

S. abortus 유래 LPS와 *E. coli* 유래 LPS에 의한 패혈증성 속 유도 작용 비교

조재열 · 유은숙*#

강원대학교 BT학부대학 생물소재공학전공 및 생명공학연구소, *제주대학교 의과대학
(Received December 19, 2006; Revised December 29, 2006)

Differential Induction of Septic Shock by Lipopolysacchrides from *E. coli* and *S. abortus*

Jae Youl Cho and Eun Sook Yoo*#

School of Bioscience and Biotechnology and Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
*College of Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract — Acute septic shock is one of inflammatory diseases mediated by pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α . In this study, we examined the pathological difference and mechanism of lipopolysaccharides isolated from *E. coli* (E-LPS) or *S. abortus* (S-LPS) on inducing acute septic shock in ICR mouse. All mice were died by intraperitoneal treatment of S-LPS with 0.75 mg/kg, whereas E-LPS treated with even 3 mg/kg only showed 30% of mice lethal, indicating that S-LPS may be more feasible in triggering a strong septic shock condition. The secretion pattern of TNF- α , a critical pro-inflammatory cytokine in septic shock condition, was also distinct between E-LPS- and S-LPS-treated groups. Thus, S-LPS strikingly increased serum level of TNF- α (6 ng/ml) at 1 h, while E-LPS just displayed at 2 ng/ml level. However, the interaction of S-LPS with LPS receptor, toll like receptor (TLR)-4, was not stronger than that of E-LPS, according to experiments with macrophage cell line RAW264.7 cells. Thus, E-LPS rather than S-LPS strongly enhanced the production of TNF- α . Interestingly, S-LPS more strongly up-regulated splenocyte proliferation, compared to E-LPS group, whereas there was no difference between S- or E-LPS treated groups in proliferation of Balb/c- or C57BL/6-originated splenic lymphocytes. Therefore, our data suggest that S-LPS is a more active endotoxin and that the strong septic shock-inducing effect of S-LPS seems due to the enhancement of early TNF- α production and S-LPS-sensitive lymphocyte proliferation.

Keywords □ Septic shock, LPS type, TNF- α , NO, splenic lymphocyte proliferation

급성 패혈증성 속은 치사율이 높은 대표적인 면역세포 매개성 질환이다. 특별히 이들 질환의 발생은 그람음성 감염균으로부터 방출된 LPS에 의해 간 대식세포(macrophage)인 Kupffer cell 이 자극을 받음으로써 분비되는 TNF- α 에 의해 주로 매개되는 것으로 보고되는데,¹⁾ 이때 분비된 TNF- α 는 혈액내 polymorphonuclear leukocyte(PML)을 자극하여 adhesion molecules의 생성을 촉진하고 간조직내로 이동하게 한다.^{2,3)} 이때 PML은 coagulation system과 활성산소 및 활성질소를 생성하여 간세포의 파괴를 유도하고, 결국 간장해에 이르게 한다.^{1,4,5)} 또한 이와 같은 과정에 의해 심하게 간세포가 파괴될 경우, endotoxin-

mediated liver injury는 계속해서 생성되는 LPS를 중화시키지 못하고,⁶⁾ septic shock과 같은 치사율이 높은 질환으로 전환되어 생명을 잃게 하는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 이런 이유로 초기 병인 유발물질인 TNF- α 의 저해제 투여시 급성 패혈증성 속 현상이 현저히 감소하는 것으로 알려져 있다. 많은 사람들이 이들 질환을 통해 사망하므로, 전 세계적으로 패혈증성 속 치료제 개발에 박차를 가하고 있다. 특별히 탁월한 치료제 후보군으로서, TNF- α 에 대한 단세포 항체(monoclonal antibody)류, protein tyrosine kinase 저해제 및 phosphodiesterase 저해제 등이 알려져 있으며, 이들 후보 물질들은 공통적으로 강력한 TNF- α 억제 효과가 보고되어져 있다.^{11,12)}

패혈증성 속 치료제 개발을 위한 동물실험 모델은 그람 음성균으로부터 생성되는 lipopolysaccharide(LPS)의 단독 혹은 이들 물질과 D-galactosamine(D-GalN) 및 CCl_4 와 같은 간 독성 유

