하였다(검은 화살표 부분). 따라서 반수치사량의 절반에 해당하는 *S. enteritidis*는 M세포를 통한 파이어 판의 감염은 일으키지 않지만, 마우스의 소장의 상피세포에는 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 또한, 술잔세포 내 축적되거나 분비되는 뮤신을 관찰하기 위하여 PAS염색을 실시한 결과, 대조군과 비교했을 때 *S. enteritidis*를 투여한 그룹에서 술잔세포 수의 감소와 뮤신분비의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 추가적으로 *S. enteritidis*가 장 상피세포에서의 밀착연접(tight

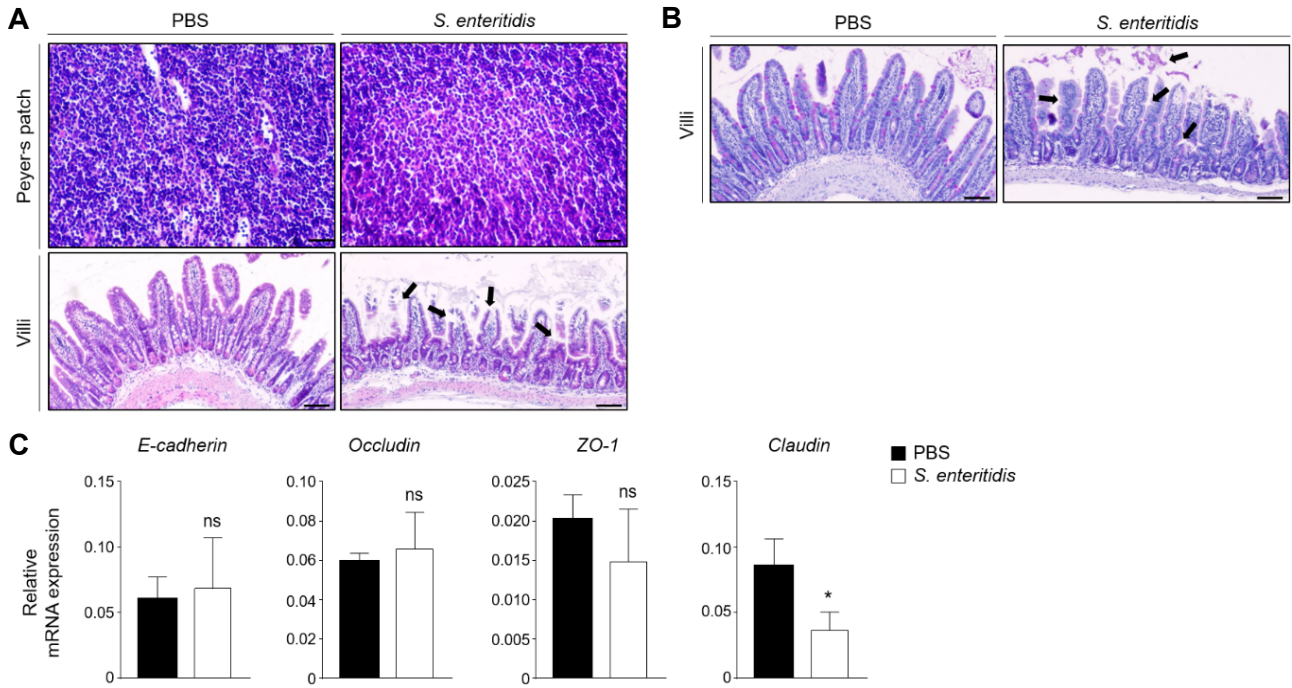


Fig. 3. *S. enteritidis* infection generates the loss of tight junctions and secretion of mucin. (A) Peyer's patch and villi of ileum were stained with H&E staining. (B) Villi of ileum were stained with PAS staining. Tissue damage and secretion of mucin are indicated (arrow). Scale bars represent 50 μ m. (C) Expression of tight junction related genes was measured by qRT-PCR. Statistical analyses were performed with two-tailed paired *t*-test. * $p < 0.05$; ns, not significant.

junction)에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. enteritidis* 감염 후 7일차 회장 조직에서 *E-cadherin*, *Occludin*, *ZO-1*, 그리고 *Claudin* 유전자의 발현량을 측정할 결과, 흥미롭게도 상피세포

