

Lactobacillus plantarum의 새로운 Probiotic 균주의 보호 효과 Salmonella enterica Serovar Typhimurium에 의한 감염에 대한 전통적 대 두 발효 식품의 JSA22

엄정선, 송진, 최혜선*

565-851 전라북도 국립농업과학원 농식품자원부

접수일: 2015년 1월 6일
개정: 2015년 1월 19일
수락됨: 2015년 1월 20일

온라인 최초 공개
2015년 1월 29일

*교신자 전화:
063-238-3624; 팩스:
+82-63-238-3843; 이메일:
choihs9587@korea.kr

pISSN 1017-7825, eISSN 1738-8872

Copyright© 2015 by
대한미생물학회

락토바실러스 종은 장 상피 장벽 기능을 향상시키고 숙주 면역 반응을 조절하며 병원성 박테리아, 효모, 곰팡이 및 바이러스의 성장을 억제하는 것으로 나타났습니다. 따라서 유산균은 장 질환을 비롯한 다양한 질병을 치료하기 위한 프로바이오틱스로, 식품 및 농업 산업에서 생물학적 방부제로 사용되어 왔습니다. 그러나 병원성 세균 감염을 억제하기 위해 유산균이 사용하는 분자 메커니즘은 제대로 특성화되지 않았습니다. 우리는 이전에 메밀 속성장에 서 *Lactobacillus plantarum* JSA22를 분리 했습니다. 이 연구에서 우리는 장 상피 세포에서 숙주 면역 반응을 자극하여 *S. Typhimurium* 및 *S. Typhimurium*에 의한 세포 독성 의 성장에 *L. plantarum* JSA22 의 영향을 조사했습니다. 결과는 장 상피 세포와 *S. Typhimurium* 및 *L. plantarum* JSA22 의 공동 배양이 *S. Typhimurium* 감염, *S. Typhimurium* 유도 NF- κ B 활성화 및 IL-8 생성을 억제하고 Akt와 p38의 인산화를 낮추는 것으로 나타났습니다. 이러한 데이터는 *L. plantarum* JSA22가 프로바이오틱 특성을 가지며 장 상피 세포의 *S. Typhimurium* 감염을 억제할 수 있음을 나타냅니다. 우리의 발견은 병원성 박테리아에 대한 치료제 및 예방제를 개발하는 데 사용할 수 있습니다.

키워드: 락토바실러스 플란타룸, 살모넬라 티피 무리움, 프로바이오틱스, 장상피세포, 예방제

소개

Salmonella enterica 는 위장염, 장열, 대변 감염, 패혈증 등 광범위한 감염을 일으킬 수 있는 식인성 병원체이다[38]. 장 상피로의 살모넬라 침입은 먼저 식세포 내에서 내재화를 유도하고 상피 세포 세포질 내에서 파종을 유도하여 상피 세포로 들어가는 다단계 과정입니다[8].

*Typhimurium*은 숙주 상피 세포 내에서 밀접하게 부착, 침입, 생존 및 복제하여 액틴 세포 골격 재배열 및 숙주 세포 신호 전달 경로 및 분자 경로를 활성화함으로써 여러 전염증 매개체의 생성을 유발합니다[2].

살모넬라 균 이 존재하는 경우 숙주 세포는 각각 TLR5, TLR4 및 TLR2에 의해 인식되는 플라젤린, 지다당류 및 지단백질과 같은 병원체 관련 분자 패턴을 인식합니다. 박테리아 성분은 숙주 세포에서 일련의 세포 신호 전달 캐스케이드를 시작하여 p38, ERK 및 JNK 단백질 키나제에 의해 매개되는 PI3K/Akt 및 여러 유형의 MAPK 경로의 활성화를 유도합니다[14]. 이어서, NF- κ B 및 AP-1과 같은 전사 인자 가 활성화 되어 전위된다.

핵으로 이동하고 적응 면역 반응을 자극하는 전염증성 사이토카인과 케모카인의 생산을 촉발합니다[37].

또한, 항생제 내성 *S. enterica* 균주의 세계적인 유병률은 최근 몇 년 동안 증가했습니다[10]. 그만큼

S. enterica 는 전 세계적으로 인간 위장염의 흔한 원인 이기 때문에 항생제 내성의 증가된 유병률은 특히 우려스럽습니다[34]. 따라서, 살모넬라 감염에 대한 효과적인 치료제 또는 예방제의 개발은 상당한 연구 관심 대상이다.

Probiotics, 특히 *Lactobacillus* 종은 *Salmonella* spp. 와 같은 병원성 박테리아의 장내 집락 및 감염을 억제할 수 있습니다. 원하지 않는 병원체 군주의 증식을 제어하거나 제거함으로써 치료적 이점을 제공할 수 있습니다[5]. 그러나 프로바이오틱스의 보호 효과를 매개하는 기본 분자 메커니즘은 완전히 규명되지 않았습니다.

프로바이오틱스의 보호 효과를 매개하는 구체적인 기전은 아직 알려지지 않았지만, 이전 연구에서는 프로바이오틱스 박테리아가 병원체와 장벽 부착 부위를 경쟁하고 유산균 및 항균 화합물을 생성하고 자극 및 조절함으로써 장내 미생물 감염을 감소시킬 수 있다고 밝혔습니다. 숙주 면역 체계[26].

다양한 식품이 주로 인간의 건강에 유익한 영향을 미치는 토종 및 프로바이오틱 유산균을 보유할 수 있고 따라서

영양 및 치료 목적으로 사용되어야 합니다[5, 15]. 예를 들어, 자연적으로 발효된 대두 식품은 일반적으로 잠재적으로 유익한 종은 프로바이오틱스로 사용됩니다[12].

우리는 이전에 전통적으로 발효된 대두 식품에서 분리된 *L. plantarum* JSA22가 *S. enterica* 와 같은 식품 매개 병원체에 대해 높은 효소 활성, 섬유소 용해 활성 및 길항 활성을 나타냄을 입증했습니다 [1]. 이 락토바실러스 군주의 항균 활성의 기본 메커니즘, 특히 박테리오파지 및 비박테리오파지 항균 물질의 생산은 광범위하게 연구되지 않았습니다. 연구의 주요 목적은 *S. Typhimurium* 감염의 예방 및 치료에 있어 분리된 프로바이오틱 군주인 *L. plantarum* JSA22의 효과를 확인하는 것이었습니다. 또한, *S. Typhimurium*에 대한 항균 활성의 분자적 기전을 평가하여 프로바이오틱 군주로 사용할 수 있는지 여부를 평가하였다. 우리의 데이터는 *L. plantarum* JSA22가 잠재적으로 프로바이오틱 군주로 사용될 수 있고 장 상피 세포의 *S. Typhimurium* 감염을 억제할 수 있음을 나타냅니다.

재료 및 방법

박테리아 군주 및 배양 조건

L. plantarum JSA22 [1] 및 *L. rhamnosus* GG(참조 군주로 사용)는 de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 브로쓰(Difco,

Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 및 37°C에서 36~72시간 동안 혐기적으로 배양되었습니다. 병원성 박테리아 군주 (*Bacillus cereus* ATCC 27348, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Escherichia coli* DSM 30083 및 *S. enterica* IFO 3313)를 Luria-Bertani(LB) 브로쓰(Difco, Becton Dickinson) 배지 또는 3 LB a LB에서 배양했습니다. 24시간 동안

산, 담즙염 및 열 내성 분석 산, 담즙염 및 열이 유산

균의 성장률에 미치는 영향을 연구하기 위해 13,000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 유산균 배양물(약 2×10^8 CFU/ml)을 수확했습니다. MRS 배지로 2회 세척하였다. 산 스트레스 분석을 위해 상층액을 제거하고 펠렛을 pH 2의 MRS 브로스에 재현탁했습니다. 1 N HCl을 사용하여 pH를 조정하였다. 산 처리된 샘플은 37°C에서 1, 2 및 3시간 인큐베이션 후에 수집되었습니다. 담즙염 스트레스 분석을 위해 모든 배양물을 0.3%의 담즙염을 함유한 MRS 배지에 접종하고 37°C에서 1, 3, 6시간 동안 배양했습니다. 열 스트레스 분석을 위해 MRS 배지에서 성장한 *Lactobacillus* 세포를 65°C에서 30, 60, 120분 동안 가열했습니다. 모든 스트레스 분석에 대해, MRS 브로스에서 연속 희석을 사용하여 생존 세포 계수를 수행했습니다. 계수를 위해 연속 희석액을 MRS 한천 플레이트에 플레이트링한 다음 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션했습니다. MRS 한천 플레이트에서 *Lactobacillus* 군주의 성장은 내산성 분리주를 식별하는 데 사용되었습니다.

담즙염 가수분해효소 유전자 발현의 역전사 PCR 분석 RNeasy 플러스 미니 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA를 박테리아 세포에서 분리했습니다. 첫 번째 가닥 cDNA는 1 µg의 분리된 RNA 템플릿과 amfiRivert Platinum cDNA 합성 마스터 믹스(GenDEPOT; Barker, Texas, USA)를 사용하여 합성되었습니다. 유전자의 하위 집합을 amfiEco Taq DNA 중합효소로 증폭하고 다음 유전자 특이적 프라이머를 사용했습니다: 16S rRNA 유전자, 248 bp: 5'-ATTATAGTCTAGTTGGAGGT-3' 및 3'-CCTGAAGTCTGAGAGAAATTTGA-3'; 담즙염 가수분해효소 (bsh) 유전자, 231bp: 5'-ATCACCGCTACATTGGTTGG-3' 및 3'-AGTCCGCCATTCCTCTACT-3'; bsh 유전자, 975 bp: 5'-ATGTGTACTGCCATAACTTAT-3' 및 3'-TTAGTTAACTGCATAGTATTG-3' [17].

