

해양 *V. vulnificus*의 내독소가 rat의 혈액 성분에 미치는 독성 효과

이 봉 헌
부산대학교 화학과
(1996년 9월 17일 접수)

The Toxic Effect of Marine *V. vulnificus* Endotoxin on the Blood Component in Rat

Bong-Hun Lee
Dept. of Chemistry, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Manuscript 17 September 1996)

Endotoxin from the cell wall of marine *V. vulnificus* was extracted using the hot phenol-water method, injected endotoxin into rat, and tested the toxic effect of endotoxin on the blood component in rat blood. The results showed that blood glucose, blood urea nitrogen, white blood cell, and reticulocyte were increased and red blood cell was the same as the number of control group(normal blood), but platelet was decreased. Above results suggested that endotoxin induced a malfunction of liver and that the increase of white blood cell was for the removal of foreign toxic substance.

Key words : endotoxin, toxic effect, blood component

1. 서 론

해양에서 사는 미생물들은 연안 환경의 오염 뿐만 아니라 미생물 오염도 유발하는데 이러한 미생물중 *Vibrio vulnificus*는 온화한 기후의 연안 해수에서 흔히 발견되는 미생물로, 특히 해수 온도가 상승할 때 해수 중이나 여러 가지 해양 생물체에서 발견된다. 이 미생물에 의한 감염은 해수에의 접촉이나 해산물 섭취로부터 기인된다.

이러한 해양 *V. vulnificus*는 숙주로의 침투성이 매우 강하여 피부 괴사를 일으키며 면역기능이 저하된 숙주를 치사시키는 등 독성이 매우 강한 특성을 소유하고 있다(Bowdre, 1981 ; Kreger, 1981). 이러한 특성이 자연적으로 얻어진 그람 음성 균의 병원성과 관련이 있는지, 없는지 간에 내독소의 역할이 상당한 관심사가 되어 왔다. 그러나 감염에 있어 내독

소가 어떤 역할을 하는 가는 실험적으로 접근하기가 어렵다. 일반적으로 그람 음성 균의 세포벽은 주로 내독소, 세포벽 단백질 및 지질 등으로 구성되어 있는데(Nikaido와 Nakae, 1979), 이중 대개의 경우 가장 큰 조성비를 가지는 내독소는 숙주에게 발열, shock 및 치사 작용과 같은 다양한 생리 활성을 유발시키는 물질로 알려져 있다(Koga, 1985 ; Behling, 1980). 내독소가 숙주 체내에서 일으킬 수 있는 다양한 생리 활성 중에 숙주의 장해 반응과 방어 반응을 동시에 만족시킬 수 있는 양면성을 가지고 있다는 것은 다른 물질들에 대한 생리 활성에 비하여 특이한 점이다. 동물의 종에 따라 투여 량에 차이는 있지만 대상 실험 동물을 자극시킬 수 있을 만한 정도의 내독소를 동물 체내에 투여하게 되면 초기에는 장해 반응이 진행되다가 회복 단계에서는 정상 상태 이

상으로 방어 기능이 항진된다.

한편 해양 *V. vulnificus*의 독성에 대한 연구는 주로 숙주의 면역계 관계 인자(Blake 등, 1979), 이 미생물의 대사적 특성(Mertens 등, 1979) 및 외독소(Kreger와 Luckwood, 1981) 등에 대한 것들이었고 내독소에 의한 독성 연구는 저조한 실정이다. 이에 저자는 *V. vulnificus*의 세포벽에서 내독소를 추출하고 이를 rat에 주사하여 rat의 혈액 성분에서 내독소의 독성 효과에 대하여 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2. 1 실험 재료

Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, lysozyme 및 sodium cholate는 Sigma(St. Lewis, Mo. USA) 제품을 사용하였고, acetone, phenol, CHCl_3 및 BuOH 등은 특급 시약을 사용하였다. 혈액 성분 분석에는 Roche(Basle, Switzerland) 및 Coulter(Northwell Drive Luton, Beds., England) 제품을 사용하였다. 실험 동물인 Spragne Dawley rat는 70 - 75일 된 것을 인제대학 의과대학에서 분양 받아서 사육시켰다.

2. 2 실험 방법

2. 2. 1 내독소의 추출

해양 *V. vulnificus*의 세포벽에서 내독소를 추출하기 위하여 아래 과정과 같이 Westphal 방법(hot phenol-water method, Westphal 등, 1958)을 사용하였다.

