

정상인 및 간경화환자 혈청의 *Vibrio vulnificus*에 대한 살균효과*

전남대학교 의과대학 미생물학교실

이 준 행 · 정 선 식

= Abstract =

Bactericidal Activity of Normal and Cirrhotic Patients' Sera against *Vibrio vulnificus*

Joon Haeng Rhee and Sun Sik Chung

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, Kwangju 500, Korea

Bactericidal activity of normal and cirrhotic patients' sera against *Vibrio vulnificus* was investigated and compared each other as a part of the pathogenesis study of *V. vulnificus* septicemia. Bactericidal activity of serum against *V. vulnificus* was complement-dependent and the alternative pathway played the major role. *V. vulnificus* strains CDC A1402 and ATCC 27562 appeared serum-sensitive, and CDC C7184, clinical isolate CNUH1 and ATCC 29307 were serum-resistant. When bactericidal activity of cirrhotic sera against serum-sensitive CDC A1402 and serum-resistant CDC C7184 was compared with that of normal sera, showed slightly poorer bactericidal activity than normal sera. Especially in the case of serum-resistant CDC C7184 strain, cirrhotic sera showed statistically significant decrease ($p < 0.05$) in their bactericidal activity.

서 론

Vibrio vulnificus 패혈증은 간 및 담도계 질환을 가지고 있거나 습관성 과음 등으로 간기능이 저하되어 있는 환자들이나 당뇨병, 혈색소증(thalassemia major) 등을 기저질환으로 가지고 있는 환자들에서 발생하며 급속하게 진행하여 2~3일 내에 50~80%에서 사망을 초래하는 치명적인 질환이다¹⁾.

*V. vulnificus*가 다른 *Vibrio* 속들과는 달리 패혈증을 잘 일으키는 이유에 대해서는 Carruthers 및 Kabat²⁾는 *V. parahaemolyticus*보다 혈청의 살균작용에 영향을 덜 받는다고 보고했고 Tamplin 등³⁾은 *V. vulnificus*가 다른 *Vibrio* 속들 보다 혈청보체계를 활성화시키는 정도가 낫다는 것을 밝혀 어느 정도 공감을 받고 있으나 *V. vulnificus*가 구체적으로 어떻게 숙주방어기전을 뚫고 사람에서 패혈증을 일으키며 왜 간경화등의 간장질환을 가지고 있는 환자군에서 패혈증이 잘 일어나는지에 대해서는 아직 확실하게 알려져 있지 않아서 Wright 등⁴⁾, Simpson 및 ※본 연구는 1984년도 금호문화재단 학술 연구조성비로 이루어졌음.

Oliver⁵⁾, Helms 등⁶⁾의 혈중 철(Fe)농도설, Kreger 및 Lockwood⁷⁾의 독소설⁸⁾ 등의 몇가지 가설들이 논의되고 있으나 확실하게 증명된 바는 아직 없다.

이에 저자들은 *V. vulnificus*에 대한 숙주방어기전에 있어 정상인과 간경화환자 사이에 어떤 차이가 있는지를 알아보면 병인론을 잘 설명할 수 있리라 생각하여 정상인 혈청의 살균작용을 관찰해보았고 정상인과 간경화환자 혈청의 살균작용을 서로 비교하여 그결과를 이에 보고 하는바이다.

재료 및 방법

1. 공시균

미국 North Carolina 대학의 Oliver 교수로부터 분양받은 *V. vulnificus* ATCC 27562, 29037, CDC C7184 등의 표준균주들과 1984년 전남의대 부속병원에서 분리된 임상분리균주 CNUH1 등 5종을 공시했다.

이들 공시균들은 modified salt water-yeast extract agar¹⁰⁾ 사면배지에 접종하여 배양시킨 후 실온에 보관하면서 실험에 사용했으며 매 2~4주마다 한번씩 계대배양해 주었다. 공시균은 실험전날 2.5

% 식염농도 brain heart infusion agar (이하 BHI) broth에 접종하여 하룻저녁 배양한 후 배양액 1cc를 다시 새로운 2.5% 식염농도 BHI broth 9cc에 넣고 150분 정도 37°C 항온수조에서 회복시킨 후 각 실험에 공시했다.