증폭된 산물은 1% agarose gel을 이용하여 분리하였고 Safe-Pinky DNA gel 염색 용액으로 염색하여 가시화하였다. 사이클링 조건은 다음과 같습니다: 50°C 2분, 95°C 3분, 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초의 45 사이클.

세포 표면 소수성 분석 배양물의 광학 밀도

를 0.4로 조정하여 대략 107 CFU/ml의 농도를 얻었다. 대략적으로, 1 ml의 박테리아 현탁액을 50 µl의 탄화수소 용액(n-헥사데칸 또는 자일렌)에 첨가하고 1분 동안 격렬하게 와류시켰다. 그런 다음, 수성 및 소수성 상을 실온에서 1시간 동안 용액을 인큐베이션하여 분리하였다. 상 분리 후, 수상의 광학 밀도를 측정하고 비교하였다.

L. plantarum JSA22는 *S. Typhimurium* 481을 억제합니다.

초기 값. 소수성은 다음 방정식을 사용하여 계산되었습니다. 소수성 백분율 = $[(A540 \text{ 초기} - A540 \text{ 수상})/A540 \text{ 초기}] \times 100$

병원성 박테리아에 대한 길항 활성 여러 병원성 박테리아에 대

한 *Lactobacillus* 군주 의 항균 효과 는 한천-웰 확산 분석을 사용하여 결정 되었습니다[44]. LB 브로스에서 밤새 성장한 박테리아 배양물을 연질(0.7%) 영양 한천(NA; Difco, Becton Dickinson)에 접종(3%(v/v))한 다음 녹인 다음 45°C와 45°C 사이의 온도로 냉각했습니다. 50°C 격렬한 균질화 후, 접종된 한천 배지를 페트리 접시에 붓고, 접종된 한천 플레이트에 직경 3mm의 웰을 천공 하였다. 페트리 접시를 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하고 억제 후광의 직경을 센티미터로 기록했습니다.

포유류 세포 배양

인간 상피 결장직장 선암종(Caco-2) 세포주(ATCC HTB-37)는 10% FBS(HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA)가 보충된 MEM(Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA)에서 유지되었습니다.) 56°C에서 30분 동안 비활성화 및 1%(v/v) 페니실린-스트렙토마이신 (10,000IU/ml, HyClone Laboratories). CCD-18Co 정상 인간 장 섬유아 세포(ATCC CRL-1 459)를 10% FBS, 1% 피루브산나트륨, 1% 비필수 아미노산 및 1% 항생제가 풍부한 MEM에서 배양했습니다. 세포 배양물 을 24시간 동안 가습된 5% CO₂ 분위기에서 37°C에서 인큐베이션했습니다.

접착 분석 세포 접착

분석은 앞서 설명한 방법에 따라 수행되었습니다[5, 24]. 간단히 말해서, Caco-2 및 CCD-18Co 세포를 2 × 10⁵ 세포/웰로 24시간 동안 24웰 플레이트에 접종한 다음, 10:1의 감염 다중도(MOI)에서 박테리아로 감염시켰다. 플레이트를 500 xg에서 10분 동안 원심분리한 다음 , 5% CO₂ 분위기 에서 37°C에서 45분 동안 인큐베이션했습니다 . 결합되지 않은 세균을 흡인하여 제거하고, 웰을 신선한 MEM으로 3회 세척하고, 세포를 0.1% Triton X-100(v/v)으로 용해시켰다. 세포 용해물을 PBS 완충액에 연속적으로 희석하고 LB 한천에 플레이트링하여 박테리아를 계수하였다.

Invasion Assay

2 x 10⁵ cells/well의 밀도로 24-well plate에서 성장한 Caco-2 및 CCD-18Co 세포 단층을 MOI 10에서 박테리아 군주로 감염시키고 500 xg에서 10분 동안 원심분리 했습니다 . 37°C, 5% CO₂ 에서 45분 동안 배양한 후 , 세포를 신선한 MEM으로 3회 세척하고 젠타마이신(100µg/ml)을 함유하는 MEM에서 90분 동안 배양하여 나머지 세포의 박테리아를 죽였습니다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS로 3회 세척하고, 세포를 RT에서 15분 동안 1% Triton X-100(v/v) 용액으로 처리하고, 용해물을 연속 희석한 다음 LB 한천 플레이트에 플레이트링했습니다. 박테리아에 감염된 세포의 수 (침투율)는 100%로 설정된 대조군 (*S. Typhimurium*)의 백분율로 계산되었습니다.

세포 세포 독성 분석 LDH 방

출 분석을 수행하기 위해 박테리아 감염 동안 세포 상청액을 평가했습니다. 포유동물 세포를 처리하기 전에 24시간 동안 2 x 10⁵ cells/well의 밀도로 24웰 플레이트에 접종했습니다. 박테리아와 2시간 동안 배양한 후, 방출된 LDH를 함유하는 감염된 세포의 상청액을 수집하고, 4°C 에서 13,000 xg에서 10분 동안 원심분리하고 , LDH 활성을 평가하였다. Caco-2 및 CCD-18Co 세포 사멸의 백분율은 제조업체가 제공한 지침에 따라 LDH Cytotoxicity Assay Kit II(Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)를 사용하여 용합 배양에서 LDH 방출을 측정하여 결정했습니다. 세포독성 활성의 백분율은 100 × (실험적 LDH 방출 - 자발적 LDH 방출)/(최대 LDH 방출 - 자발적 LDH 방출)로 계산되었으며, 여기서 자발적 LDH 방출은 비-용합 세포 배양에서 검출된 수준이었다.

면역형광 연구

24웰 플레이트의 유리 커버슬립에서 성장한 CCD-18Co 세포의 단층(1 x 10⁴ cells/well)을 45분 동안 박테리아 군주로 감염시켰다. 감염 후, 커버슬립의 CCD-18Co 세포를 PBS로 3회 세척하고, PBS 중 3.7% 파라포름알데하이드로 20분 동안 고정하고, PBS 중 0.2% (v/v) Triton X-100으로 10분 동안 투과화시켰다. 투과된 세포를 PBS 중 3%(w/v) BSA와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하여 비특이적 결합을 억제하였다. 세포를 *Salmonella* SopB 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션한 다음, 3% BSA에서 Alexa Fluor 488-접합 토기 항염소 이차 항체와 함께 1시간 동안 RT에서 암실에서 인큐베이션했습니다. 샘플을 PBS로 3회 세척하였다. DAPI를 포함하는 마운팅 배지를 현미경 슬라이드에 분배하고 세포가 있는 커버슬립을 슬라이드 위에 놓았다. 세포는 형광현미경(Leica DMI6000; Leica, Germany)을 사용하여 가시화하였다.

총, 세포질 및 핵 단백질 추출물의 분리

전체 세포 단백질에서 *Salmonella* SopB 발현 을 검출하기 위해 CCD-18Co 세포를 2개의 100mm 직경 배양 접시(2 × 10⁶ 세포/접시)에 뿌린 다음 1:10의 MOI로 1시간 동안 박테리아로 감염시켰다. 세포 단층을 PBS로 3회 세척하고 세포 스크레이퍼를 사용하여 분리하였다. 그 다음 세포를 프로테아제 억제제 카테일을 함유하는 얼음처럼 차가운 방사성면역침전 분석 완충액(pH 7.4에서 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% 데옥시콜레이트, 및 1mM EDTA)에서 용해시키고, 전체 세포 용해물을 수집하기 위해 4°C에서 5분 동안 13,000 xg .

세포질 및 핵 단백질 추출물은 Pieper et al. [33] 약간의 수정이 있습니다. CCD-18Co 세포를 100mm 직경의 배양 접시에 5 × 10⁶ cells/dish로 24시간 동안 파종한 다음 MOI 50에서 1시간 동안 박테리아로 감염시켰다.

세포를 PBS로 3회 세척하고 저장성 완충액 A(pH 7.9에서 10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.2mM PMSF 및 0.5mM DTT)에서 긁어 모아 세포질 및 핵 분획을 얻었다. 샘플 을 4°C에서 5분 동안 3,300 xg에서 원심분리 한 후 상층 액을 수집하고

세포질 추출물로 사용. 그런 다음 펠릿을 고장성 완충액 B(20mM HEPES(pH 7.9), 0.2mM EDTA, 25%(v/v) 글리세롤, 1.5mM MgCl₂, 0.4M NaCl, 0.5mM DTT)에 재현탁하고 얼음 위에서 10분 동안 인큐베이션했습니다. [39]. 13,000 xg에서 10분간 원심분리한 후 상층 액을 모아 핵단백질 추출물로 사용하였다. 분리된 분획의 총 단백질 농도는 Bradford 단백질 분석 데이터(Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)를 사용하여 결정되고 정규화되었습니다.

웨스턴 블로팅 및 항체 니트로셀룰로오스

막을 1시간 동안 0.1% Tween-20(TBS-T)이 포함된 Tris 완충 식염수에서 3% BSA로 차단한 다음 1차 항체와 함께 1시간 동안 인큐베이션했습니다. 다음 1차 항체가 사용되었습니다: 다클론 항-SopB 항체(1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 다클론 항-p65 항체(1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), 다클론 항-phospho-Akt 항체(1:500; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), 다클론 항-Akt 항체(1:500; Abcam Inc.), 단일클론 항포스포-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)(1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 다클론 항-p38 MAPK 항체(1:1000; Cell Signaling Technology), 다클론 항-라민-B 항체(1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), 다클론 항 GAPDH 항체(1:3,000; Abcam Inc.) 및 다클론 항-베타 액틴 항체(1:5000; Abcam Inc.). TBST로 막을 3회 세척한 후, 염소 항마우스 IgG 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합체, 염소 항토끼 IgG HRP 접합체 또는 토끼 항염소 IgG HRP 접합체(1:3,000; Bio-Rad)의 2차 항체 1시간 동안 멤브레인과 함께 인큐베이션하였다. 블롯은 BM 화학발광 블로팅 기질(POD; Roche, Mannheim, Germany)을 사용하여 전개되었습니다.

