

Vibrio vulnificus Lipopolysaccharide 의 생물학적 특성과 *Escherichia coli* 및 *Salmonella typhimurium* 의 Lipopolysaccharides 와의 비교 연구

김용호 · 이봉헌 · 신희대 · 강신원
부산대학교 자연과학대학 화학과

Biological Properties of *Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide and compared to those of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharides

Kim Yong Ho, Pong Hun Rhee, Hong Dae Sin and Shin Won Kang
Department of Chemistry, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-390, Korea

ABSTRACT: *Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide (LPS) was extracted, performed chemical analysis, tested its biological activities, and compared to those of *Escherichia coli* LPS and *Salmonella typhimurium* LPS. The lethal activity of *V. vulnificus* LPS was 138.6 mg/kg in mouse, but this was lower than those of *E. coli* LPS (56.3 mg/kg) and *S. typhimurium* LPS (37.5 mg/kg). The result of fatty acid analysis showed that *V. vulnificus* LPS had more saturated fatty acid than *E. coli* LPS and *S. typhimurium* LPS. Above results indicated that *V. vulnificus* LPS did not have much effect on the lethality. The results of biological responses of enzymes and blood cells by LPSs showed that *V. vulnificus* LPS had slightly greater activity than *E. coli* LPS and *S. typhimurium* LPS. *V. vulnificus* LPS was recommendable for stimulant on interferon induction because of adequate stimulation and safety for host and cell lines.

KEY WORDS □ *Vibrio vulnificus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, Lipopolysaccharides

동물의 장내에는 대변 매 mg 당 약 10^{11} 마리 정도의 미생물들이 오랜 적응과 순화에 의해 숙주의 방어기구와 무관하게 상재군총(Resident flora)으로써 존재하고 있으며, Peptidoglycan, Lipopolysaccharide (LPS)와 같은 미생물의 세포막 성분들은 숙주에게 생리, 생화학적 및 면역학적인 자극을 지속적으로 가하고 있다(Ozawa 등, 1982). 특히 LPS가 숙주 체내에서 일으킬 수 있는 다양한 생물학적 활성중에 숙주의 장해기구와 방어기구를 동시에 자극시킬 수 있는 양면성은 다른 물질들에 대한 생물학적 활성에 비하여 특이하다(Homma 등, 1983). 즉, 동물의 종에 따라 투여

량에 차이는 있지만 대상 실험동물을 자극시킬 수 있을만한 정도의 LPS를 동물 체내에 투여하게 되면 초기에는 장해반응이 진행되다가 회복단계에서는 초기 정상상태 이상으로 방어기능이 항진된다. 이와 같은 초기 정상상태 이상의 생체 방어기능 항진 때에는 Interferon (IFN), Interleukin (IL) 및 Tumor Necrosis Factor (TNF) 등이 숙주체내에 유리되어진다(Shim 등, 1979; Williamson 등, 1983). IFN, TNF 및 IL과 같은 Biological Response Modifier (BRM)는 실험동물 또는 유전공학적으로 체내외에서 생성시켜 면역 보강 치료제로도 이용되기도 한다(Philip 등, 1986). 이러

한 BRM 생성연구에는 각기 다른 미생물 종들의 LPS가 이용되어지고 있다(Machara 등, 1977). 특히 Kusumoto 등(1985)에 의하여 LPS 활성의 본체라고 할 수 있는 Lipid A가 합성됨에 따라서 이러한 합성 Lipid A의 여러가지 변형체를 이용한 BRM 유도 생성연구는 매우 활발하여 질 것으로 기대된다. BRM 중 현재 면역 보강 치료제로 많이 이용되어지고 있는 IFN의 유도 생성연구는 여러 미생물 종들의 LPS를 이용한 연구가 많았으나(Matsumura 등, 1988), 최근 보고되어진 숙주에 대한 조직 침투성과 치사성이 강한 새로운 *Vibrio*과의 병원성 미생물인 *V. vulnificus* (Goo 등, 1982)의 LPS를 이용한 IFN 유도생성을 다른 미생물 종의 LPS와 비교 검토한 결과는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 *V. vulnificus*의 LPS를 추출하여 화학적, 생물학적 특성을 밝히고 IFN 유도 활성제 개발 가능성을 타진해 보고자 하였으며 대조 미생물로서는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028로부터 LPS를 추출하여 실험하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

E. coli ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 및 해수에서 분리한 *V. vulnificus*를 37°C에서 Trypticase Soy Broth(TSB, Microbiology system, Cockeysville, MD)로 24 시간 동안 진탕 배양하였고, *V. vulnificus* 배양은 NaCl(5g/l)을 추가시켰다(Yoshida 등, 1985).

