Lipopolysaccharide에 의해 과활성화된 마우스 비장세포에서 Enrofloxacin의 조절작용

고형주 · 주흥구*

제주대학교 수의과대학, 수의과학연구소

Modulatory action of enrofloxacin in lipopolysaccharide-induced hyper-activated mouse spleen cells

Hyeong-Ju Ko, Hong-Gu Joo*

College of Veterinary Medicine, Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Abstract: Enrofloxacin, a fluoroquinolone, is a broad-spectrum antibiotic widely used in veterinary medicine that inhibits the action of bacterial DNA gyrase, resulting in anti-bacterial effects. This study was performed to examine whether enrofloxacin has modulatory and anti-inflammatory activity on immune cells. A few studies have reported the anti-inflammatory effects of enrofloxacin. In this study, we used mouse spleen cells treated with lipopolysaccharide (LPS) and examined the effects of enrofloxacin. Several assays were performed in LPS-treated spleen cells after the enrofloxacin treatment. Enrofloxacin inhibited the metabolic activity and mitochondrial membrane potential of LPS-treated spleen cells significantly. On the other hand, enrofloxacin did not alter the proportion of the subsets in spleen cells, and did not induce cell death. The production of tumor necrosis factor- α in LPS-treated spleen cells was inhibited by enrofloxacin. Overall, enrofloxacin had modulatory activity in spleen cells treated with LPS. These data may broaden the use of enrofloxacin as an antibiotic with anti-inflammatory activity in veterinary clinics.

Keywords: enrofloxacin, spleen cells, anti-inflammatory activity, lipopolysaccharide, modulatory action

*Corresponding author

Hong-Gu Joo
College of Veterinary Medicine, Veterinary
Medical Research Institute, Jeju National
University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju 63243,
Korea

Tel: +82-64-754-3379
Fax: +82-64-756-3354
E-mail: jooh@jejunu.ac.kr

ORCID:
Hyeong-Ju Ko
<https://orcid.org/0000-0002-2477-6722>
Hong-Gu Joo
<https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

Conflict of Interest
The authors declare no conflicts of interest.

Received: February 21, 2019
Revised: May 12, 2019
Accepted: May 13, 2019

서론

Quinolone계 항생제는 광범위항생제이며, 초기에 nalidixic acid가 개발된 이래 최근에는 2세대 quinolone계 항생제인 fluoroquinolone이 다수 사용되고 있다[1]. Fluoroquinolone은 넓은 항균범위를 가지며 경구투여로도 높은 혈중 농도를 얻을 수 있어 사람과 산업동물에서 비교적 안전하게 여러 감염증의 치료에 널리 사용되는 약물이다[2]. Quinolone계 항생제는 병원성 세균의 세포질 안으로 들어가 DNA 복제 시 필요한 DNA gyrase를 불활화시켜 세포 분열을 차단함으로써 살균효과를 나타낸다[1].

Fluoroquinolone계 약물은 항균작용뿐만 아니라 항염증작용을 하는 것으로 알려졌다[3], ciprofloxacin, moxifloxacin은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 사람의 monocyte에서 생성된 각종 염증매개물질들을 유의적으로 감소시키는 사실이 보고되었다[4-6]. 하지만 현재까지 자세한 항염증기전은 알려지지 않았다.

본 연구에서는 산업동물의 세균성 감염증에 널리 사용되고 있는 enrofloxacin이 항균작용 이외에 어떤 조절작용을 하는 지 알아보고자 하였다. 주요 면역세포인 비장세포에 LPS를 이용하여 과활성화된 염증성면역세포를 만든 후 enrofloxacin을 처리하여 그 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

실험동물과 시약

모든 실험에는 8-12주령 사이의 C57BL/6 마우스가 사용되었고, 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며, 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다(승인번호 2018-0011, 2019-0002). Enrofloxacin은 바이트릴 25주(Bayer, 25 mg/mL)를 사용하였다.

비장세포의 분리와 물질처리

실험실에 확립된 방법을 통해 비장세포를 분리하였다[7]. 비장세포는 70 µm cell strainer (BD Bioscience, USA)에 걸러 single cell 용액을 만든 후 계수하였고 96- 또는 6-well culture plates에 배양하였다. Enrofloxacin과 LPS를 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양한 후 분석에 이용하였다.