IL-8 생산 측정

배양 상층액의 IL-8 수준은 제조사의 프로토콜에 따라 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 키트(Abcam Inc.)를 사용하여 결정되었습니다. 비색 반응의 전개 후, Synergy Mx 마이크로플레이트 리더(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 표준 농도(X축)에 대한 평균 흡광도를 표적 단백질 농도(Y축)에 대해 플롯팅하여 표준 곡선을 생성했습니다. 샘플의 흡광도를 표준 곡선과 비교하여 샘플에서 IL-8의 농도를 결정했습니다.

통계 분석 통계적으로

유의한 차이는 Student's t-test의 P 값을 계산하여 결정되었습니다. < 0.05의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었습니다.

결과 및 논의

L. plantarum JSA22 *Lactobacilli*의 항균 활성 및 프로바이오틱 특성은 숙주에게 건강상의 이점을 제공할 수 있으며,

장내 정상 미생물총의 균형을 회복시키고, 병원성 세균이 장벽에 부착하는 것을 억제하고, 염증 과정을 예방하는 능력으로 인해 동물과 인간 모두에서 증상 조절 또는 장 질환 예방에 효과적이라는 증거가 축적되고 있습니다. [35].

우리의 이전 연구에서 우리는 한국의 전통 발효 식품인 메밀 속성장에서 분리된 *L. plantarum* 균주 JSA22가 다양한 병원성 박테리아에 대해 프로바이오틱 특성과 상당한 항균 활성을 갖는다는 것을 입증했습니다[1]. 우리는 *L. plantarum* strain JSA22의 probiotic potential value와 antipathogenic activity에 대한 평가를 정확히 확인하였다. 이 연구에서 우리는 *L. rhamnosus* strain GG(LGG)를 양성대조군으로 사용했는데, 이는 이 probiotic 균주가 인간의 위장관에서 분리되어 광범위하게 연구되었기 때문입니다[7]. 이 프로바이오틱 균주는 산과 담즙에 내성이 있고, 인간과 토끼의 장 점막 세포에 강한 접착성을 가지며, 박테리아 효소 활성의 억제를 매개하고, 항균 물질을 생산하는 것으로 나타났습니다[22].

따라서 우리는 *L. plantarum* 균주 JSA22가 열, 담즙 및 산성 pH 스트레스 조건에서 성장한 이 균주의 생존율을 향상시킬 수 있는지 여부를 테스트했습니다. 산에 적응된 *L. plantarum* 균주 JSA22의 생존력은 *L. rhamnosus* GG의 생존율과 매우 유사하였다(Fig. 1A).

도 1A에 나타난 결과와 일치하게, 생존 연구 데이터는 *L. plantarum* JSA22 및 프로바이오틱 박테리아 균주 *L. rhamnosus* GG가 담즙 및 열 스트레스 하에서 높은 생존율을 나타냈다는 것을 나타내었다(도 1B 및 1C).

숙주 지질 대사에 관여하는 박테리아 효소인 BSH(담즙염 가수분해효소)를 분비하는 프로바이오틱 균주는 고콜레스테롤혈증 치료에 잠재적으로 사용되기 때문에 관심이 있습니다. BSH는 장내 미생물총에 있는 공생 박테리아에 의해 생성되는 효소이며,

간과 장에서 유전자 발현의 중요한 조절자로서 숙주 지질 대사에 관여합니다[18, 21]. 따라서 다양한 프로바이오틱 균주에 의한 향상된 BSH 활성은 고콜레스테롤혈증을 치료하기 위한 약제학적 개입에 대한 생물학적 대안으로서 잠재력을 제공할 수 있습니다[21]. 본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 *L. plantarum* JSA22에서 bsh 유전자의 RNA 발현을 평가하였고, 양성 대조군으로 16S rRNA를 사용하였다(Fig. 1B). 예상 크기의 PCR 산물이 *L. plantarum* JSA22에서 검출되었습니다. 최근 연구에서는 산에 민감한 균주를 pH 2.0에 장기간 노출시켜 내산성 균주를 생산할 수 있음을 보여주었습니다[4]. 또한, 이전 연구에서는 *L. plantarum* 균주 WCFS1이 산성 조건에서 성장하고 생존할 수 있었고 세포가 수확 되었음을 보여주었습니다.

L. plantarum JSA22는 *S. Typhimurium* 483을 억제합니다.

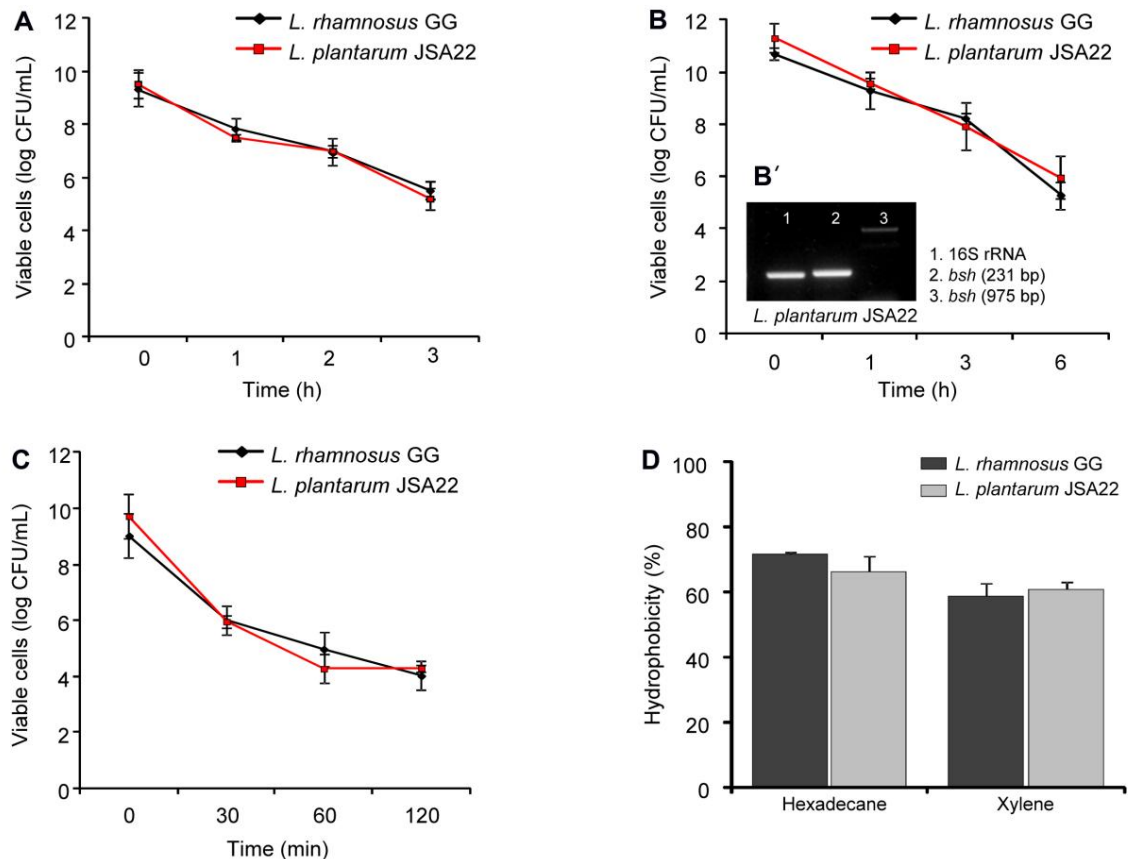


그림 1. *L. plantarum* 균주 JSA22의 프로바이오틱 특성 평가.

(A) 산(pH 2.0), (B) 담즙(0.3% 담즙) 및 (C) 열(65°C) 스트레스에서 *L. rhamnosus* GG 및 *L. plantarum* JSA22 균주의 생존력(log CFU/ml).

(B') *L. plantarum* JSA22에서 담즙 가수분해효소 (bsh) 유전자의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR 분석을 사용하여 평가했습니다. (D) 다른 소수성 용매에서 *L. rhamnosus* GG 및 *L. plantarum* JSA22 균주의 세포 표면 소수성. 실험은 3회 이상 수행하였으며 대표적인 데이터를 제시하였다. 오차 막대는 표준 편차를 보여줍니다.

성장의 정지기부터 위액 치료에 대한 높은 내성과 GI-tract assay에서 높은 생존율을 일관되게 나타냈다[11]. 이러한 결과는 *L. plantarum* JSA22가 가열, 담즙 및 낮은 pH와 같은 스트레스 요인에서 살아남을 수 있음을 나타냅니다.

프로바이오틱 균주와 병원체의 세포 표면 소수성을 비교하면 이들의 집락 능력을 나타낼 수 있습니다[6, 19]. 이전 연구에서는 프로바이오틱 균주 *Bifidobacterium longum* B6과 *L. rhamnosus* GG가 Caco-2 세포에 대한 높은 소수성과 강한 결합력을 가지며, 균주가 Caco에 대한 *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*의 부착을 효과적으로 억제 하는 것으로 나타났습니다. [40]. 따라서, 박테리아 세포 표면 소수성은 경쟁 억제에 강하게 영향을 미치며, 이는 시험관내 접착 분석 데이터가 생체내 집락화를 나타낼 수 있음을 나타냅니다. 본 연구에서는 *L. plantarum* JSA22 및 *L. rhamnosus* GG의 소수성 박테리아 세포 표면 특성을 평가하기 위해 n-hexadecane 및 xylene을 사용했습니다.

(그림 1D). 테스트된 균주의 소수성 백분율은 72%에서 58% 사이였습니다. 이전 연구에 따르면 소수성 백분율이 40% 이상인 균주는 표면 배열 단백질, 벽 삽입 단백질, 세포질 막 단백질 및 지질과 같은 소수성 분자가 박테리아 세포 표면에 있음을 나타냅니다[43]. 따라서 *L. plantarum* 균주 JSA22의 소수성은 자일렌 및 n-헥사데칸에 대한 높은 친화도에 영향을 미칠 수 있습니다.