2. 혈청

정상인 혈청은 건강한 남자 의과대학생 15명으로부터 채취한 혈액으로부터 분리하여 이들을 모아서 섞은(pooling) 다음 2cc씩 나누어서 -70°C에 보관하면서 사용했고 간경화환자 혈청은 조직생검 및 임상소견 등으로 확진 가능했던 간경화환자들 중 최근 1주일 이내에 항생제를 투여받은 적이 없는 환자들로부터 채취한 혈액에서 분리하여 각각을 2cc씩 나누어 -70°C에 보관하면서 사용했다.

3. 혈청살균효과

-70°C에 보관중인 혈청을 실온에서 녹여서 그대로 쓰거나, 실온에서 녹힌 혈청을 56°C에서 30분 동안 가열하여 불활화 시키거나, Fine 등의 방법¹¹⁾에 의해 조제된 100mM MgEGTA stock solution을 가해서 100mM MgEGTA 농도로 만들어서 작

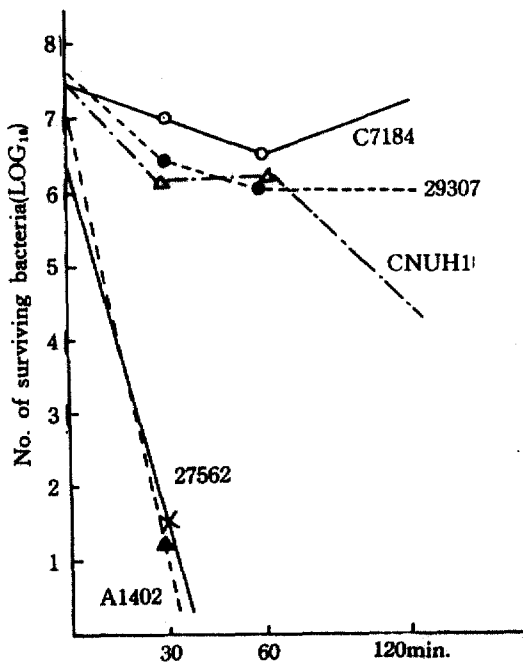


Fig. 1. Bactericidal activity of 75% normal human serum on 5 strains of *Vibrio vulnificus* (CDC C7184, ATCC 29307, clinical isolate CNUH1, ATCC 27562 and CDC A1402).

은 플라스틱시험관(12×75mm: Costar, Cambridge M. A. U.S.A.)에 0.75cc씩 분주한 후 인산완충식염수 (phosphate buffered saline: PBS)로 적당농도로 희석한 균액 0.25cc를 가하여 각각 0분, 30분, 60분, 120분에 생존균수를 검사했다. 생존균수검사는 pour plate법으로 실시했으며 plating media로는 2.5% 식염농도 BHI agar를 사용했다. 정상인과 간경화환자 혈청 사이의 살균활성차이에 대한 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의해서 실시했다.

4. 혈청내 C3, C4치의 측정

정상인들로부터 얻어진 혼합혈청 (pooled serum)과 간경화환자 혈청내의 C3, C4치는 일본 Nissui사의 N-immunoring kit를 이용하여 단원면역확산 (single radial immunodiffusion)법으로 측정했다.

