Journal of Radiation Industry 7(2~3) : 161~166(2013)

감마선 조사가 Staphylococcal Enterotoxin B의 비장세포 증식률 및 Interleukin-2 분비능에 미치는 영향

박종흠 · 성낙윤 · 변의백 · 송두섭 · 김재경 · 송범석
김재훈 · 이주운 · 유영춘[1,*]

한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [1]건양대학교 의과대학 미생물학교실

Effect of Gamma-Irradiation on the Cell Proliferating and Interleukin-2 Producing Activity of Mouse Splenocytes of Staphylococcal Enterotoxin B

Jong-Heum Park, Nak-Yun Sung, Eui-Baek Byun, Du-Sup Song, Jae-Kyung Kim, Beom-Seok Song, Jae-Hun Kim, Ju-Woon Lee and Young-Choon Yoo[1,*]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

Abstract - The purpose of this study was to investigate the cell proliferating and interleukin-2 producing activity of staphylococcal enterotoxin B by gamma-irradiation. Staphylococcal enterotoxin B was gamma-irradiated with the various doses of 0, 2, 20 and 50 kGy. SDS-PAGE analysis showed that gamma-irradiation caused the sharp decrease of the content of staphylococcal enterotoxin B and the effect was irradiating dose-dependent. Non-irradiated staphylococcal enterotoxin B increased the cell proliferation of splenocytes isolated from female Balb/c mouse, whereas 2 kGy-irradiated toxin significantly decreased the activity. 20 and 50 kGy-irradiated staphylococcal enterotoxin B was no effect. A similar effect on the interleukin-2 production of mouse splenocytes was observed with non-irradiated and irradiated staphylococcal enterotoxin B. It was considered to be due to the decrease of the antigenicity of staphylococcal enterotoxin B by gamma-irradiation. Therefore, these results suggest that gamma-irradiation can be effective for the decrease of the antigenicity of staphylococcal enterotoxin B as superantigen.

Key words : Gamma-irradiation, Staphylococcal entrotoxin B, Cell proliferation, Interleukin-2, Antigenicity

* Corresponding author: Young-Choon Yoo, Tel. +82-70-4642-6495, Fax. +82-70-4642-6495, E-mail. yc_yoo@konyang.ac.kr

서 론

오염된 식품을 섭취함으로써 일어나는 질병을 광범위하게 식중독이라 지칭하며, 문화의 발달과 문명의 진보, 생활수준의 향상과 과학기술의 발전에 따라 그 발병 양상이 변화되고 있는 추세이다(Much *et al*. 2009). 식중독은 과거 고기류와 생선 등의 단백질을 다량으로 함유하는 제품군에서 주로 발병하였으나, 현재에는 과일 및 채소류까지도 그 범위가 다양하게 확대 되어가고 있는 추세이다(Rall *et al*. 2008). *Staphylococcus aureus*는 식중독의 증상에 영향을 주는 세균중의 하나로 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있기 때문에 식품에 쉽게 오염되며, 식품 위생상 매우 중요한 세균이다(Alarcon *et al*. 2006). *Staphylococcus aureus*는 식품에 부착력이 강하여 일단 부착이 되면 세척으로 제거하기가 어렵고 환경에 대한 저항성 또한 매우 강하기 때문에 제거가 쉽지 않다(Moon *et al*. 2004).

*Staphylococcus aureus*에 의한 식중독 증상은 균이 생산하는 독소(entrotoxin)를 섭취함으로써 일어나게 된다(Rall *et al*. 2008). 자연계에는 여러 종류의 *Staphylococcus*가 존재하지만, enterotoxin을 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다. Enterotoxin은 분자량이 20,000～35,000 Da인 단일 폴리펩타이드이며, 면역학적으로 서로 다른 9가지, 즉 enterotoxin A, B, C, D, E, F, G, H, I 및 J의 형태로 분류된다(Chen *et al*. 2001). 이중 병인학적으로 주로 거론되는 표현형은 A, B, D형이다(Chen *et al*. 2001). 또한 enterotoxin은 trypsin, chymotrypsin, renin 및 papain 등의 단백질 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되지 않으며, 내열성이 강하여 고온으로 처리해도 완전히 파괴되지 않는다(Hepner 1980).