종합하면, 이러한 데이터는 *L. plantarum* JSA22가 잠재적인 프로바이오틱 가치가 있는 장 상피를 집락화하는 능력이 있음을 나타냅니다.

프로바이오틱 균주는 또한 식품 생산 동물을 프로바이오틱으로 처리하여 해당 동물 및 그 제품에서 식인성 병원체를 감소시켜 식품 안전을 개선하는 데 사용할 수 있습니다[38]. 이전에 보고된 연구에 따르면 *L. rhamnosus* GG는 *E. coli*, *S. Typhi*, *B. cereus* 및 *S. aureus*를 억제하고 *L. rhamnosus* GG는 박테리아의 성장을 억제하는 박테리오파지 및 항균성 펩티드를 생성합니다.

병원성 박테리아 [29]. 다음으로 우리는 *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. enterica* 를 포함한 병원성 박테리아에 대한 *L. plantarum* JSA22 및 *L. rhamnosus* GG의 시험관 내 항균 활성을 조사했습니다. *L. plantarum* JSA22와 *L. rhamnosus* GG는 모두 4가지 병원성 박테리아에 대해 유사한 길항 활성을 가졌으며 한천-반점 플레이트에서 1.8mm 이상의 명확한 억제 영역을 생성했습니다(그림 2). *L. rhamnosus* 균주 GG와 비교하여, *L. plantarum* JSA22는 *E. coli* 및 *S. enterica*에 대해 더 높은 억제 활성을 나타냈다. 따라서, *L. plantarum* JSA22는 세균성 질병의 치료를 위한 후보 광역 항균제로 사용될 수 있다. 전반적으로, 우리의 결과는 *L. plantarum* JSA22가 잠재적인 프로바이오틱 균주로 사용될 수 있고 균주의 항균 활성이 식품 매개 감염을 치료하거나 예방하기 위해 이용될 수 있음을 나타냅니다.

제한된 영양소를 놓고 경쟁하고 장 상피에서 병원체의 부착, 침입 및 증식을 억제함으로써 [3]. 또한 프로바이오틱스는 장 상피 세포에 부착되어 병원성 장내 세균의 부착을 경쟁적으로 배제하는 것으로 알려져 있다 [5]. 따라서 접착성 프로바이오틱스는 장내 집락화와 병원균의 부착을 억제할 수 있는데, 이를 경쟁 배제(competitive exclusion)라고 한다 [2]. 도 3A에 나타난 바와 같이, *S. Typhimurium*의 CCD-18Co 및 Caco-2 세포주에 대한 부착은 *L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG 처리에 의해 유의하게 감소되었다. 그러나, 숙주 세포에 대한 *S. Typhimurium*의 부착은 *Lactobacillus* 균주 의 부재하에 수행된 *S. Typhimurium* 감염 에서 현저하게 더 높았다 (Fig. 3A). 따라서, *L. plantarum* 균주 JSA22는 장 상피 세포주에 대한 *S. Typhimurium* 부착을 유의하게 억제합니다.

L. plantarum JSA22가 *S. Typhimurium* 의 부착, 침입 및 세포독성에 미치는 영향

프로바이오틱 균주는 항균 작용을 매개할 수 있습니다

우리는 장 세포에서 *S. Typhimurium* 진입 및 증식에 대한 *L. plantarum* JSA22의 효과를 결정하기 위해 침입 분석을 수행했습니다. 이를 평가하기 위해 *L. plantarum* JSA22 및 *S. Typhimurium* 균주를 다음 중 하나와 함께 공동 배양했습니다.

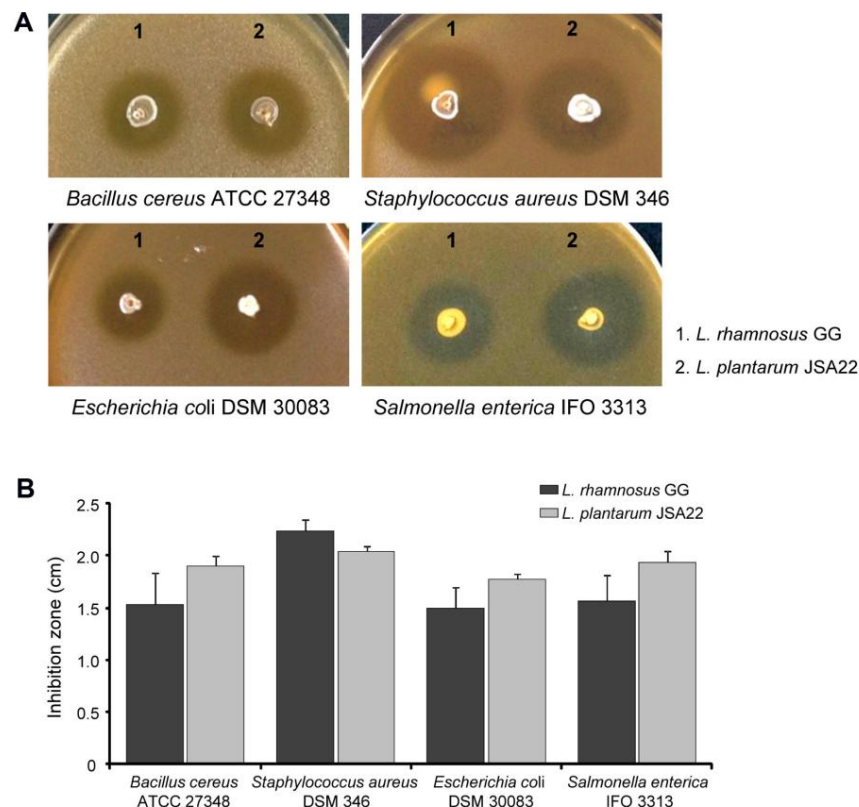


그림 2. *L. plantarum* JSA22의 병원성 세균에 대한 길항 활성.

(A) *L. rhamnosus* GG 및 *L. plantarum* JSA22 균주의 병원성 세균에 대한 항균 활성을 나타내는 한천 반점 시험. 억제 영역은 적절한 조건에서 24~48시간의 배양 후에 관찰되었습니다. 박테리아 성장이 없는 깨끗한 영역이 억제 영역입니다. (B)

다양한 병원성 미생물의 억제 영역 직경을 측정하고 기록했습니다. 오차 막대는 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 표준 편차를 나타냅니다.

L. plantarum JSA22는 *S. Typhimurium* 485를 억제합니다.

CCD-18Co 세포주 단층 또는 Caco-2 세포주 단층 및 겐타마이신 보호 분석을 수행했습니다. CCD-18Co(54%) 및 Caco-2 세포(64%)에 대한 *S. Typhimurium* 침입율은 프로바이오틱 박테리아 균주 *L. rhamnosus* GG의 존재하에 감소되었다 (그림 3B). CCD-18Co(48%) 및 Caco-2 세포(70%)의 *S. Typhimurium* 침입율은 양성 대조군 (*S. Typhimurium* 단독 접종)과 비교하여 *L. plantarum* strain JSA22의 존재하에서 유의하게 감소 하였다.).

따라서 우리는 *L. plantarum* 균주 JSA22가 *S. Typhimurium*이 숙주 세포에 부착하는 것을 방해하여 *S. Typhimurium*에 의한 장 세포의 침입을 억제한다고 추측하였다. 이전 연구에서도 병원균의 경쟁적 배제로 인해 프로바이오틱 균주가 있는 경우 병원성 박테리아의 부착 및 침입이 감소했다고 보고했습니다[23, 38].

Apoptosis와 세포막 완전성의 유지는 장 상피 장벽 기능을 유지하고 박테리아 침입을 차단하는 데 중요합니다[28]. 이 연구에서 우리는 장 세포주의 세포 사멸을 예방하거나 촉진하는 *L. plantarum* JSA22의 효과를 조사했습니다.

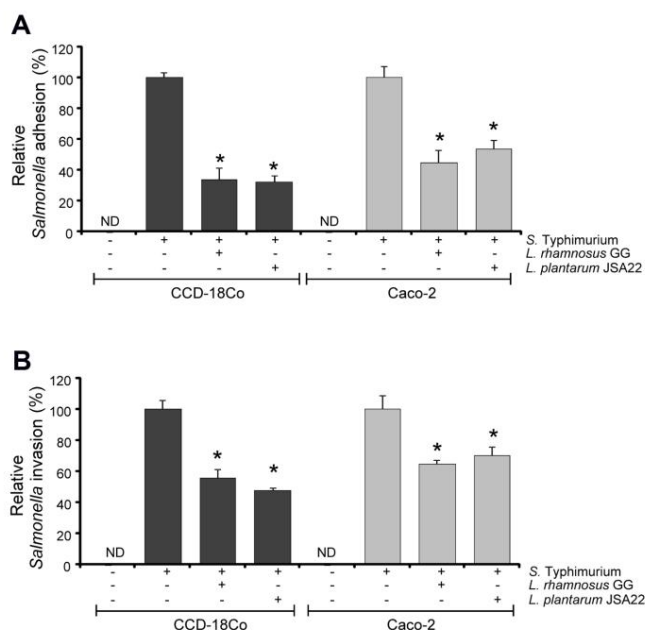


그림 3. *L. plantarum* JSA22가 *S. Typhimurium*의 부착 및 침입에 미치는 영향.

CCD-18Co 및 Caco-2 세포의 *S. Typhimurium*에 감염된 단층에 대한 부착 (A) 및 침입 (B) 비율은 100%로 설정된 *S. Typhimurium*(대조군)에 부착되거나 침입한 비율로 계산되었습니다. 모든 실험은 최소 3회 이상 수행되었으며 대표적인 데이터가 표시됩니다. 데이터는 평균(± SD)으로 표시됩니다. *, $p < 0.05$. ND, 감지되지 않음.

