

**\*Corresponding author:**

Hong-Gu Joo  
Laboratory of Veterinary Pharmacology,  
College of Veterinary Medicine, Jeju National  
University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju 63243,  
Korea  
Tel: +82-64-754-3379  
Fax: +82-64-756-3354  
E-mail: joooh@jejunu.ac.kr

ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Received: May 16, 2022

Revised: Jun 21, 2022

Accepted: Jun 24, 2022



© 2022 The Korean Society of Veterinary Science.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 항암제 (5-fluorouracil, doxorubicin, vincristine)로 인한 비장세포의 면역억제에 대한 *Bordetella bronchiseptica*의 보호 효과

이유정, 주홍구\*

제주대학교 수의과대학 수의약리학실

## The protective effects of sonicated *Bordetella bronchiseptica* bacterin on the immunosuppression of spleen cells induced by anti-cancer drugs (5-fluorouracil, doxorubicin, and vincristine)

You-Jeong Lee, Hong-Gu Joo\*

Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

### Abstract

5-Fluorouracil, doxorubicin, and vincristine are chemotherapy agents used to treat various cancers, such as breast cancer and lymphoma for decades, and their effects on cancer have been proven. On the other hand, these anti-cancer drugs cause fatal side effects, including immunosuppression. This study investigated whether sonicated *Bordetella bronchiseptica* bacterin (*B. bronchiseptica*) can attenuate the immunosuppression of spleen cells induced by these chemotherapy agents and which subsets of spleen cells were affected. *B. bronchiseptica* increased the metabolic activity of spleen cells treated with 3 anti-cancer drugs. Cell death analysis using Annexin V/propidium iodide showed that *B. bronchiseptica* markedly decreased the death of spleen cells. The subsets of spleen cells were analyzed by flow cytometry using a surface marker-specific antibody. *B. bronchiseptica* increased nitric oxide production in the spleen cells treated with anti-cancer drugs ( $p < 0.0001$ ). Despite the pharmacological effects of anti-cancer drugs, many patients suffer from the fatal side effects of immunosuppression. This study provides valuable information on how to overcome chemotherapy-induced immunosuppression.

**Keywords:** anti-cancer drugs; spleen cells; immunosuppression; *Bordetella bronchiseptica*; cytokine production

### 서론

5-Fluorouracil (5-FU)은 주로 대장암, 위암 및 유방암 등 고형암 치료에 사용되는 대사길항 항암제이다[1]. Doxorubicin (DOX)은 type II topoisomerase 억제제인 anthracycline 계열의 항암제이며[2], Vincristine (VCR)은 microtubule polymerization

저해제인 Vinca alkaloids 계열의 항암제이다[3]. 두 항암제는 자주 함께 사용되며, 많은 종류의 암 치료에서 특히 림프종에 효과를 나타낸다[4]. 많은 연구에 따르면, 항암제를 이용한 화학요법이 순환 림프구의 수치를 감소시키며, 심각한 경우 치료와 관련된 림프구 감소증을 일으키며 이는 환자의 생존율에 영향을 미치게 된다[5].

*Bordetella bronchiseptica*는 그람음성 간균이며, 동물에서 호흡기 감염을 주로 일으키는 병원체로 알려져 있다. *B. bronchiseptica*는 사람에서의 감염이 거의 일어나지 않으며, 사람에게서 백일해를 일으키는 *Bordetella pertussis*와 밀접한 연관이 있다[6,7]. *B. pertussis*는 TLR2를 통해 마우스의 수지상세포와 대식세포를 활성화하고, 강력한 면역 자극 효과 및 adjuvant 효과가 있다는 것이 밝혀졌다[8].

이전 연구에서, *B. bronchiseptica*를 마우스에 접종했을 때 비장세포가 증식 반응을 보이고 T helper 1 세포 반응을 유도할 수 있다는 것이 보고되었다[9]. 본 연구팀은 *B. bronchiseptica* 항원이 *Mycoplasma hyopneumoniae* 특이적 IgG의 생산을 증가시키고, 골수세포를 활성화하고 면역 기억 효과를 높인다는 것을 통해 *B. bronchiseptica*가 B 림프구에 영향을 미친다는 것을 알았다[10]. 또한 *B. bronchiseptica* 사균체가 수지상세포의 항원 제시 능력을 높여 백신 adjuvant 후보물질로서 사용할 수 있음을 보여주었다[11].

이번 연구에서는 *B. bronchiseptica*가 항암제에 대하여 비장세포를 보호할 수 있는지를 규명하여, 항암제로 인한 면역 억제를 극복해 낼 방안에 대하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 세포주

본 연구에 사용된 EL-4 (murine T lymphoblast cell line; Korean Cell Line Bank, Korea) 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine 이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. EL-4 세포는 암 세포이며  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 배양하였다.

