J. Fd Hyg. Safety 15(1), 30–35 (2000)

대장균 내독소에 의한 토끼의 혈중 지질 및 cytokines 변화간의 상관성에 관한 연구

최석철† · 김재영 · 김태운 · 권헌영 · 황수명 · 최국렬* · 장동석 · 이원재*****

*지산대학 임상병리과, *인제대학 데이터정보학과, **부경대 식품공학과, ***부경대 미생물학과*

Relationship Between Changes of Lipids and Cytokines in *Escherichia coli* Endotoxin-induced Septicemic Rabbits

Seok-Cheol Choi†, Jai-Young Kim, Tae-Un Kim, Heun-Young Kwon, Soo-Myung Hwang, Kook-Lyeol Choi*, Dong-Suck Chang and Won-Jae Lee*****

Dept. of Clinical Pathology, Jisan College, Pusan 609-757, Korea

**Dept. of Data Science, Inje University, Kim Hae 621-7495, Korea*

***Dept. of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-731, Korea*

****Dept. of Microbiology, Pukyong, National University, Pusan 608-737, Korea*

ABSTRACT – To investigate the effects of bacterial endotoxin on lipids and cytokines, and to explain the relationships between their changes, we carried out this study using experimentally *Escherichia coli* (*E. coli*) endotoxin-induced septicemic rabbits. The triglyceride and cholesterol concentrations in endotoxin groups were generally high ($p<0.01$ or 0.05) at all sampling time points (from 3hr to 24 hr), while phospholipid concentrations in endotoxin groups elevated in dose-dependent fashion at 3hr and 6hr after endotoxin injection compared to control group ($p<0.05$). There were significant negative correlations between lipids changes and cytokines (TNF-α and IL-1β) each other ($p<0.05$), and endotoxic rabbits having higher triglyceride of cholesterol levels shown relatively better conditions compared with others. As a result, the alterations in the lipid compositions caused by endotoxin may imply an active exhibition of the host defense mechanism rather than the disturbances of lipid metabolism.

Key words □ Endotoxin, Rabbit, Lipid, Cytokines

내독소는 그람음성 박테리아의 세포 외막에 있는 지다당류(lipopolysaccharide) 성분으로 phospholipid-like lipid A domain에 의해 고정되어 있다.[1] 내독소는 그람음성 박테리아 감염에 의해 야기되는 다양한 숙주반응의 개시에 중요한 역할을 한다. 박테리아가 혈액이나 혈청에 노출되면 내독소는 박테리아의 표면으로부터 막조각, 막기포 또는 박테리아의 인지질과 지다당류의 혼합소포체 형태로 유리된다.[2-3] 이와 같이 분비된 내독소는 혈장전구체나 특정 세포(대식세포, 혈관내피세포, 호중구)를 자극하여 쇼크성 매개물질을 분비함으로써 전신 염증반응을 유도하게 되며 생체내 여러 대사계에도 영향을 미친다. 내독소에 대한 가장 초기적이고 일관된 대사반응중 한 가지는 triglyceride-rich very low density lipoprotein(VLDL)의 증가로 인한 혈장 중성지방 농도의 상승이다.[4] 이와 같은 내독소 기인성 지질대사계 성분의 변화는 순환 내독소의 독성 효과를 제거하기 위한 생체의 방어기작이라는 주장도 있고,[5] 내독소 투여로 인해 생성이 증가된 cytokine계의 전염증성(proinflammatory) 물질들이 lipoprotein lipase의 활성능 및 중성지방 제거능(clearance)을 감소시킴으로 인해 일어난 대사적 혼란으로 설명되기도 한다.[6]

본 연구는 지질 대사계에 대한 내독소의 영향을 특정 시간대 별로 조사하고, 내독소 투여로 인해 활성화된 cytokine 생성과 지질 대사계의 변화 간에 어떤 상관성이 있는지를 함께 규명하기 위해 전향적으로 수행되었다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

실험용 토끼

생후 약 8주된 New Zealand White 종 토끼 수컷으로서 평균 체중은 1.80 kg(1.7-1.9 kg)이었다(주. 대한 실험동물센터). 구입후 동물전용 사육실(온도 20-22℃, 습도 40-50%)에서 일주일간 순화 적응시킨후 실험에 사용하였다.