의 말단부위에서 주로 발현하는 *Claudin*의 mRNA 발현량만이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3C). 밀착연접단백질은 장 상피세포를 연결하는데 있어 가장 중요한 요인으로 꼽히며 특히

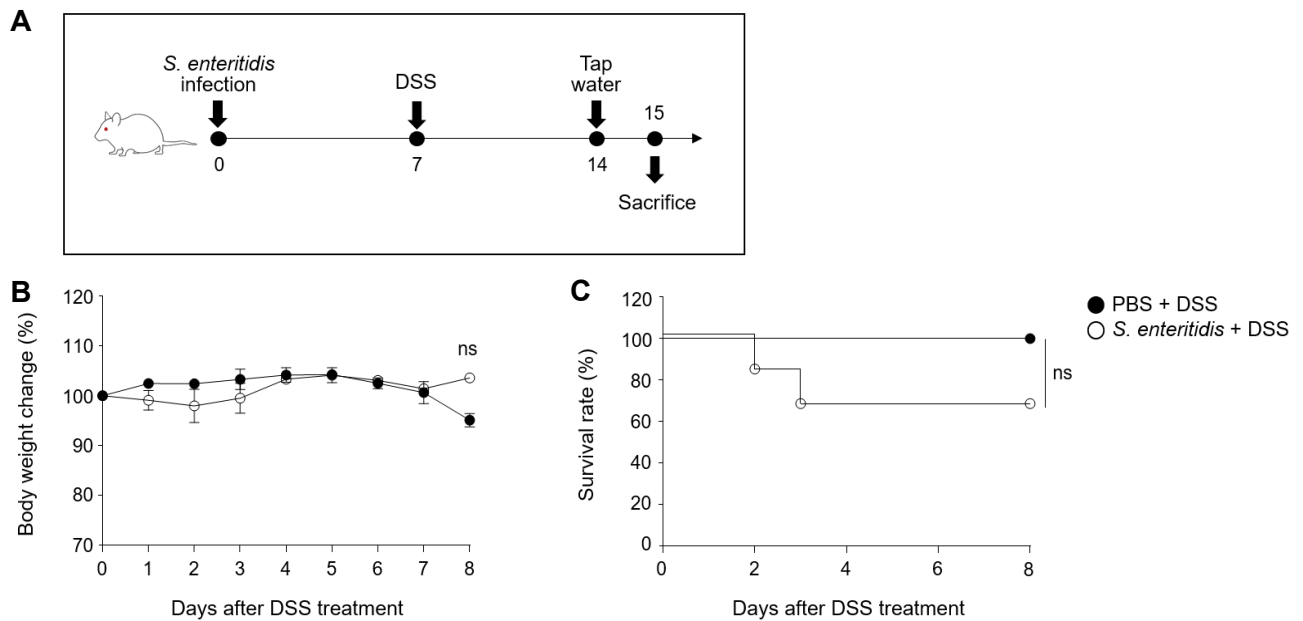


Fig. 4. *S. enteritidis* infection increases inflammatory susceptibility of mice. (A) Schematic of strategies for administration of *S. enteritidis* and DSS. Body weight (B) of mice infected with *S. enteritidis* and survival rate (C) was monitored after 3% DSS treatment. ns, not significant.

*Claudin*은 최근 연구에서 장 내 방어막의 역할과 동시에 다양한 질병의 중요한 신호전달의 매개체로 알려져 있다[4, 28]. 또한 비슷한 연구에서 *S. typhimurium*이 장내 상피세포 내의 *Claudin*을 포함한 밀착연접단백질을 조절한다고 밝혔다. 이를 통하여 *S. enteritidis*에 의해 유도되는 장 상피세포의 손상이 다른 질환을 유도할 수 있다고 판단하였으며 특히 염증반응에 민감하게 반응할 것이라 추측하였다.