비장세포의 대사활성 측정

비장세포를 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well culture plate에 넣은 후 enrofloxacin과 LPS를 처리하였다. 48시간 뒤 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay를 실시하였다[8]. 세포에 MTT용액을 0.5 mg/mL 농도로 4시간 동안 처리한 후 10% sodium dodecyl sulfate용액을 well당 100 µL씩 넣어 2시간동안 반응시켰다. Microplate reader (Molecular devices, San Jose, USA)를 이용해 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

유세포분석

마우스 비장세포를 배양한 후 2×10^6 cells/mL의 농도로 6-well culture plate에 넣고 enrofloxacin과 LPS를 처리하였다. 48시간 배양한 후 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 측정하기 위해 Rhodamine123 용액으로 염색하였고, cell death (세포사) 측정을 위해 Annexin V-FITC와 propidium iodide 용액으로 염색하였다[9]. 또한 비장세포의 subset 변화를 분석하기 위해, T cell과 B cell 특이적인 표면마커인 CD3ε와 CD19에 대한 특이 항체를 사용하여 염색하였다[10]. 유세포분석은 CytoFLEX와 CytExpert software (Beckman Coulter, USA)를 이용해 분석하였다.

Tumor necrosis factor-α 정량

비장세포를 96-well culture plates에 넣은 후 LPS와 enrofloxacin을 처리하고 72시간 배양하였다. ELISA kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 이용해 배양된 세포의 상층액에 있는 tumor necrosis factor (TNF)-α의 생산량을 측정하였다[11].

통계분석

Fig. 1과 6은 평균±표준편차로 나타냈다. ANOVA 분석과

Fig. 1. Enrofloxacin decreases the metabolic activity of LPS-treated spleen cells. Spleen cells were treated with enrofloxacin (0–50 µg/mL) and lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL) for two days and an MTT assay was performed.

LPS, lipopolysaccharide. * indicate $p < 0.05$, 0.001 respectively.

Turkey 검정으로 유의성을 확인하였으며, p value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

비장세포의 대사활성도에 대한 enrofloxacin의 효과

살아있는 마우스 비장세포의 대사활성도(metabolic activity)를 측정하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포에서 대사활성도를 측정하여 세포의 증식률, 생존율을 알아보는 분석법이다. Enrofloxacin은 단독으로 처리하였을 때 농도변화에 상관없이 세포의 대사활성도에 변화가 없었다. 반면 LPS를 처리하였을 때는 enrofloxacin에 의해 대사활성도가 감소되는 것을 확인하였다. 특히 enrofloxacin의 농도가 25–50 µg/mL에서는 대사활성도가 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

Enrofloxacin에 의한 비장세포의 미토콘드리아 막전위 변화

Enrofloxacin과 LPS로 처리된 마우스 비장세포의 MMP변화를 분석하기 위해, 세포를 Rhodamine 123 용액으로 염색한 후 유세포분석을 실시하였다. MMP분석에서 enrofloxacin만 처리한 세포에서는 유의한 변화가 없었지만, LPS를 단독으로 처리한 세포에서는 MMP 수치가 높아졌고 이후 enrofloxacin의 농도에 따라 농도의존적으로 MMP수치가 낮아졌다(Fig. 2). 또한 세포의 크기(forward scatter, FSC) 및 granularity (side scatter, SSC)를 분석한 결과, LPS가 처리되지 않은 세포에서 enrofloxacin의 투여는 FSC/SSC에 영향을 미치지 않았다. 반면, LPS가 처리된 세포에서는 FSC/SSC가 증가한 세포군이 관찰되었다(P1 region). 또한 LPS + enrofloxacin 복합처리군에서는 enrofloxacin의 농도에 비례하여 P1 region의 세포수(비율)가 감소하였다(Fig. 3).