*V. vulnificus*를 37 °C에서 24 시간 동안 tryptic soy broth 배지를 이용하여 배양시킨 후 원심 분리하여 cell pellet을 얻었다. Acetone으로 건조시킨 균체를 증류수로 3회 세척한 다음 100 mL 증류수에 부유시켜 3분 동안 sonication시키고 4,000 x g에서 60 분간 원심 침전시켜 침전을 구하였다. 여기에 동량의 90% aqueous phenol (v/v)을 가하고 65 - 68 °C에서 20 분간 homogenize 시킨 후 10°C로 냉각시켜 4,000 x g에서 60 분 동안 원심 침전시켜 상층을 취하고 침전에 대하여 동일 조작을 3회 추가하여 재 추출하였다. 추출액을 증류수에서 3일간 투석시킨 후 5,000 x g에서 60분 동안 원심 침전시키고 상층액에 CHCl_3 -BuOH (5:1, v/v)를 가하고 다시 3,

000 x g에서 10 분 동안 원심 침전하였다. 상층액에 hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 가하여 원심 침전한 후 상층액을 3일간 증류수에 투석시킨 다음 농축하여 동결 건조시켜 사용하였다.

2. 2. 2 내독소가 rat의 혈액 성분에서 미치는 독성 측정

내독소에 의한 독성 효과를 알아보기 위하여 내독소 0.1 mg을 pyrogen-free phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 0.1 mL에 용해시켜 각 군 5 마리씩의 Spragne dawley rat에 정맥 주사한 후 0, 6, 12 및 18 시간의 rat 혈액을 15 gauge needle로 뽑아 rat 혈액 내의 혈당(blood glucose), 혈중 요소 질소(blood urea nitrogen, BUN) 농도, 백혈구(white blood cell, WBC) 수, 적혈구(red blood cell, RBC) 수, 혈소판(platelet, PLT) 수 및 망상 적혈구(reticulocyte, PLT) 수를 측정하였다.

Blood glucose 및 BUN은 Gilford IMPAC 400E 및 COBAS MIRA를 이용하여 측정하였다. WBC, RBC 및 PLT는 Coulter STIV로 분석하였는데 이때 기계의 대조는 4C plus를 기계 관리용 Q.C.로 사용하였다. RETI는 1% brilliant cresyl blue를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

내독소를 pyrogen-free PBS에 용해시켜 주사하였고 실험 동물간의 변화를 최소로 줄이기 위하여 연령, 성별 및 기타 인자의 변화를 적게 하여 동일 실험 군을 5마리씩 동일한 사육 상자에서 실험전 일주일 동안 건강 상태를 확인한 후 독성을 측정하였으며, 실험중 죽은 동물은 실험 군에서 제외시켜 실제 실험 동물 수로 하였다.

3. 1 Blood glucose 및 blood urea nitrogen 농도 측정 결과

내독소에 의하여 간과 심장에서 blood glucose 농도가 감소하고 간에서 pyruvate kinase의 활성이 변하며 sugar catabolism에서 glucokinase와 phosphofructo kinase의 활성이 감소된다는 연구 보고가 있다. 본 연구에서 정상 대조군(정상 혈액)의 평균 blood glucose 값은 $98 \pm 6.2 \text{ mg/dl}$ 이었고 내독소 투여 군

해양 *V. vulnificus*의 내독소가 rat의 혈액 성분에 미치는 독성 효과

Table 1. Change of blood glucose and blood urea nitrogen by *V. vulnificus* endotoxin

blood collection	blood glucose (mg/dl)	blood urea nitrogen (mg/dl)
control group	98 ± 6.2	21 ± 2.0
6 h	88 ± 8.0	26 ± 4.3
12 h	112 ± 4.0	23 ± 2.0
18 h after challenge	128 ± 6.0	24 ± 3.0

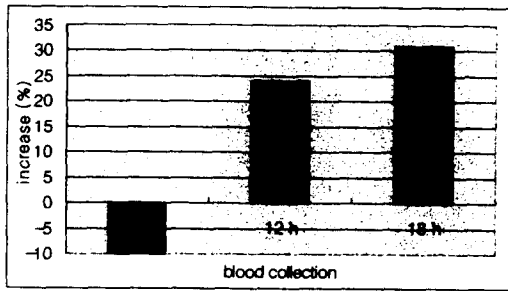


Fig. 1. Change of blood glucose by *V. vulnificus* endotoxin.

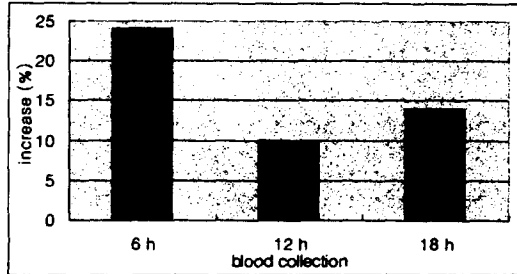


Fig. 2. Change of blood urea nitrogen by *V. vulnificus* endotoxin.

