

마우스 복강내 대식세포에 대한 *Vibrio vulnificus* Hemolysin의 세포독성

전남대학교 의과대학 미생물학교실, 전남대학교 의과학연구소

임인수 · 이시은 · 김 설 · 배미옥 · 이준행 · 신부안 · 정선식 · 류필열

=Abstract=

The Cytotoxic Effect of *Vibrio vulnificus* Hemolysin on the Mouse Peritoneal Macrophages

Ihn Soo Im, Shee Eun Lee, Seol Kim, Mi Ok Bae, Joon Haeng Rhee,
Boo Ahn Shin, Sun Sik Cung and Phil Youl Ryu

Department of Microbiology, Research Institute of Medical Sciences,
Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea

V. vulnificus is an estuarine bacterium which causes septicemia and shock in susceptible patients. The organism produces a hemolytic cytotoxin (VvH), which has a membrane damaging effect on erythrocytes. To clarify the mechanisms by which VvH might contribute to virulence, we examined its effect on macrophages.

When mouse peritoneal macrophages were harvested and co-cultured with hemolysin-positive *V. vulnificus* strains (100 bacteria/ cell), about 60% of the macrophages were killed; macrophages were not killed when co-cultured *V. vulnificus* strain CVD 707, a VvH-negative deletion mutant. Exposure of macrophages to filtered culture supernatants (2.5 HU/ml) and purified VvH (3 HU/ml) resulted in an increase in dead cells (80 and 90%, respectively), as determined by the trypan blue dye exclusion method and LDH release from macrophages was also increased (70 and 65.5%, respectively). The cytotoxic effect of VvH on macrophages was both the dose- and time-dependent. The VvH caused damage to the macrophage membrane and was blocked significantly by preincubation with cholesterol ($p < 0.01$). Fetal bovine serum showed remarkable inhibition of VvH synthesis by *V. vulnificus* and inhibited VvH activity in culture supernatant. Cell viability was increased by 35% ($p < 0.01$) and LDH release decreased by 28% ($p < 0.01$) when macrophages were incubated with *V. vulnificus* (100 bacteria/ cell) in DMEM-10% FBS for 2 hr. Bacterial clearance activity of mice against *V. vulnificus* CVD 707 was decreased by pretreatment with 10 HU of VvH.

This result suggests that the VvH can impair the membrane of macrophages and may play a role in the pathogenesis of *V. vulnificus* septicemia.

Key Words: *Vibrio vulnificus*, Hemolysin, Macrophage

접수 : 2000년 7월 15일, 게재결정 : 2000년 11월 17일

책임저자: 류필열, 광주광역시 동구 학동 5번지 전남대의 미생물학교실 501-190

전화: 062-220-4135, Fax: 062-220-4135, pyryu@chonnam.chonnam.ac.kr

*이 논문은 1997년도 전남대학교 학술연구비의 지원에 의해서 조성되었음.

서 론

*Vibrio vulnificus*는 바다에 서식하는 호염성 세균으로서 패혈증과 창상감염을 일으키는 그람음성 간균이다. 패혈증은 원발성 패혈증과 창상감염 후의 속발성 패혈증으로 분류된다^{6,18,19}. 원발성 패혈증은 주로 만성 간질환을 가지고 있거나 습관성 과음 등으로 간기능이 저하되어 있는 환자들이나, 당뇨병 등으로 면역기능이 저하되어 있는 환자들이 *V. vulnificus*로 오염된 해산물을 생식한 경우에 발생한다. *V. vulnificus*는 감수성이 있는 사람에서 구강을 통하여 소장에 도달하면 장관 벽을 뚫고 직접 혈류로 들어가 증식하여 전형적인 패혈증을 일으킨다고 알려져 있다^{22,25}. 반면 창상감염은 외상이 있는 사람이 바닷물이나 갯벌과 접촉하거나 오염된 어패류에 의해 상처를 받은 후에 봉소염과 같은 피부병변형태로 발병하고 일부에서는 더욱 진행하여 속발성으로 패혈증을 일으킨다. 패혈증은 일단 발병하면 급속하게 진행하는데 저혈압 등의 패혈증 속 증상을 나타낸 환자들에 있어서는 집중적인 치료에도 불구하고 2~3일 이내에 50% 이상이 사망하는 것으로 알려져 있다^{1,3,4,6,24,29}.

*V. vulnificus*는 혈청의 살균작용과 탐식세포에 의한 탐식작용과 같은 숙주의 비특이적 방어기전으로부터 보호되고 증식하여 급속하게 패혈증을 유발한다. *V. vulnificus*의 독성인자 (virulence factor)로는 용혈소 (hemolysin 혹은 cytolysin)^{2,7,12}, 단백질분해효소^{15,16}, collagenase²⁸, siderophore^{5,27}, 핵막다당체^{33,34,41} 등이 알려져 있다. Kreger와 Lockwood¹²는 *V. vulnificus*의 배양 상청액에 환원성을 가진 세포독소와 단백질분해효소가 존재함을 증명하고 세포독소를 부분 정제하여 분리된 독소가 포유동물의 적혈구를 용해시킬 뿐만 아니라 세포독성이 있으며 피부의 혈관투과성을 증가시키고 마우스에 치명적이라는 사실을 밝혀내었으며, Shinoda 등²⁶은 이 용혈소의 작용기전을 밝혀낸 바 있다. 그러나 Morris 등²⁰은 *V. vulnificus*의 병원성은 *V. vulnificus*가 생성하는 세포독소나 단백질분해효소의 양과 관련이 있는 것이 아니라 transferrin-bound 철을 획득할 수 있는 능력 및 철 제한 배지에서 증식할 수 있는 능력에 영향을 받는다고 보고하여 현재 독소관련 병인론은 여전히 논란이 되고 있다. 특히 최근 Wright와 Morris³⁵는 패혈증 환자로부터 분리된 세포독소를 생성하는 병원성 *V. vulnificus*를

transposon mutagenesis와 marker exchange technique에 의하여 cytolysin 유전자를 불활성화시킨 용혈소 음성 변이주와 용혈소 양성 야생주를 마우스에 주사하였을 경우 LD₅₀에 변화가 없었다고 보고 하면서 *V. vulnificus* 패혈증에 있어 cytolysin은 주요한 병원성 인자가 되지 못할 것이라 주장한 바 있다.