### 실험동물과 약물

실험동물은 (주)샘타코 BIO (Korea)에서 제공받아 제주대학교 실험동물센터에서 유지하였으며, 8-12주령의 Balb/c 마우스를 실험에 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 시행하였다(승인번호: 2021-0047). 5-FU, DOX, VCR은 모두 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### *B. bronchiseptica*의 준비와 처리

*B. bronchiseptica*의 박테린은 next generation sequencing로 규명된 *B. bronchiseptica* 균주를 사용하였다. Luria Broth agar에서 24시간 배양한 뒤 초음파를 60% amplitude로 30초씩 3 cycles 처리하여 불활성화 하였다. *B. bronchiseptica* 박테린의 단백질 양은

Bradford assay로 측정하였다. 세포에 처리하는 박테린의 농도는 비장세포를 활성화하기 위한 lipopolysaccharide 농도와 동일하게 1 µg/mL로 정하여 사용하였다[12].

### 비장세포의 준비

비장세포는 본 실험실의 확립된 실험법에 따라 준비하였다[12]. 이산화탄소를 이용하여 마우스를 안락사시킨 후 비장을 적출하여 ACK lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)로 적혈구를 용혈시킨 후 세포 용액을 cell strainer (sieve size, 70 µm)에 통과시켰다. 비장세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acid, 10 mM Hepes buffer, 55 µM 2-mercaptoethanol이 포함된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 비장세포는  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 culture plate에 넣은 뒤 물질을 처리하였다.

### 세포의 대사활성도 측정

비장세포와 EL-4 세포를 각각  $1 \times 10^6$  cells/mL,  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 96-well culture plate에 분주하여 5-FU, DOX, VCR와 *B. bronchiseptica*를 처리한 후 3일간 배양하였다. Cell counting kit-8 (CCK-8; Dojindo, Japan)을 10 µL/well 농도로 처리하여 4 시간 동안 배양한 후 흡광도를 측정하였다. 비장세포와 EL-4 세포의 흡광도는 microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 사이토카인 생산량 측정

비장세포의 interleukin (IL)-2와 IL-4의 생산량을 측정하기 위하여 비장세포에 5-FU, DOX, VCR과 *B. bronchiseptica*를 처리한 후 3일간 배양하였다. 상층액을 분리하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Thermo Fisher Scientific)로 정량하였다. 분석은 제조사가 제시한 방법으로 진행되었으며 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포사 분석

물질을 처리한 비장세포의 세포사멸을 분석하기 위해 Annexin V-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC; BD Biosciences; USA)와 propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) 용액으로 세포를 염색하였다. 비장세포를 24-well culture plate에  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 분주하여 물질을 처리하고 24시간 배양하였다. 세포를 거두어  $1 \times$  Annexin binding buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세포를 세척한 후, 1 µL Annexin V-FITC로 10분간 염색하고, 유세포분석 5분 전에 20 µg/mL PI 용액 5 µL로 10분간 염색하였다. LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences)로 측정하여 FlowJo software (BD Biosciences)로 분석하였다.

**림프구 아형 분석**

림프구의 아형 분석을 위해 물질 처리된 비장세포에 1차 항체(Biotin-labeled CD4, CD8, CD19 antibody; BD Biosciences) 1  $\mu$ L를 4°C에서 30분간 처리한 후 2번 세척하였다. 이어서 2차 항체 (allophycocyanin-streptavidin; BioLegend, USA) 0.25  $\mu$ L로 4°C에서 30분간 염색 후 2번 세척하였다. LSRFortessa flow cytometer로 측정하여 FlowJo software로 분석하였다.