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 064-754-3847 (팩스) 064-702-2687
(E-mail) eunsyoo@cheju.ac.kr

발 물질과의 병용투여 방법을 이용하여 진행하고 있다.¹³⁾ 여러 가지 간독성 유발물질이 패혈증성 속 모델에 중요한 병인 유발 인자로 사용되지만, 치사와 관련된 중요한 병리적 작용은 LPS에 의해 유래되는 것으로 알려져 있다. 본 연구 그룹에서는 패혈증성 속 모델에서 치료효과가 뚜렷한 여러 가지 TNF- α 저해제 개발을 시도하는 과정에서 LPS의 오리진 및 관련 동물(생쥐 혹은 흰쥐)의 계통 선택이 약물 평가시 매우 중요한 요인이 될 수 있다는 것을 확인한 바 있다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 두가지 다른 type의 LPS를 ICR 및 C57BL/6 생쥐에서 치사 효과 및 치사효과 유발 기전에 관한 몇가지 실험들을 진행하여 차후 관련 약물 개발시 사용될 동물모델의 이용에 관한 기본 자료를 제시하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험재료

Pentoxifylline(PTX), prednisolone, L-cycloserine, *E. coli* (0111:B4)유래 LPS(E-LPS), *S. abortus equi* 유래 LPS(S-LPS), concanavalin A 및 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma(USA)로부터 구매하여 사용하였으며, leflunomide 유도체인 A77,1726은 대웅제약 합성연구팀에서 합성된 것을 이용하였다. Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 ATCC(USA)로 부터 구입하여 실험하였다. 또한 세포배양시 사용된 RPMI 1640 및 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사(USA)로부터 구입하였다. 그의 사용된 모든 시약은 특급이상 및 Sigma제품을 이용하였다. 초자의 경우 24 well plate는 Falcon사(USA) 제품을, TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 Amersham Life Science Co(Arlington Heights, U.K.) 사로부터 구입하여 정량에 이용하였으며 ELISA reader로는 Spectramax 250 microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.)를 사용하였다.

TNF- α 정량

In vivo 법 - 절식된 ICR 생쥐에게 각 각 표시된 농도로 조제된 LPS를 복강에 투여한 후, 각 시간별로 채혈 후, 원심분리를 통해 혈청을 얻었다. 혈청내로 유리된 TNF- α 의 양은 TNF- α ELISA kit를 이용하여 결정하였다. TNF- α 의 정량은 mouse TNF- α ELISA kit를 이용하여 정량하였다. TNF- α 의 정량한계는 5 pg/ml 이하였으며 standard TNF- α 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

In vitro 법 - Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml)과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18

시간 동안 배양하였다.¹⁴⁾ 이후 배지를 제거하고 500 μ l의 LPS (최종농도 1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 배양 배지를 원심 분리(12,000 rpm, 3분간)하여 상층액을 얻고 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다.

Nitric oxide의 정량

배양 배지에서의 nitric oxide 정량은 Cho 등의 방법¹⁴⁾으로 RAW264.7 세포(2×10^6 cell/ml) 및 splenocytes(5×10^6 cell/ml)를 이용하여 실시하였다. 배양 배지 100 μ l과 Griess시약[5% (v/v) phosphoric acid 용액 내 1% (w/v) sulfanilamide 및 0.1% (w/v) naphthylethylenediamide] 100 μ l를 혼합한 후 상온에서 10분 동안 방치한 후에 발색된 정도를 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 표준 정량곡선은 sodium nitrite를 적정한 농도로 희석하여 동일 방법으로 흡광도를 측정한 후 완성하였다.

Lymphocyte 증식 정량

E-LPS 및 S-LPS 간의 splenocyte 증식효과 비교실험을 다음의 방법으로 실시하였다.¹⁴⁾ ICR, Balb/c 및 C57BL/6 생쥐로 부터 무균조작으로 비장을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 5×10^6 cell/ml 농도로 96 well plates에 접종하였다. 여러 농도의 LPS를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. Lymphocyte 분열증식은 MTT assay로 확인하였다.