내독소

실험적 패혈증 유발을 위해 대장균으로부터 순수분리 정제된 내독소(Lipopolysaccharide; *Escherichia coli* serotype O55: B5, Sigma co., USA)를 구입하여 사용 전까지 냉장 보관하였다.

분석시약 및 기기

주) 중외제약에서 중성지방, 콜레스테롤, 인지질 분석용 표준 Kit를 구입하여 Autohumalyzer 900S(Automated clinical chemistry analyzer Co., Germany) 기기로 분석하였으며, cytokine 성분인 tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 interleukin-1β(IL-1β)는 표준 Kit인 TNF-α-IRMA와 IL-1β-IRMA (Biosource Co., Belgium)를 구입하여 γ-counter COBRA 5010 Quantum(Packard Co., U.S.A.) 기기로 분석하였다.

실험방법

내독소의 50% 치사량(50% lethal dose, LD50)

본 연구 목표중 하나가 내독소 기인성 지질대사계 및 cytokine 생성의 특정시간대별 변화양상을 함께 관찰하는 것이므로 적어도 내독소 투여후 24시간까지 치명적 패혈증 상태를 보이면서도 사망하지 않고 견뎌낼 수 있는 적정 내독소 투여량을 추정할 필요가 있었다. 따라서 Litchifield Wilcoxin 방법에 의해 24시간의 LD_{50}을 구한 결과 약 0.60 mg/kg였다.[7]

실험군의 분류 및 내독소 투여

구입한 토끼들을 연구목적에 따라 대조군, 0.10 mg/kg의 내독소투여군(Group A)과 0.50 mg/kg의 내독소 투여군(Group B)으로 분류하였고, 내독소 투여군들은 다시 채혈시간에 따라 3, 6, 12, 24시간으로 아그룹화하여 용량 및 시간의존성 변화양상을 관찰하였으며 각 그룹의 개체수는 6마리씩 하였다(Table 1). 내독소 투여용량은 상기한 LD_{50} 농도(약 0.60 mg/kg)에 근거하여 고용량(0.50 mg/kg)과 저용량(0.10 mg/kg)으로 결정하였다. 내독소 투여군을 시간대별로 독립된 실험군으로 분류한 이유는 토끼가 어리고 유약한 관계로 한 실험개체를 대상으로 여러 시간대별 연속적인 혈액채취가 어렵고 자칫 실험도중 사망의 우려가 있었기 때문이었다. 내독소는 실험 당일 pH 7.4의 멸균된 생리식염수에 0.10 mg/0.1 ml의 비율로 용해시킨 뒤 최소 6시간동안 금식시킨 토끼의 귀정맥을 통해 천천히 한번에 주사하였다.

Table 1. Classification of endotoxin-injected groups according to the dose of endotoxin administration and blood sampling time

Group	Dose (mg/kg)[a]	Time(hrs)[b]			
		3	6	12	24
Group A	0.10	$G\text{-}A_3$	$G\text{-}A_6$	$G\text{-}A_{12}$	$G\text{-}A_{24}$
Group B	0.50	$G\text{-}B_3$	$G\text{-}B_6$	$G\text{-}B_{12}$	$G\text{-}B_{24}$

a: Dose of injected endotoxin., b: Time of blood collection

혈액검체의 채취 및 분석

혈액검체의 채취는 마취상태 하에서 실시하였다. Ketamine을 10 mg/kg 농도로 둔부를 통한 근육주사후 토끼가 충분히 마취되었다고 판단되었을 때(주사후 약 10분) 앙와위 자세로 한 뒤 ether로 보조 흡입마취를 좀 더 시키면서 상복부 절개를 통해 심장을 직접 노출시켰다. 18게이지 바늘이 달린 30cc주사기로 토끼의 심실부위에 직접 찔러 채혈하여(30cc) 즉시 원심분리시켜 중성지방, 콜레스테롤, 인지질, TNF-α, IL-1β 등을 분석하였다.