성적

정상인 혈청의 *V. vulnificus*에 대한 살균활성을

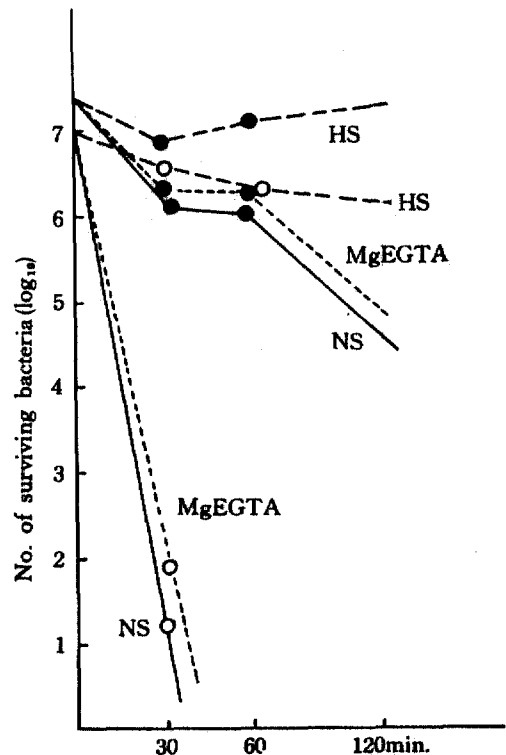


Fig. 2. Bactericidal activity of normal human serum (NS), heated serum (HS) and MgEGTA-treated serum (MgEGTA) on *Vibrio vulnificus* CDC A1402 (□) and clinical isolate CNUH1 (●).

관찰해 본 결과 공시균주에 따라 크게 혈청내성균 및 혈청감수성균으로 나눌 수 있었다(그림 1). 전자에는 CDC C7184, ATCC 29307, 임상분리균주 CNUHI 등의 균주들이 속했으며 그 중에서 CDC

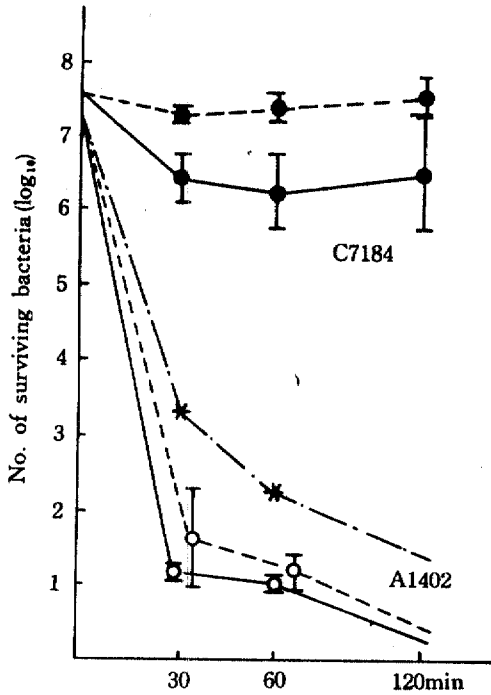


Fig. 3. Bactericidal activity of normal human pooled serum (—) and cirrhotic patients' sera (-----) against *V. vulnificus* C7184 and A1402. Note that one cirrhotic patient's serum (*) showed distinctively poorer bactericidal activity. The patient's serum was not accounted in the calculation of mean bactericidal activity of cirrhotic sera against A1402.

Table 1. Mean bactericidal activities of normal and cirrhotic sera against serum-resistant *Vibrio vulnificus* C7184 and serum-sensitive *Vibrio vulnificus* A1402

Time (min.)	C7184*		A1402*	
	Normal (n=3)	Cirrhotic (n=11)	Normal (n=3)	Cirrhotic (n=10)
0	5.0 × 10 ⁷		2.0 × 10 ⁷	
30	4.1 (3.8)	28.8† (1.5)	2.0 (1.0)	7.4‡ (7.6)
60	3.4 (5.7)	35.4† (2.5)	0.3 (0.6)	1.4‡ (1.8)
120	5.1 (8.6)	52.6† (3.0)	0	0

Unit: CFU/ml, *: × 10⁶ except at 0 min, **: × 10¹ except at 0 min, (): standard deviation, †: p < 0.05, ‡: p > 0.10.

C7184균주가 제일 내성이 강했고 후자에는 CDC A1402, ATCC 27562 등이 속했는데 두 균주 사이에는 큰 차이를 관찰할 수 없었다.