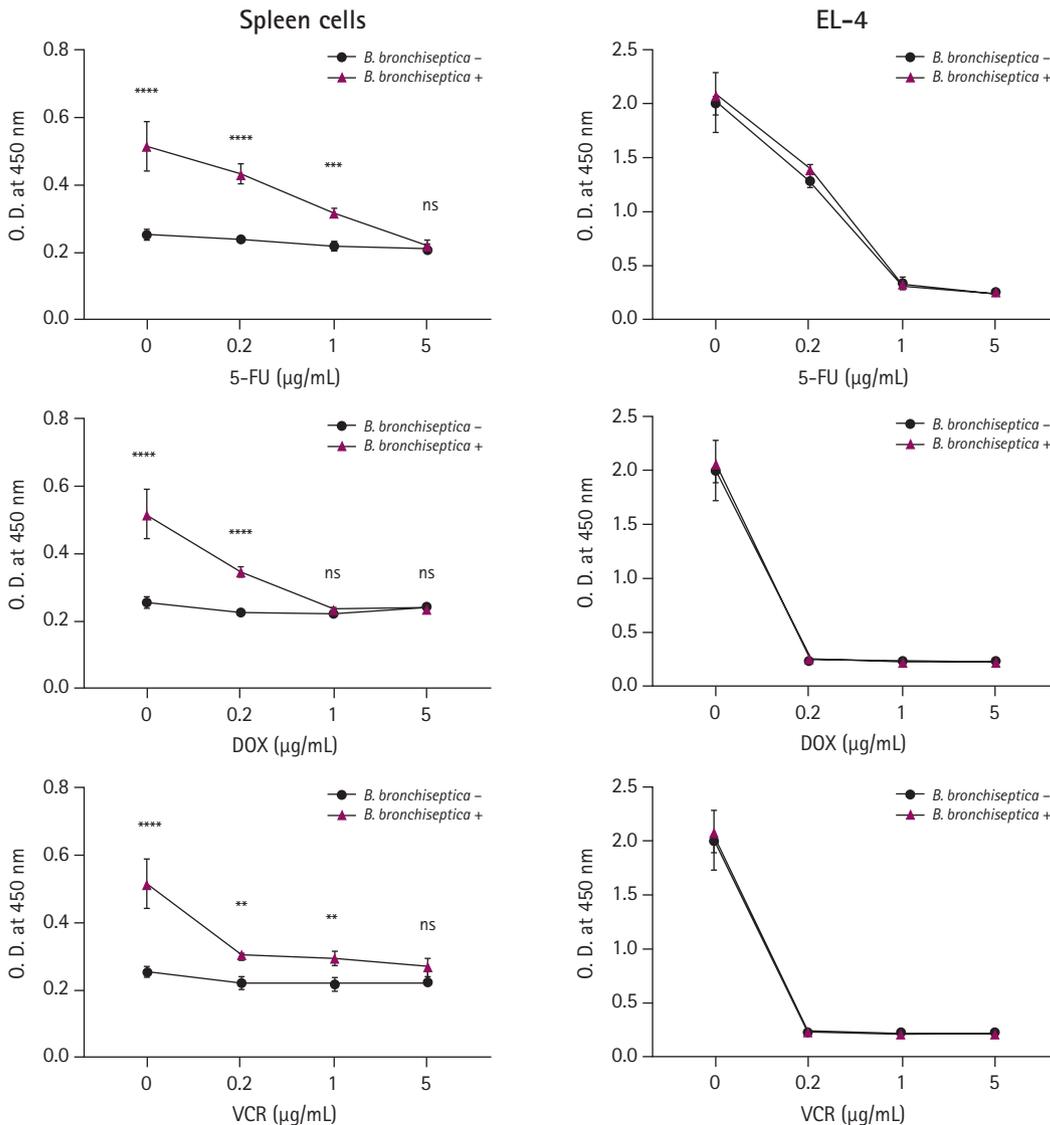
**Nitric oxide 생성능 평가**

비장세포의 nitric oxide (NO) 생성능 평가를 위해 Griess reagent

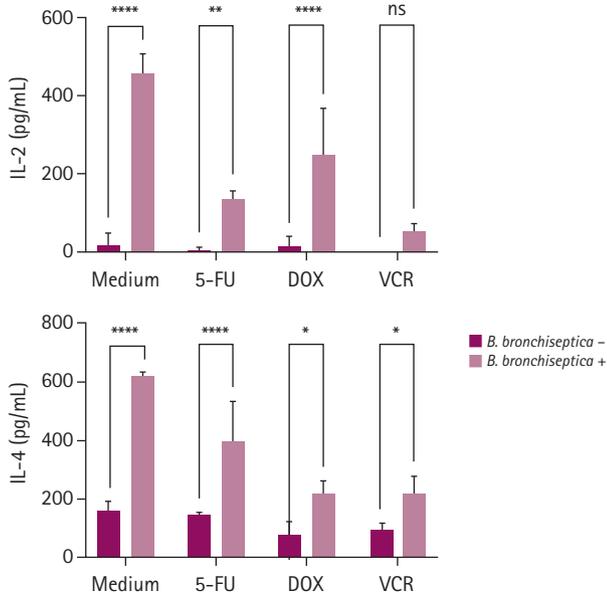
(0.1% N-1-naphthylethylenediamine, 1% sulfanilamide, 5%  $H_3PO_4$ )를 이용하였다. 물질을 처리한 비장세포의 상층액과 Griess reagent를 96-well plate에 각각 50  $\mu$ L씩 혼합하여 10분 반응 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 수준은 sodium nitrite를 이용한 standard curve를 이용하여 계산하였다.

**통계분석**

Fig. 1-3의 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며, 2-way ANOVA 분석 후 Sidak's multiple comparison test를 이용하여 *B. bronchiseptica* 처리 및 비처리군 간 차이의 유의성을 확인하였다.



**Fig. 1.** *Bordetella bronchiseptica* increases the metabolic activity of chemotherapeutic agent-treated spleen cells but not EL-4 cells. Spleen cells and EL-4 cells were cultured in a 96-well culture plate at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and  $1 \times 10^5$  cells/mL, respectively, and treated with 0 to 5  $\mu$ g/mL 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (DOX), and vincristine (VCR) and 1  $\mu$ g/mL *B. bronchiseptica* for 3 days. The cells were incubated with a CCK-8 solution for the last 4 hours and the optical density (O.D.) was measured at 450 nm using a microplate reader. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Significance at \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respectively compared to the group not treated with *B. bronchiseptica*. ns, not significant.