에서는 6 시간 실험 군에서 일시적으로 낮은 값을 나타내었는데(Table 1, Fig. 1), 이는 내독소가 insulin과 같은 작용을 하여 일시적으로 저혈당 상태를 야기시킨다는 Wood 등(1966)이나 Raymond 등(1981)의 결과와 잘 일치하고 있다. 그 이후 시간에서 blood glu-

cose 농도는 증가하였다(12 및 18 시간에서 대조 군에 비하여 24 및 31% 증가).

Blood urea nitrogen 변화는 신장의 기능 이상 유무를 알아볼 수 있는 지표로서(Fischbach, 1984), Hinshaw 등(1968)에 의하면 동물에 내독소를 투여하였을 때 동물의 종류에 따라 다소 다르지만 신장 혈관 수축, 대동맥압의 저하에 따른 신혈류량의 감소나 요세관 기능이 파괴된다고 하였다. 본 실험 결과 6 시간의 내독소 주사 군이 24%, 12 시간이 10%, 18 시간이 14% 상승된 값을 나타내었다(Table 2, Fig. 2). 따라서 본 실험 결과 내독소에 의한 BUN 상승은 신장 기능 이상이 다소 동반된 것으로 생각되었다.

3. 2 혈액 성분의 변화 측정 결과

내독소에 대한 반응은 혈구 종류에 따라 차이가 있지만 일반적으로 Nagayama(1971) 등에 따르면 PLT 계통이 가장 예민하게 반응한다고 하였다. 혈액 성분의 변화 측정은 내독소를 투여한 다음 각 시간에 따라 채취한 혈액을 EDTA-2K'에 잘 혼합하여 응혈을 방지한 채로 실온에서 방치시키면서 2 시간 이내에 Coulter STIV에서 4C plus를 정도 관리 검체로하여 각 검체의 혈구 수를 측정하였다.

그 결과 정상 대조 군의 WBC 수는 $85 \pm 2.63 \times 10^2/\text{mm}^3$ 이었으며, 내독소 투여 각 군과 6, 12 및 18 시간 실험 군 모두 정상 대조

Table 2. Change of blood cell by *V. vulnificus* endotoxin

blood collection	white blood cell ($10^2/\text{mm}^3$)	red blood cell ($10^6/\text{mm}^3$)	reticulocyte (%)	platelet ($10^4/\text{mm}^3$)
control group	85 ± 2.63	7.65 ± 0.25	1.2 ± 0.4	8.61 ± 0.56
6 h	105 ± 2.43	7.58 ± 0.62	1.5 ± 0.5	5.47 ± 0.23
12 h	92 ± 1.83	7.55 ± 0.54	2.4 ± 0.5	6.75 ± 0.62
18 h after challenge	98 ± 2.17	7.63 ± 0.21	1.6 ± 0.5	6.42 ± 0.65

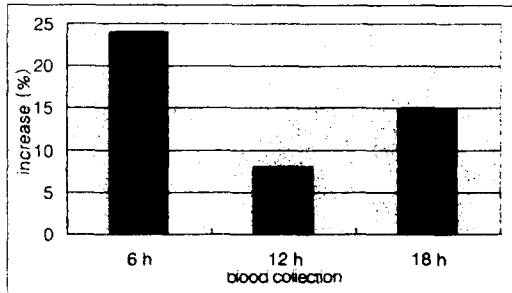


Fig.3. Change of white blood cell by *V. vulnificus* endotoxin.

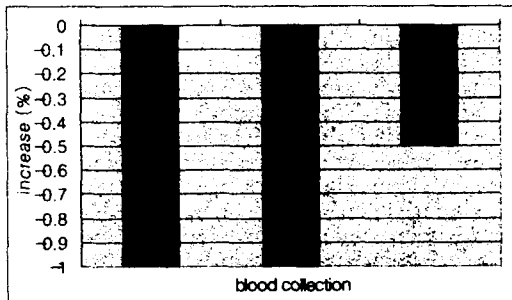


Fig.4. Change of red blood cell by *V. vulnificus* endotoxin.

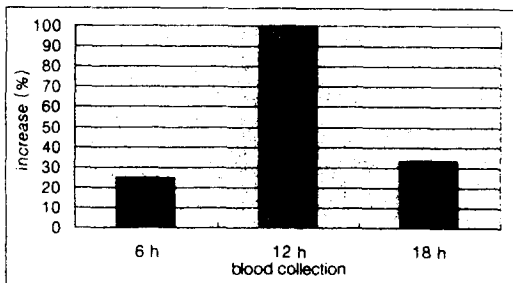


Fig.5. Change of reticulocyte by *V. vulnificus* endotoxin.