이상에서 관찰된 혈청의 살균작용이 56°C 30분간 불활화시킨 혈청에서는 거의 없어지는 것으로 보아 주로 혈청보체계가 살균작용에 관여하리라 추정할 수 있었다(그림 2). 혈청보체계 중 classic과 alternate pathway중 어느 것의 작용이 더 큰지 알아보기 위해 classic pathway의 활성화에 절대적으로 필요한 calcium을 선택적으로 제거(chelate)시키는 MgEGTA^{11,12}를 처리한 혈청과 처리하지 않은 혈청의 살균활성을 비교관찰한 바 큰 차이가 없어 alternate pathway가 주로 관여하리라 사료되었다(그림 2).

정상인 혈청 살균활성 검사에서 혈청내성을 나타낸 CDC C7184균주와 혈청감수성을 나타낸 CDC A1402균주를 공시하여 간경화환자와 정상인 사이에 혈청살균활성에 의의있는 차이가 있는지를 보았더니 간경화환자의 혈청살균활성의 평균이 정상인 혼합혈청(pooled serum)보다 비교적 낮다는 사실을 알 수 있었다(그림 3, 표1). 특히 혈청내성 균주인 CDC C7184균주에서 혈청감수성 CDC A1402균주에서 보다 그 차이가 약간 더 두드러졌으며, 혈청내성 CDC C7184균주에서 간경화환자 혈청의 살균활성 평균과 정상인 혼합혈청의 그것과의 차이는 Student's t-test로 검정해 본 결과통계적으로 의의가 있었다(P < 0.05). 혈청감수성 CDC A1402균주에 있어서 다른 10명의 간경화환자 혈청 보다 두드러지게 살균활성이 낮은 혈청이 있었는데 이는 극한값으로 간주해서 살균활성의 평균계산에서는 생략했지만 참고적으로 정상 및 간경화환자 혈청의

Table 2. Serum C₃ and C₄ concentrations of cirrhotic patients

Name	C ₃	C ₄
CSJ (F)	80	20
LHW (M)	85	52
KHH (M)	25	13
KKT (M)	100	65
KJK (M)	65	28
YKS (F)	80	22
PWR (F)	60	35
PKS (F)	45	22
KYM (M)	60	20
KYY (M)	65	26
RSK (M)	NT	NT
Normal range	80~170	15~45
Control (pooled serum)	88	38

NT: not tested, F: female, M: male.

살균활성 평균치와 비교해 보았다(그림 3). 이는 정상인 혼합혈청의 살균활성 평균과는 각 시간별로 약 2log10 정도, 다른 간경화환자의 그것과는 약 1.5log10 정도의 차이를 나타냈다.

혈청내 C₃ 및 C₄ 농도(표2)와 혈청의 살균활성 간에는 특별한 상관관계는 없는 것으로 보였다. C₃, C₄ 혈청농도가 정상보다 훨씬 낮았던 환자(KHH)에서도 혈청살균활성은 다른 환자와 큰 차이가 없었다. 혈청내 C₃ 농도는 검사된 10명 중 6명에서 정상범위보다 낮았으나 C₄ 농도는 단지 한 명에서 정상범위보다 낮았는데 이는 범 및 윤의 보고¹⁾와 비슷했다. 그러나 이 C₃ 및 C₄의 혈청농도가 낮았던 환자와 그렇지 않은 환자들 사이에 *V. vulnificus*에 대한 살균활성에 별다른 차이가 없어서 특별한 의미를 발견할 수 없었다.

고 찰

*V. vulnificus*는 원발성 패혈증과 창상감염의 두가지 형태로 사람에게서 병을 일으키는데 후자의 경우 별다른 기저질환이 없는 정상인에서도 발병하지만 전자의 경우에는 거의 전부에서 간 및 담도계 질환을 가지고 있거나 습관성 파음 등으로 간기능이 저하되어 있는 환자들에서 발병하고 급속하게 진행하여 50~80%에서 사망을 초래한다^{1,2)}. *V. vulnificus*는 일단 감수성이 있는 환자에서 구강을 통해 소장 에 도달하면 장관벽을 뚫고 직접 혈류로 들어가 증

식하며 전형적인 패혈증을 일으킨다^{13,14)}.