**Fig. 2.** Effect of *Bordetella bronchiseptica* on the production of interleukin (IL)-2 and IL-4 in spleen cells. Spleen cells were treated with 0.2 µg/mL 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (DOX), and vincristine (VCR) and 1 µg/mL *B. bronchiseptica* for 3 days. The supernatant of cells was collected and used for enzyme-linked immunosorbent assay. The optical density was measured at 450 nm using a microplate reader. The data are presented as mean ± standard deviation. Significance at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respectively compared to the group not treated with *B. bronchiseptica*. ns, not significant.

0.05 미만의  $p$ -value를 갖는 경우 유의한 것으로 판단하였다.

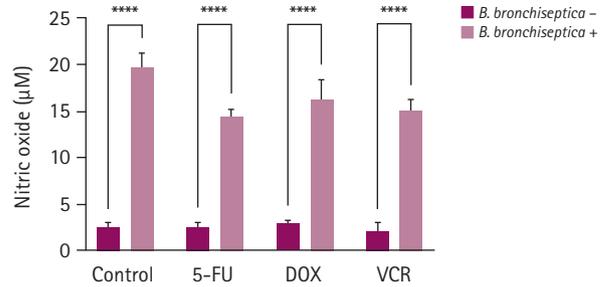
## 결과

### 항암제를 처리한 비장세포와 EL-4 세포에서 *B. bronchiseptica*에 의한 대사활성도 변화

항암제를 처리한 비장세포와 EL-4 세포의 대사활성도에 *B. bronchiseptica*가 영향을 미치는지 알아보기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다(Fig. 1). 비장세포의 경우, 5-FU와 VCR 처리군에서는 0-1 µg/mL 농도에서, DOX 처리군에서는 0-0.2 µg/mL 농도에서 *B. bronchiseptica*가 비장세포의 대사활성도를 유의하게 증가시켰다. 5 µg/mL의 농도에서는 모두 유의하게 증가하지 않았다. 반면에, EL-4 암세포의 경우, 5-FU 처리군은 1 µg/mL부터, DOX와 VCR 처리군은 0.2 µg/mL 농도부터 대사활성도가 크게 감소하였으며, 모든 농도에 걸쳐 *B. bronchiseptica*에 의한 대사활성도 증가는 나타나지 않았다.

### *B. bronchiseptica*가 항암제를 처리한 비장세포의 사이토카인 생산량에 대한 미치는 영향

*B. bronchiseptica*가 항암제를 처리한 비장세포의 사이토카인 분



**Fig. 3.** *Bordetella bronchiseptica* increases NO production in chemotherapeutic agent-treated spleen cells. Spleen cells were treated with 0.2 µg/mL 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (DOX), and vincristine (VCR) and 1 µg/mL *B. bronchiseptica*. NO production was determined using a NO assay, as described in "Materials and Methods". The data are presented as mean ± standard deviation. Significance at \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared to the group not treated with *B. bronchiseptica*.