*S. Typhimurium*에 감염되었습니다. 상피 세포의 생존 능력은 상피 세포 손상 및 세포 사멸의 지표로서 LDH 방출을 측정함으로써 간접적으로 평가되었다. 우리는 또한 apoptosis 수준이 병원성 박테리아의 부착과 관련이 있을 수 있다고 추측했습니다. 도 4에 나타난 바와 같이, *L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG와 함께 배양한 상피 세포에 의한 낮은 LDH 방출은 LDH 양성 대조군(용해) 및 *S.*

Typhimurium 균주(유산균 없음). MOI 100에서 *L. plantarum* JSA22로 감염된 CCD-18Co 단층의 LDH 수준은 CCD-18Co의 LDH 수준보다 4배 낮았습니다.

S. Typhimurium 단독으로 감염된 단층. 유사하게, MOI 100에서 *L. plantarum* JSA22로 감염된 Caco-2 단층의 세포독성 백분율은 *S. Typhimurium* 단독으로 감염된 Caco-2 단층의 세포독성보다 4.6배 낮았다.

MOI 100에서 *L. rhamnosus* GG 감염으로 감염된 CCD-18Co 및 Caco-2 세포주의 세포독성 백분율은 다음과 같습니다.

각각 10%와 24%입니다. 따라서, *L. plantarum* JSA22는 장 상피 세포에서 *S. Typhimurium*에 의한 세포 독성에 대한 보호를 유도합니다. 이러한 데이터는 *L. plantarum* JSA22가 숙주 상피 세포에 대한 부착을 잠재적으로 억제함으로써 *S. Typhimurium*에 의한 세포막 손상을 억제하지만 장 세포주와 두 균주의 동시 배양이 상피 세포막 누출을 증가시킴을 보여줍니다. *L. rhamnosus* GG가 인간 장 상피 세포와 마우스 결장세포의 사이토카인에 의한 세포사멸사를 예방한다는 최근 보고에 따르면 [41], 우리는 *L. rhamnosus* GG와 *L. plantarum* JSA22가 모두 *S. Typhimurium*에 의한 세포독성을 예방한다는 것을 발견했습니다. 따라서, 우리의 결과는 *L. plantarum* JSA22가 *S. Typhimurium*에 의한 세포막 손상을 예방하고 막 손상과 관련된 박테리아 유발 지연된 세포 사멸 세포 사멸을 악화시킬 수 있음을 보여줍니다.

S. Typhimurium 성장 및 생존에 대한 *L. plantarum* JSA22의 효과

살모넬라 는 장 상피 세포의 침입을 매개하는 다양한 이펙터 단백질 을 암호화합니다. 예를 들어, 유형 III 단백질 분비 시스템(T3SS)은 살모넬라 병원성 섬 I(SPI-1)이라고 하는 염색체 영역에 의해 암호화되며, 이는 장 상피 세포로 전위되는 SopB를 비롯한 다양한 효과기 단백질의 생산을 가능하게 합니다. 그 다음 전위된 이펙터 단백질은 장 상피 세포 액틴 세포골격을 조절하여 장 상피 세포로 박테리아의 내재화를 촉진합니다. 특히, SopB 단백질 수준은 감염 후 최대 12시간 동안 장 상피 세포에서 지속됩니다.

또한, SopB는 살모넬라 감염의 세포내 단계에서 숙주 세포 침입을 중재합니다[32].

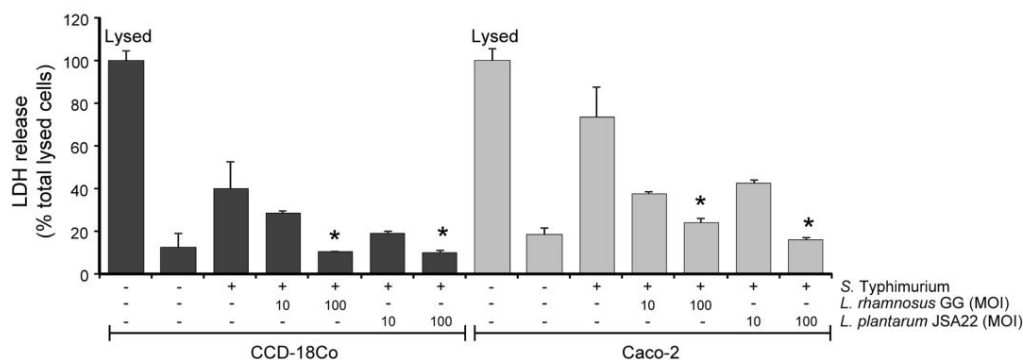


그림 4. *S. Typhimurium*에 의한 세포 독성 에 대한 *L. plantarum* JSA22 의 보호 효과 .

손상된 상피세포에서 방출되는 LDH를 측정하여 세포독성을 추정하였다. *S. Typhimurium*(60분, 37°C, 5% CO₂) 으로 처리된 CCD-18Co 및 Caco-2 단층 을 사용하여 *S. Typhimurium* 매개 세포독성을 평가했습니다. *L. plantarum* JSA22 및 *L. rhamnosus* GG 를 사용한 CCD-18Co 및 Caco-2 세포의 전처리 는 *S. Typhimurium* 에 의한 세포 손상 으로부터 보호 했습니다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에 대한 평균(± SD)으로 표시됩니다. 스튜던트 t-검정을 사용하여 분석을 수행했습니다. *, $p < 0.05$.

*S. Typhimurium*이 *Lactobacillus* 군주 와 동시 감염된 숙주 세포로 의 침 입을 시각적으로 조사하기 위해 감염된 CCD-18Co 세포를 anti-SopB 항체로 염 색하여 *Salmonella*를 검출했습니다. 도 5A에 도시된 바와 같이 , 숙주 세포 표 면에 대한 살모넬라 부착은 *L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG 의 존재하에 상당히 감소된 반면, 장 상피 세포의 살모넬라 감염은 *S. Typhimurium* 단독으로 감염된 세포 배양에서 현저하게 더 높았다. . NI가 있는 CCD-18Co 세 포에서 , 장 상피 표면에 대한 살모넬라 의 부착은 검출할 수 없었다. 공초점 이미 지는 우리의 데이터를 더욱 확증하고 *Lactobacillus* 군주 의 존재하에 장 상피 세포의 *S. Typhimurium* 감염 감소를 나타냅니다. 공초점 현미경 데이터와 일치 하게, SopB 발현 분석 데이터는 SopB 수준이 *L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG 의 존재 하에서 *S. Typhimurium*에 감염된 상피 세포의 단백 질 추출물에서 더 낮다는 것을 보여주었습니다 . *S. Typhimurium* 단독으로 감 염된 상피 세포의 SopB 수준 은 상당히 높았으며, 이는 *L. plantarum* 군주 JSA22가 숙주 세포 내에서 살모넬라 생존 및 복제의 억제 를 매개할 수 있음을 나 타냅니다.

이전 연구에서는 다양한 프로바이오틱 성분 이 *S. Typhimurium*에서 sopB 유전자 발현을 하향 조절 하여 장 상피 세포로의 침입을 방지한다고 보고했습니다 [9]. 젖산 생산 박테리아 치료, 특히 낮은 박테리아 투여량은 대부분의 SPI-1 인코딩 독성 유전자 (hilA, hilC, hilD, sopB, sopD, sopE2, sipA, sipC, avrA 및 sptP) 의 발현을 억제합니다. 살모넬라에 감염된 닭 맹장[42].

우리의 데이터는 또한 이러한 발견과 일치 했으며 *L. plantarum* 과 함께 배양 된 *S. Typhimurium* 에서 sopB 유전자 발현 의 하향 조절을 보여주었습니다.

JSA22. 이러한 결과를 바탕으로 우리는 *L. plantarum* JSA22가 *S. Typhimurium*의 독성 관련 유전자의 하향 조절을 매개하는 단백질을 분비한다 고 추측했습니다. 따라서 장내 병원균에 대한 프로바이오틱스의 항균 효과는 주 로 병원성 박테리아의 독성 유전자 발현 억제에 의해 매개될 수 있습니다.

L. plantarum JSA22 에 의한 Akt 인산화, p38 MAPK 인산화 및 NF-κB 활성화 억제

최근 연구에 따르면 *L. brevis* G-101은

MyD88-PI3K 신호 전달 경로 를 통해 IRAK1과 AKT 모두 인산화 되어 결국 NF-κB 와 MAPK를 활성화합니다[13]. 함께, 이러한 데이터는 일부 프로바이오틱 락 토바실러스 군주가 박테리아 감염 중 염증 반응 매개 손상을 예방하는 데 유용할 수 있음을 나타냅니다. Kuijl et al. [20]은 또한 *Salmonella* 이펙터 단백질 SopB가 Akt의 활성화를 유도하여 Rab14 및 AS160 인산화를 활성화하여 식세포 성숙을 차단함으로써 항세포자멸사 신호전달에 기여함을 보여주었습니다.

따라서, *L. plantarum* JSA22 의 항염식 활성을 매개하는 세포내 신호전달 사건의 역할을 조사하기 위해, 자극된 CCD-18Co 세포에서 Akt 및 p38 MAPK 인산화 및 NF-κB 활성화를 평가했습니다.

S. Typhimurium 과 함께 . 도 4에 도시된 바와 같이. 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, *L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG에 감염된 숙주 세포 의 총 세포 단백질에서 Akt 및 p38 인산화 수준이 유의하게 감소한 반면, *Lactobacillus* 가 없는 *S. Typhimurium* 감염 세포 에서 Akt 및 p38 활성화 가 현저하게 증가 하였다. . phospho-Akt/총 Akt의 비율에 기반한 상대 신호 강 도의 정량적 분석은 10배 더 낮은 수준을 나타냈다.