*V. vulnificus*는 다른 *Vibrio*속들과는 달리 특징적으로 패혈증을 잘 일으키는데, 이는 다른 *Vibrio*속들에 비해 혈청의 살균작용에 대하여 상대적으로 내성을 나타내고, 혈청보체계를 활성화시키는 정도가 낮으며, 병원성이 높은 균주들은 대식세포 (macrophage)와 같은 탐식세포의 탐식작용에 별로 영향을 받지 않는 등의 특성에 기인하는 것으로 알려져 있다^{9,13,30,32}. 대식세포는 면역반응에 있어서 가장 중심적이고 중요한 역할을 수행한다. 대식세포는 숙주에 침입한 세균 등에 대하여 항원 비특이적으로 탐식, 치사케 하는 기본적인 탐식작용과 개체방어와 염증반응에 연관된 여러 인자를 분비하여 염증반응을 매개한다. 이러한 대식세포의 기능에 이상이 초래되면 세균에 대한 숙주의 방어력에 저하가 초래된다. Yamanaka 등³⁷은 *V. vulnificus*가 분비하는 용혈소가 흰쥐의 복강 mast cell의 세포막에 손상을 초래하여 histamine 등을 유리시킨다고 보고한 바 있어, 이러한 보고는 이것이 다른 그람음성세균에 비해 급격히 진행되는 패혈증의 병인론에 용혈소가 중요한 역할을 할 가능성을 제시하고 있다. 그러나 *V. vulnificus*가 생산하는 용혈소와 대식세포간의 생체내 관계에 대해서 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *V. vulnificus*가 생산하는 용혈소가 패혈증의 발병기전에 있어 중요한 역할을 담당하는 대식세포에 대한 세포독성에 대해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험균주

본 실험에 사용한 균주의 특성은 Table 1과 같다. 이들 균주는 미국 Maryland 주립 의과대학의 Morris 박사로부터 분양 받아 50% glycerol이 함유된 Luria broth (L broth)에 희석하여 -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 앞서 L agar plate에 배양하여 실험균주의 colony 형태를 확인한 후 2.5% NaCl이 함유된 L broth에 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 1. *Vibrio vulnificus* strains used in this study

Strains	Hemolytic activity	Colony morphology	Comments
<i>V. vulnificus</i> MO6-24/O	+	opaque	wild strain isolated from a patient with septicemia
<i>V. vulnificus</i> CVD 752	+	translucent	Tn4 insertion into CPS synthesis gene of MO6-24/O
<i>V. vulnificus</i> CVD 707	-	opaque	marker exchange in hemolysin gene of MO6-24/O

실험동물

실험에 사용한 동물은 6~8주된 CD-1 마우스 암컷을 사용하였다. 이들 마우스는 항온항습장치가 된 무균조건하에서 키우면서 사용하였다.

용혈소의 분리 및 정제

2% NaCl이 함유된 heart infusion broth에서 6~7시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양한다. 배양액을 10,000 x g로 30분간 원침시킨 후 상청액으로부터 Kim 등¹⁰⁾의 방법에 따라 용혈소를 정제하였다.

용혈소의 활성 측정

용혈소를 분리, 정제하는 과정에서 용혈 활성 측정은 사람 적혈구를 용해시키는 정도를 이용한 Okada 등의 방법²¹⁾에 따라 실시하였다. 즉, Alsever 용액에 보관중인 신선한 사람 적혈구를 PBS로 3회 원심 세척한 후 최종적으로 1% (v/v)의 세포 농도가 되도록 1 ml 당 1 mg씩의 bovine serum albumin이 첨가되어 있는 phasphated buffered saline (PBS-BSA)에 부유시킨다. 용혈소는 PBS-BSA로 2배 순차 희석하여 96 well round bottom plate에 각 well당 50 µl 씩 넣고 적혈구 부유액을 50 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 용혈되지 않은 적혈구가 밑바닥에 가라앉도록 4℃에서 10분간 방치한다. 용혈소의 역가는 완전 용혈을 일으킨 용혈소 희석 배수의 역수로 나타내었다.

마우스 복강내 대식세포의 분리

CD1 마우스의 복강내 2 ml의 thioglycolate를 주사하고 3일 후에 10 ml의 혈청이 함유되지 않은 RPMI 1640 배양액으로 복강을 세척하여 복강세포를 채취한다. 복강세포는 혈청이 첨가되지 않은 배양액으로 2회 세척한 후, 세포를 1x10⁶/ml의

농도로 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배양액에 부유시키고, 이를 24 well tissue culture plate 또는 8 chamber slide glass에 넣고 1시간 동안 배양 부착시킨다. 배양 후 비부착 세포를 배양액으로 세척하여 제거한 후 다음 실험에 사용한다.

생균 또는 용혈소의 대식세포에 대한 세포독성 시험

분리된 마우스 대식세포를 DMEM 또는 RPMI-1640 배지에 10⁶ cell/ml의 농도로 희석하고 0.5 ml를 slide glass chamber plate에 배양한 후 6시간 배양한 세균 부유액 또는 용혈소와 30분부터 3시간까지 배양하여 세포 배양액을 버리고 0.004% trypan blue로 염색한다. 현미경상에서 염색된 죽은 세포와 염색되지 않은 살아 있는 세포 수를 측정한다. 마우스 복강내로 생균을 감염시킨 후 복강내의 대식세포의 생존능을 보기 위해서는, 1x10⁸ CFU/ml의 농도로 맞춘 1 ml의 균 희석액을 마우스 복강내로 주입한 2시간 후에 대식세포를 분리하여 trypan blue로 염색하여 살아 있는 세포와 죽어 있는 세포를 계산하였다.