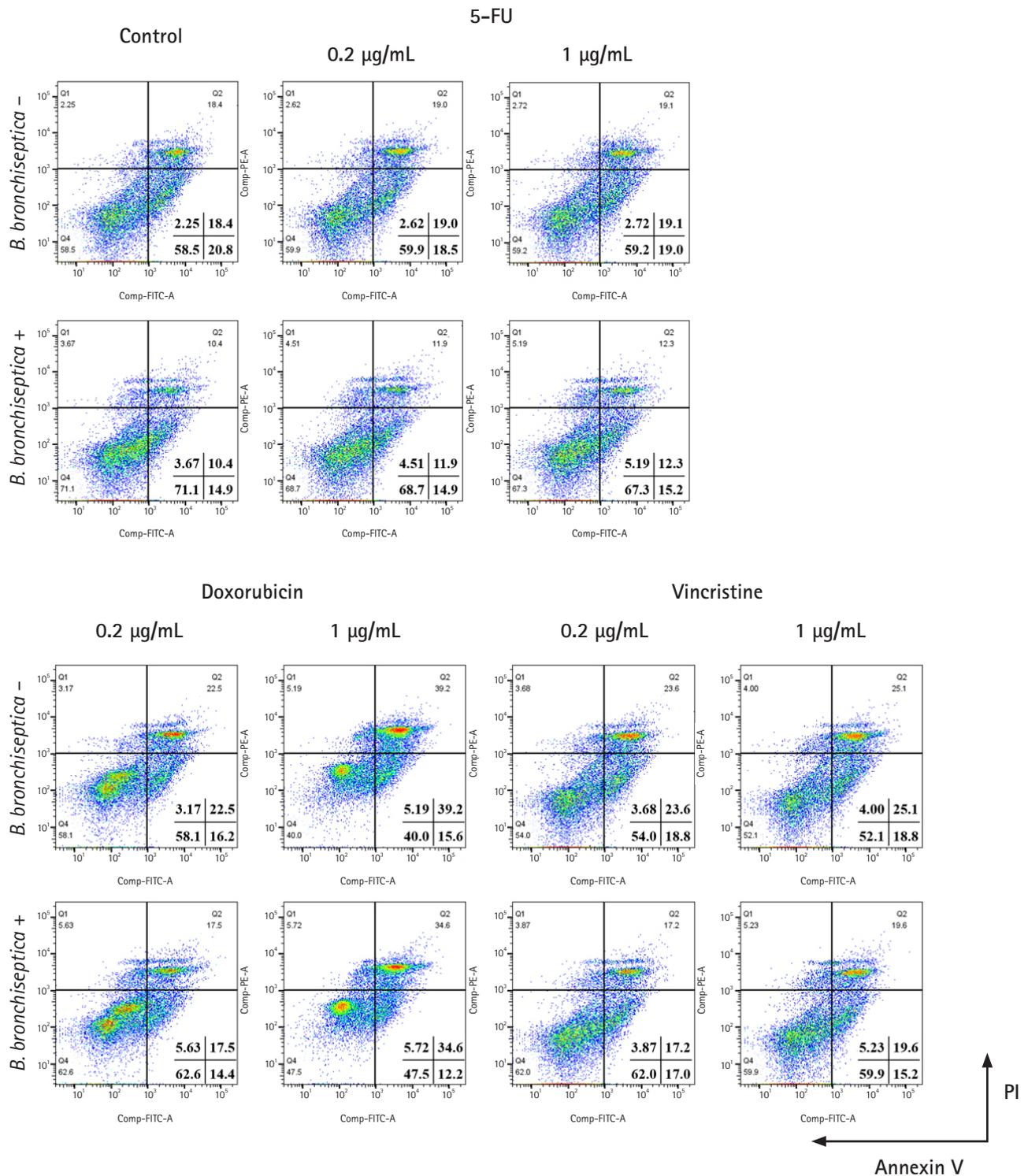
비 능력에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 ELISA를 통해 IL-2, IL-4의 생산량을 측정하였다(Fig. 2). 3가지 항암제를 0.2 µg/mL의 농도로, *B. bronchiseptica*는 1 µg/mL 농도로 처리하였다. VCR의 처리군에서의 IL-2 생산량을 제외하고, 모든 실험군에서 *B. bronchiseptica*에 의해 IL-2, IL-4의 생산량이 유의하게 증가하였다. *B. bronchiseptica*에 의한 IL-2의 증가 정도는 DOX 처리군에서, IL-4의 증가 정도는 5-FU 처리군에서 그 유의성이 가장 높았다.

### *B. bronchiseptica*에 의한 비장세포의 NO 생성능 증가

*B. bronchiseptica*가 항암제 처리된 비장세포의 활성을 증가시키는 지 알아보기 위해 NO 생성능 평가를 실시하였다(Fig. 3). 세 가지 항암제를 처리한 비장세포의 NO 생성능은 대조군과 큰 차이가 없었다. 모든 처리군에서 *B. bronchiseptica*에 의해 NO 생성능이 크게 증가하였고, 그 차이는 통계적으로 유의했다.

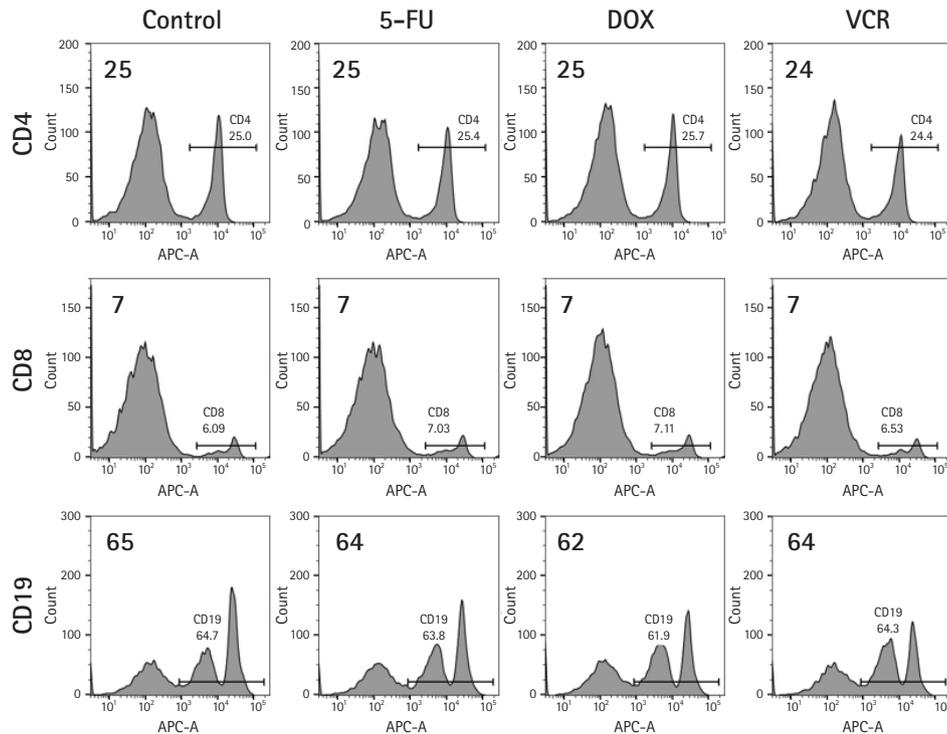
### *B. bronchiseptica*가 항암제에 의한 비장세포의 세포사멸에 미치는 영향

