J. Fd Hyg. Safety 21(4), 213–217 (2006)

비브리오 패혈증에 미치는 LDL의 영향

김종현 · 김종석[1,†] · 류완희[2] · 허 현[3]
전북대학교 병원 산부인과학교실, [1]전북 대학교 의과대학 생화학 교실,
[2]전북 대학교 병원 내과학 교실, [3]동국대학교 이과대학 미생물학 교실

The Effect of LDL on *Vibrio vulnificus* Septicemia

Jong-Hyeon Kim, Jong-Suk Kim[1], Wan-Hee Yoo[2], and Hyeon-Hur[3]
Department of Obstetrics & Gynecology, Chonbuk National University Hospital
[1]Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School
[2]Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Hospital
[3]Department of Microbiology, Dongkook University, College of Science
(Received November 20, 2006/ Accepted December 18, 2006)

ABSTRACT – The halophilic bacterium *Vibrio vulnificus* is known to be a foodborne pathogen that causes septicemia in human. *V. vulnificus* infection is characterized by the high fatality rates and the primary attack against a person who have underlying diseases such as liver cirrhosis. However, there is no effective treatment for *V. vulnificus* septicemia except for classical treatments such as antibiotics. Recently, it has been known that lipoprotein (LDL) plays a major role in the protection against infection and inflammation. Consequently in this paper we analyzed the effects of LDL on *V. vulnificus* septicemia. We purified *V. vulnificus* cytolysin, a major virulent factor of *V. vulnificus* infection and measured inhibitory effects of mouse serum, cholesterol, and LDL on its hemolytic activity. Next experiments were performed to investigate whether LDL has a protective role against septicemia induced by *V. vulnificus* in mice. Intraperitoneal injection of LDL (1 mg as protein) into mice 3hr before *V. vulnificus* (1×10^6 CFU) injection, and *V. vulnificus* -induced lethality was determined. For the determination the relationship between LDL or cholesterol and prognosis, we determined serum levels of cholesterol and lipoprotein from *V. vulnificus* septicemia patients (n=15) who had visited the Chonbuk National University Hospital in Chonju. *V. vulnificus* cytolysin –induced hemolysis of mice erythrocytes was completely inhibited by serum, cholesterol, and low-density lipoprotein. *V. vulnificus*- induced lethality of mice injected with LDL showed only 40% compared to 100% of control. In survival groups (n=4) of *V. vulnificus* septicemia patients (n=15), their serum LDL and cholesterol revealed normal levels (153.3±40.7, LDL; 190.8±16.3, Total cholesterol). However, in death groups (n=11) showed very low levels (35.6 ±13.9, LDL; 59.2±15.1, Total cholesterol). Our study indicates that cholesterol and LDL are a prognosis indicator of *V. vulnificus* septicemia as well as an inhibitor of virulent action of *V. vulnificus* cytolysin. We suggested that the serum levels of cholesterol or LDL would be major index in the treatment and prevention of *V. vulnificus* septicemia.

Key words: *V. vulnificus* septicemia, *V. vulnificus* cytolysin, Cholesterol, LDL

서 론

비브리오 불니피쿠스(*Vibrio Vulnificus*) 균에 의한 비브리오 패혈증은 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있는 어패류와 바닷물에 의해 감염되며, 간경화나 혈색소 침착증와 같이 면역 반응이 저하되어 있는 환자에서 높은 유병률을 보인다.[1] 우리 나라에서도 매년 비브리오 패혈증으로 많은 사람들이 사망하고 있어 심각한 보건 사회적 문제가 되어 왔다. 그러나 현재까지도 균 감염 시 나타나는 증상들의 병태생리기전이 확실히 밝혀지지 않고 있으며 따라서 효과적인 치료 및 예방 방법이 없는 실정이다.

감염증시 나타나는 여러 가지 임상 증상 및 실험을 통하여 얻어진 증거 자료들로 보아 cytolysin(hemolysin), protease 등 과 같은 외독소들이 비브리오 패혈증에 직접 또는 간접적으로 관여한다고 보고하고 있다.[2,3,4] 그리고 비브리오 패혈증이 간 손상 환자에서 특히 많은 발병을 보이는

†Author to whom correspondence should be addressed.