Modified MTT Method

대식세포의 생존능의 검사법의 일종으로 미토콘드리아 효소 활성을 측정하기 위해 Toda의 방법³¹⁾을 변형하여 MTT를 측정하였다. 즉 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Co.)를 PBS에 5 mg/ml의 농도로 희석한 후 0.2 µm의 filter로 여과한 후 4℃에 보관하면서 사용하였다. 대식세포를 96-well plates에 50 µl씩 분주하여 2시간 동안 배양한 후 비부착 세포를 제거한다. 용혈소가 함유된 시료를 50 µl씩 분주하여 1시간 배양한 후, 20 µl의 MTT solution을 첨가하여 4~6시간 배양한다. 세포 배양액을 버린

후 PBS로 세척하고 100 μ l의 10% SDS-0.01 N HCl를 넣고 plate mixer로 가볍게 흔들어 준 후 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 일주야 처치한다. 다음날 50 μ l의 n-propanol를 첨가하여 formazan을 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정한다.

세포독성 측정을 위한 LDH Assay

용혈소 및 세균의 처치에 의한 세포막의 손상에 의한 lactate dehydrogenase (LDH) 유리에 대한

측정은 colorimetric Cytotox 96 kit (Promega Corp., Madison, WI)를 구입하여 사용하였다. 음성 대조군으로는 아무 것도 처치하지 않은 세포 배양액을 사용하였으며, 모든 세포의 원형질막의 손상에 의한 LDH의 유리는 lysis 용액으로 세포를 처리한 시료를 사용하였다. 세포독성비율 (percentage of cytotoxicity)은 (experimental release - spontaneous release)/(total release-spontaneous release) x 100으로 계산하였다.

Table 2. Cytotoxic effects of *V. vulnificus* on murine peritoneal macrophage in vitro

<i>V. vulnificus</i> strains	% Viable cells after incubation for 1 hour (average \pm SD)
MO6-24/O	48.4 \pm 10.79*
CVD 752	46.6 \pm 11.24*
CVD 707	94.3 \pm 4.03
Control	96.5 \pm 3.44

Each value was determined after incubation and is the average of three individual experiments; 4 hours log-phase bacterial cultures were used with a macrophage/bacteria of 1:100.

Viable cells were determined by trypan blue exclusion method.

*p value < 0.01 (*V. vulnificus* MO6-24/O or CVD 752 versus *V. vulnificus* CVD 707 and control)

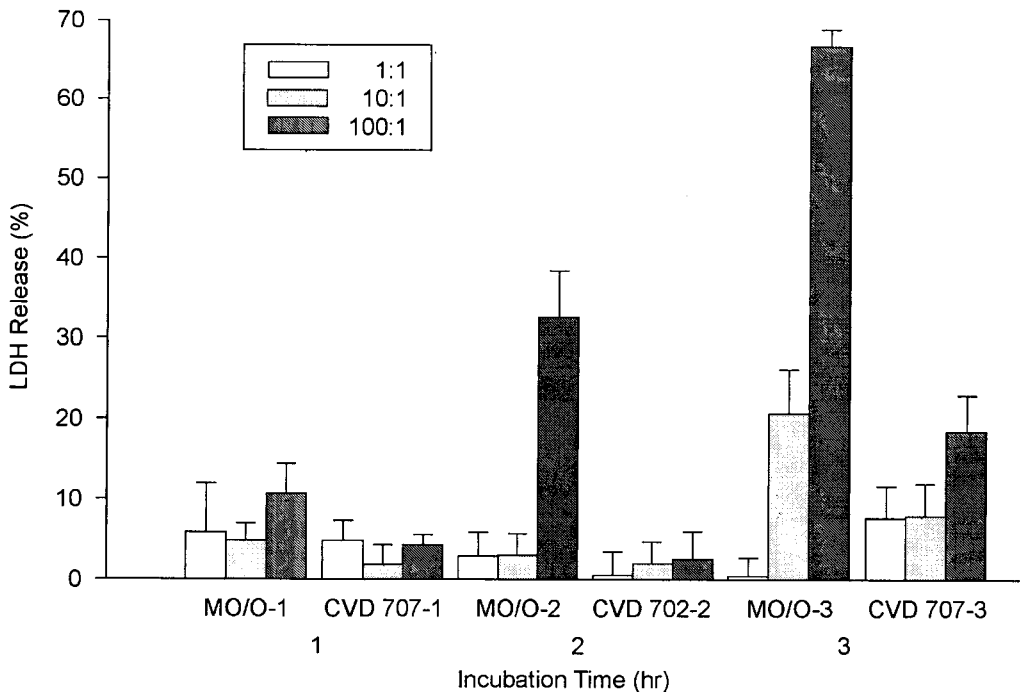


Figure 1. Effects of *V. vulnificus* infection on LDH release from macrophages. Macrophages were incubated with *V. vulnificus* MO6-24/O or CVD 707. LDH activity in the culture supernatant was measured using the colorimetric Cytotox 96 kit (Promega Corp). Each value is the average \pm standard deviation from 3 experiments.

마우스 감염 후 혈액내의 생균수 측정

생체내 세균감염에 대한 숙주의 방어기전에 미치는 용혈소의 영향을 조사하기 위하여, 10 HU의 용혈소를 마우스의 복강내로 주사하였다. 용혈소 주사한 후 30분에 1.0×10^7 CFU의 *V. vulnificus* CVD 707을 복강내로 감염시키고 2시간 후에 마우스의 혈액을 채취하여 생균수를 pour plate 방법에 의하여 측정하였다. 세균 배양을 위한 배지로는 2% NaCl이 함유된 trypticase soy agar를 사용하였다.