자료의 분석 및 통계처리

실험결과들은 전문 통계프로그램인 SAS(version 6.03)를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다. General linear model procedure의 다중분산분석(MANOVA)을 실시하여 그룹간의 차이에 대한 통계적 비교검정을 실시하였고, 만일 그룹간에 유의한 차이가 인정되면 대비검정(contrast test)을 통해 다시 유의성을 확인하였다. 각 변수들 사이의 상관관계는 Pearson의 상관분석을 이용하였고 숫적 표현이 가능한 모든 자료들은 평균값±표준오차로 표시하였고 $p \leq 0.05$일 때 통계적 의미를 부여하였다.

결 과

중성지방 농도

중성지방 농도는 대조군의 경우 106.85±9.58 mg/dL였는데 비해, 내독소 투여군의 경우 $G\text{-}A_{12}$(102.17±10.49 mg/dL)을 제외하고는 모두 대조군보다 유의하게 높았다($p<0.05$, $p<0.01$, Fig. 1).

총 콜레스테롤 농도

총 콜레스테롤 농도는 모든 내독소 투여군이 시간 및 용

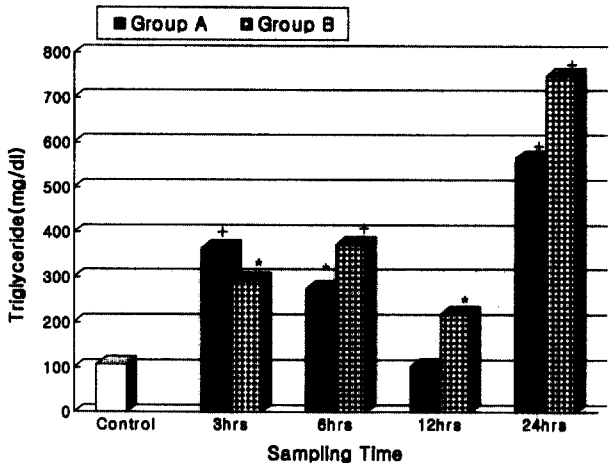

Fig. 1. Sequential change of triglyceride concentration, comparing between control group and each endotoxin-injected group
Group A, endotoxin 0.10 mg/kg injected group, Group B, endotoxin 0.50 mg/kg injected group, *$p<0.05$, $^{+}p<0.01$ compared with control.

량의존성으로 대조군(77.23±18.52 mg/dL)보다 의미있게 높았다($p<0.05$, Fig. 2).

인지질 농도

인지질 농도는 G-A_3, G-A_6, G-B_3, G-B_6이 대조군(6.03±0.16 mg/dL)보다 유의하게 높았으나($p<0.05$) 나머지 내독소 투여군들은 대조군과 차이가 없었다($p>0.05$, Fig. 3). 전체적인 변화양상도 내독소 투여후 6시간까지 시간 및 용량의존성이었다.

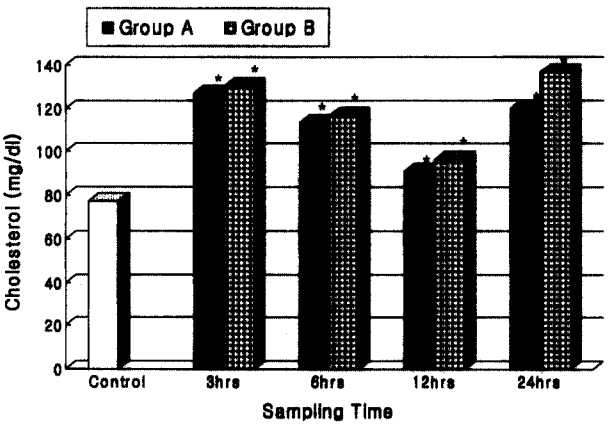

Fig. 2. Sequential change of cholesterol concentration, comparing between control group and each endotoxin-injected group
Group A, endotoxin 0.10 mg/kg injected group, Group B, endotoxin 0.50 mg/kg injected group, *$p<0.05$ compared with control.