시 약

Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, E-Toxate는 Sigma(St. Lewis, Mo USA) 제품을 사용하였고 지방산 분석용 시약은 E. Merck 제품을 그리고 효소활성, 혈액성분 및 세포성분 분석은 Roche(Basle, Switzerland) 및 Coulter(Northwell Drive Luton, Beds., England) 제품을 사용하였다.

실험동물

C57 BL/6N Crj mouse(20-25g)와 70-75일 된 Spragne Dawley rat는 인제대학 해부학교실에서

분양받아서 사용하였다.

LPS의 추출

Westphal 변법(1965)에 의해 다음과 같이 추출 정제하였다. Acetone으로 건조시킨 균체를 증류수로 3회 세척한 다음, 100ml 증류수에 부유시켜 3분 동안 sonication 시켰고, 4,000×g에서 60분간 원심침전시켜 침사를 구하여 여기에 동량의 90% aqueous phenol(wt/v)을 가하여, 65-68°C에서 20분간 homogenize시킨 후, 10°C로 냉각시켜 4,000×g에서 60분 동안 원심침전한 후 상층을 취하고, 침사에 대하여 동일 조작을 3회 추가하여 재추출하였다. 추출액을 증류수에서 3일간 투석시킨 후, 5,000×g에서 60분 동안 원심침전시키고 상층액에 CHCl₃-BuOH 용액(5:1, v/v)을 가하고 다시 3,000×g에서 10분간 원심침전하였다.

상층액에 Hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 가하여 원심침전시킨 상층액을 3일간 증류수에 투석시킨 후 농축하여 100,000×g에서 초원심분리한 후 동결 건조시켜 사용하였다.

배양 상층액은 63-68%(v/v)의 EtOH로 처리한 후 4,000×g에서 원심시켜서 90% aqueous phenol(w/v)조작과정에서부터 균체와 동일하게 처리하였다.

지방산 분석

Lipopolysaccharides 2mg을 100°C 2M HCl 용액에서 6시간 동안 가수분해시킨 후 10ml의 CHCl₃:MeOH:H₂O(4:10:5, v/v/v) 용액에 넣어 건조시킨 다음 2M HCl로 산성화하여 10% BF₃-MeOH를 가하고 100°C에서 30분 동안 methylation시킨 후 냉각시키고 n-hexane:ethyl ether(1:1, v/v)을 가하여 지방산 methylester를 추출하여 GC 측정용 vial에 넣어 Supelco standard(Tech. Bull. Supelco, 1982)를 대조로 하여 MIS(Microbial Identification System, H-P)에서 지방산을 분석하였다.

생물활성의 측정

20-25g 외 C57 BL/6N Crj mouse 및 Spragne Dawley rat(1군을 5마리씩으로하여 총 50마리의 mouse 및 rat를 사용)를 사용하여 LD₅₀(50% lethal dose, 실험동물의 50%를 죽이는데 필요한 LPS의 양)을 측정하였고, 2μg/ml의

Shigella flexneri LPS 를 양성대조로하여 Sigma 사의 research reagent kit 를 이용하여 limulus amebocyte lysate 의 활성을 측정하였다(Tai 등, 1977).

효소, 혈액성분 및 세포성분의 활성도를 비교 측정하기 위하여(실험동물로 rat 를 사용) 각 LPS 의 rat 에서 구한 LD₅₀ 양을 pyrogen free phosphate buffered saline(pH7.4) 0.1 ml 에 용해시켜 각군에 해당하는 5 마리씩의 Spragne Dawley rat 에 정맥주사한 후 0, 6, 12, 18 시간까지의 Rat 혈액내의 Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Lactic acid dehydrogenase(LDH), γ -Glutamyl transferase (GGT) 활성, Blood urea nitrogen(BUN), Blood sugar 농도, 총 백혈구수, 망상 적혈구수 및 총 혈소판수를 각각 측정하였다.