Fig. 2. Enrofloxacin reduces the MMP of LPS-treated spleen cells. Mouse spleen cells were treated with enrofloxacin (EFX; 0, 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$) in 6-well culture plates with or without 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS for two days. The treated spleen cells were stained with a Rhodamine 123 solution. The number of histograms indicates the mean fluorescence intensities. MMP, mitochondrial membrane potential; LPS, lipopolysaccharide; EFX, enrofloxacin.

Fig. 3. Enrofloxacin decreases the size of LPS-treated spleen cells. The cells were treated with enrofloxacin (EFX; 0, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). The P1 region includes $\text{FSC}^{\text{high}}\text{SSC}^{\text{med}}$ cells activated by LPS. LPS, lipopolysaccharide; EFX, enrofloxacin; FSC, forward scatter; SSC, side scatter.

Enrofloxacin이 비장세포의 cell death에 미치는 영향
Enrofloxacin과 LPS로 처리된 마우스 비장세포의 cell death를 확인하기 위해 Annexin V-FITC/propidium iodide

로 염색한 후 유세포분석을 실시하였다. Enrofloxacin은 LPS 유무에 관계없이 cell death의 변화가 없었다(Fig. 4).

Fig. 4. Enrofloxacin does not induce the cell death. Spleen cells were treated with enrofloxacin (EFX; 0, 10, and 50 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for two days. The treated cells were stained with annexin V-FITC/propidium iodide for cell death analysis. The numbers in quadrants indicate the percentage of cells in viable (lower left), early apoptosis (lower right), late apoptosis (upper right), and necrosis (upper left). EFX, enrofloxacin; LPS, lipopolysaccharide.

비장세포의 T림프구와 B림프구의 구성에 enrofloxacin 이 미치는 영향

마우스 비장세포는 T 림프구와 B림프구로 구성되었다. Enrofloxacin이 그 구성에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위해, enrofloxacin과 LPS를 비장세포에 처리한 후 CD3ε와 CD19특이적인 항체를 이용해 염색했다. 유세포분석을 실시한 결과, LPS 유무에 관계없이 enrofloxacin처리에 의해 T림프구와 (Fig. 5A) B림프구의 (Fig. 5B) 구성에서 유의한 변화가 관찰되지는 않았다.

Enrofloxacin에 의한 비장세포의 TNF-α 생산 감소

마우스 비장세포를 enrofloxacin과 LPS로 처리하여 3일간 배양한 후 대표적인 염증성사이토카인 중 하나인 TNF-α 생산량을 측정하였다. LPS를 처리한 세포에서는 TNF-α의 수치가 높았고, 여기에 더해 enrofloxacin을 6.25–50 µg/mL로 처리한 세포에서는 감소하였지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 6).

고 찰

Quinolone계 항생제의 항염증효과에 대한 연구는 제한적으로 보고된 바 있다. 사람의 단핵구를 LPS로 자극한 후에 ciprofloxacin을 처리하였더니 IL-1β, IL-6 그리고 TNF-α의

생산이 억제되었으며[5], moxifloxacin을 적용하여 IL-1α와 TNF-α의 분비가 유의하게 감소되는 사실을 확인하였다[4,6]. 수의임상에서 많이 사용되는 enrofloxacin 또한 사이토카인의 생산 조절이 보고되었다[12]. 하지만 염증성 사이토카인의 생산 저하 이외에 quinolone계 항생제의 면역세포에서 조절작용에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 본 연구에서는 산업동물에서 대표적인 항생제로 사용되고 있는 enrofloxacin의 조절작용을 알아보기 위해, 마우스의 비장세포에 LPS를 처리한 후 분석하였다.

LPS로 처리된 비장세포의 경우 enrofloxacin 25–50 µg/mL의 농도범위에서 대사활성도와 MMP 모두 감소하였다. 또한 LPS에 의해 FSC/SSC가 증가한 구역(P1 region)의 세포 수도 enrofloxacin에 의해 감소되었다. 하지만 LPS를 처리하지 않은 비장세포의 경우 enrofloxacin에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 Enrofloxacin에 의해 감소된 대사활성도가 세포가 죽으면서 활성도가 떨어진 것인지를 확인하기 위해 Annexin V-FITC/PI 분석을 실시하였는데 cell death의 변화는 관찰되지 않았다. 특히 propidium iodide는 세포 핵을 염색하여 cell death의 변화를 민감하게 보여줄 수 있지만[13], late apoptosis와 necrosis 모두에서 뚜렷한 변화가 없었다. 따라서 대사활성도의 감소가 세포사에 의한 것이 아니라 세포대사의 저하에 의한 것으로 추정된다. Enrofloxacin은 T림프구와 B림프구의 비율에도 영향을 주지 않았다.