이유에 대해 아직까지 명확하게 구명되지 않았지만 혈중 철의 농도와 밀접한 연관이 있음이 여러 연구 결과를 통해 알려져 있다[5]. 체내 철분의 60%을 차지하고 있는 간이 손상되면 혈중 철분의 농도가 증가하여 비브리오 균의 치사력이 증가되었다고 보고하여 간 손상환자에서 비브리오 균의 패혈증이 높은 이유를 간접적으로 설명하였다. 이는 비브리오 균 감염 시 적혈구의 용혈을 통한 혈중의 철분의 농도 증가와 비브리오 균의 치사력이 아주 밀접한 연관이 있음을 시사한다. 따라서 지금까지의 여러 증거들로 보아 비브리오 패혈증의 독성인자는 바로 용혈인자 일 것으로 생각된다. 따라서 많은 연구가 독소 중에서도 특히 cytolysin은 강력한 용혈인자로서 혈관투과성을 증가시키고 강력한 치사활성 갖고 있어 국내외 많은 연구자들의 연구 초점의 대상이 되어 이 독소에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.[3] 본 연구실에서도 cytolysin에 대한 연구를 진행하여 cytolysin의 용혈작용 기전 및 폐부종을 통한 치사기전을 제시하는 등 많은 연구보고를 한 바 있다.[6-8]

최근의 비브리오 패혈증의 연구에서 cytolysin이 콜레스테롤에 의해 그 독작용이 특이적으로 억제된다고 보고되었다.[9] 또한 흥미롭게도 최근 혈중 콜레스테롤을 많이 포함하고 있는 저밀도 지단백질인 LDL (low density lipoprotein)이 세균감염증과 염증반응에 중요한 방어작용을 갖고 있음이 보고 되고 있다.[10] 이러한 결과들은 혈중 콜레스테롤이나 LDL이 세균감염증에 중요한 방어 인자임을 시사하여준다. 결과적으로 본 연구에서 비브리오 불니피쿠스 균으로부터 cytolysin을 정제하고, 사람의 혈액으로부터 LDL 등의 지질단백질을 추출하여 마우스에 주입하여 cytolysin의 용혈 활성 억제 정도와 사망률을 조사하고자 하였으며, 또한 실제 비브리오 패혈증환자의 혈액의 LDL수치가 환자의 병태진행에 어떠한 영향을 주는지 평가하고자 한다.

방 법

비브리오 불니피쿠스 균 배양 및 cytolysin 정제

본 연구에서 비브리오 불니피쿠스 E4125 균주는 미국 M. H. Kothary (Department of Microbiology, Virulence Assessment Branch, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, Washington D.C.) 박사로부터 분주 받아 사용하였다. 균 선택 배지인 TCBS agar에서 colony들을 Kreger 등의 방법에 따라 다시 100 mM TES (N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethamesulfonic acid)-NaOH 완충액 (pH 7.4)을 포함하는 heart infusion diffusate broth (HI)에 접종하고 배양하였다.[11] 배양 후 상청액에 존재하는 cytolysin을 Kim 등의 방법에 따라 ammonium sulfate fractionation, calcium phosphate gel adsorption, DEAE-cellulose chromatography, 및 Phenyl-Sepharose CL-4B chromatography을 거쳐 순수하게 정제하여 사용하였다.[6]

비브리오 불니피쿠스 cytolysin 용혈활성 측정

비브리오 불니피쿠스 균의 cytolysin의 활성은 마우스 적혈구의 용혈 정도를 이용한 Bernheimer 등의 방법을 응용하여 측정하였다.[12] 즉 cytolysin와 BSA (1 mg/ml)을 함유하는 phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.4) 용액 1 ml에 PBS로 여러 번 세척하여 미리 조제된 0.7% 마우스 적혈구 부유 액 1 ml를 가하고, 37°C에서 30분간 부치한 후 원심 시켜 상청액에 유리된 hemoglobin 농도를 545 nm에서의 흡광도로 측정하여 50%의 hemoglobin 유리를 일으킨 cytolysin의 양을 1 hemolytic unit (HU)로 정의하였다. 완전 (100%) 용혈은 saponin을 최종농도가 0.01%되게 하여 마우스 적혈구를 용혈 시킨 후 측정하였으며, 이 때 흡광도는 0.8정도였다.