총 백혈구수, 총 적혈구수 및 혈소판수는 Coulter S+IV 로 측정하였는데, 이때 기계의 대조는 4C plus 를 기계관리용 Q.C. 로 사용하였다. 망상 적혈구수는 1% Brilliant Cresyl Blue 를 이용하여 측정하였으며, 효소, 혈중 요소질소 및 혈당은 Gilford IMPAC 400E COBAS MIRA 를 사용하여 각각 그 활성 및 농도를 측정하였다(Tietz, N.W., 1976).

Interferon assay protocol

96 well micro titer plate(Costar)에 WISH Cells(Amion Tissue, human)을 50,000 cells/0.1 ml/well 이 되도록 10% Fetal calf serum 이 함유된 MEM media(Gibco Laboratories Grand Island, New York, USA)에 희석하여 각각의 well 에 분주한 다음, 37°C의 CO₂ incubator 에서 24 시간 배양시킨 후 시료를 3.2 배 희석하여 세포가 들어있는 well 에 접종하고 이때 각각의 plate 마다 100 I.U./ml 의 IFN 을 동시에 접종한다. 다시 37°C의 CO₂ incubator 에서 24 시간 배양 후 2,000 -3,000 TCID₅₀/ml 의 vesicular stomatitis 를 challenge 한다. 35°C의 CO₂ incubator 에서 18-24 시간 동안 배양시킨 후 0.5% crystal violet in saline, EtOH and formalin 용액으로 염색시킨다.

역가 계산: 각 희석 배수에서 염색된 정도를 550 nm 에서 흡광도를 측정하여 표준 IFN 과 비교

하여 계산한다.

결과 및 고찰

LPS 의 추출

배양액 1l 당 회수된 건조 균체량은 *V. vulnificus* 가 3.1g/l 로 가장 많았고, LPS 는 균체로부터는 *V. vulnificus* 가 3.0mg 이었고, 배양상층액으로부터는 *E. coli* 가 16.0mg 으로 균체량의 0.62% (w/w)가 회수되어 가장 많이 추출되었다(Table 1).

지방산 분석

각 균체로부터 측정된 총 지방산 함량은 *V. vulnificus* 28%, *E. coli* 39% 이었고, *S. typhimurium* 의 경우 53% 이었다. 각 균주가 공통적으로 가지고 있는 지방산은 C11:0 iso 3OH, C14:0, C16:1 cis 및 C16:0 이었고 이들중 Tripalmitolein 과 Tripalmitin 이 많이 포함되어

Table 1. Final yield of LPS from bacterial culture.

bacteria	dry weight (g/l)	LPS (mg/whole culture)	
		pellet	supernatant
<i>V. vulnificus</i>	3.1	3.0	10.0
<i>E. coli</i>	2.6	1.0	16.0
<i>S. typhimurium</i>	2.1	1.0	4.0

Table 2. Fatty acid composition of *V. vulnificus*, *E. coli*, and *S. typhimurium* LPS.

fatty acid	% of total fatty acid from LPS		
	<i>V. vulnificus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
C11:0 iso 3OH	2.24	0.75	0.60
C12:0	ND	5.86	ND
C13:0	ND	0.71	ND
C14:0	2.01	9.81	7.49
C15:0 anteiso	23.53	ND	ND
C15:0 3OH	36.66	2.37	ND
C15:0	ND	17.49	17.55
C16:1 cis	6.34	23.02	27.29
C16:0	17.71	13.28	14.28
C17:0	ND	0.79	ND
C18:0	8.95	ND	ND
C19:cyclo C11-12	ND	1.38	2.01

ND: not determined

있었다(Table 2).

한편 *V. vulnificus* LPS에 많이 포함된 지방산은 C15:0 3OH가 36.66%, *E. coli* LPS는 C16:1 cis가 23.02%이었고 *S. typhimurium* LPS에서도 역시 C16:1 cis가 27.29%로 가장 많이 함유되어 있었다. 전체적인 chromatogram은 *V. vulnificus* LPS에서는 포화 지방산 함량이 많으나 이에 반해 대조균주인 *E. coli*와 *S. typhimurium* LPS에서는 불포화 지방산 함량이 많음을 보여주고 있다.

생물활성의 측정

LD₅₀ 및 Limulus amebocyte lysate gel 활성: 각 LPS의 mouse에 대한 LD₅₀는 실험군중에서 *V. vulnificus*가 가장 낮아 138.6 mg/kg이었고, *S. typhimurium*이 37.5 mg/kg로 가장 높았으며, rat에서의 LD₅₀는 mouse의 경우와 유사하였다(Table 3).