결 과

실험균주에 의한 대식세포의 손상

*V. vulnificus*와 마우스 복강내 대식세포간의 상호관계를 관찰하기 위하여, 마우스 복강내 대식세포를 분리 배양하면서 실험균주를 처치하여 광학현미경으로 관찰하였던 결과 용혈소를 생산하는 균주 (MO6-24/O 및 CVD 752)로 1시간 동안 공동배양한 대식세포의 상당수는 세포 배양 용기 표면으로부터 분리되어 떨어져 있었으며 부착되어 있는 세포의 약 50% 정도가 사멸된 것으로 관찰되었다. 그러나 용혈소를 생산하지 못하는 균주인 CVD 707과 공동배양한 대식세포는 전혀 손상을 받지 않았으며 음성 대조군과 차이가 전혀 없었다 (Table 2). 대식세포의 원형질막에 손상이 초래되면 세포 안으로부터 밖으로 LDH가 유리되어 나오는데 대식세포를 실험균주와 배양한 후에 LDH의 유리 정도를 측정하여 실험균주에 의한 세포독성을 측정하였다. 용혈소를 생산하는 MO6-24/O 균주와 배양한 대식세포는 2시간부터 LDH의 유리가 의의 있게 증가한 반면 용혈소를 생산하지 못하는 CVD 707과 배양한 대식세포에서는 LDH의 유리가 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 따라서 세균이 분비하는 용혈소에 의해 대식세포가 손상됨을 알 수 있었다.

세균 배양액 및 정제된 용혈소에 의한 대식세포의 손상

실험균주를 2% NaCl이 함유된 L broth에 6시간 배양한 후 균배양액 내의 용혈소의 농도를 측정하였던 바 균주 MO6-24/O는 32 HU/ml의 농도로 용혈소를 생산할 수 있었으나 균주 CVD 707은 용혈소를 전혀 생산하지 않았다 (성적표시 생략). 이

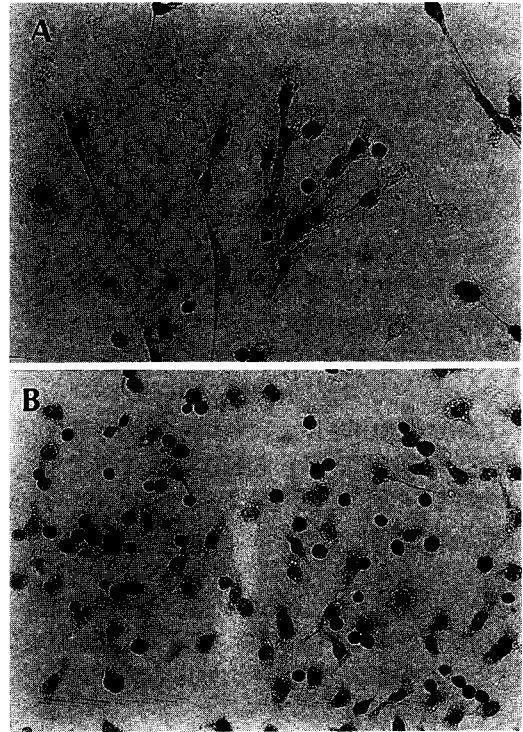


Figure 2. Light microscopy of peritoneal macrophages after treatment with *V. vulnificus* culture supernatant. Macrophages were treated with culture supernatants of *V. vulnificus* MO6-24/O (A) or CVD 707 (B) for 1 hour at 37°C, fixed with ethanol, stained with Giemsa solution and examined by light microscopy (400x magnification).

들 균배양액으로 대식세포를 처치한 후 대식세포를 Giemsa 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였던 바 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. MO6-24/O 배양으로 처치된 대식세포의 세포막이 손상되어 세포 원형질이 세포 밖으로 빠져 나오며 일부에서는 ghost cell이 관찰되기도 하였다. 대식세포 균배양액으로 처치한 후 LDH의 유리 정도를 관찰하였던 바 Fig. 3과 같이 CVD 707 배양액으로 처치한 대식세포에서는 LDH가 유리되지 않았으나 균주 MO6-24/O 배양액으로 처치된 대식세포에서는 LDH가 배양액내의 용혈소의 농도와 처치시간에 비례하여 유리되었다. 또한 대식세포의 생존능을 MTT assay를 실시하여 조사하였던 바 Fig. 4에서와 같이 균주 CVD 707 배양액으로 처리한 세포는 대부분이 생존하여 MTT로부터 formazan을 형성할 수 있었으나 균주 MO6-24/O 배양액으로 처치된 세포는 대부분이 사멸되어 for-

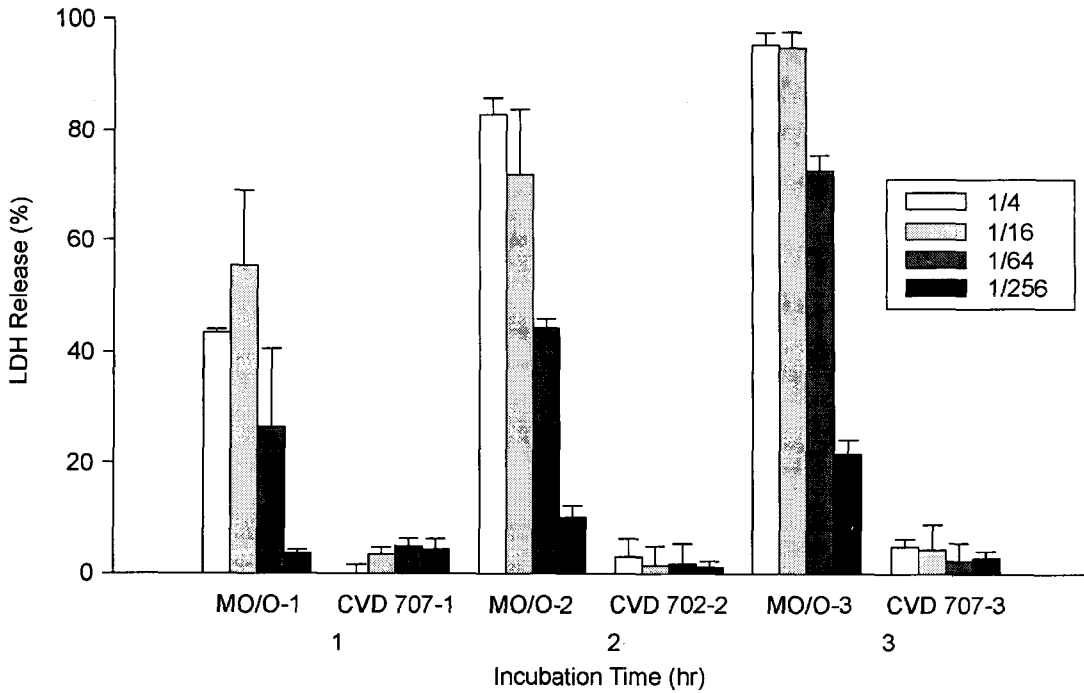


Figure 3. Effects of culture supernatants of *V. vulnificus* on LDH release from macrophages. Macrophages were cultured in media containing the culture supernatants of *V. vulnificus*. MO6-24/O or CVD 707 at 37°C for 1, 2 and 3 hours. LDH activity in the culture supernatant of macrophages was measured using the colorimetric Cytotox 96 kit (Promega Corp). Each value is the average \pm standard deviation from 3 experiment.