Low density lipoprotein (LDL) 조제

LDL은 건강한 성인 혈청에서 Koo등의 방법을 응용하여 분리하였다.[13] 초원심분리기(Beckman, USA)의 swinging bucket rotor을 이용하여 100,000 rpm에서 15°C 20시간 원심 하였다. 파스퇴로 피펫을 이용하여 very low-density lipoprotein (VLDL)을 제거하고, infranatant 층을 회수하여 NaBr의 density가 1.063 g/ml되도록 다시 혼합한다. 그리고 다시 100,000 rpm에서 15°C 24시간 원심하여 LDL을 얻어 마지막에 PBS를 외액으로 24시간 4°C에서 투석하여 사용하였다.

비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 동물 독성실험

실험동물로 15-20 g 사이의 female BALB/c 마우스를 ㈜샘타코 Bio Korea(경기도 오산시) 에서 구입하여 사용하였다. 실험도중 실험동물은 특수 제작된 실험 동물실에서 관리하였으며, 자유식을 공급하였다. 마우스의 복강 내에 LDL 1mg (as protein) 주입한 3시간 후 복강 주사로 비브리오 불니피쿠스 균(1×10^6)을 주입 후 사망률을 관찰하였다.

비브리오 패혈증 환자에서 LDL 및 콜레스테롤 분석

2000-20003년까지 전북 대학 병원의 비브리오 패혈증 환자에서 생존한 환자와 사망한 한자의 혈청 콜레스테롤, LDL을 조사하였다.

통계분석

통계검사는 ANOVA test 및 Student's test 프로그램을 이용하였다. 본 연구에서 $p < 0.05$를 significant로 인정하였다.

결 과

비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 용혈 활성에 미치는 마우스 혈청, 콜레스테롤과 LDL의 영향

Lipoprotein은 감염 및 염증에 중요한 방어작용을 한다고 알려져 있다.[10] 따라서 본 연구자는 정제된 cytolysin의 용혈 활성에 미치는 마우스 혈청, 콜레스테롤 및 LDL의 영향을 관찰 하였다. 정제된 비브리오 불니피쿠스 cytolysin(0.5 HU)를 각 대조군(PBS), 10 uL 마우스 혈청, 1 mg LDL, 10 ug 콜레스테롤에 주입하여 37도에서 30분간 용혈 활성 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군은 20%, 마우스 혈청은 55%, LDL는 75%, 콜레스테롤은 91%정도 용혈 활성을 억제하였다. 모두 비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 용혈 활성을 억제하였고 특히 콜레스테롤과 LDL이 강하게 억제하였다(Fig. 1). 이런 결과로 콜레스테롤 및 LDL이 비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 강력한 억제 인자임이 확인되었다.

마우스 *in vivo* model을 이용하여 비브리오 패혈증에 LDL의 직접적인 영향 관찰

결과적으로 다음실험에서 본 연구자는 lipoprotein 이 직접 비브리오 불니피쿠스 감염에 보호작용을 하는지 확인하기 위하여 마우스 *in vivo* model을 이용하여 비브리오 불니피쿠스 감염에 대한 lipoprotein 의 방어작용을 관찰 하였다. 이 실험을 위하여 lipoprotein중에 콜레스테롤을 가장 많이 함유하고 있는 low density lipoprotein (LDL)을 이용하였다.

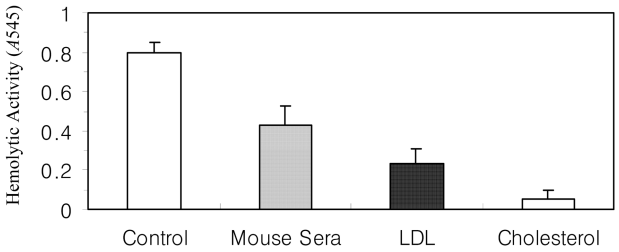

Fig. 1. Effect of cholesterol, LDL, and mouse serum on the hemolytic activity of *V. vulnificus* cytolysin. *V. vulnificus* cytolysin (0.5 HU) was incubated with the indicated materials (10 ml mouse serum, 1mg LDL, 10 mg cholesterol) 37°C for 30 min. Hemolytic activity was determined as described in "Materials and Methods". Each value denotes the mean ± SD for four experiments.