Table 3. Endotoxic activity and Limulus activity of *V. vulnificus*, *E. coli*, and *S. typhimurium* LPS

LPS	Limulus test (ng/ml)	LD ₅₀ in mouse (mg/kg)	LD ₅₀ in rat (mg/kg)
<i>V. vulnificus</i>	0.1	138.6	116.7
<i>E. coli</i>	0.1	56.3	48.3
<i>S. typhimurium</i>	0.1	37.5	25.6

mouse: C57BL/6NCrj, rat: Spragne Dawley

Limulus amebocyte lysate gel 활성 시험은 FDA *E. coli* Endotoxin-reference Lot EC-2를 reference로 하여 검출감도는 0.01-0.03 ng/ml인 연구용 kit를 이용하여 측정한 결과 모두 0.1 ng/ml이었다(Table 3).

순환혈액 중의 효소활성의 측정: Rat를 Ethylether로 마취 후 심장으로부터 채혈된 혈액을 30분 이내에 2,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 4°C 냉장고에 보관한 후 활성 측정을 하였다.

군중별로 보면 실험군인 *V. vulnificus*가 병원성 대조균인 *S. typhimurium* 및 비병원성 대조균인 *E. coli*에 비하여 조금 큰 효소활성을 보였다. 활성변화가 정상대조균에 매우 유사한 GGT를 제외한 3가지 효소중 특히 활성 증가가 현저한 효소는 LDH이었다(Table 4, Fig.1). LDH, ALT에서는 시료 투여 후 시간 경과에 따라서 그 활성이 점차 감소하였으나, AST는 3가지 효소 중 활성 증가는 제일 낮았지만 *S. typhimurium*만 제외하고는 시간 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였다.

Blood urea nitrogen(BUN)은 실험 군중간에 현저한 차이없이 다소 증가된 경향을 보였고 *V. vulnificus*의 경우 시료투여 후 6시간 군에서 다른 실험군에 비하여 가장 높은 활성을 보였다(Fig.2).

Table 4. Changes of enzyme activity and blood component in rat by LPS(LD₅₀).

Enzyme		ALT (IU/l)	AST (IU/l)	LDH (U/ml)	GGT (IU/l)	BUN (mg/dl)	Blood Sugar (mg/dl)
control group		30 ± 9	90 ± 17	105 ± 21	5 ± 2	21 ± 2	98 ± 16
	6 h	37 ± 5	109 ± 7	316 ± 17	12 ± 3	26 ± 4	109 ± 8
	12 h	36 ± 6	108 ± 4	274 ± 15	3 ± 1	23 ± 2	112 ± 4
<i>V. vulnificus</i>	18 h after challenge	51 ± 9	123 ± 9	213 ± 27	5 ± 2	24 ± 3	128 ± 6
	6 h	27 ± 5	37 ± 8	175 ± 11	2 ± 1	21 ± 2	109 ± 8
	12 h	31 ± 5	50 ± 6	218 ± 19	5 ± 1	25 ± 1	112 ± 6
<i>E. coli</i>	18 h after challenge	29 ± 7	71 ± 9	168 ± 13	7 ± 2	24 ± 1	98 ± 5
	6 h	58 ± 5	197 ± 9	435 ± 18	3 ± 1	26 ± 2	92 ± 6
	12 h	39 ± 5	96 ± 9	143 ± 31	7 ± 2	21 ± 1	113 ± 6
<i>S. typhimurium</i>	18 h after challenge	34 ± 3	74 ± 9	147 ± 22	7 ± 1	23 ± 2	137 ± 7

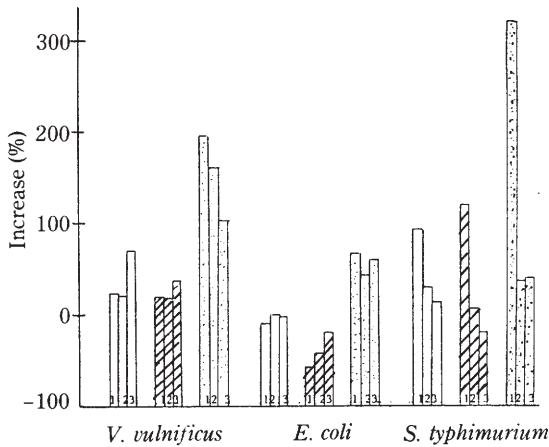


Fig. 1. Changes of enzyme activity in rat by LPS (LD_{50}).
1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge
□: ALT, ▨: AST, ▩: LDH