따라서 *Staphylococcus aureus* 균에 의한 식중독 예방법은 식품 내로 오염방지, 오염균의 증식 및 enterotoxin 생성억제, 식품에 생산된 독소를 분해 및 해독하는 방법 등을 들 수 있다. 그러나 *Staphylococcus aureus*는 그 분포범위가 매우 광대하고 식품으로의 오염경로가 매우 다양하여 식품이 이 균에 오염될 기회가 대단히 높기 때문에 근본적인 오염방지는 거의 불가능하다(Jung 1994). 한편, 방사선 조사기술은 오염되어 있는 세균이나 바이러스를 제거하기 위한 효과적인 방법으로 현재 국제기구에서도 이 방법을 권고하고 있는 추세이다. 또한 방사선 조사기술은 난백으로부터 분리되는 높은 알레르기성 단백질인 ovalbumin의 구조적인 변성을 통한 알레르기원성을 쉽게 감소시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며(Seo *et al*. 2004), 고분자 다당체인 베타글루칸(β-glucan)의 당쇄결합(glycosidic bond)를 파괴하여 고분자의 다당체를 쉽게 저분자로 변환시켜 생리활성을 증대시킬 수 있는 효과적인 방법으로 제시되고 있다(Sung *et al*. 2012).

본 연구에서는 *Staphylococcus aureus* 균에 의한 식중독 발병을 억제하기 위한 방법의 일환으로써, *Staphylococcus aureus*가 생산하는 staphylococcal entrotoxin B에 방사선 조사를 적용하고 이에 따른 비장세포의 증식률 및 염증성 인자인 interleukin-2 분비능에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 감마선 조사

본 연구에서 *Staphylococcus aureus* 기원의 staphylococcal entrotoxin B (SEB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소(Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co^{60} 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

2. SDS-polyacryamide gel electrophoresis (PAGE)

다양한 선량(0, 2, 20, 50 kGy)으로 조사된 PBS 완충용액에 5 mg ml^{-1}의 농도로 녹인 SEB를 전기영동 sample buffer와 1 : 3으로 혼합하여 10%의 polyacrylamide gel에 well당 20 μg씩 로딩한 후, 120 volt에서 40분 동안 전개하였고, marker로는 Bio-Rad사의 prestained molecular weight marker (188, 98, 62, 49, 38, 28, 17 및 14 kDa)를 사용하였다.

3. 마우스로부터 비장세포 분리

생후 6주령의 암컷 Balb/c 마우스를 오리엔트바이오(Orient Co., Seoul, Korea)로부터 구입하여 평균온도 22±2°C, 상대습도 50±10%가 유지되는 실험동물 사육실에서 1주일간의 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 fetal bovine serum (FBS)와 항생제 penicillin과 streptomycin (100 IU ml^{-1}, 100 μg ml^{-1})을 함

유한 Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) 배지로 세척한 후 tissue grinder로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 red blood cell lysis buffer (BD Bioscience, USA) 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

4. 비장세포 증식능 측정

비장세포의 증식능을 측정하기 위하여 96 well plate에 well당 1×10^6개의 비장세포를 분주한 후, 방사선 조사 (2, 20, 50 kGy) 및 비조사된 SEB를 1.25, 2.5, 5 μg ml^{-1}의 농도로 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST 방법을 통해 세포 증식능을 측정하였다. 비장세포의 증식능은 다음의 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Splenocyte proliferation (\%)} = \frac{\text{Sample 처리구의 흡광도}}{\text{Sample 무처리구의 흡광도}} \times 100$$