*B. bronchiseptica*가 항암제에 의한 비장세포의 세포사멸을 줄일 수 있는지 확인하였다. 대사활성도 분석에서 효과가 있었던 항암제 농도인 0.2 µg/mL과 1 µg/mL로 비장세포를 처리하였다. Annexin V-FITC와 PI 염색을 하여 생존세포의 비율과 early/late apoptosis, necrosis의 비율을 측정하였다(Fig. 4). 5-FU와 DOX, VCR의 각 1 µg/mL 농도에서 *B. bronchiseptica*를 1 µg/mL 농도로 처리하였을 때 생존세포(annexin V-/PI-)의 비율은 각각 8.1%, 7.5%, 7.8% 증가하였고, early apoptosis (annexin V+/PI-)와 late apoptosis (annexin V+/PI+)의 비율은 각각 10.6%, 8.0%, 9.1% 감소하였다. 반면 necrosis (annexin V-/PI+)의 비율은 5-FU는 2.5%, DOX는 0.5%, VCR은 1.2%로 약하게 증가하였다.

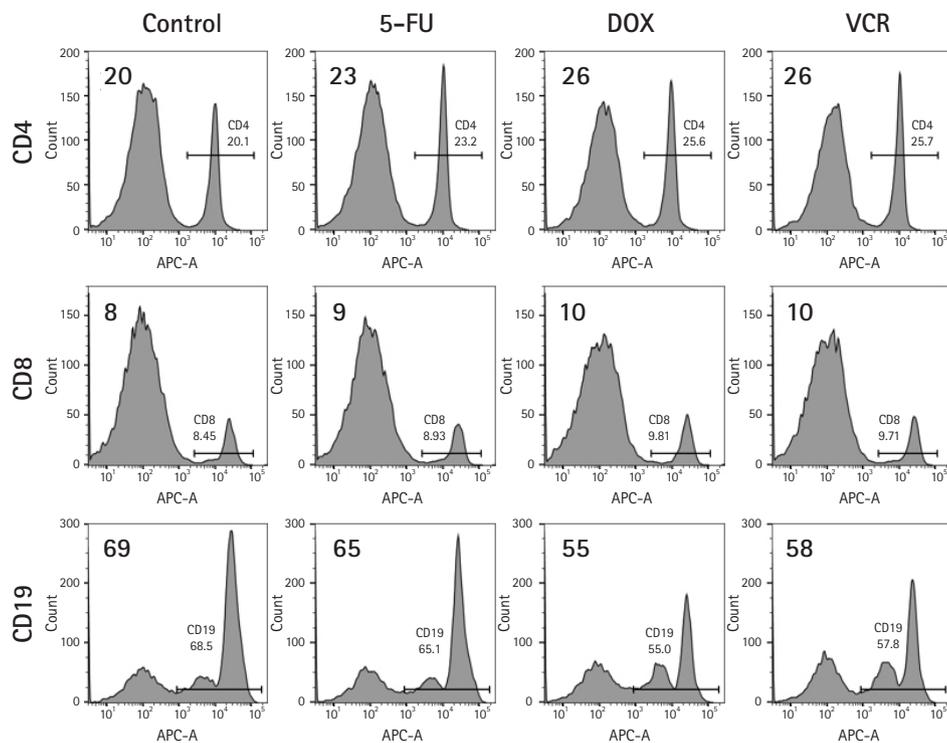


**Fig. 4.** *Bordetella bronchiseptica* reduces the cell death of spleen cells caused by chemotherapeutic agents. The cell death of spleen cells was analyzed by staining with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) followed by flow cytometry. The percentage of the cell populations is indicated in quadrants: viable cells (lower left), early apoptotic cells (lower right), late apoptotic cells (upper right), and necrotic cells (upper left). 5-FU, 5-fluorouracil.

*B. bronchiseptica* –



*B. bronchiseptica* +



**Fig. 5.** Effect of *Bordetella bronchiseptica* on the population of major lymphocyte subsets in spleen cells. Lymphocyte subsets were detected by flow cytometry. A representative histogram set was presented from 3 independent experiments with consistency. The number in histograms indicates the percentage of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD19<sup>+</sup> T cells in spleen cells. 5-FU, 5-fluorouracil; DOX, doxorubicin; VCR, vincristine.