마우스 복강 내에 균 주입 3시간 전에 복강 내에 1 mg LDL를 투여하여 생존 율을 관찰하였다. 그 결과 **Fig. 15**에 표시 된 바와 같이 LDL은 비브리오 불니피쿠스 에 의한 사망률을 40%로 감소시켰다(Fig. 2).

비브리오 패혈증 환자에서의 혈청 LDL 및 콜레스테롤 분석

LDL이 비브리오 감염병의 강력한 억제자임이 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험을 통하여 밝혀져 본 연구자는 전북대학교 병원에 내원한 비브리오 패혈증으로 판명된 환자들의 혈액내의 lipoprotein 및 콜레스테롤 농도를 추적조사하였다. 비브리오 패혈증으로 입원 중인 환자 (15명)의 혈액 분석에서 정상 수준의 콜레스테롤 (190.8±16.3)과 혈청 지단백질 LDL (53.3±40.7)을 가진 환자는 모두 생존하였다(4명). 그러나 정상보다 낮은 수치 (35.6 ±13.9, LDL; 59.2±15.1, 콜레스테롤)를 보이는 환자는 사망하였다(11명)(Table 1). 이는 사람 혈중 lipoprotein 및 콜레스테롤이 비브리오 패혈증의 병태생리과정과 아주 밀접한 연관이 있음을 시사하였다.

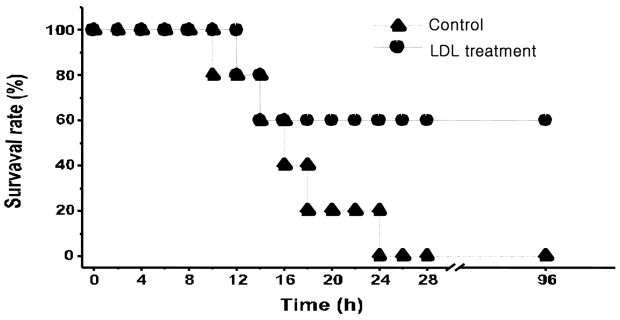

Fig. 2. Effect of LDL on *V. vulnificus* induced lethality of mice. LDL (1 mg) was intraperitoneally injected into mice before 3 h intraperitoneal injection of *V. vulnificus* (1×10^6 CFU). Survival was determined during the 96-h period after injection, after which no further loss of animals occurred (n=10). A Kaplan-Meier survival curve is shown.

Table 1. Lipid profiles in patients with *V. vulnificus* infection

	Lived	Dead	*p* Value
Number	4	11	
Sex (Male/Female)	4/0	7/4	
Age	55.0±16.3	59.2±15.1	0.65
Total cholesterol (<200 mg/dl)	190.8±40.0	71.7±15.7	0.0001
Triglyceride (< 200 mg/dl)	124.7±63.3	64.8±76.7	0.26
HDL-cholesterol (48.9-73.5 mg/dl)	26.3±13.6	20.4±8.12	0.38
LDL-cholesterol (<130 mg/dl)	155.3±40.7	35.6±13.9	.0001

Data were presented as mean ± standard deviation.

고 찰

세균의 exotoxin, endotoxin, peptidoglycans, lipoteichoic acids 등은 세균으로 인한 패혈증, 패혈성 쇽을 일으키는데 중요한 역할을 한다.[10,14-16] 그러므로 혈청 지 단백질인 LDL은 세포의 독소들의 활성을 막음으로써 항염작용을 한다고 한다. LDL이 황색 포도상 구균의 alpha-toxin를 불활성화 시킴으로써 방어 작용을 한다는 것은 이미 알려진 사실이다.[17] 이것은 혈청 지 단백질인 LDL이 세균 감염의 방어체제에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다. 이러한 연구 배경으로 실험한 이번 연구에서 혈청 LDL이 비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 용혈 활성을 약 75% 억제하였고 또한 비브리오 패혈증 마우스에 혈청 LDL를 주입한 결과 사망률이 40% 감소하였다는 것은 혈청 지 단백질인 LDL이 비브리오 패혈증에도 강력한 세균 방어 작용을 한다는 것을 시사한다고 볼 수 있다.