5. Cytokine 분비능 측정

감마선 조사된 SEB의 비장세포 cytokine 분비능에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 분리된 비장세포를 2×10^6 cells $well^{-1}$씩 48 well plate에 450 μL씩 분주하고 2에서 50 kGy로 감마선 조사된 SEB를 1.25, 2.5, 5 μg ml^{-1}의 농도로 각각 50 μl씩 처리하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하여, 이 상등액에 포함되어 있는 interleukin-2 (IL-2)의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (eBioscience, USA)를 사용하여 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 결과로 나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA test 방법으로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's two-tailed *t*-test를 이용하여 $p^*<0.05$, $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 논의

1. 감마선 조사된 SEB의 SDS-PAGE 분석

감마선 조사된 SEB의 구조적인 변화를 관찰하기 위하여 SDS-PAGE분석을 수행하였다. 다양한 선량 (50, 20, 2 kGy)으로 감마선 조사 또는 비조사 (0 kGy; intact)된 SEB를 10%의 polyacryamide gel에 전개하여 분자량 변화의 패턴을 관찰한 결과 (Fig. 1), 비조사군에서는 17～28 kDa의 분자량 범위 사이에서 뚜렷하게 단일 밴드가 관찰된 반면 50 kGy와 20 kGy 방사선 조사된 SEB는 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다. 반면 상대적으로 낮은 선량인 2 kGy 감마선 조사된 SEB의 경우 17～28 kDa의 분자량 범위에서 뚜렷하지는 않지만 일부 단일밴드가 남아 있는 것으로 관찰되었다. 또한, 2 kGy로 조사된 SEB의 경우, 전기영동 젤 전체에 걸쳐 단백질이 끌리는 경향을 나타내고 있는 것으로 보아 감마선 조사에 의해서 SEB 단백질이 응집하거나 그 구조가 깨지는 것으로 추정되었다 (Fig. 1). 이러한 결과로 미루어 보아 감마선의 조사는 SEB의 구조를 쉽게 변형시키는 것으로 사료되며, 이러한 단백질의 구조적 변화는 SEB의 항원성에도 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

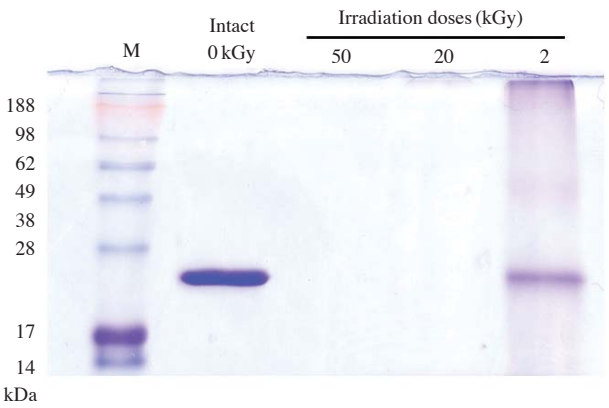

Fig. 1. SDS-PAGE profile of gamma-irradiated (50, 20, 2 kGy) and non-irradiated (0 kGy; intact) SEB. lane 1-molecular weight marker, lane 2-unirradiated intact SEB, lane 3～50 kGy irradiated SEB, lane 4～20 kGy irradiated SEB and lane 5～2 kGy irradiated SEB.

2. 감마선 조사된 SEB의 비장세포 증식능에 미치는 영향

SEB는 아주 적은 양으로도 짧은 시간 안에 면역세포인 T세포의 면역활동을 과다하게 활성화시키는 초항원 (superantigen)의 한 종류로써, 항원과 비특이적인 방법으로 다양한 T세포 수용체에 결합하여 T세포의 활성화를 유도시켜 (McFadden *et al*. 1993), SEB를 정상인의 피부에 도포하였을 때 홍반이나 경결 등의 피부 변화를 초래시킬 수 있다 (Strange *et al*. 1996). 또한, SEB는 알레르겐으로 작용하여 SEB에 대한 특이 IgE가 비만세포나 호염기구에 결합하여 히스타민 분비를 유도하고 염증을