S. enteritidis 감염이 장내 염증반응에 미치는 영향 조사

*S. typhimurium*에 감염된 마우스는 DSS에 의해 유도되는 염증반응에 더 민감하다는 선행연구[25]에 착안하여 *S. enteritidis* 감염으로 인해 약해진 상피세포 간 밀착연접이 장내 염증유도에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위한 실험을 설계하였다(Fig. 4A). 앞의 실험에서 정한 반수치사량 절반 농도의 *S. enteritidis*를 경구 감염시키고, 3% DSS를 처리한 그룹의 체중 변화(Fig. 4B)와 생존율(Fig. 4C)을 8일 동안 모니터링 하였다. PBS를 경구 투여한 대조군에 비해 *S. enteritidis*를 감염시킨 실험그룹에서 DSS처리 후 2~3일차에 일부 개체들이 5% 정도의 체중감소를 보이다가 죽었는데(Fig. 4B-Fig. 4C), 이는 DSS로 장 염증을 유도시키는 일반적인 실험에서는 볼 수 없었던 현상들이었다. 이를 토대로 앞선 결과들과 함께 유추해보면, *S. enteritidis* 감염으로 인하여 손상된 상피세포의 말단부위에 추가로 처리한 DSS가 직접 영향을 끼쳐 장내 유도되는 염증반응의 시기를 더 앞당기고, 나아가 생존에까지 영향을 끼친 것으로 보인다. DSS가 손상된 상피세포 혹은 다른 장내 면역세포 내에 염증반응을 증폭시키는 자세한 신호 메커니즘을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)과 2020학년도 부산대학교 BK21 FOUR 대학원혁신지원사업 지원으로 이루어졌습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ao, T. T., Feasey, N. A., Gordon, M. A., Keddy, K. H., Angulo, F. J. and Crump, J. A. 2015. Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010(1). *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 941-949.
- Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C. P., Edwards, R. A., George, M. D., Ouyang, W. and Raffatellu, M. 2014. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity* **40**, 262-273.
- Bernal-Bayard, J. and Ramos-Morales, F. 2018. Molecular mechanisms used by *Salmonella* to evade the immune system. *Curr. Issues Mol. Biol.* **25**, 133-168.
- Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Banuelos, C., Gonzalez-Mariscal, L., Schnoor, M. and Orozco, E. 2013. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One* **8**, e65100.
- Broz, P., Ohlson, M. B. and Monack, D. M. 2012. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* **3**, 62-70.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. and Germain, R. N. 2006. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.* **203**, 2841-2852.
- Fabrega, A. and Vila, J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 308-341.
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S. and Gordon, M. A. 2012. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* **379**, 2489-2499.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C. and Grassl, G. A. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* **5**, 391.
- Graham, S. M., Walsh, A. L., Molyneux, E. M., Phiri, A. J. and Molyneux, M. E. 2000. Clinical presentation of non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in Malawian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 310-314.
- Ingram, J. P., Brodsky, I. E. and Balachandran, S. 2017. Interferon-gamma in *Salmonella* pathogenesis: New tricks for an old dog. *Cytokine* **98**, 27-32.
- Johansson, M. E. and Hansson, G. C. 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 639-649.
- Johansson, M. E., Sjovall, H. and Hansson, G. C. 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 352-361.
- Kak, G., Raza, M. and Tiwari, B. K. 2018. Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol. Concepts* **9**, 64-79.
- Keddy, K. H., Musekiwa, A., Sooka, A., Karstaedt, A., Nana, T., Seetharam, S., Nchabaleng, M., Lekalakala, R., Angulo, F. J., Klugman, K. P. and for Germs-SA. 2017. Clinical and microbiological features of invasive nontyphoidal *Salmonella* associated with HIV-infected patients, Gauteng Province, South Africa. *Medicine (Baltimore)* **96**, e6448.
- Kim, Y. S. and Ho, S. B. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**, 319-330.
- Kogut, M. H., Lee, A. and Santin, E. 2020. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult. Sci.* **99**, 1906-1913.
- Li, X. Y., Bleumink-Pluym, N. M. C., Luijckx, Y. M. C. A.,