L. plantarum JSA22는 *S. Typhimurium* 487을 억제합니다.

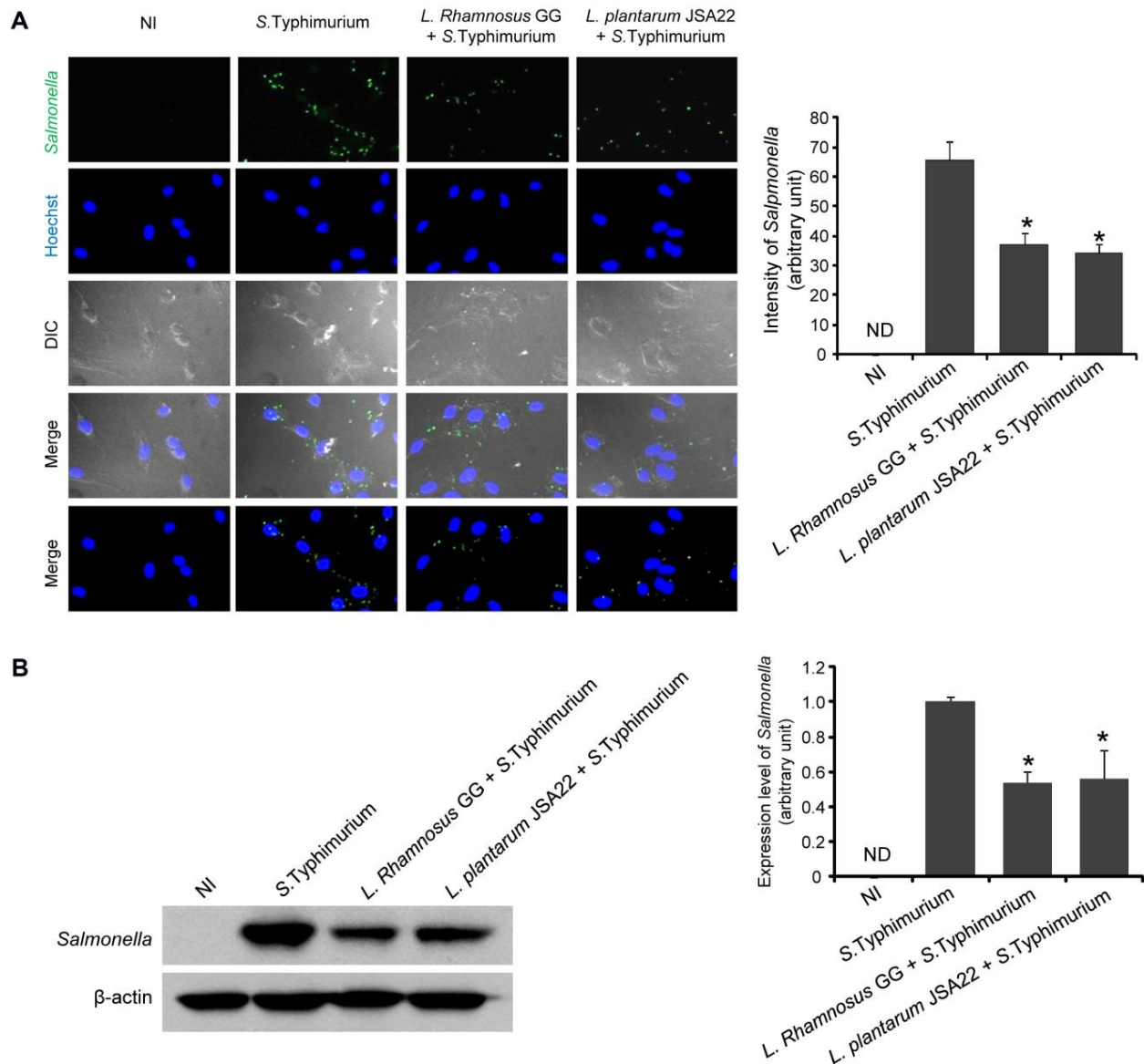


그림 5. *L. plantarum* JSA22는 *S. Typhimurium* 감염을 억제합니다.

(A) 살모넬라 침입의 시각화를 위해 박테리아 군주에 감염된 CCD-18Co 세포를 FITC-접합된 항-SopB 항체로 염색하였다. DAPI 염색을 통해 상피세포의 핵을 시각화하였고, 살모넬라균은 FITC가 결합된 anti-SopB 항체로 염색하였다. 샘플당 3개의 다른 공초점 평면(최소 30개 세포)의 이미지를 분석하여 SopB 발현을 추정했습니다(오른쪽 패널). (B)

전체 세포 단백질에서 SopB의 발현 수준은 항-SopB 항체를 사용한 면역블롯 분석을 사용하여 결정되었습니다. 데이터는 단백질 로딩 대조군(오른쪽 패널)으로서 β -액틴에 대해 정규화되었습니다. 총 세포 단백질에서 SopB의 발현 수준은 농도계 분석을 수행하여 정량화하였다. 블롯의 각 밴드는 β -액틴 농도에 데이터를 사용하여 정규화되었으며 SopB의 수준은 3개의 개별 실험에서 평균 \pm SD로 표시됩니다. NI: 감염되지 않음, ND: 감지되지 않음. *, $p < 0.05$.

락토바실러스가 없는 상태에서 *S. Typhimurium*에 감염된 숙주 세포와 비교하여 *S. Typhimurium* 및 *L. plantarum* 군주 JSA22 모두에 감염된 숙주 세포에서의 Akt 인산화(도 6A). phospho-p38/총 p38 비율에 대한 신호 강도 분석은 *S. Typhimurium*에 감염된 상피 세포가 2배 더 높은 p38 인산화를 가짐을 보여주었습니다

L. plantarum JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG 군주와 공동 배양한 *S. Typhimurium*에 감염된 상피 세포보다 이러한 결과는 *L. plantarum* JSA22가 pro-apoptotic Akt 인자를 억제하고 p38 활성화를 억제함으로써 상피 세포의 생존을 촉진한다는 것을 나타냅니다.

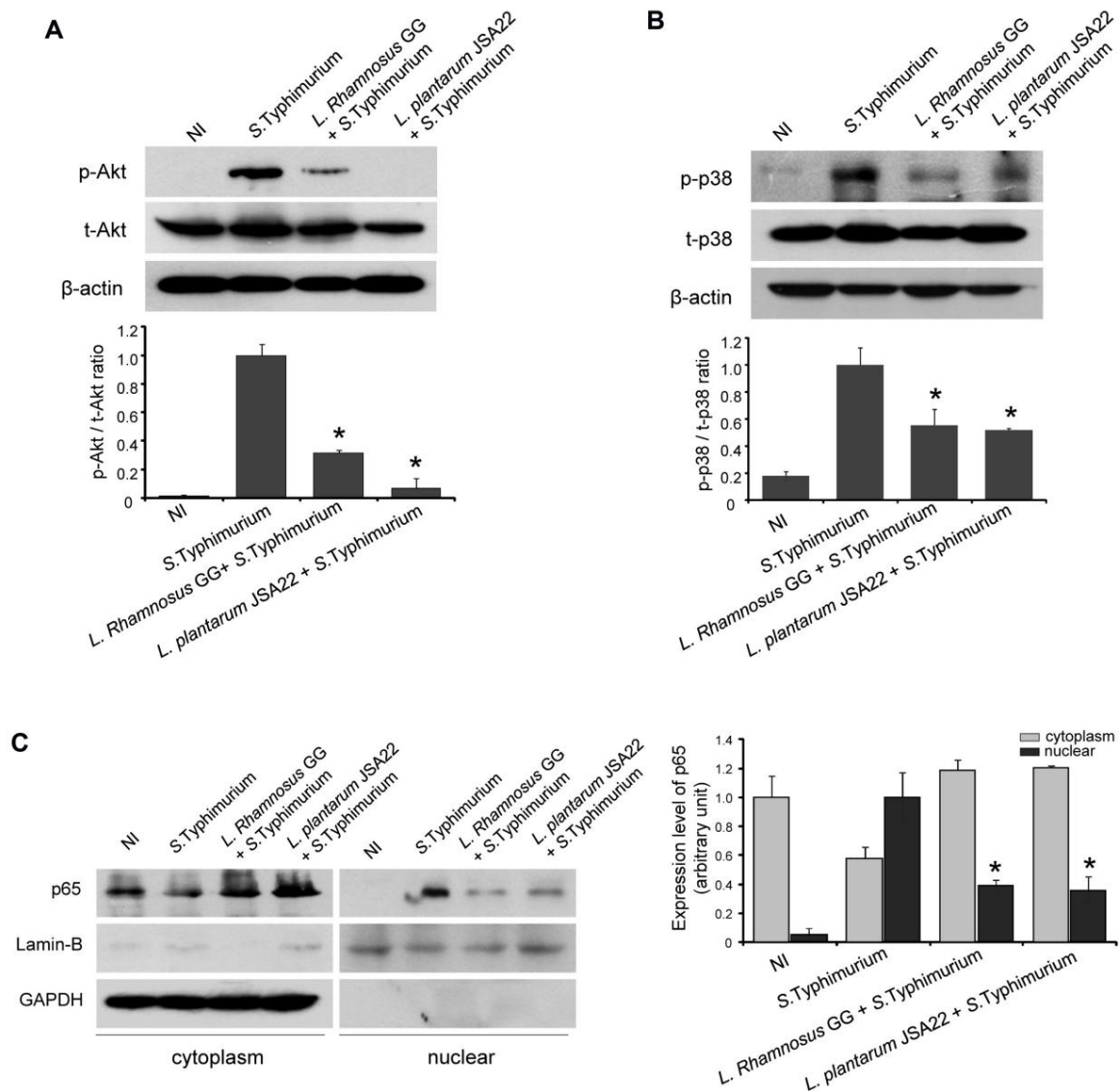


그림 6. *L. plantarum* JSA22에 의한 *S. Typhimurium* 유도 염증 매개체 및 NF-κB 활성화 억제.