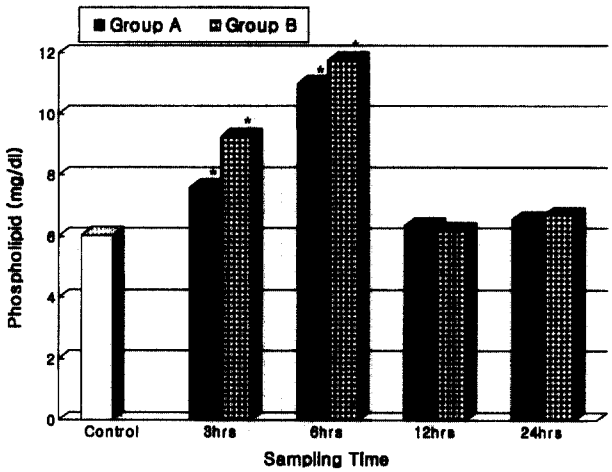

Fig. 3. Sequential change of phospholipid concentration, comparing between control group and each endotoxin-injected group
Group A, endotoxin 0.10 mg/kg injected group, Group B, endotoxin 0.50 mg/kg injected group, *$p<0.05$ compared with control.

Tumor necrosis factor-α(TNF-α)

TNF-α농도는 모든 내독소 투여군들이 용량 또는 시간의존성으로 24시간까지 대조군(0,63±0.11 pg/mL)보다 유의하게 더 높았다($p<0.05$ 또는 $p<0.01$, Fig. 4).

Interleukin 1β(IL-1β)

내독소 투여군들의 IL-1β농도는 용량 또는 시간의존성으로 24시간까지 대조군(1.52±0.14 pg/mL)보다 의미있게 높

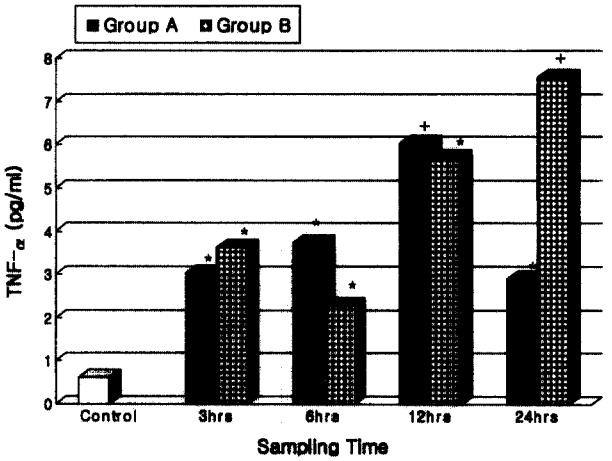

Fig. 4. Sequential change of TNF-α (tumor necrosis factor-α), comparing between control group and each endotoxin-injected group
Group A, endotoxin 0.10 mg/kg injected group, Group B, endotoxin 0.50 mg/kg injected group, *$p<0.05$, $^{+}p<0.01$ compared with control.

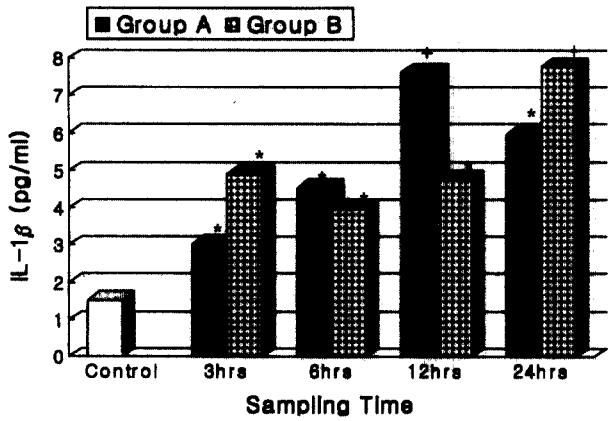

Fig. 1. Sequential change of IL-1β (interleukin 1β), comparing between control group and each endotoxin-injected group
Group A, endotoxin 0.10 mg/kg injected group, Group B, endotoxin 0.50 mg/kg injected group, *$p<0.05$, $^{+}p<0.01$ compared with control.