mazan을 형성할 수 없었다 ($p < 0.01$ at 27-fold dilution or less). 또한 균배양액의 희석 비에 따라 formazan의 형성능도 비례하여 증가하는 양상을 보였다. 정제된 용혈소를 대식세포에 처치한 후 세포의 생존율과 LDH 유리에 대한 실험을 실시하였던 바 균주 MO6-24/O 배양액으로 처치 시와 유사하게 용혈소의 양과 처치시간에 비례하여 세포에 손상이 초래되는 경향을 보였다 (Fig. 5).

용혈소의 세포 독작용에 대한 cholesterol 및 fetal bovine serum (FBS)의 영향

용혈소를 cholesterol과 전처치하면 적혈구에 대한 용혈작용이 소실된다고 알려져 있어 본 실험에서도 용혈소를 10 μ g의 cholesterol (Sigma, St. Louis, MO)과 37°C에서 30분간 전처치한 후 대식세포에 처치하여 세포의 생존율과 LDH의 유리를 조사하였다. Fig. 6에서와 같이 대식세포에 대한 용혈소의 세포 독작용이 cholesterol의 전처치에 의해 완전히 소실되었다. 대식세포를 균주 MO6-24/O로 처치 시에 cholesterol과 FBS를 배지에 첨가하

여 1시간 후에 세균의 생존율과 LDH의 유리를 조사하였던 바, Fig. 7에서와 같이 cholesterol과 FBS이 동일하게 세균에 의한 대식세포의 손상을 차단함을 알 수 있었다. 이때 세포 배양액내의 용혈소의 농도를 측정하였던 바 전혀 검출할 수 없었다 (성적 미제시).

용혈소가 마우스 생체내의 세균 제거능에 미치는 영향

용혈소가 숙주 내에서 대식세포와 같은 탐식세포에 의한 비특이적 세균 제거에 미치는 영향을 조사하기 위해, 마우스 복강을 통하여 용혈소를 주입한 후 용혈소를 생산하지 않는 균주 CVD 707을 복강내로 감염시킨 후 2시간에 마우스의 혈액을 채취하여 생균수를 측정하였던 바 Table 3에서와 같이 용혈소를 주입한 마우스에서 대조군에 비하여 보다 더 많은 수의 균이 검출되어 (p value < 0.01), 생체내에서 용혈소가 세균의 증식을 증가시키는 경향을 보였다. 용혈소를 생산할 수 있는 균주 MO6-24/O와 용혈소를 생산하지 못하는

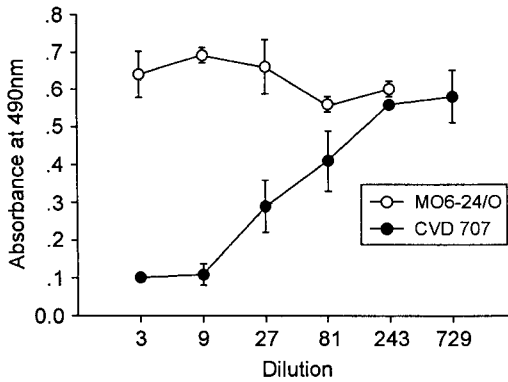


Figure 4. Effect of *V. vulnificus* culture supernatant on the viability of macrophages. Macrophages were incubated on 96-well plates (50 μ l/well) for 2 hr and non-adherent cells were removed by vigorous washing with RPMI-1640. Test samples in the media (50 μ l) were added to each well and cells were cultured for 1 hr. Then, 20 μ l of the MTT solution was added to each well and the cells were cultured for 4 hours. After incubation, unincorporated MTT was removed by aspiration, the cells were washed and then 100 μ l of 10% SDS-0.01 N HCl was added to each well. After mixture were mixing slightly on a plate mixer, the culture plates were incubated overnight at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO₂ incubator. Optical density was quantitated on an ELISA reader at 490 nm after adding 50 ml of n-propanol.

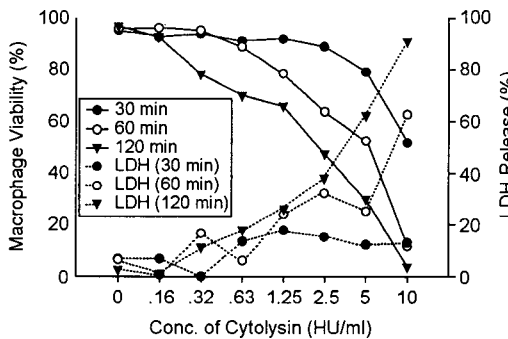


Figure 5. Kinetic changes in the viability of macrophages and LDH release after treatment with various doses of purified *V. vulnificus* cytolysin (VvH). Macrophages were incubated with DMEM media containing VvH at final concentration of 0, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, and 10 HU/ml. Macrophages were incubated with each dose of VvH for 30, 60, and 120 min at 37 $^{\circ}$ C.