## *B. bronchiseptica*에 의한 비장세포 림프구 아형의 변화

*B. bronchiseptica*가 비장세포의 림프구에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Flow cytometer를 이용하여 림프구 아형 분석을 하였다(Fig. 5). 항암제 단독처리군은 대조군에 비해 특별한 변화를 보이지 않았다. *B. bronchiseptica*를 단독으로 처리하였을 때는 대조군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 비율은 5% 줄어들고 CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 세포의 비율은 각각 2%, 4% 증가하였다. 반면 *B. bronchiseptica* 단독처리군에 비해 항암제와 *B. bronchiseptica*를 함께 처리하였을 때에는 CD4<sup>+</sup> 세포와 CD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 증가한 반면, CD19<sup>+</sup> 세포는 DOX, VCR 처리군에서 각각 14%, 11% 감소했다.

## 고찰

많은 종류의 항암제들이 개발되어 사용되고 있지만, 그의 부작용으로 인한 문제는 여전히 해결되지 않고 있다. 다양한 부작용 중 골수억제로 인한 순환 림프구의 감소는 감염으로 인한 위험을 크게 증가시킬 뿐만 아니라, 심각한 경우 환자의 생존율에도 영향을 미친다[5]. 이전 연구에서는 *B. bronchiseptica*의 접종으로 마우스의 비장세포가 증식 반응을 보이며, 골수세포를 활성화 하고 면역 기억 효과를 높이는 등 림프구에 영향을 미치는 사실을 보고하였다[9]. 이에 본 연구에서는 항암제로 인한 비장세포의 활성 및 생존을 저하를 *B. bronchiseptica*가 어느 정도 보호할 수 있는지 알아보았다.

*B. bronchiseptica*는 0-1 µg/mL의 5-FU와 VCR이 처리된 비장세포의 대사활성도를 유의하게 증가시켰으며, DOX가 처리되었을 때는 0-0.2 µg/mL의 농도에서 유의하게 증가시켰다(Fig. 1). 하지만 *B. bronchiseptica*에 의한 증가 정도는 항암제의 농도가 증가함에 따라 감소했다. *B. bronchiseptica*에 의한 대사활성도 증가 효과가 세포 특이적인지 알아보기 위해 EL-4 세포에도 *B. bronchiseptica*를 처리하였다. 그 결과, 항암제에 의해 EL-4 세포의 대사활성도가 눈에 띄게 감소하였지만, *B. bronchiseptica*에 의한 대사활성도 증가는 보이지 않았다(Fig. 1). 이를 통해 *B. bronchiseptica*가 암세포인 EL-4 세포의 대사활성도에는 영향을 미치지 않으면서 비장세포의 대사활성도는 증가시키는 사실을 알 수 있었다. 세 종류의 항암제 0.2-1 µg/mL의 농도에서 *B. bronchiseptica*가 유의하게 대사활성도를 증가시켰으므로, 항암제가 처리된 비장세포에 대한 *B. bronchiseptica*의 효과를 자세히 분석하기 위해 이 농도를 사용하였다. 비장세포에서 분비되는 NO를 Nitrite의 형태로 측정하였는데, NO 생성능 분석의 결과도 CCK-8 assay와 유사한 경향을 보였다. *B. bronchiseptica*를 처리하였을 때 NO의 생산량이 모든 군에서 증가하였으며, 항암제를 처리한 비장세포에서도 현저히 증가하였다(Fig. 3).

IL-2는 T 림프구의 분화를 자극시키며, 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 림프구와 CD8<sup>+</sup> T 림프구가 생산하는 사이토카인이다[13]. IL-4는 naïve T 림프구가 T helper 2 (Th2) 림프구로 분화하도록 하는 사이토카

인이며, 분화된 Th2 림프구는 추가적인 IL-4를 생산한다[14]. IL-2와 IL-4는 림프구의 생존 및 분화에 직접적인 연관이 있는 사이토카인이므로[15,16], 비장세포에 물질을 처리하여 IL-2와 IL-4의 생산량을 확인하였다. 대부분의 처리군에서 *B. bronchiseptica*에 의해 IL-2과 IL-4의 생산량이 증가하였으며, IL-2는 DOX 처리군에서, IL-4는 5-FU 처리군에서 가장 큰 증가를 보였다(Fig. 2). 또한 *B. bronchiseptica*를 처리하지 않았을 때와 비교하여 사이토카인 생산량이 크게 증가하는 것으로 보아, *B. bronchiseptica*는 림프구의 생존과 분화를 일으키는 사이토카인을 생산하여 항암제로 인한 면역 저하를 줄여줄 수 있을 것으로 예상된다. 또한 Annexin V-FITC와 PI 염색을 통해 *B. bronchiseptica*의 비장세포 세포사에 대한 영향을 확인하였다. Annexin V-FITC와 PI 분석 결과, *B. bronchiseptica*는 항암제 처리로 인한 림프구의 세포사 비율을 감소시켰으며, 생존세포의 비율은 증가시켰다. 분화중인 T 림프구에서 IL-2를 제거했을 때 성장이 억제될 뿐만 아니라 세포자멸사도 발생했으며[17], IL-4는 T 림프구의 활성화, 분화, 사멸에도 관여를 한다는[15] 연구 결과들을 고려하면 *B. bronchiseptica*에 의한 IL-2와 IL-4의 생산량 증가가 세포사 감소로 이어진 것으로 추정된다.