Blood Sugar 는 모든 실험군중에서 시료 투여 후 6 시간 실험군에서는 평균 5% 가 정상대조군에 비하여 증가되었다가 12 시간 실험군에서 다시 14% 증가되었는데 그 후 18 시간 실험군에서는 *V. vulnificus* 와 *S. typhimurium* 에서 36% 까지 증가되었다(Fig.2). 이와 같은 사실은 내독소 투여에 대해 pyruvate kinase 항진에 의해 일시적으로 고혈당이 된다는 Snyder 등(1971)의 보고와 일치한다.

순환혈액 세포의 변화

순환되는 혈구 세포 중 내독소투여에 대하여 감

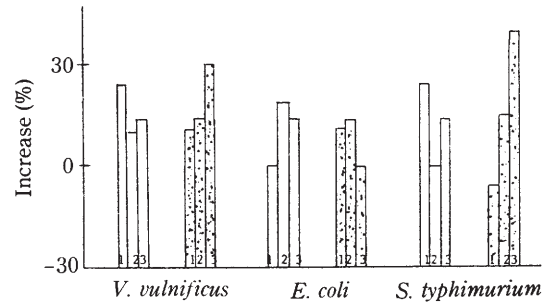


Fig. 2. Changes of BUN and blood sugar in rat by LPS (LD_{50}).
1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge
□: BUN, ▨: blood sugar

수성이 높은 세포들은 혈소판, 백혈구 및 세망내피계 세포들이고 외·내배엽성 세포들은 감수성이 낮다(Bradley, S.G., 1979). 본 실험에서는 White Blood Cell(WBC), Red Blood Cell(RBC), Reticulocyte(RET) 및 Platelet(PLT) 등 Rat 순환혈액 중의 혈구 세포의 수적 변동을 측정하였다.

RBC 에 비해 WBC, RETI 및 PLT 의 변동이 현저한 것처럼 각기 변화되는 양상은 달랐으며 (Table 5), WBC 나 RETI 는 증가하는 반면 PLT 는 현저하게 감소되는 현상을 나타내었다(Fig.3). 즉 WBC 는 *V. vulnificus* 의 6 시간 실험군에서 정상대조군에 비하여 68% 증가, RETI 는 *E. coli* 의 18 시간 실험군에서 133% 증가와 *S.*

Table 5. Changes of cellular element in rat by LPS (LD_{50}).

cellular element		WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	RETI (%)	PLT ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
control group		85 \pm 26.3	7.65 \pm 0.25	1.2 \pm 0.4	8.61 \pm 0.56
	6 h	143 \pm 24.3	7.58 \pm 0.62	1.5 \pm 0.5	5.27 \pm 0.78
	12 h	92 \pm 18.3	7.43 \pm 0.54	2.4 \pm 0.5	2.75 \pm 0.26
<i>V. vulnificus</i>	18 h after challenge	98 \pm 21.7	7.56 \pm 0.21	1.8 \pm 0.5	5.82 \pm 0.61
	6 h	98 \pm 23.5	7.43 \pm 0.47	1.3 \pm 0.3	5.47 \pm 0.23
	12 h	105 \pm 17.1	7.53 \pm 0.19	1.5 \pm 0.5	2.95 \pm 0.41
<i>E. coli</i>	18 h after challenge	93 \pm 20.5	7.90 \pm 0.63	2.8 \pm 0.5	5.04 \pm 0.52
	6 h	89 \pm 19.8	7.42 \pm 0.58	2.0 \pm 0.6	4.05 \pm 0.44
	12 h	79 \pm 24.5	7.23 \pm 0.57	1.5 \pm 0.3	3.75 \pm 0.32
<i>S. typhimurium</i>	18 h after challenge	107 \pm 21.7	7.68 \pm 0.53	1.0 \pm 0.5	4.02 \pm 0.41