CVD 707을 마우스의 복강내로 감염시킨 후 2시간 후에 복강내의 대식세포를 분리하여 세포의

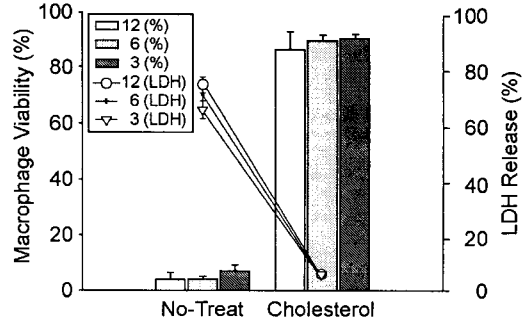


Figure 6. Effect of cholesterol on cytotoxic activity of *V. vulnificus* hemolysin to macrophages. Cholesterol (10 μ g) and hemolysin were mixed in DMEM and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Macrophages were incubated with DMEM media containing cholesterol-treated VvH at final concentration of 3, 6 and 12 HU/ml. Macrophages were incubated with each dose of VvH for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C. Each value is the average \pm standard deviation from 3 experiments.

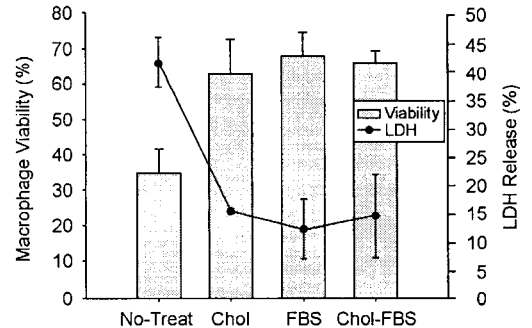


Figure 7. Effect of cholesterol and FBS on cytotoxic activity of *V. vulnificus* to macrophages. Macrophages were incubated in DMEM media containing 10 μ g/ml of cholesterol and/or 10% FBS with *V. vulnificus* MO6-24/O (100 bacteria/cells) at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour. Each value is the average \pm standard deviation from 3 experiments.

생존율을 비교하였던 바, Fig. 8에서와 같이 용혈소를 분비하는 균주를 감염시킨 마우스의 대식세포의 생존율이 25% 정도로 대조군 (약 65%)에 비해 현저히 낮았다.

고찰

*V. vulnificus*가 생산하는 용혈소는 면양, 말, 소, 토끼와 닭 등의 동물의 적혈구를 용해시킬 수 있으며, 이들 적혈구의 감수성 정도는 용혈소와의

Table 3. Effects of cytolysin on host bacterial clearance against *V. vulnificus* CVD 707

No. (log ₁₀) of bacteria in blood at 2 hours after IP inoculation	
Control mice	4.66 ± 0.03
Cytolysin-injected mice	5.37 ± 0.10

Each value is the average ± standard deviation from 3 mice per group.
p value < 0.01 (control mice versus cytolysin-injected mice)

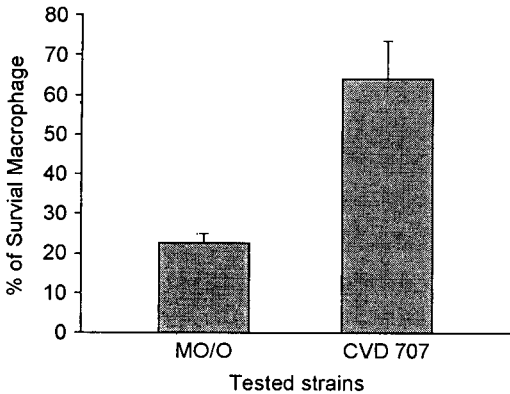


Figure 8. Viability of peritoneal macrophages after intraperitoneal infection with 10⁹ CFU of *V. vulnificus*. Each value is the average ± standard deviation from 3 experiment.

결합력 및 적혈구 막의 안정성과 밀접한 관계가 있다³⁹. Oliver 등²³은 *V. vulnificus*가 생산하는 용혈소와 단백분해효소가 패혈증 속의 발병기전에 있어 매우 중요한 역할을 하며, 모든 병원성 *V. vulnificus*의 배양 상청액은 Chinese hamster ovary cell에 세포독성을 갖는다고 보고하였다. 용혈소의 분자량은 약 56 kilodalton으로 알려져 있고, 또한 유전자의 염기서열이 모두 밝혀져 있다^{36,38}.

V. vulnificus 용혈소는 활발하게 증식하는 지수 증식기의 세균으로부터 만들어져 세균 밖으로 분비된다¹². 분비된 용혈소는 적혈구를 용혈시키기 위해서는 *E. coli*의 용혈소나 *Staphylococcus aureus*의 alpha-toxin과 같이 두 단계의 과정을 거친다. 즉, 첫 단계로는 온도의 영향을 받지 않는 적혈구 막에 존재하는 cholesterol과 결합하는 과정과, 두 번째 단계로는 온도의 영향을 받는 과정으로서 적혈구 막에 구멍을 형성하여 K⁺과 혈색소를 유리하는 과정이다⁴⁰. Menestrina 등¹⁴은 대장균의 용혈소는 사람에서 분리한 대식세포의 세포막에 작용하여 막공을 형성할 수 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 *V. vulnificus*가 분비하는 용혈소도

마우스의 대식세포에 작용하여 세포막의 손상을 초래하여 LDH의 유리를 일으키는데 용량 의존적인 경향을 보였다. 용혈소를 생산하는 세균에 의한 대식세포의 손상과 LDH의 유리는 균배양액 또는 정제된 용혈소 처치에 의한 것보다 많은 시간이 소요되었다. 용혈소 처치에 의한 LDH 유리를 동반하면서 세포의 사멸은 용혈소가 대식세포의 세포막 손상에 의한 것이라 생각되며 광학현미경하에서 관찰할 때 이를 확인할 수 있었다.