Fig. 5. Enrofloxacin does not alter the proportion of lymphocytes. Spleen cells were treated with enrofloxacin (EFX; 0, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for two days. The treated cells were stained with biotin-labeled CD3e (A) and CD19 (B) specific antibodies and streptavidin-FITC sequentially. The stained cells were analyzed by FACS. The lymphocyte region (P1) and the positive region of each marker (P2) were gated sequentially. The number in the histograms indicates the value of P2 subtracted from that of the isotype control (4.59%). EFX, enrofloxacin; LPS, lipopolysaccharide; FACS, fluorescence-activated cell sorter.

Fig. 6. Enrofloxacin decreases the production of TNF- α in LPS-treated spleen cells. The cells were cultured and treated with LPS and EFX in 96-well culture plates as in Fig. 1. The amounts of TNF- α in the supernatants were measured using ELISA. The data are presented as mean $\pm$ SD from four individual wells. TNF- α , tumor necrosis factor- α ; LPS, lipopolysaccharide; EFX, enrofloxacin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

TNF- α 는 대표적인 염증성사이토카인으로 다양한 종류의 세포에서 LPS에 의해 증가한다[14,15]. TNF- α 의 생산량을 확인한 결과, enrofloxacin은 6.25–50 μ g/mL 범위에서 감소시켰지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

LPS가 염증성 자극인자로서 비장세포를 과활성화시키고 염증유사반응을 유도하는 사실을 감안하면, 본 연구의 결과들은 enrofloxacin이 염증 시 면역세포에 작용하여 항염증효과를 나타낼 수 있는 가능성을 보여준다. 산업동물에서 염증 발생 시 처방약물로서 항생제와 소염제가 많이 사용되며, 소염제 중 특히 스테로이드는 많은 부작용을 동반한다. Enrofloxacin이 항생효과 이외에도 항염증효과가 있다는 사실은 소염제의 사용을 줄일 수 있는 근거가 될 수 있어, 산업동물 임상에 유용한 정보가 될 수 있을 것으로 기대된다.

References

- Paton JH, Reeves DS. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs* 1988;36:193-228.
- Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Cámara M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:247-274.
- Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 2005;33 Suppl 2:55-70.
- Araujo FG, Slifer TL, Remington JS. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:26-30.
- Sachse F, von Eiff C, Becker K, Rudack C. Anti-inflammatory effects of ciprofloxacin in *S. aureus* Newman induced nasal inflammation *in vitro*. *J Inflamm (Lond)* 2008;5:11.
- Shalit I, Halperin D, Haite D, Levitov A, Romano J, Oshero N, Fabian I. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1 β and TNF- α secretion and NF κ B and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:230-235.
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001;69:555-564.
- Kim MH, Byon YY, Ko EJ, Song JY, Yun YS, Shin T, Joo HG. Immunomodulatory activity of ginsan, a polysaccharide of panax ginseng, on dendritic cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13:169-173.
- Moon SY, Joo HG. Anti-inflammatory effects of 4,4'-diaminodiphenyl sulfone (dapsone) in lipopolysaccharide-treated spleen cells: selective inhibition of inflammation-related cytokines. *Korean J Vet Res* 2015;55:199-204.
- Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014;68:234-238.
- Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015;16:145-150.
- Pomorska-Mól M, Czyżewska-Dors E, Kwit K, Pejsak Z. Enrofloxacin in therapeutic doses alters cytokine production by porcine PBMCs induced by lipopolysaccharide. *Drug Chem Toxicol* 2017;40:295-299.
- Ross DD, Joneckis CC, Ordóñez JV, Sisk AM, Wu RK, Hamburger AW, Nora RE, Nora RE. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res* 1989;49:3776-3782.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- α by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1998;273:974-980.