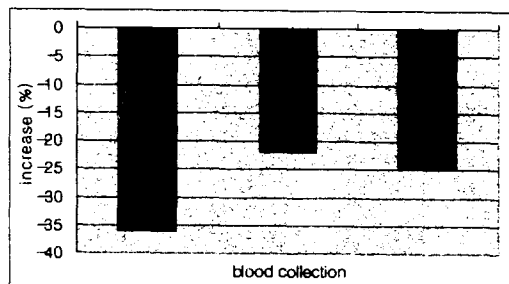


Fig.6. Change of platelet by *V. vulnificus* endotoxin.

군에 비하여 WBC 수가 증가되었다(Table 2, Fig. 3).

RBC 수는 정상 대조 군이 $7.65 \pm 0.25 \times 10^6/\text{mm}^3$ 이었는데 내독소 투여에 의하여 변화가 거의 없었다(Table 2, Fig. 4).

RETI는 골수에서 생성되며 RBC가 완전히 성숙되기 4일 전에 유출되는데 정상 동물 혈액 중에 보통 0.5 - 1.5% 정도 존재한다. 본 실험 결과, RETI는 대조 군의 $1.2 \pm 0.4\%$ 에 비하여 내독소 투여 12 시간에 거의 100% 정도 증가된 측정값을 나타내었다(Table 2, Fig. 5).

PLT는 내독소에 아주 예민하여 내독소에 의해 쉽게 파괴되는데 본 실험에서 PLT는 다른 혈구 세포가 증가한 것과는 달리 심한 감소를 보였는데(Table 2, Fig. 6) 특히 내독소 투여 후 6 시간 실험 군이 그러하였다.

따라서 내독소 투여에 의하여 영향을 많이 받는 세포는 PLT, WBC와 같은 중배엽 세포라고 한 Masao(1974)의 보고와 일치하였다. 또한 RETI의 증가는 성숙 RBC 수의 변화와는 관련 없이 이루어지는 것으로 보아 내독소에 의해 가해지는 자극에 대한 방어 반응에 의한 결과라고 생각되었다. RETI의 증가를 제외하고는 PLT나 WBC 세포들이 주로 동물체 내의 이물질 제거에 관련된 세포들임에 비추어 볼 때, 이들의 감소와 증가는 숙주의 감염 반응에 기인한 것이 아니라 내독소와 같은 이물질을 동물 체내에 주입하게 됨에 따라 이러한 물질을 제거하기 위하여 동원되어진 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Bowdre, J.H., Polle, M.D., and J.D. Oliver, *Infect. Immun.*, 32, 1193, 1982.
- Behling, U.H. and A. Nowothy, 1980, In *bacterial endotoxins and host response*(M.K. Agarwal, ed.) pp. 11-26, Elsevier, North-Holland
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., and P.C.Heublein, N. *Engl. J. Med.*, 300, 1, 1979.
- Fisbach, F.T., 1984, *Man. Lab. Diag.*
- Hinshaw, L.B., Solomon, L.A., Holmes, D. D., and L.J. Greenfield, S. G. O., 127, 981, 1968.

해양 *V. vulnificus*의 내독소가 rat의 혈액 성분에 미치는 독성 효과

- Kreger, A., De Chatelet, L., and P. Shirley, J. Infect. Dis., 144, 244, 1981.
- Koga, T., Nishihara, T., Fujiwara, T., Nishizawa, T., Okahashi, N., Noguchi, T., and S. Hamada, Infect. Immun., 47, 638, 1985.
- Kreger, A. and D. Luckwood, Infect. Immun., 33, 583, 1981.
- Masao, Y., J. M. A., 73, 1156, 1974.
- Mertens, A., Negler, J., Hansen, W., and E. Gepts-Friedenreich, J. Clin. Microbiol., 9, 233, 1979.
- Nikaido, H. and T. Nakae, Adv. Microbiol. Physiol. (A.H. Rose and J.G. Morris, ed.) p. 1681-1881, Academic Press, London.
- Nagayama, M., Zucker, M.B., and F.K. Beller, Thromb. Diath. Haemorrh., 26, 467, 1971.
- Raymond, R.M., Harkema, J.M., and T.S. Emersony, Am. J. Physiol., 240, H342, 1981.
- Woods, M.W., Landy, M., Whitby, J.L., and D. Burk, Bacteriol. Rev., 25, 447, 1961.
- Westphal, O., Luderitz, O., Eichenbengev, E., and E. Neter, 1958, Chem. and Biol. of Much. Sacch.