대식세포는 외부에서 침입한 물질을 제거하는데 중요한 역할을 하는 면역계 세포중의 하나이다. Yamanaka 등³⁷도 쥐의 복강에서 분리한 비만세포 (mast cell)에 *V. vulnificus*의 용혈소로 처치하였던 바 세포막이 손상을 받아 histamine이 유리된다고 보고한 바 있다. 대식세포에 대한 용혈소의 세포독성은 적혈구에 대한 용혈기전과 유사하리라 생각된다. Shinoda 등²⁶은 cholesterol이 온도와 무관한 세포막과의 결합과정을 차단한다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 용혈소를 cholesterol과 FBS로 각각 전처치하면 대식세포에 대한 세포독성이 상실됨을 관찰하였다. 균배양액이나 정제된 용혈소를 cholesterol과 전처치하면 cholesterol이 용혈소의 세포 독작용을 완전히 차단할 수 있었으나, 대식세포를 세균과 배양할 때 관찰되는 세포의 손상은 cholesterol 처치에 의해 완전하게 차단되지 못하였다. 10% FBS이 함유된 배지에서 대식세포를 실험군주 MO6-24/O와 1시간 동안 배양시에는 대조군에 비해 세포의 생존율이 35%에서 70% 정도로 증가하는 양상을 보였다. 이때 세포 배양배지에 함유된 용혈소의 농도를 측정하였던 바 통상적인 시험관 방법으로는 전혀 검출할 수 없었다.

V. vulnificus 감염증의 병인론에서 독성인자로서의 용혈소 역할에 대해서는 많은 논란이 있다^{23, 35}. Wright와 Morris²⁴는 용혈소 유전자에 변이를 유발한 세균을 마우스의 복강에 감염시켰을 때 대조군에 비해 LD₅₀의 차이가 없었다고 보고한 바

있다. 그러나 아직까지 용혈소는 매우 강력한 독성인자로서 감염증의 병인론에 있어 중요한 인자 중의 하나로 여겨진다¹⁷⁾. Gray와 Kreger⁸⁾는 용혈소에 대한 monoclonal 또는 polyclonal antibody를 이용한 ELISA나 indirect immunofluorescence 방법을 사용하여 마우스의 피하로 균을 감염시킨 후 국소 부위의 병변 또는 혈청으로부터 용혈소를 검출할 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 Gray와 Kreger⁷⁾는 *V. vulnificus*의 용혈소를 마우스의 피하에 주사하였던 바 *V. vulnificus* 감염증에 나타나는 피부병변과 동일한 증상이 발생한다는 보고를 하였으며, Kook 등¹¹⁾은 흉부 대동맥에서 guanylate cyclase를 활성화시켜 저혈압과 빈맥을 유발시킨다고 보고하였다. 본 실험에서 *V. vulnificus*는 용혈소를 분비하여 시험관 내에서나 마우스 생체내에서 대식세포에 손상을 초래하여 탐식기능을 억제하여 세균의 증식을 증가시키는 결과를 얻었다. 따라서 용혈소는 *V. vulnificus* 감염증의 병인론에 관여하는 중요한 독성인자 중의 하나로 사료된다.

결 론

*V. vulnificus*의 강력한 독성인자로 여겨지는 용혈소가 대식세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 마우스 복강으로부터 대식세포를 분리하여 생균 및 용혈소를 처치하였을 때 대식세포의 생존율, 탐식능 및 LDH 유리 등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대식세포를 용혈소 생산 균주인 *V. vulnificus* MO6-24/O, MO6-24/T 또는 CVD 752 (100 bacteria/MΦ)와 같이 1시간 동안 배양시에는 대식세포의 40% 정도만 생존하였으나, 용혈소 비생산 균주 CVD 707과 배양시에는 99% 정도의 대식세포가 생존하였다. 대식세포의 세포막 손상의 정도를 측정하기 위해 LDH의 유리를 측정하였던 결과 CVD 707과 공동배양시보다 MO6-24/O와 공동배양시에 더 많은 LDH가 유리되는 경향을 보였다. MO6-24/O 균주의 배양 상청액 (2.5 HU/ml)과 정제된 용혈소 (3 HU/ml)로 대식세포를 처치 시에 대식세포의 생존율이 각각 20%와 10% 내외이었으며, LDH의 유리도 약 70%와 65.5% 정도로 증가하였다. 용혈소의 대식세포에 대한 세포 독작용은 처치한 용량과 시간에 비례하는 경향을 보였다. 용혈소를 cholesterol과 전처치함으로써 대식세포에 대한 용혈소의 세포 독작용이 소실되어 세포의

생존율이 증가하고 LDH의 유리가 현저히 감소하였다 ($p < 0.01$). FBS는 *V. vulnificus*에서 용혈소의 생산을 억제하고 균상청액 내의 용혈소의 세포 독작용을 억제하여, DMEM-10% FBS에서 대식세포와 *V. vulnificus* MO6-24/O를 1시간 배양시 (100 bacteria/cell)에 세포의 생존율이 35% 증가하고 ($p < 0.01$) LDH의 유리가 28% 감소하였다 ($p < 0.01$). 용혈소를 전처치한 마우스에 CVD 707을 복강내로 감염시킨 후 생균수를 측정하였던 바 대조군에 비해 많은 수의 세균이 검출되었다.

이상의 성적으로 보아 *V. vulnificus*에서 생산되는 용혈소는 대식세포의 세포막에 손상을 입혀 대식세포의 탐식작용과 같은 비특이적 숙주 방어작용에 이상을 초래함으로써 *V. vulnificus* 패혈증의 독성인자로서 중요한 역할을 하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김영표, 전인기, 이재준: *Vibrio vulnificus* 감염증 - 임상적 및 역학적 관찰. 대한의학협회지 **28**: 773-780, 1985.
- 2) 류필열, 박하송, 조영국, 안태휴: *Vibrio vulnificus*의 외독소에 관한 연구. 전남의대잡지 **26**: 179-188, 1989.
- 3) 양동은, 김현수, 김형원, 신동현, 김세종: 세균학적으로 증명된 *Vibrio vulnificus* 패혈증 58예에 대한 임상적 고찰. 대한내과학회잡지 **41**: 383-391, 1991.
- 4) 조남중: 국내 *Vibrio vulnificus* 감염증의 역학 및 임상상 - 1983년에서 1985년 사이에 균배양검사로 확인된 28예. 대한의학협회지 **29**: 69-77, 1986.
- 5) Antdrus CR, Walter M, Crosa JH, Payne SM: Synthesis of siderophores by pathogenic *Vibrio* species. *Curr Microbiol* **9**: 209-214, 1983.
- 6) Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein: Disease caused by a marine *Vibrio*: clinical characteristics and epidemiology. *N Engl J Med* **300**: 1-5, 1979.
- 7) Gray LD, Kreger AS: Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection. *J Infect Dis* **155**: 236-241, 1987.
- 8) Gray LD, Kreger AS: Detection of *Vibrio vulnificus* cytolysin in *V. vulnificus*-infected mice.