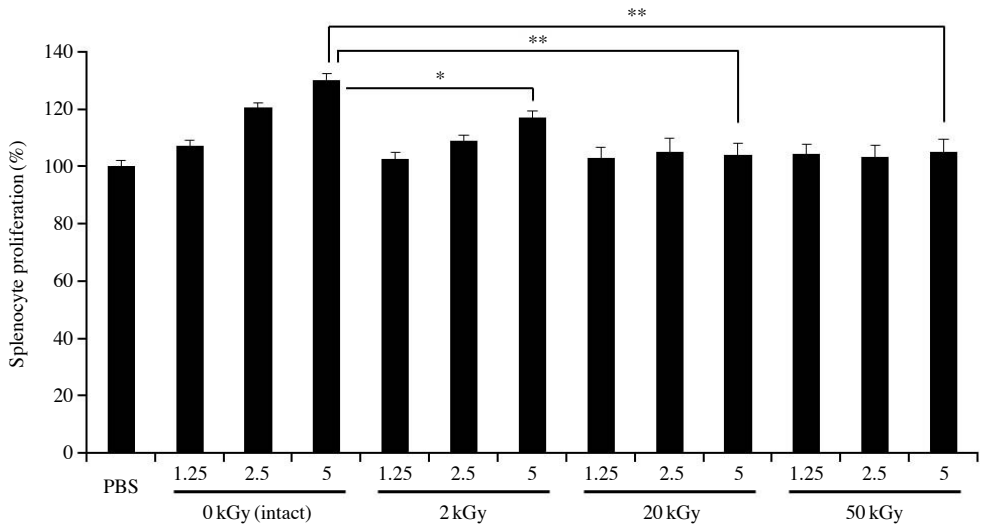

Fig. 2. Cell proliferation of gamma-irradiated (50, 20, 2 kGy) and non-irradiated (0 kGy; intact) SEB in splenocytes isolated from Balb/c mouse. Gamma-irradiated and non-irradiated SEB were treated at the concentration of 1.25, 2.5 and 5 μg ml^{-1} (n=3), respectively.

일으키거나(Leung *et al*. 1993) 아토피피부에 존재하는 랑게르한스세포에 IgE 친화력이 강한 제일형 수용체(FcεRI)의 표현을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Bieber *et al*. 1992). 본 연구에서는 감마선 조사된 SEB의 항원성에 관하여 알아보기 위하여 우선 마우스로부터 분리한 비장세포에 감마선 조사 및 비조사된 SEB를 처리하여 비장세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다. 그 결과, 비조사된 SEB는 농도에 비례하여 비장세포 증식능을 증가시키는 반면, 2 kGy로 조사된 SEB의 경우, 비조사된 SEB에 비하여 비장세포의 증식능을 감소시키는 것이 관찰되었으며($p<0.05$), 20 kGy와 50 kGy로 조사된 SEB는 비장세포의 증식능에 영향을 미치지 않았다($p<0.01$, $p<0.001$) (Fig. 2). 이러한 결과는 감마선 조사가 SEB의 비장세포 증식능을 감소시킬 수 있음을 의미하였다. 즉, 앞서의 Fig. 1의 SDS-PAGE의 결과에서 제시하는 바처럼, 2 kGy의 감마선 조사는 SEB의 17～28 kDa의 분자량 범위의 단일 밴드(lane 2)를 어느 정도 감소시키고 있고(lane 5), 20 kGy와 50 kGy로 조사선량 증가는 SEB 단일 밴드를 완전히 제거하는 결과로 살펴볼 때(lane 3 및 lane 4), 감마선 조사에 따른 SEB 단백질의 응집이나 깨짐과 같은 구조적인 변화가 항원성에 영향을 미친 것으로 사료되었다. 일반적으로, 초항원은 대량의 T세포들을 활성화시키는 것을 특징으로 하며 기존의 항원과는 달리 세포내 활성화 과정을 거치지 않고 항원 전달세포의 표면에 있는 주요 조직적합복합체 제이항원 분자(MHC classII)에 직접 결합한 후 T세포 수용체 β 쇄(Vβ)의 영역과 다양하게 교차 결합을 이루어 다크론성 T 세포 활성화와 cytokine 분비를 유도하게 되고(Fleischer and Schrezenmeier, 1988), 이 경우 주로 CD4와 CD8 아형에 모두 속한 T 세포가 활성화되며 기존의 항원 존재시 활성화되는 T 세포보다 10～100배 이상의 활성화된 형태를 띠게 된다(Kappler *et al*. 1989).