(A, B) p-AKT 및 p-p38에 특이적인 1차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행한 후 HRP가 결합된 2차 항체로 배양하여 모든 균주의 전체 세포 단백질에서 p-AKT 및 p-p38의 발현 수준을 분석했습니다. 항독소, 항-β-액틴 항체를 사용하여 로딩 대조군으로서 액틴 발현을 추정하였다. 각 밴드의 강도는 농도계 분석을 통해 정량화하고 인간화된 단백질과 전체 단백질의 비율을 계산하였다. (C) NF-κB p65의 발현은 감염된 CCD-18Co 세포로부터 얻은 세포질 및 핵 분획을 염색하기 위해 항-NF-κB p65 항체로 면역블롯 분석을 수행하여 결정 하였다. 항-GAPDH 및 항-라민 B 항체를 각각 세포질 및 핵 단백질 마커로 사용하였다. 핵 및 세포질 분획에서 p65의 발현 수준은 농도계 분석을 수행하여 정량화했습니다(오른쪽 패널). 표시된 데이터는 최소 3개의 독립적인 실험을 나타냅니다. 데이터는 평균(± SD)으로 표시됩니다. NI: 감염되지 않았습니다. *, $p < 0.05$.

이전 연구에서는 프로바이오틱 *L. 람노스* GR-1 이 염증 매개체의 방출을 매개하는 NF-κB 활성화를 촉진 하여 장독소성 대장균 에 대한 방광 세포의 면역 반응을 조절했다고 밝혔습니다.

또한, 비노생식기 프로바이오틱 *L. rhamnosus* GR-1은 방광 세포에서 TLR4 발현을 증가시켰습니다[16]. 에게

L. plantarum JSA22가 NF-κB 의존적 방식으로 숙주 선천성 면역 반응을 활성화 했는지 여부를 테스트하기 위해 우리는 CCD-18Co에서 NF-κB의 핵 전위를 평가했습니다

세포. 도 6C에 도시된 바와 같이, *S. Typhimurium* 균주 단독으로 숙주 세포 감염은 증가된 NF-κB p65 소단위 핵 전위를 초래하였다. NF-κB의 활성화는

L. plantarum JSA22는 *S. Typhimurium* 489를 억제합니다.

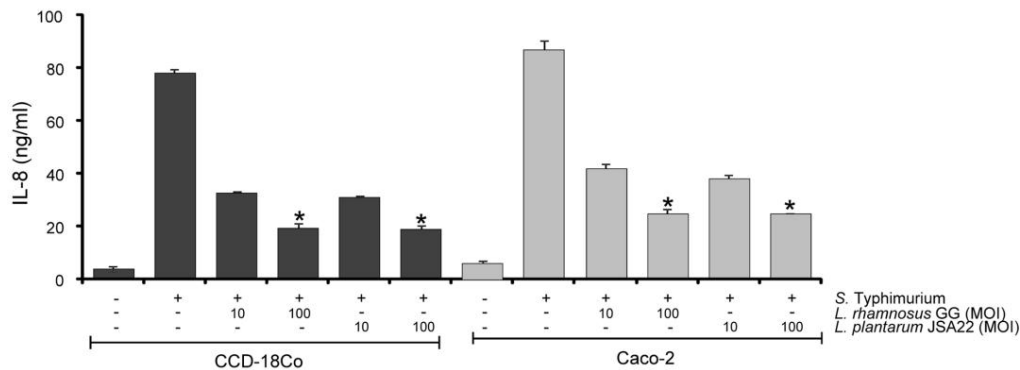


그림 7. *L. plantarum* JSA22에 의한 *S. Typhimurium* 유도 IL-8 생산 조절.

3시간 동안 *S. Typhimurium* 및 lactobacilli (*L. plantarum* JSA22 또는 *L. rhamnosus* GG)에 감염되거나 처리되지 않은 CCD-18Co 및 Caco-2 세포의 IL-8 발현은 배양 상등액을 사용하여 ELISA를 수행하여 결정되었습니다. 데이터는 3개의 개별 실험에 대한 평균(± SD)으로 표시됩니다. *, $p < 0.05$.

L. plantarum JSA22 및 *S. Typhimurium*에 동시 감염된 세포에서 현저하게 낮았고, *L. rhamnosus* GG 균주는 NF-κB 의존성 유전자 활성화 수준을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 *L. plantarum* JSA22가 장 상피 세포에서 NF-κB 경로의 살모넬라 유도 활성화를 유의하게 감소시켜 살모넬라 감염을 억제한다는 것을 나타냅니다. 함께, 이러한 결과는 *L. plantarum* 균주 JSA22가 살모넬라에 의해 자극된 숙주 세포에서 Akt, p38 MAPK 및 NF-κB (p65 의존적 방식) 경로를 억제함으로써 박테리아 성장을 예방할 수 있음을 나타냅니다.

MOI 100에서 *L. plantarum* JSA22로 감염된 세포, CCD-18Co 및 Caco-2 세포는 각각 3배 및 4배 낮은 수준으로 IL-8을 분비했습니다. NI로 처리된 CCD-18Co 및 Caco-2 세포 단층은 검정에 의해 검출 가능한 수준에서 IL-8을 분비하지 않았다. 이러한 결과는 *L. plantarum* JSA22가 살모넬라 감염 과정에서 IL-8 생성을 감소시켜 숙주 세포의 면역 반응을 감소시킬 수 있음을 입증합니다.

L. rhamnosus GG는 *H. pylori*를 처리한 대식세포에서 종양 괴사 인자 알파 생성을 억제하여 유사한 항염증 효과가 있는 것으로 최근 보고되었으며 놀랍게도 *B. breve* Bb99는 *H. pylori* 노출 [28, 30].

L. plantarum JSA22에 의한 IL-8 생산 감소

장 상피 세포는 악성 살모넬라 균주 감염에 대한 보호 면역 반응에 기여하는 다양한 전염증성 사이토카인을 생성 및 방출하는 것으로 알려져 있기 때문에 살모넬라의 주요 저장소로 간주됩니다[36]. 또한, 살모넬라 감염은 숙주 세포에서 IL-8, IL-6, IL-18, TNF-α, MCP-1 및 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 자극합니다 [25]. 최근 연구에 따르면 여러 프로바이오틱 락토바실러스 균주가 IL-8의 분비를 방지하거나 약화시키며, 이 균주가 숙주 면역 기능을 직접 조절하고 염증성 질환에 영향을 미치는 항염증 효과를 매개할 수 있음을 보여주었습니다[31].

따라서 우리는 *L. plantarum* JSA22 균주에 의한 *S. Typhimurium*에 감염된 CCD-18Co 및 Caco-2 세포주에서 IL-8 생산을 유도할 수 있는지 여부를 평가했습니다. 도 7에 나타난 바와 같이, ELISA 분석은 *L. plantarum* 균주 JSA22에 감염된 CCD-18Co 및 Caco-2 세포에서 IL-8의 발현이 *S. Typhimurium* 단독으로 감염된 세포보다 유의하게 낮음을 나타내었다. *S. Typhimurium*에 감염된 대조군과 비교하여

우리의 결과는 특정 *B. breve* 균주가 염증 유발 반응을 유발할 수 있다는 이전 연구에서 보고된 것과 일치합니다[27].

결론적으로, 한국의 전통 발효식품인 메밀속성장에서 분리한 *L. plantarum* JSA22는 잠재적인 probiotic 균주로 사용하기에 바람직한 특성을 가졌다. *L. plantarum* JSA22는 *S. Typhimurium*의 박테리아 성장, 부착 및 세포 침입을 억제했습니다. 또한, *L. plantarum*은 IL-8 발현을 억제하고 *Salmonella*에 의한 NF-κB 활성화를 억제하여 장 상피 세포의 염증 반응을 억제하여 Akt와 p38의 인산화를 감소시킬 수 있었습니다. 종합하면, 우리의 데이터는 *L. plantarum* JSA22가 염증성 장 질환을 치료하기 위한 프로바이오틱 제제로 사용될 수 있고 식품 안전 강화, 항균 및 산업 응용을 포함하여 다른 용도로 사용될 수 있음을 나타냅니다.

L. plantarum JSA22에 의해 분비되는 박테리옌, 박테리옌 유사 물질 및 항균 리포펩티드와 같은 새로운 길항 물질을 확인하고 특성화하기 위해서는 추가 연구가 필요합니다. 따라서 이 연구는 데이터

L. plantarum JSA22가 잠재적으로 프로바이오틱 균주로 사용될 수 있으며 이는 박테리아 감염에 대한 숙주 면역 반응을 향상시킬 수 있음을 나타냅니다 .

감사의 말

이 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 연구 프로그램(PJ010991)의 지원을 받았습니다.