최근 또 다른 연구에서 콜레스테롤은 toxin oligomerization으로 비브리오 불니피쿠스 cytolysin를 불활성 시킨다는 보고가 있었는데 그것은 비브리오 불니피쿠스 cytolysin는 콜레스테롤 의존 cytolysin임을 시사하였다. 콜레스테롤 의존 cytolysin는 이미 잘 알려진 대로 많은 병적 세균에서 병을 야기하는 pore-forming 단백질 그룹이며 이것은 먼저 monomer로서 주세포에 세포 벽에 결합한 다음 후에 다른 monomer 또는 oligomeric complex들과 세포 표면에서 확산한다.[18] 그리하여 많은 연구에서 콜레스테롤 의존 cytolysin 분자와 콜레스테롤의 세포 결합이 toxin monomer의 oligomerization를 통해 독소 불활성을 야기한다고 보고하였다.[9]

결국 본 연구에서는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 콜레스테롤과 더불어 LDL이 비브리오 패혈증 방어하는데 영향을 줄 것으로 시사한다. 또한 근 4년간의 전북대학 병원 비브리오 패혈증 환자의 조사에서도 혈청 콜레스테롤과 LDL 정상 수치에 있는 사람은 모두 생존하였으나 반대로 정상보다 낮은 사람은 모두 사망하는 결과를 보였다. 이는 사람 혈청 콜레스테롤과 지 단백질 LDL 이 비브리오 패혈증 환자의 예후에 밀접한 관계가 있음을 보여준다. 즉 혈청 콜레스테롤과 지 단백질인 LDL이 비브리오 패혈증을 야기하는 비브리오 불니피쿠스 cytolysin를 강력히 억제하여 패혈증으로 인한 사망률을 감소시킨다는 것이다. 이 결과는 임상에서 패혈증의 예방과 치료에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

한편 우리 가정의학과 의사는 평소 건강 검진이나 혈액검사 시 특히 만성 간질환 환자에서는 혈청 콜레스테롤과 LDL를 검사하여 낮은 수치라면 식이요법과 알코올 금단 등으로 적정 수준의 수치를 유지하도록 하고 이러한 환자의 경우 여름에 회나 어패류 생식을 삼가는 등의 예방과 권고에 도움이 될 것이다.