3. 감마선 조사된 SEB의 비장세포 사이토카인 IL-2 분비에 미치는 영향

사이토카인은 병원성 미생물의 침입에 대항하여 숙주를 방어할 수 있는 물질이며, IL-2는 항원 및 마이토젠(mitogen)과 결합하여 B세포, NK세포 및 대식세포의 증식을 조절하는 인자로 세포 매개 면역반응에서 중요한 역할을 한다(Abbas and Lichtman 2003). 또한 IL-2는 적응 면역계의 중추적인 역할을 담당하는 T 면역세포에서 분비되는 전구염증성 사이토카인으로 면역작용의 지표물질로 알려져 있어(Ruy *et al*. 2006), 이 물질의 분비 유무에 따라 어떤 물질의 항원성을 알아볼 수 있는 중요한 지표로써도 이용되기도 한다. 따라서 본 연구에서는 감마선 조사된 SEB의 항원성을 알아보기 위하여 다양한 선량(2, 20, 50 kGy)으로 감마선 조사된 SEB가 마우스로부터 분리한 비장세포의 사이토카인 IL-2 분비능에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 3은 감마선 조사 및 비조사된 SEB를 처리한 비장세포의 IL-2 분비능에 대한 결과이다. 즉, 비조사구 SEB는 농도에 비례하여 비장세포의 IL-2 분비능을 증가시키는 반면, 방사선 조사된 SEB는 감마선 조사선량이 증가할수록 비조사된 SEB에 의한 IL-2 분비능을 감소시키는 경향을 나타내었다. 특히, 20 kGy와 50 kGy로 조사된 SEB는 비장세포의 IL-2 분

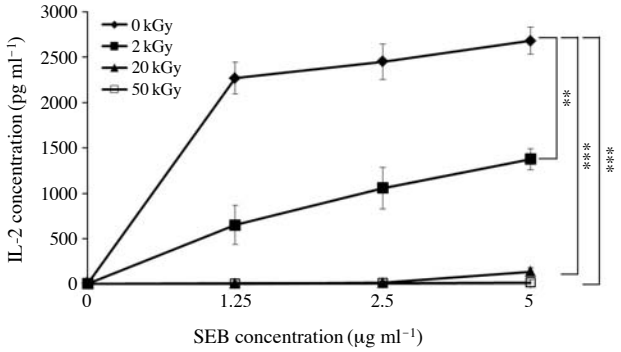

Fig. 3. IL-2 production of gamma-irradiated (50, 20, 2 kGy) and non-irradiated (0 kGy; intact) SEB in splenocytes isolated from Balb/c mouse. Gamma-irradiated and non-irradiated SEB were treated at the concentration of 1.25, 2.5 and 5 μg ml^{-1} (n=3), respectively.