- Toxicol* **27**: 439-464, 1989.
- 9) Johson DE, Calia FM, Musher DM, Goree A: Interaction of *Vibrio vulnificus* to serum bactericidal and opsonizing factors: relation to virulence in suckling mice and humans. *J Infect Dis* **150**: 413-417, 1984.
 - 10) Kim HR, Rho HW, Jeong MH, Park JW, Kim JS, Park BH, Kim UH, Park SD: Hemolytic mechanism of cytotoxin produced from *V. vulnificus*. *Life Sci* **53**: 571-578, 1993.
 - 11) Kook H, Lee SE, Baik YH, Chung SS, Rhee JH: *Vibrio vulnificus* hemolysin dilates rat thoracic aorta by activating guanylate cyclase. *Life Sci* **59**: PL41-47, 1996.
 - 12) Kreger A, Lockwood D: Detection of extracellular toxin (s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **33**: 583-590, 1981.
 - 13) Kreger A, DeChatelet L, Shirley P: Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: Association of virulence with resistance to phagocytosis. *J Infect Dis* **144**: 244-248, 1981.
 - 14) Menestrina G, Pederzoli C, Dalla Serra M, Begante M, Gambale F: Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophage is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J Membr Biol* **149**: 113-121, 1996.
 - 15) Miyoshi N, Miyoshi S, Sugiyama K, Suzuki Y, Furuta H, Shinoda S: Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* protease. *Infect Immun* **55**: 1936-1939, 1987.
 - 16) Miyoshi S, Sugiyama K, Suzuki Y, Furuta H, Miyoshi N, Shinoda S: Enhancement of vascular permeability due to histamine releasing effect of *Vibrio vulnificus* protease in rat skin. *FEMS Microbiol Lett* **40**: 95-98, 1987.
 - 17) Miyoshi S, Oh EG, Hirata K, Shinoda S: Extracellular toxic factors produced by *Vibrio vulnificus*. *J Toxicol Toxin Rev* **12**: 253-288, 1993.
 - 18) Morris JG: *Vibrio vulnificus*: a new monster of the deep? *Ann Intern Med* **109**: 261-263, 1988.
 - 19) Morris JG, Black RE: Cholera and other vibrioses in the United States. *N Engl J Med* **312**: 343-350, 1985.
 - 20) Morris JG Jr, Wright AC, Simpson LM, Wood PK, Johnson DE, Oliver JD: Virulence of *Vibrio vulnificus*: Association with utilization of transferrin-bound iron, and lack of correlation with levels of cytotoxin or protease production. *FEMS Microbiol Lett* **40**: 55-59, 1987.
 - 21) Okada K, Mitsuyama M, Miake S, Amako K: Monoclonal antibodies against the haemolysin of *Vibrio vulnificus*. *J Gen Microbiol* **133**: 2279-2284, 1987.
 - 22) Oliver JD: The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. *Mar Tech Soc J* **15**: 45-52, 1981.
 - 23) Oliver JD, Wear JE, Thomas MB, Warner M, Linder K: Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diag Microbiol Infect Dis* **5**: 99-111, 1986.
 - 24) Park SD, Shon HS, Joh NJ: *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea: clinical and epidemiologic findings in seventy patients. *J Am Acad Dermatol* **24**: 397-403, 1991.
 - 25) Poole MD, 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.
 - 26) Shinoda S, Miyoshi S, Yamanaka H, Miyoshi-Nakahara N: Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microbiol Immunol* **29**: 583-590, 1985.
 - 27) Simpson LM, Oliver JL: Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **41**: 644-649, 1983.
 - 28) Smith GC, Merkel JR: Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: Potential contribution to its invasiveness. *Infect Immun* **35**: 1155-1156, 1982.
 - 29) Tacket CD, Brenner R, Blake PA: Clinical features and epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J Infect Dis* **149**: 558-561, 1984.
 - 30) Tamplin ML, Specter S, Rodrick GE, Freidman H: *Vibrio vulnificus* resists phagocytosis in the absence of serum opsonins. *Infect Immun* **49**: 715-718, 1985.
 - 31) Toda H, Shino O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto: An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Method* **93**: 157-165, 1986.

- 32) Tsuru S, Taniguchi M, Fugisawa H, Zinnaka Y, Nomoko K: Differing resistance to polymorphonuclear cells of halophilic- and hypotonic-types of *Vibrio vulnificus*. *J Clin Lab Immunol* **22**: 185-189, 1987.
 - 33) Wright AC, Simpson LM, Oliver JD, Morris Jr JG: Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **58**: 1769-1773, 1990.
 - 34) Wright AC, Simpson LM, Zane SF, Oliver JD: Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Infect Immun* **55**: 269-272, 1987.
 - 35) Wright AC, Morris JG Jr: The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect Immun* **59**: 192-197, 1991.
 - 36) Wright AC, Morris JG Jr, Maneval DR Jr, Richardson K, Kaper JB: Cloning of cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **50**: 922-924, 1985.
 - 37) Yamanaka H, Sugiyama K, Furuta H, Miyoshi S, Shinoda S: Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. *J Med Microbiol* **32**: 39-43, 1990.
 - 38) Yamanaka K, Wright AC, Kaper JB, Morris JG Jr: The cytotoxin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. *Infect Immun* **58**: 2706-2709, 1990.
 - 39) Yamanaka H, Shimatani S, Tanaka M, Katsu T, Ono B, Shinoda S: Susceptibility of erythrocytes from several animals species to *Vibrio vulnificus* hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* **52**: 251-255, 1989.
 - 40) Yamanaka H, Sotah T, Katsu T, Shinoda S: Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. *J Gen Microbiol* **133**: 2859-2864, 1987.
 - 41) Yoshida SI, Ogawa M, Mizuguchi Y: Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **47**: 446-451, 1985.
-