*V. vulnificus*의 병인론에 관한 가설들과 이들 뒷바침하기 위한 실험결과들이 몇몇 학자들에 의해 발표되었다. Wright 등¹⁵⁾은 CCl₄에 의한 간세포가 파괴된 마우스에서 혈청내 철의 농도가 증가하며 *V. vulnificus*의 LD50가 상당히 감소했다고 보고했으며, Simpson 및 Oliver¹⁶⁾는 *V. vulnificus*가 siderophore를 생산하여 그 자신이 철을 획득할 수 있다고 보고했고, Helms 등¹⁷⁾은 hemoglobin, methemoglobin, hematin 등과 *V. vulnificus*를 같이 마우스에 주사하면 균에 의한 치명률이 훨씬 증가한다고 보고했다. 이상은 간이 나쁜 환자에서 혈중 철농도가 증가하며 이때에 *V. vulnificus*가 혈중에 들어가면 증식이 왕성해져서 쉽게 패혈증에 빠지고 상당수에서 사망을 초래하리라는 가설을 뒷받침한다.

그러나 Kreger 및 Lockwood¹⁸⁾는 *V. vulnificus*의 배양액으로부터 항원성을 가진 이열성의 독소를 분리 정제하여 분리된 독소가 포유동물의 적혈구를 파괴하고 세포독성이 있으며 피부의 혈관투과성을 증가시키며 마우스에 치명적이라는 사실을 밝혀냈고 그 사실들이 *V. vulnificus* 감염시 나타나는 임상 증상들과 부합되고 독성이 강한 균주에서 독소의 생산이 더 많았다는 점에서 독소가 *V. vulnificus* 감염증의 원인으로서 중요하다고 강조했다. 또한 이는 간이 인체에서 제독기관으로 중요하게 작용한다는 점에서 간이 나쁜 환자에서 *V. vulnificus* 패혈증이 잘 생기는 이유를 짐작할 수 있게 했으나 Wright 등¹⁵⁾은 *in vivo* 실험에서 생물학적, 면역학적 효과를 나타낼 만큼의 독소를 발견할 수 없었다고 보고하여 현재 이 주장은 논란의 대상이 되고 있다.

Carruthers와 Kabat¹⁹⁾는 *V. vulnificus*가 *V. parahaemolyticus*보다 혈청의 살균작용에 영향을 덜 받는다고 했으며 Tamplin 등²⁰⁾은 *V. vulnificus*가 다른 *Vibrio* 속들 보다 혈청보체계를 활성화시키는 정도가 낮다고 보고하여 *V. vulnificus*가 다른 *Vibrio*들과는 달리 패혈증을 잘 일으킬 수 있으리라 주장했다.

본 실험에서는 정상인 혈청에 대한 감수성 정도에 따라 공시균주들을 크게 두군으로 나눌 수 있었는데 원래 사람혈액에서 분리된 CDC C7184, ATCC 29307, CNUH1 등은 혈청내성이었으며 사람의 연조직에서 분리된 CDC A1402와 자연환경에서 분리된 ATCC 27562는 혈청감수성으로 나타났다. 이는 Carruthers 및 Kabat의 결과¹⁹⁾와 대체적으로 일치했으며 혈액에서 분리된 균주들이 그의 인체의 다른 부위에서 분리된 균주들과 비교해 혈청의 살균작용에 대체적으로 내성을 나타낸다는 Roantree

및 Rantz¹¹⁾ Schoolnik¹²⁾ 등의 주장과도 부합했다. 또한 56°C에서 30분 동안 혈청보체제를 불활화시킨 혈청에서는 살균작용을 거의 볼 수 없었던 점으로 미루어 *V. vulnificus*에 대한 혈청살균효과는 혈청보체제가 중요한 작용을 할 것이며 MgEGTA로 classic pathway를 차단시킨 후에도 혈청의 살균효과가 별로 감소하지 않았던 점으로 보아 혈청보체 중에서도 alternate pathway가 주로 관여하리라 생각되었다.