- Wubbolts, R. W., van Putten, J. P. M. and Strijbis, K. 2019. MUC1 is a receptor for the *Salmonella* SiiE adhesin that enables apical invasion into enterocytes. *PLoS Pathog.* **15**, e1007566.
19. Manne, C., Takaya, A., Yamasaki, Y., Mursell, M., Hojyo, S., Wu, T. Y., Sarkander, J., McGrath, M. A., Cornelis, R., Hahne, S., Cheng, Q., Kawamoto, T., Hiepe, F., Kaufmann, S. H. E., Yamamoto, T., Radbruch, A. and Tokoyoda, K. 2019. *Salmonella* SiiE prevents an efficient humoral immune memory by interfering with IgG(+) plasma cell persistence in the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 7425-7430.
20. Martens, E. C., Neumann, M. and Desai, M. S. 2018. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 457-470.
21. Masschalck, B. and Michiels, C. W. 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **29**, 191-214.
22. Mittrucker, H. W. and Kaufmann, S. H. 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc Biol.* **67**, 457-463.
23. Ragland, S. A. and Criss, A. K. 2017. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **13**, e1006512.
24. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. and Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**, 361-367.
25. Schultz, B. M., Salazar, G. A., Paduro, C. A., Pardo-Roa, C., Pizarro, D. P., Salazar-Echegarai, F. J., Torres, J., Riedel, C. A., Kalergis, A. M., Alvarez-Lobos, M. M. and Bueno, S. M. 2018. Persistent *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection increases the susceptibility of mice to develop intestinal inflammation. *Front. Immunol.* **9**, 1166.
26. Takaya, A., Yamamoto, T. and Tokoyoda, K. 2019. Humoral immunity vs. *Salmonella*. *Front. Immunol.* **10**, 3155.
27. Ubeda, C., Djukovic, A. and Isaac, S. 2017. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin. Transl. Immunol.* **6**, e128.
28. Venugopal, S., Anwer, S. and Szaszi, K. 2019. Claudin-2: roles beyond permeability functions. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5655.
29. Vogt, S. L., Pena-Diaz, J. and Finlay, B. B. 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* **34**, 106-15.
30. Watson, K. G. and Holden, D. W. 2010. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cell. Microbiol.* **12**, 1389-1397.
31. Yang, J. Y., Jie, Z., Mathews, A., Zhou, X., Li, Y., Gu, M., Xie, X., Ko, C. J., Cheng, X., Qi, Y., Estrella, J. S., Wang, J. and Sun, S. C. 2020. Intestinal epithelial TBK1 prevents differentiation of t-helper 17 cells and tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **159**, 1793-1806.

초록 : *Salmonella enteritidis* 감염에 의해 장내 점막에서 유도되는 면역반응에 관한 연구

이강희¹ · 이세희¹ · 양진영^{1,2*}

(¹부산대학교 생명시스템학과, ²부산대학교 생명과학과)

점막면역체계는 병원체에 대하여 정밀하게 설계된 생물체의 방어체제로 그 중 위장관은 최전방에서 가장 중요한 기능을 하는 기관이다. 숙주 감염을 일으키는 병원성 미생물 가운데 식중독을 유발하는 살모넬라는 구강경로로 체내로 들어와 파이어판을 통해서 침입한다. 다양한 혈청형의 살모넬라 균주는 여러 톨루사수용체의 리간드를 통해서 숙주의 선천면역을 자극하지만, 숙주 특이성과 병원성에 따라 장내 점막에서 다양한 후천면역반응을 유도하기도 한다. 우리는 살모넬라 균주 중 비교적 연구가 덜 되어있는 *S. enteritidis*에 의해 감염되었을 때 장내에서 일어나는 면역반응을 연구하였다. 우선 마우스에 처리할 적정 농도의 살모넬라 농도를 정하기 위해 살모넬라의 농도를 다르게 하여 실험을 진행하였고 고농도의 살모넬라 처리군에서 더 낮은 생존율과 높은 몸무게 감소를 관찰하였다. 반수치사량의 반에 해당하는 농도의 살모넬라를 마우스에 감염시켰을 때 장내 수지상세포와 T 세포에 유의적인 차이가 없는 것을 확인하였다. 하지만 동일한 조건의 마우스에서 회장조직을 염색했을 때 뮤신 분비의 증가와 술잔세포의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 밀착연접단백질 유전자의 상대적인 발현량을 분석하였고 살모넬라 처리군에서 *Claudin*의 유의적인 감소를 확인할 수 있었다. 이어 살모넬라 감염 후 DSS를 처리한 실험에서 살모넬라 처리군에서 생존율이 낮아짐을 확인하여 *S. enteritidis*가 염증반응을 악화시킨다는 것을 알 수 있었다.