국문요약

비브리오 불니피쿠스는 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있는 어패류와 바닷물에 의해 간경화 같은 만성 간질환 환자에 주로 감염되어 높은 치사율을 보이는 비브리오 패혈증을 일으킨다. 그러나 현재까지도 항생제 같은 대증적 요법 외 효과적인 치료 및 예방 방법이 없는 실정이다. 최근 혈중 LDL 같은 지단백질 이 감염 과 염증반응에 중요한 방어작용을 가지고 있음이 알려졌다. 따라서 LDL이 비브리오 패혈증에 영향을 미치는지 평가해 보았다. 비브리오 패혈증을 일으키는 비브리오 불니피쿠스 균을 배양하고, 대표적인 병태 인자인 비브리오 불니피쿠스 cytolysin를 추출하여 cytolysin의 용혈 활성에 혈청, 콜레스테롤 및 LDL의 영향을 조사하였다. 그리고 마우스에 직접 LDL를 복강 내 주입하여 혈중농도를 변화시킨 후 비브리오 불니피쿠스 균의 마우스 사망률을 조사하였다. 또한 전북 지역 대학 병원에서 비브리오 패혈증 환자에서 생존한 환자와 사망한 환자의 콜레스테롤과 LDL를 조사하였다. 비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 용혈 활성은 혈청, cholesterol 및 LDL에 의해 억제되었다. 비브리오 불니피쿠스 균의 마우스 사망률은 LDL을 주입한 경우 40%나 사망률이 낮게 나타났다. 전북 지역 대학 병원에 비브리오 패혈증으로 입원 중인 환자 (15명)의 혈액 분석에서 정상 수준의 콜레스테롤 (190.8±16.3)과 혈청 지단백질 LDL (53.3±40.7)을 가진 환자는 모두 생존하였다 (4명). 그러나 정상보다 낮은 수치 (35.6 ±13.9, LDL; 59.2±15.1, 콜레스테롤)를 보이는 환자는 사망하였다 (11명). 콜레스테롤과 LDL은 비브리오 불니피쿠스 cytolysin의 독작용의 억제 요소로서, 비브리오 패혈증의 예후에 중요한 요소임이 밝혀졌다. 또한 이는 콜레스테롤과 LDL이 비브리오 패혈증의 예방과 치료에 중요한 지표가 될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Blakes, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C.: Disease caused by a marine Vibrio. Clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.* **300,** 1-5 (1979).
2. Kreger, A.S. and Lockwood, D.: Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **33,** 583-590 (1981).
3. Gray, L.D. and Kreger, A.S.: Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **48,** 62-72 (1985).
4. Miyoshi, S. and Shinoda, S.: Role of the protease in the permeability enhancement by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Immunol.* **32,** 1025-1032 (1988).
5. Wright, A.C., Simpson, L.M. and Oliver, J.D.: Role of iron in the pathogenesis *of Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* **34,** 503-507 (1981).
6. Kim, HR., Rho, HW., Jeong, MH., Park, JW., Kim, JS., Park, BH., Kim, UH. and Park, SD.: Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*. *Life Sci.* **53**, 571-577 (1993).
7. Kim, HR., Park, SD., Park, JW., Jeong, MH., Kim, JS. and Park, BH.: Purification and characterization of cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Kor. J. Biochem.* **24,** 7-12 (1992).
8. Park, JW., Ma, SN., Song, ES., Chae, MR., Park, BH., Rho, HW., Park, SD. and Kim, HR.: Pulmonary damage by *V. vulnificus* cytolysin. *Infect. Immun.* **64,** 2873-2879 (1996).
9. Kim, BS. and Kim, JS.: Cholesterol induces Oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytolysin specifically. *Exp. Mol. Med.* **34,** 239-242 (2002).
10. Canturk, N.Z., Canturk, Z., Okay, E., Yirmibesoglu, O. and Eraldemir, B.: Risk of nosocomial infections and effects of total cholesterol, HDL cholesterol in surgical patients. *Clin. Nutr.* **21,** 431-436 (2002).
11. Kreger, A.S., Kothary, M.H. and Gray, L.D.: Cytolytic toxins of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio damsela*. *Methods Enzymol.* **165,** 176-189 (1988).
12. Bernheimer, A.W. and Schwartz, L.L.: Isolation and composition of *staphylococcal* alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* **30,** 455-468 (1963).
13. Koo, BS., Lee, DS., Yang, JY., Kang, MK., Sohn, HS. and Park, JW.: Lipoprotein lipase-mediated uptake of glycated LDL. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33,** 148-154 (2000).
14. Delgado-Rodriguez, M., Medina-Cuadros, M., Gomez-Ortega, A., Martinez-Gallego, G., Mariscal-Ortiz, M., Martinez-Gonzalez, M.A. and Sillero-Arenas, M.: Cholesterol and serum albumin levels as predictors of cross infection, death, and length of hospital stay. *Arch. Surg.* **137,** 805-812 (2002).
15. Parker, TS, Levine, DM, Chang, JC, Laxer, J, Coffin, CC. and Rubin, AL.: Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect. Immun.* **63**, 253-258 (1995)..
16. Netea, M.G, de Bont N, Demacker, P.N., Kullberg, B.J., Jacobs, L.E., Verver-Jansen, T.J., Stalenhoef, A.F. and Van der Meer, J.W.: Lipoprotein(a) inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human mononuclear cells. *Infect. Immun.* **66**, 2365-2367 (1998)..
17. Fussle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Tranum J.J. and Kranz, T. & Wellensiek, H.J.: On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* α-toxin. *J. Cell Biol.* **91,** 83-94 (1981).