비능을 거의 유도하지 않았다. 이러한 결과는 앞서의 결과와도 연관되는 결과로써, 감마선의 조사에 따른 SEB 단백질 밴드의 구조적 변화에 의한 감소(Fig. 1)에 기인된 항원성의 저하가 증식률의 감소(Fig. 2)와 IL-2 분비능의 감소(Fig. 3)와 영향을 미치는 것으로 추정되었다. 따라서, 방사선 조사기술은 SEB와 같은 초항원성 물질의 항원성을 감소시키는 데 매우 효과적이며, *Staphylococcus aureus*와 같은 미생물의 오염으로 인하여 생성되는 독소인 SEB가 유발하는 병인론적인 현상들을 효과적으로 제어할 수 있는 방법으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 식중독 균인 *Staphylococcus aures*와 같은 미생물이 생성하는 독소인 staphylococcal enterotoxin B에 감마선의 조사가 비장세포의 증식률 및 염증성 면역인자인 interleukin-2의 분비능에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, SEB는 감마선 조사에 의하여 쉽게 구조적인 변화에 따른 감소를 관찰하였으며, 마우스로부터 분리된 비장세포의 증식률을 감소시키고 IL-2의 분비능을 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 감마선 조사에 의한 SEB의 구조적인 변화에 따른 항원성 감소의 결과에 의한 것으로 사료되며, 이러한 결과로 미루어 보아 감마선의 조사는 초항원인 SEB의 항원성을 감소시킬 수 있는 효과적인 방법임이 제시된다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 재원으로 한국연구재단 방사선기술개발사업 (2012-M2A2A6011335) 및 국방과학연구소 기초연구 순수기초(ADD-12-02-06-01)과제에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Abbs AK, Lichtman AH. 2003. Cell and tissues of the immune system. pp. 264-269. *In*: Cellular and Molecular Immunology (Jason M and Bill S *eds*.), WB Saunders Co., Philadephia, PA.

Alarcon B, Vicedo B and Aznar R. 2006. PCR-based procedure for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in foods. *J. Appl. Microbiol.* **100**:352-364.

Bieber T, Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D and Salle C. 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J. Exp. Med.* **175**:1285-1290.

Chen TR, Hsiao MH, Chiou CS and Tsen HY. 2001. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foodborne outbreaks. *Int. Food Microbiol.* **71**:63-70.

Cho M, Kim BY and Rhim JH. 2003. Degradation of alginate solution and powder by gamma-irradiation. *Food Eng. Prog.* **7**:141-145.

Fleischer B and Schrezenmeier H. 1998. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.* **167**: 1697-1707.

Hepner E. 1980. Food poisoning and Salmonella infectious in England and Wales, 1976-1978. *Publ. Hlth. Lond.* **94**:337-379.

Jung HK. 1994. Ecological studies on the causative agents of food poisoning from food animals. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **20**:90-98.

Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y and Marrack P. 1989. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* **244**:811-813.

Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, Hanifin JM and Sampson HA. 1993. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J. Clin. Invest.* **92**:1374-1380.

McFadden JP, Noble WC and Camp RD. 1993. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br. J. Dermatol.* **128**:631-632.

Moon JY, Lee EJ and Kim YB. 2004. Rapid detection of methi-

cilin resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *J. Bacteriol. Virol.* **34**:91-100.

Much P, Pichler J, Kasper SS, Allerberger F. 2009. Foodborne outbreaks, Austria 2007. *Wien. Klin. Wochenschr.* **121**:77-85.

Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr, Candeias JMG, Cardoso KFG and Araujo, JP. 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet. Microbiol.* **132**:408-413.

Ryu HS and Kim HS. 2006. Effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (sorghum, su-su) water extracts on mouse immune cell activation. *Korean J. Food Nutr.* **19**:176-182.

Seo JH, Lee JW, Kim JH, Byun EB, Lee SY, Kang IJ and Byun MW. 2007. Reduction of allergenicity of irradiated ovalbunin in ovalbumin-allergic mice. *Radiat. Phys. Chem.* **76**:1855-1857.

Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL and Baadsgaard O. 1996. Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch. Dermatol.* **132**:27-33.

Sung NY, Byun EB, Song DS, Yoo YC, Kim JK, Park JH, Song BS, Park SH, Lee JW, Yu YB and Kim JH. 2012. Low molecular weight β-glucan stimulates Doxorubicin-induced suppression of immune functions in mice. *Food Sci. Biotechnol.* **21**:645-651.

Manuscript Received: October 18, 2013
Revised: October 24, 2013
Revision Accepted: October 29, 2013