림프구 아형 분석 결과, *B. bronchiseptica*를 처리하지 않았을 때는 대조군과 항암제 처리군 사이에 변화가 없었던 반면 *B. bronchiseptica*를 처리했을 때에는 림프구의 아형에 변화를 보였다(Fig. 5). 대조군에 비해 *B. bronchiseptica*를 단독 처리했을 때 CD4<sup>+</sup> 세포의 비율은 감소하고 CD19<sup>+</sup> 세포의 비율이 증가한 것과 달리, 항암제 + *B. bronchiseptica* 처리군에서는 *B. bronchiseptica* 단독처리군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 비율이 증가하고 CD19<sup>+</sup> 세포의 비율이 감소했다. ELISA의 결과와 종합하여 고려해보면 이는 항암제를 처리했을 때 *B. bronchiseptica*는 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 세포의 생존율을 상대적으로 증가시켜 CD19<sup>+</sup> 세포의 비율은 감소된 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *B. bronchiseptica*가 항암제가 처리된 비장세포의 대사활성도, 사이토카인 생산량, NO 생성능을 증가시키고 세포사는 감소시킨다는 것을 확인하였다. 따라서 *B. bronchiseptica*는 항암제로 인해 발생할 수 있는 림프구 감소 및 면역 억제에 대해서 보호 효과를 가질 수 있음을 보여준다. 그러나 항암제의 종류에 따라 *B. bronchiseptica*에 반응하는 정도가 다르고, 림프구 아형에 미치는 영향도 다르다는 점에서 *B. bronchiseptica*를 항암제와 어떠한 조합으로 사용해야 더욱 효과가 있는지 추가적인 연구가 필요하다.

## Acknowledgments

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(No. NRF-2020R1F1A1069946)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## ORCID

You-Jeong Lee, <https://orcid.org/0000-0001-6847-2037>

Hong-Gu Joo, <https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

## References

- Sethy C, Kundu CN. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: implication of DNA repair inhibition. *Biomed Pharmacother* 2021; 137:111285.
- Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;16:3267–3285.
- Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:790–803.
- Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2020;101:34–41.
- Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, Sebban C, Le Cesne A, Judson I, Tredan O, Verweij J, Biron P, Labidi I, Guastalla JP, Bachelot T, Perol D, Chabaud S, Hogendoorn PC, Cassier P, Dufresne A, Blay JY. European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Res* 2009;69:5383–5391.
- Gupta S, Goyal P, Mattana J. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia a thread in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *IDCases* 2019;15:e00509.
- Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 2003;35:32–40.
- Dunne A, Mielke LA, Allen AC, Sutton CE, Higgs R, Cunningham CC, Higgins SC, Mills KH. A novel TLR2 agonist from *Bordetella pertussis* is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol* 2015;8:607–617.
- Gueirard P, Minoprio P, Guiso N. Intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in mice induces long-lasting antibody and T-cell mediated immune responses. *Scand J Immunol* 1996;43:181–192.
- Yim SH, Hahn TW, Joo HG. *Bordetella bronchiseptica* antigen enhances the production of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen-specific immunoglobulin G in mice. *J Vet Sci* 2017;18: 327–332.
- Lee YJ, Han Y, Joo HG. *Bordetella bronchiseptica* is a potent and safe adjuvant that enhances the antigen-presenting capability of dendritic cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2020;24: 47–52.
- Kim HJ, Joo HG. Paclitaxel inhibits the hyper-activation of spleen cells by lipopolysaccharide and induces cell death. *J Vet Sci* 2016;17:453–458.
- Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008;26:453–479.
- Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol* 2000;165:3620–3625.
- Riou C, Dumont AR, Yassine-Diab B, Haddad EK, Sekaly RP. IL-4 influences the differentiation and the susceptibility to activation-induced cell death of human naive CD8+ T cells. *Int Immunol* 2006;18:827–835.
- Kelly E, Won A, Refaeli Y, Van Parijs L. IL-2 and related cytokines can promote T cell survival by activating AKT. *J Immunol* 2002;168:597–603.
- Röpke C, Gladstone P, Nielsen M, Borregaard N, Ledbetter JA, Svejgaard A, Odum N. Apoptosis following interleukin-2 withdrawal from T cells: evidence for a regulatory role of CD18 (beta 2-integrin) molecules. *Tissue Antigens* 1996;48: 127–135.