았다($p<0.05$ 또는 $p<0.01$, Fig. 5).

지질성분과 TNF-α 사이의 상관관계

모든 내독소 투여군의 중성지방, 총 콜레스테롤, 인지질 각각의 농도변화와 TNF-α사이에 여러 시간대에 걸쳐 유의한 음의 상관관계가 있었다(Table 2).

지질성분과 IL-1β 사이의 상관관계

모든 내독소 투여군의 중성지방, 총 콜레스토롤, 인지질 등 각각의 농도변화와 IL-1β 사이에 24시간까지 여러 시간대에 걸쳐 의미있는 음의 상관관계가 있었다(Table 3).

고 찰

세균의 독소를 이용한 시험관 및 동물실험 연구들은 세균성 패혈증으로 인한 생리학적 또는 병리학적 기전들을 규명하기 위해 시도되어 왔다. 특히, 그람음성 박테리아 내독소가 그와 같은 세균감염에 대한 숙주반응의 개시에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀지면서 대장균 내독소를 이용한 다양한 연구모델들이 보고되고 있다. 본 연구저자들은 그람음성 박테리아성 패혈증의 일부 병리학적 상황들을 이해하기 위해 대장균 내독소를 이용한 토끼모델을 연구하게 되었으며, 특히 내독소 기인성 지질계의 변화와 cytokine 활성간의 어떤 인과관계의 가능성에 연구 촛점을 맞추게 되었다.

세균감염에 대한 반응으로 고지혈증의 발생은 신체의 대사반응에 연료를 공급하기 위한 fat store의 mobilization을 의미한다는 제안과 함께 지질성분에 의한 내독소의 불활성화가 보고되었다.[8-11] Read 등[11]은 인위적으로 투여한 triglyceride-rich lipoprotein이 세균 내독소에 결합하여 독성을 중화시킴으로서 실험용 쥐의 생존율이 향상되었다고 보고하였다.

본 연구에서 분석한 지질대사 물질들의 농도는 내독소 투여 후부터 증가하기 시작하여 24시간까지 대부분 지속적 증가를 보였으며, 특히 중성지방 농도의 증가율이 가장 격심하였다. 또한 지질성분들과 TNF-α나 IL-1β간에 여러 시간대에 걸쳐 각각 유의한 음의 상관성을 나타낸 결과는 투여된 내독소에 대해 지질계가 숙주방어 기작에 있어 중요

Table 2. Relationships of TNF-α to lipid components in each endotoxin-injected group (Group A / Group B)

Parameter		TNF-α			
		3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
	3hr	①–0.68*/NS ②NS/NS ③–0.93*/NS			
	6hr		①–0.79*/–0.62* ②–0.85*/–0.72* ③ –0.67*/NS		
①TG ②T-CH ③PL	12hr			①–0.65*/–0.63* ②NS/–0.91* ③–0.77*/NS	
	24hr				①NS/–0.63* ②NS/NS ③NS/–0.68*

Values mean correlation coefficient, r value.
*, $p<0.05$; NS, not significant.
Abbreviation: TG, triglyceride; T-CH, total cholesterol; PL, phosholipid

Table 3. Relationships of IL-1β to lipid components in each endotoxin-injected group (Group A / Group B)

Parameter		IL-1 β			
		3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
	3hr	①-0.74*/NS ②NS/NS ③-0.68*/-0.73*			
	6hr		①-0.64*/-0.73* ②-0.63*/-0.68* ③NS/-0.77*		
①TG ②T-CH ③PL	12hr			①-0.63*/-0.70* ②-0.84*/-0.92* ③NS/NS	
	24hr				①NS/NS ②NS/-0.91* ③-0.68*/NS

Values mean correlation coefficient, r value.
*, $p<0.05$; NS, not significant.