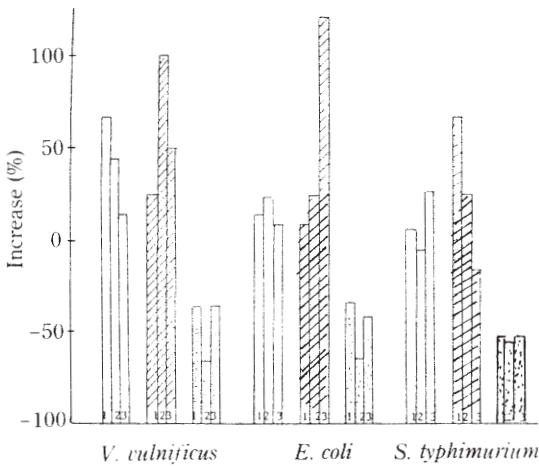


Fig. 3. Changes of cellular element in rat by LPS(LD₅₀).
1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge
□: WBC, ▨: RETI, ▩: PLT

typhimurium 은 6 시간 실험군에서 67% 증가한 반면, PLT는 *V. vulnificus* 12 시간 실험군에서 정상대조군에 비하여 68% 까지 감소하였고, 각 실험군의 시료채취 시간에 무관하게 정상대조군에 비하여 35% 이하의 현저한 감소를 보이고 있다 (Fig.3). 한편 증가되는 세포군중 WBC가 큰 변화없이 유사하게 증가된 추세를 보이고 있고, RETI에서는 *V. vulnificus*가 증가된 상태를 거의 유지하고 있으나, *E. coli*에서는 시간경과에 따라서 25%, 133%로 현저한 증가를 보이는 반면에 *S. typhimurium*에서는 6 시간 실험군에서 67%로 증가되었다가 시간경과에 따라 25%로 감소되어 18 시간 후에는 정상대조군과 비슷한 수치를 나타내었다.

Rat에서 Interferon(IFN) 생성유도

IFN은 살아있는 virus나 죽은 virus를 접종시키거나 미생물 LPS를 투여시킨 세포에서 생성되어지는 저분자 단백질로서 세포내에서 비특이적으로 virus 증식을 억제한다. 특히 미생물의 LPS에 의하여 생성되어지는 것으로는 Macrophage나 B 세포에서 생성되어지는 α/β 형 (Ho, M. 등, 1976)과 T 세포, Large granular lymphocyte (LGL) 및 Natural killer(NK) 세포에서 생성되어지는 γ 형 IFN이 있다(Matsumura 등, 1983).

실험군에서 IFN을 생성유도한 것은 *V. vulnificus*와 *S. typhimurium*이었으며, 각각 시료

Table 6. Induction of Interferon (unit: IU / ml) by LPS (LD₅₀)

blood collection	bacteria	<i>V. vulnificus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
control	none	0	0	0
6 h	LPS(LD ₅₀)	0	0	1-5
12 h	LPS(LD ₅₀)	1-5	0	0
18 h	LPS(LD ₅₀)	0	0	0
after challenge				

투여 후 12 시간 및 6 시간에서 IFN이 검출되었고 생성량은 양실험군에서 모두 1-5 IU/ml이었다 (Table 6).

고 찰

LPS는 숙주에게 발열, shock 및 치사작용과 같은 다양한 생물활성을 가지고 있고 그 정도는 숙주 및 미생물의 종에 따라서 다르다(Takao 등, 1986; Penny 등, 1983). 본 연구결과에서는 *V. vulnificus* LPS의 LD₅₀가 병원성 대조군인 *S. typhimurium*보다 3.7배, 비병원성 대조군인 *E. coli*보다 1.5배 생물활성이 낮았다(Table 3).

V. vulnificus LPS의 치사활성이 대조군보다 적은 것은 LPS 함량 중 포화 지방산이 다른 대조군에 비하여 많기 때문이라고 생각된다. 그러나 치사활성 이외의 효소군, 혈액성분 및 혈액세포 활성에서는 다른 대조군들에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었다.

즉, *V. vulnificus* LPS에 의한 효소군의 생물활성은 *E. coli*의 ALT, AST 및 LDH 활성에 비하여는 다소 높은 활성 증가를 보이고, *S. typhimurium*의 효소군에 비하여는 낮은 활성 증가를 보였다(Fig.1).