간경화환자들은 일반적으로 건강한 정상인들에 비해 그람음성 세균들에 의한 복막염, 균혈증 및 기타 세균감염증에 감수성이 높으며¹³⁻¹⁶⁾, 이는 *V. vulnificus* 패혈증에도 해당된다. 간경화환자들이 세균감염증에 감수성이 높은 이유로는 DeMeo 및 Anderson¹³⁾, Maderazo 등¹⁴⁾, Campbell 등¹⁵⁾, Yousif-Kadaru 등¹⁶⁾은 간경화환자 혈청에서 호중구의 주화성(chemotaxis)이 감소해 있음을 보고했고, Wyke 등¹⁷⁾은 간경화환자 혈청의 opsonization이 감소해 있음을 보고했으며, Fierer 및 Finley¹⁸⁾는 간경화환자의 혈청의 대장균에 대한 살균활성이 감소되어 있음을 보고했다. 본 실험에서도 Fierer 및 Finley¹⁸⁾의 결과와 비슷하게 간경화환자 혈청에서 *V. vulnificus*에 대한 살균활성이 감소되는 경향을 보였으며 특히 혈청내성 균주에 있어서 그 감소경향이 통계적으로 유의있게 나타났다. 이는 사람의 혈액으로부터 분리되는 균주들이 주로 혈청내성을 나타낸다는 사실과 결부시켜 생각해 볼 때 매우 흥미있는 사실로서 혈류로 혈청내성 *V. vulnificus*가 들어 갔을 때 간경화환자는 이를 빠른 시간내에 효과적으로 처리해 내지 못하기 때문에 정상인에서 보다 간경화환자에서 패혈증이 잘 발생하리라 짐작할 수 있었다.

그러나 이러한 살균활성의 차이가 비록 통계적으로 유의있는 것이기는 하지만 정상인에서는 패혈증이 거의 발생하지 않는다는 점을 감안하면 예상되는 정도에는 미치지 못한 감을 지을 수 없다. 따라서 혈청의 살균작용 외에도 정상인 및 간경화환자의 *V. vulnificus*에 대한 주화성, 탐식작용 및 탐색세포 안에서의 살균작용에 대해서도 앞으로 더욱 추구해 봐야 병인론이 밝혀지리라 생각된다. 또한 혈청살균작용에 중요한 역할을 하는 혈청보체의 농도와 혈청살균작용 사이에 큰 상관관계가 없었던 점으로 미루어 보아 간경화 환자의 혈청내의 보체 이외의 다른 물질이 혈청살균작용을 저해할 수도 있으며 이러한 물질을 구명하려는 노력 또한 앞으로의 중요과제라 사료된다.

결 론

정상인과 간경화환자 혈청의 *V. vulnificus*에 대한 살균효과를 조사해 본 결과는 다음과 같았다. 혈청의 *V. vulnificus*에 대한 살균효과는 주로 혈청보체에 의한 것으로 생각되었으며, 주로 alternate pathway가 관여하리라 추정되었다. 공시균 중 *V. vulnificus* CDC A1402 및 ATCC 27562는 혈청감수성, CDC C7184, 임상분리균주 CNUH1 및 ATCC 29307은 혈청내성을 나타냈다. 혈청감수성 CDC A1402 및 혈청내성 CDC C7184균주에 대한 정상인 및 간경화환자의 혈청살균활성을 비교해 본 결과, 간경화환자 혈청에서 더 낮은 살균활성을 보이는 경향을 관찰할 수 있었으며 특히 혈청내성 CDC C7184균주에서 통계적으로 유의있는 활성감소를 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 김영표, 전인기, 이재준: *Vibrio vulnificus* 감염증 임상적 및 역학적 관찰. 대한의학협회지. 28: 773-780, 1985.
- 2) 범희승, 윤종만: B형 간염포식자양성 급만성 간질환에서 혈청 IgG, IgM, IgA 및 C₃, C₄의 변화. 대한내과학회잡지, 29: 1-7, 1985.
- 3) Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG and Heublein PC: Disease caused by a marine *Vibrio*. *N. Engl. J. Med.* 300:1-6, 1979.
- 4) Carruthers MM and Kabat WJ: *Vibrio vulnificus* (lactose-positive *Vibrio*) and *Vibrio parahaemolyticus* differ in their susceptibilities to human serum. *Infect. Immun.* 32:964-966, 1981.
- 5) Tamplin ML, Specter S, Rodrick GE and Friedman H: Differential complement activation and susceptibility to human serum bactericidal action by *Vibrio* species. *Infect. Immun.* 42:1187-1190, 1983.
- 6) Wright AC, Simpson LM and Oliver JD: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* 34:503-507, 1981.
- 7) Simpson LM and Oliver JD: Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 41:644-649, 1983.
- 8) Helms SD, Oliver JD and Travis JC: Role of heme compounds and haptoglobin in *Vibrio vulnificus* pathogenicity. *Infect. Immun.* 45:345-349, 1984.
- 9) Kreger A and Lockwood D: Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 33:583-590, 1981.
- 10) Oliver JD and Colwell RR: Extractable lipids of