한 역할을 수행할 수도 있다는 의미있는 시사점으로 판단된다. 매우 흥미로운 사실은 내독소 투여군들 중 이와 같은 지질 성분들의 농도가 높은 개체일수록 임상적으로 보다 덜 심각한 증세를 보였고, 반대로 임상적으로 매우 치명적인 패혈증 증세를 보인 토끼들의 혈중 지질농도는 상대적으로 낮았다는 점이다. 과거의 연구보고들은 고밀도 지단백(HDL), 저밀도 지단백(LDL), 초저밀도 지단백(VLDL) 그리고 chylomicron과 같은 혈장 지질성분들이 내독소에 결합할 수 있다고 제의하였다.[10,12-15] 지질성분에 대한 내독소의 결합은 TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 cytokine계 염증인자들의 생성과 방출을 유도하는 내독소의 생물학적 효과를 크게 감소시켜 줄 것이다.[16-17] Parker 등[18]은 reconstituted high-density lipoprotein과 다른 지단백 성분은 내독소에 대한 세포 수용기와 함께 경쟁하여 cytokine생성의 활성을 차단하며 지단백의 표면을 덮고 있는 phospholipid leaflet 속으로 내독소의 lipid A domain이 삽입됨으로써 지단백에 결합되며 이러한 삽입은 lipid A domain을 가리워서 cytokine생성의 활성에 필요한 내독소와 내독소 수용체간의 상호작용을 방해한다고 보고하였다.

한편, 내독소 투여에 따른 면역학적 측면에서 일어나는 변화를 보면, 혈류를 따라 전신을 순환하는 내독소는 조직내에 수없이 많이 존재하는 대식세포, 단구, 임파구, kupffer cell 등을 자극하여 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8와 같은 염증성 cytokine물질을 분비해 내게 된다. TNF-α는 발열원(pyrogen)으로 개체를 고열에 빠지게 하지만 다른 한편으로는 조직에 출혈성 괴사를 일으키거나 대사장애를 유도하고 마침내 허혈성 쇼크를 유도하여 간 급성기단백질 합성, 응고촉진, 심근기능억제, 저혈압 및 쇼크, TNF-α, IL-6, IL-8등의 생성 역시 자극한다.[19] 따라서 이러한 cytokine들이 개체를 치명적 상황에 빠트리는 전신성 염증반응과 여러 장기손상의 중요한 매개체가 된다는 점을 고려해볼 때 본 연구에서 관찰된 지질성분들이 TNF-α나 IL-1β와 의미있는 음의 상관성을 보였다는 사실은 의학적으로 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 즉 내독소 투여후 혈중 지질농도가 상대적으로 더 증가된 개체가 그렇지 않은 개체보다 내독소 기인성 패혈증에 더 저항성이 있을런지도 모르며 이는 내독소의 독성을 중화시키거나 불활성화시키는 지질성분 특유의 능력에 기인할 것이다.

결론적으로, 내독소 투여후 혈중 지질성분들의 농도증가는 내독소로 인한 지질대사계의 혼란이기보다 오히려 세균이나 독성물질의 체내 침투에 대한 숙주방어 시스템에 적극 참여하는 지질 대사계의 능동적 기작으로 보아야 한다.

국문요약

본 연구는 대장균 내독소로 실험적 패혈증을 유도한 토끼를 이용하여 지질성분과 cytokines에 대한 박테리아 내독소의 영향과 이 물질들 변화간의 상호 관련성을 조사한 결과이다. 내독소 투여군의 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 전 검체채취 시간대에서 대조군보다 대체적으로 높았다($p<0.01$ 또는 0.05). 내독소 투여군의 인지질 농도는 내독소 투여