또한 *S. typhimurium* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH 활성변화는 시료투여 후 6 시간 실험군에서 급격한 활성증가를 보인 후 12 시간, 18 시간의 시간 경과에 따라서 활성 저하를 보였다.

그러나 *V. vulnificus* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH 효소군에서는 LDH의 6 시간 실험군을 제외하면, 비교적 완만한 활성증가를 유지하고 있

다.

LDH 효소활성은 관련 장기 이외의 PLT의 다량 파괴로부터 유출되어지는 세포질성 LDH의 유입에 의한 활성증가를 고려하면 *V. vulnificus* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH 활성증가는 비교적 적당하고 지속적인 자극을 받고 있는 결과로 보여진다.

V. vulnificus LPS에 의한 혈액세포 활성변화는 시료투여 후 시간경과에 무관하게 WBC와 RETI군이 높은 활성을 유지하고 있고, PLT의 파괴가 다른 대조군에 비하여 낮았다가 18시간부터는 정상대조군의 PLT 정도로 급격히 상승했다(Fig.3).

증가된 WBC의 종류별 분류에서는 분지형 호중구의 평균 증가가 80% 이상 증가하였다(미발표 결과). 대조군인 *E. coli*와 *S. typhimurium* LPS에 의한 혈액세포 변동은 RETI가 시간경과에 따라 지속적으로 증가하거나 감소되고, WBC의 활성도 지속적으로 감소되거나 급격히 상승하며, PLT 회복이 지연되는 것(Fig.3)과 BUN의 완전한 저하(Fig.2) 등을 종합하여 볼 때, 병원성 대조군인 *S. typhimurium* LPS가 숙주 체내에 미치는 영향은 초기의 급격한 자극으로 인하여 그 방어기능에 심한 장애를 받은 후 회복이 지연되어진다고 본다. 그러나 *V. vulnificus* LPS가 숙주 체내에 미치는 영향은 ALT, AST 및 LDH의 활성증

가 후 지속적인 활성유지와 WBC 및 RETI도 또한 그 활성증가가 지속적으로 유지되는 점 등을 고려해 볼 때, 초기의 장애작용을 ALT 및 LDH 활성증가로 생각할 수 있는, 간장의 해독작용 증가, WBC, RETI 및 PLT의 활성증가로부터 추측되는 망상 내피계의 활성, 즉 방어기구의 활성증가가 현저하다고 볼 수 있다(Dziarski, 1982). 따라서 *V. vulnificus*에 의한 숙주의 장애와 방어기구 활성증가 방어기능을 자극시키는 기능이 장애기구 자극에 비하여 크다고 볼 수 있다.

결론적으로 *V. vulnificus* LPS의 LD₅₀가 낮은 이유중에 LPS 자체를 구성하고 있는 포화 지방산 함량의 증가나, KDO가 결핍된 단순한 소수의 당으로 구성된 구조적 측면에서의 이유에 첨가하여 숙주의 방어기능을 강력하게 자극시키는 이유도 함께 고려되어질 수 있다.

IFN 생성자극제로는 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에 사용하고자 할 때, IFN 생성량은 같지만 초기의 강력한 장애반응으로 cell lines나 실험동물 생체에 심한 장애반응을 초래하는 *S. typhimurium*에 비하여, 방어기구 자극성이 크고 그 자극이 지속적이므로 숙주와 cell lines에 안정성을 주고 효과적인 자극을 적절히 가해줄 수 있는 *V. vulnificus* LPS가 보다 좋은 IFN 유도 생성제로 생각된다.

적 요

*Vibrio vulnificus*에서 추출한 Lipopolysaccharide(LPS)의 mouse에서의 치사 활성 측정결과 138.6mg/kg으로서 대조 미생물인 *Salmonella typhimurium* LPS, 37.5mg/kg과 *Escherichia coli* LPS, 56.3mg/kg에 비하여 낮았으며, LPS의 화학 분석결과 대조 미생물군들에 비하여 포화 지방산 함량이 많았다. *V. vulnificus* LPS에 의한 효소군의 생물활성은 대조군에 비해 다소 높은 활성을 보였고 혈액 세포의 활성변화도 비슷한 결과를 나타냈다. 또한 Interferon 유도 생성량은 *S. typhimurium*과 *V. vulnificus*가 모두 1~5IU/ml이었다. 따라서 *V. vulnificus* LPS의 포화 지방산 함량이 많고 순환혈액 중의 효소 및 혈액 세포의 활성이 높은 것으로 보아 숙주의 방어기구를 강하게 자극하기 때문에 치사량이 낮은 것으로 생각된다. 따라서 숙주에 대하여 장애 자극이 적은 *V. vulnificus* LPS는 Interferon 생성 자극제로 적절한 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 87년도 한국과학재단 연구비로 수행되었으며 이에 감사의 뜻을 표하고 또한 본 연구에 도움을 주신 목암연구소에 사의를 표합니다.