- gram-negative marine bacteria: phospholipid composition. *J. Bacteriol.* **114**:897-908, 1973.
- 11) Fine DP, Marney Jr SR, Colley DG, Sergeant JS and DesPrez RM: C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J. Immunol.* **109**:807-809, 1972.
 - 12) DesPrez RM, Bryan CS, Hawiger J and Colley DG: Function of the classical and alternate pathways of human complement in serum treated with ethylene glycol tetraacetic acid and MgC12-ethylene glycol tetraacetic acid. *Infect. Immun.* **11**:1235-1243, 1975.
 - 13) Oliver JD: The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. *Mar. Tech. Soc. J.* **15**:45-52, 1981.
 - 14) Poole MD and Oliver JD: Experimental pathogenicity and mortality in ligated ileal loop studies of newly reported halophilic lactose-positive *Vibrio* sp. *Infect. Immun.* **20**:126-129, 1978.
 - 15) Roantree RJ and Rantz LA: A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. *J. Clin. Invest.* **39**:72-81, 1960.
 - 16) Schoolnik GK, Buchanan TA and Holms KK: *Gonococci* causing disseminated gonococcal infection are resistant to the bactericidal action of normal human sera. *J. Clin. Invest.* **58**:1163-1173, 1976.
 - 17) Conn HO and Fessel JM: Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variation of theme. *Medicine (Baltimore)* **50**:161-197, 1971.
 - 18) Tisdale WA: Spontaneous colon bacillus bacteremia in Laennec's cirrhosis. *Gastroenterology.* **40**:141-148, 1961.
 - 19) Gerdig DN, Khan MY, Ewing JW and Hall WH: *Pasteurella multocida* peritonitis in hepatic cirrhosis with ascites. *Gastroenterology.* **70**:413-415, 1976.
 - 20) Targan, SR, Chow AW and Guze LB: Spontaneous peritonitis of cirrhosis due to *Campylobacter fetus*. *Gastroenterology.* **71**:311-313, 1976.
 - 21) DeMeo AN and Anderson BR: Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N. Engl. J. Med.* **286**:735-740, 1972.
 - 22) Maderazo EG, Ward PA and Quintiliani R: Defective regulation of chemotaxis in cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.* **85**:621-630, 1975.
 - 23) Campbell AC, Dronfield MW, Toghil PJ and Reeves WG: Neutrophil function in chronic liver disease. *Clin. Exp. Med.* **45**:81-89, 1981.
 - 24) Yousif-Kadaru AGM, Rajkovic IA, Wyke RJ and Williams R: Defects in serum attractant activity in different types of chronic liver disease. *Gut.* **25**:79-84, 1984.
 - 25) Wyke RJ, Rajkovic IA and Williams R: Impaired opsonization by serum from patients with chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* **51**:91-98, 1983.
 - 26) Fierer J. and Finley F: Deficient serum bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. *J. Clin. Invest.* **63**:912-921, 1979.