후 3 및 6 시간대에 용량의존성으로 대조군보다 높았다($p<0.05$). Tumor necrosis factor-α(TNF-α)와 interleukin-1β(IL-1β) 농도는 모든 검체채취 시기에서 대조군보다 증가하였다($p<0.01$ 또는 0.05). 지질성분들의 변화와 cytokines(TNF-α나 IL-1β) 변화간에 유의한 음의 상관성이 있었으며($p<0.05$), 중성지방이나 콜레스테롤 농도가 보다 높았던 내독소 투여 토끼들이 그렇지 않은 토끼들보다 상대적으로 더 좋은 임상상태를 보였다. 본 연구결과는 내독소에 의한 지질성분들의 변화가 지질 대사계의 혼란이라기보다 숙주 방어기작의 능동적 작용일 수도 있음을 시사하고 있다.

참고문헌

1. Raetz, C.R., Ulevitch, R. I., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A. and Nathan, C. F.: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.*, **5**, 2652-2660 (1991).
2. Brandtzaeg, P., Bryn, K., Kierulf, P. and Jantzen, E.: Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *J. Clin. Invest.*, **89**, 816-823 (1992).
3. Seydel, U., Labischinski, H., Kastowsky, M. and Brandenburg, K.: Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology*, **187**, 191-211 (1993).
4. Feingold, K. R., Staprans, I., Memon, A. H., Moser, J. K. and Grunfeld, C.: Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemis: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. J. *Lipid Res.*, **33**, 1765-1776 (1992).
5. Feingold, K. R. and Rapp, J. H.: Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. J. *Clin. Invest.*, **86**, 696-702 (1990).
6. Grynfeld, C. and Feingold, K. R.: Regulation of lipid metabolism by cytocines during host defense. *Nutrition*, **12(1suppl)**, 24-26 (1996).
7. 이영순: 실험동물의학. 서울대학교 출판부, 서울, pp. 456-460 (1997).
8. Blackburn, G.: Lipid metabolism in infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 1321-1332(1977).
9. Cavana, V., Siegel, J. and Sabesin, S.: Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of p;asma lipids and apolipooroteins. *J. Lipid Res.*, **30**, 39-49 (1989).
10. Eichbaum, E.B., Harris, H.W., Kane, J.P. and Rapp, J.H.: Chylomicrons can inhibit endotoxin activity in vitro. *J. Surg. Res.*, **51**, 413-416 (1991).
11. Read, T.E., Grunfeld, C. and Kumwenda, Z.L.: Triglyceride-rich lipoproteins prevent septic death in rats. *J. Experi. Med.*, **182**, 267-272 (1995).
12. Emancipator, K., Csado, G. and Elin, R.: In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect. Immun.*, **60**, 596-601 (1992).
13. Freudenberg, M., Kleine, B. and Tialonos, C.: The Fate of lipopolysaccharide in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. *Rev. Infect. Dis.*, **6**, 483-487(1984).
14. Munford, R.S. and Dietschy, J.M.: Effects of specific antibodies, hormones, and lipoproteins on bacterial lipopblysaccharides injected into the rat. *J. Infect. Dis*, **152**, 177-184 (1985).
15. Munford, R.S., Hall, C.L., Lipton, J.M. and Dieschy, J.M.: Biological activity, Lipoprotein-binding behavior, and in vivo diposition of extracted and native forms of Salmonella typhimurium lipoplysaccharides. *J. Clin. Invest*, **70**, 877-888 (1982).
16. Beutler, B.A. and Cerami, A.: Recombinant interleukin-1 suppresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cell. *J. Immunol.*, **135**, 3969-3971 (1985).
17. Hopf, U., Ramadori, G., Muler, B. and Galanos, C.: Hepatocellular clearance function of bacterial lipopolysaccharides and free lipid A in mice with endotoxic shock. *Am. J. Emerg. Med*, **2**, 13-19 (1984).
18. Parker, T.S., Levine, D.M. and Change, J.C.C.: Reconstituted High-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect. Immun*, **63**, 253-256 (1995).
19. Ayres, S.M., Grenvik, A., Holbrood, R.R. and Shoemaker, W.C.: In Textbook of critical care, 3rd ed., W.B. Saunders Co., pp. 154-160 (1995).