참고문헌

- 안용준, 최혜선. 2014. 대두 발효 제품에서 분리된 유산균을 생산하는 엑소폴리사 카라이드의 잠재적인 프로바이오틱 특성. J. 한국어 Soc. 식품 과학. 뉴트르. 43: 749-755.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Cors M, Raffatellu M. 2013. Probiotics: 속성, 예 및 특정 응용 프로그램. 콜드 스프링 하버 퍼스펙티브. 메드. 3: a010074.
- Boirivant M, Strober W. 2007. 작용 메커니즘 프로바이오틱스. 커 의견. 위장병. 23: 679-692.
- Collado MC, Sanz Y. 2007. Bifidobacterium 의 내산성 유도 : 잠재적으로 프로바이오틱 균주의 바람직한 특성을 개선하기 위한 메커니즘. J. Appl. 미생물. 103: 1147-1157.
- Das JK, Mishra D, Ray P, Tripathy P, Beuria TK, Singh N, Suar M. 2013. Salmonella enterica serovar Enteritidis 에 대한 Lactobacillus plantarum 균주의 항감염 활성에 대한 시험관 내 평가. 창자 패트호그. 5:11 .
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000. Bifidobacterium longum 의 13개 균주의 접착, 자가응집 및 소수성 . 레트 사람. 적용 미생물. 31: 438-442.
- Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. 2004. 락토바실러스 람노시스 균주 GG는 송아지를 위한 잠재적인 프로바이오틱입니다. 할 수있다. J. 수의사. 해상도 68: 249-253.
- Fabrega A, Vila J. 2013. Salmonella enterica serovar Typhimurium이 숙주에서 성공하는 기술: 독성 및 조절. 클린. 미생물. 계 26: 308-341.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. 2006. 부티레이트는 특히 살모넬라 병원성 섬 1 유전자 발현 을 하향 조절 합니다. 적용 환경. 미생물. 72: 946-949.
- Guard-Bouldin J, Morales CA, Frye JG, Gast RK, Musgrove M. 2007. 표 현형 마이크로어레이 항생제 내성 패턴에 의한 살모넬라 엔테리카 하위 집단의 검출. 적용 환경. 미생물. 73: 7753-7756.
- Ingham CJ, Beerthuyzen M, van Hylckama Vlieg J. 2008. 산성 스트레스에 대한 반응 및 회복에 대한 Lactobacillus plantarum WCFS1 미세 집락 의 집단 이질성 . 적용 환경. 미생물. 74: 7750-7758.
- Iqbal MZ, Qadir MI, Hussain T, Janbaz KH, Khan YH, Ahmad B. 2014. Probiotics 및 다양한 질병에 대한 유익한 효과. 박. 제이팜. 과학 27: 405-415.
- 장 SE, Hyam SR, Han MJ, Kim SY, Lee BG, Kim DH. 2013. Lactobacillus brevis G-101은 NF-kappaB, MAPK 및 AKT 경로를 억제하고 M1 대식세포를 M2 유사 대식세포로 분극화하여 쥐의 대장염을 개선합니다. 제이. 적용 미생물. 115: 888-896.
- Johnson GL, Lapadat R. 2002. ERK, JNK 및 p38 단백질 키나아제에 의해 매개되는 미토겐 활성화 단백질 키나아제 경로. 과학 298: 1911-1912.
- Kailasapathy K, Chin J. 2000. Lactobacillus acidophilus 및 Bifidobacterium spp.와 관련된 프로바이오틱 유기체의 생존 및 치료 가능성. 면역. 세포 바이오. 78: 80-88.
- Karlsson M, Scherbak N, Reid G, Jass J. 2012. Lactobacillus rhamnosus GR-1은 TLR4를 통해 대장균 자극 방광 세포에서 NF-카파B 활성화를 향상 시킵니다 . BMC 미생물. 12:15 .
- Kaushik JK, Kumar A, Duany RK, Mohanty AK, Grover S, Batish VK. 2009. Lactobacillus plantarum 의 토착 분리주의 기능 및 프로바이오틱 특성 . 플로스 원 4: e8099.
- 김경, 이병현. 2005. 위장 미생물총에서 담즙염 가수분해효소에 대한 생화학적 및 분자적 통찰력 - 리뷰. 아시아 오스트랄라스. 제이애임. 18: 1505-1512.
- Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N, Yiangou M. 2010. 추정 프로바이오틱 락토바실러스 균주의 접착력, 세포 표면 특성 및 면역 조절 활성 평가. 국제 J. 식품 미생물. 140: 154-163.
- Kuijl C, Savage NDL, Marsman M, Tuin AW, Janssen L, Egan DA, et al. 2007. 세포 내 박테리아 성장은 PKB/AKT1 주변의 키나제 네트워크에 의해 제어됩니다. 네이처 450: 725-730.
- Kumar RS, Brannigan JA, Prabhune AA, Pundle AV, Dodson GG, Dodson EJ, Suresh CG. 2006. Bifidobacterium longum 의 접합된 담즙염 가수분해효소의 구조 및 기능 분석은 페니실린 V 아실라아제와의 진화적 관계를 보여줍니다. J. Biol. 화학 281: 32516-32525.
- Lee DJ, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM. 2000. 신생아 동물 모델에서 프로바이오틱 치료 평가. 소아과. 서그. 국제 16: 237-242.
- Lee JJ, Kwon H, Lee JH, Kim DG, Jung SH, Ma JY. 2014. 락토바실러스 플란타 롬을 함유한 발효 소시호탕 은 혈관 평활근 세포의 항증식 활성을 향상시킵니다. BMC 보완. 대체. 메드. 14:78 .
- 임 에스엠, 안DH. 2012. 유산균의 Caco-2 세포 부착에 영향을 미치는 인자 및 살모넬라 티피무리움(Salmonella Typhimurium) 감염 억제 효과. J. 미생물. 생명공학. 22: 1731-1739.
- Lin YP, Thibodeaux CH, Pena JA, Ferry GD, Versalovic J. 2008. Probiotic Lactobacillus reuteri 는 c-Jun 을 통해 전염증성 사이토카인을 억제 합니다. 염증. 장 병성 14: 1068-1083.
- 라이언 MT. 2008. 결장암 예방에서 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 역할: 가정 된 메커니즘 및 생체 내 증거. 국제 J. 물. 과학 9: 854-863.
- Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H,

L. plantarum JSA22는 S. Typhimurium 491을 억제합니다.

Hosoda M, et al. 2002. Caco-2 세포에 대한 유산균의 부착 및 사이토카인 분비에 미치는 영향. 미생물. 면역. 46: 293-297.

28. Myllyluoma E, Ahonen AM, Korpela R, Vapaatalo H, Kankuri E. 2008. 체외에서 헬리코박터 파일로리 감염에 대한 다중 프로바이오틱 조합의 효과. 클린. 백신 면역. 15: 1472-1482.

29. Ogunshe AA, Omotoso MA, Bello VB. 2011. 칸디다 질염에 연루된 칸디다 종에 대한 Lactobacillus 균주의 대사 산물의 체외 항균 활성. 말레이어. 제이. 메드. 과학 18: 13-25.

30. Pena JA, Versalovic J. 2003. Lactobacillus rhamnosus GG는 접촉 독립적 메커니즘에 의해 지질다당류 활성화된 쥐 대식세포에서 TNF-알파 생산을 감소시킵니다. 세포 미생물. 5: 277-285.

31. Peral MC, Rachid MM, Gobbato NM, Huaman Martinez MA, Valdez JC. 2010. Lactobacillus plantarum 으로 치료한 만성 감염된 다리 궤양 환자의 다형핵 백혈구에 의한 인터루킨-8 생산. 클린. 미생물. 감염. 16: 281-286.

32. Perrett CA, Zhou DG. 2013. 살모넬라 유형 III 효과기 SopB는 숙주 세포 세포외 배출을 조절합니다. 이머징 미생물 감염. 2: e32.

33. Pieper GM, Olds C, Hilton G, Lindholm PF, Adams MB, Roza AM. 2001. 항산화 치료는 심장 이식 거부 반응에서 심근 핵 인자 카파 B의 활성화를 억제하고 심근 핵 단백질의 니트로실화를 억제합니다. 항산화. 산화 환원 신호. 3: 81-88.

34. Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BD, Destro MT. 2011. 식품 및 관련 출처에서 분리된 다제 내성 Salmonella enterica 분리물에서 클래스 1 인테그론 및 항생제 내성 유전자의 특성화. 브라즈. J. 미생물. 42: 685-692.

35. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Mengheri E. 2007. 새로운 돼지 Lactobacillus sobrius 균주는 장 독성으로부터 장 세포를 보호합니다.

대장균 K88 감염 및 막 장벽 손상을 예방합니다. J. Nutr. 137: 2709-2716.

36. Saarinen M, Ekman P, Ikeda M, Virtala M, Gronberg A, Yu DTY, et al. 2002. 인간 장 상피 세포로 의 살모넬라 침입은 HLA-B27에 의해 조절됩니다. 류마티스 41: 651-657.

37. Tan Z, Huang M, Puga A, Xia Y. 2004. Ah 수용체 복합체 활성 조절에서 MAP 키나제의 중요한 역할. 독. 과학 82: 80-87.

38. Thirabunyanon M, Thongwittaya N. 2012. Salmonella Enteritidis 감염에 대한 Bacillus subtilis 의 새로운 probiotic 균주의 보호 활동. 해상도 수의사. 과학 93: 74-81.

39. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. 2002. 내피 세포 및 근세포에서 독소루비신 유도 세포자멸사 동안 핵 인자-카파B의 활성화는 세포자멸사를 촉진합니다: 과산화수소의 역할. 바이오켄. J. 367: 729-740.

40. Xu H, Jung HS, Lee HY, Ahn J. 2009. 선별된 프로바이오틱 균주의 세포 표면 특성 및 접착 가능성 평가. 레트 사람. 적용 미생물. 49: 434-442.

41. Yan F, 포크 DB. 2002. 프로바이오틱 박테리아는 장 상피 세포에서 사이토카인 유도 세포자멸사를 예방합니다. J. Biol. 화학 277: 50959-50965.

42. Yang X, Brisbin J, Yu H, Wang Q, Yin F, Zhang Y, et al. 2014. 닭에서 살모넬라 전좌 및 독성 유전자 발현을 감소시키는 능력을 가진 선별된 젖산 생산 박테리아 분리주. 플로스 원 9: e93022.

43. Yu Z, Zhang X, Li S, Li C, Li D, Yang Z. 2013. 중국 감치에서 분리된 Lactobacillus plantarum 균주의 프로바이오틱 특성 평가. World J. Microbiol. 생명공학. 29: 489-498.

44. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suarez V, Vinderola G, et al. 2011. 치즈에서 분리된 Lactobacillus plantarum 균주의 특성 및 프로바이오틱 잠재력. 식품 미생물. 28: 1033-1040.