REFERENCE

1. Bradley, S.G. 1979. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxin. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**: 69-74

2. Dziarski, R. 1982. Studies on the mechanism of peptidoglycan and Lipopolysaccharide induced polyclonal activation. *Infect. Immun.* **35**: 507-514
3. Engels, W. Endont, J. Kamps, M.A.F. and Van boveh, C.P.A. 1985. Role of Lipopolysaccharide in opsonization and Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. **49**: 182-189
4. Goo, J.S., Kim, D.W., Han, K.S., Suk, J.S., Pank, M.H., and Kim, S.I., 1982. Lactose fermenting *Vibrio* (*Vibrio vulnificus*) septicemia.
5. Maehara, M. and Ho, M., Dreining, M.C., 1976. Cellular basis of interferon formation and hyporeactivity after exposure to bacterial Lipopolysaccharide. *J. Inf. Dis.*, **133**: A30-36
6. Homma, Y., Iwanaga, S., Niwa, M. and Yoshida, M., 1983. Endotoxins, M.D.P. P. 141-158 Japan, Tokyo.
7. Ilkka, H., Harri, S., and Mirja, S., 1982. Pulmonary toxicity of endotoxins comparison of Lipopolysaccharide from various bacterial species. *Infect. Immun.* **35**: 528-532
8. Maehara, N., and M.H. 1977. Cellural origin of intreferon induced by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **15**:
9. Matsmura, H., and M. Nakano, 1988. Endotoxin-induced interferon-production in culture cells derived from BCGG-infected C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* **140**: 494-500
10. Masao, Y. 1970. Endotoxic response of various cells. Study of bacterial toxin. P256. Japan, Tokyo.
11. Kusumoto, S., Kotani, S., Takada, H., Ogawa, T., Kakahashi, I. *et al.* 1985. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from *Escherichia coli* Re-mutant. *Infect. Immun.* **49**: 225-237
12. Ozawa, A., Ohnishi, N., Ikigai, H., Tazume, S. *et al.* The role of intestinal bacteria in host defenes mechanisms against infection. In intestinal flora and self defense. Ed., Tomotari, M. PP. 191-211. Japan scientific societies press, Tokyo
13. Penny, J. Hitchcoke and Teresa, M. Brown. 1983. Morphological heterogenity among *Salmonella* Lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-277
14. Philip, R., and L.B. Epstein, 1986. Tumor necrosis factor as immunomodulation and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself -interferon and interleukin-1. *Nature* **323**: 86
15. Shim, B.S., Hong, K.J., and Kim, L.K. 1979. The nature of endotoxin-induced tumor necrosis factor. *Korean J. Biochem.* **11**: 1-9
16. Snyder, I.S., Deter, M. and Jagle, J. 1961. Effect of endotoxin on pyruvate kinase activity inmouse livere. *Infect. Immun.* **4**: 138-142
17. Supelco, Inc., 1982. Identification of bacteria by analysis of cellular fatty acids. Supelco Technical Bulletin 767
18. Tai, J.K. and Liv. T.Y. 1977. Studies on *Limulus* amebocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **152**: 2178
19. Takao, K., Chikanori, T., Mikio, S. and Takehiko, W. 1986. Biological and Chemical characterization of Lipopolysaccharide from *Selenomonas* sp. in human periodontal pockets. *Infect. Immun.* **51**: 969-971
20. Tietk, N.W. 1976. Fundamentals of clinical chemistry P569, 1059. W.B. Sunders Company, Philadelphia.
21. Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **5**: 83-91
22. Williamson, B., Carwell, E.A., Rubin. B.Y., Prendegasee, J.S. and Old, L.Y. 1983. Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 5379-5401
23. Yoshida, S.L., Midori, O. and Yasuo, M., 1985. Relation of capsular materials and coloby opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **47**: 446-451

(Received Feb. 22 1989)