MTT assay에 의한 세포 증식 평가

LPS 처리 48시간 후, MTT 용액(5 mg/ml) 20 μ l를 첨가하고 다시 4시간 동안 동일 조건에서 배양하였다.¹⁴⁾ 발색은 30% SDS 용액을 첨가하여 유도하였으며¹⁵⁾ 흡광도는 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

통계처리

각 data는 paired Student's *t*-test를 이용하여 실시하였으며 *p* 값이 0.05 이상일 때 유의성 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

패혈증성 속은 현재 암환자나 면역이 약한 소아 및 노인 인구 사망률의 75%를 차지하는 주요 병적 상황이며, 이러한 패혈증성 속의 대부분(약 70%)은 그람-음성 균의 내독소에 의한 것

으로 알려져 있다. 결과적으로 분비되는 여러 가지 염증성 사이토카인이나 세포독성 물질에 의한 여러 장기의 손상에서 기인되는 급성염증 질환으로 볼 수 있으며, 세균 감염에 기인하는 점에서 전신염증반응증후군(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)과 용어적으로 구별된다. 전세계적으로 많은 연구그룹들이 패혈증성 속을 치료하기 위한 치료제 개발연구에 집중하고 있다. 현재까지 개발되고 있는 대표적인 약물들은 surfactin C, YS-51 및 JTE-67 등이다.¹⁶⁻¹⁸⁾

Sanchez Crespo 그룹은 *Brucella abortus* 및 *Brucella melitensis*에서 유래된 smooth LPS 및 lipid A가 *E. coli* 유래 LPS 보다 낮은 대식세포 반응성을 보인다고 보고¹⁹⁾ 하면서, 각 세균으로부터 유래된 내독소와 같은 병원성 물질들이 패혈증성 속의 유도에 결정적인 역할을 수행한다고 알려져 왔다. 본 연구에서도 두가지 다른 그림 음성균 유래 내독소의 패혈증성 속 유도에 관한 작용들을 몇가지 다른 계통의 생쥐들을 이용하여 치사 유도 정도를 비교하여 보았다.

Septic shock model에서 E-LPS 및 S-LPS의 생쥐 치사 효과

*S. abortus*에서 유래된 각각의 LPS를 생쥐 당 0.75부터 3 mg씩(E-LPS) 혹은 0.19 부터 0.75 mg씩(S-LPS) ICR의 복강에 주사하고 날마다 내독소에 의한 패혈증 유발 정도(치사량)를 3일간 관찰하였다. Table I에서 보여지 듯, S-LPS는 0.75 mg에서는 6마리 모두가 24시간 안에 사망하였으며, 0.375 mg은 48시간 안에 그리고 0.19 mg은 76시간에 50%를 치사시키는 것으로 나타났다. 반면에 E-LPS는 고농도(3 mg/mouse)에서 6마리 중 2마리만을 치사시켰을 뿐 그 이외 농도에서는 전혀 ICR 생쥐의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 본 결과로 볼 때, S-LPS는 E-LPS보다 더 강력한 치사모델 유발 내독소로 사료된다. 특별히 이들 치사 작용은 ICR 생쥐에서 뚜렷이 관찰되었으며, C6BL/6 및 Balb/C에서는 패혈증성 속 현상이 현저히 감소되었기 때문에 (data not shown), 왜 이런 차이가 발생되었는지에 관한 증거들을 얻기 위해 ICR 생쥐를 이용한 연속된 실험을 진행하였다.

생쥐 모델에서 E-LPS 및 S-LPS에 의한 TNF-α 분비 효과

우선 E-LPS와 S-LPS간의 뚜렷한 치사 유발 효과 차이를 규

Table I - Effect of E-LPS or S-LPS on the septic shock-mediated mouse lethality

Day	Lethality (death/total)					
	E-LPS (mg/mouse)			S-LPS (mg/mouse)		
	0.75	1.5	3	0.1875	0.375	0.75
0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
1	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	6/6
2	0/6	0/6	0/4	1/4	4/4	
3	0/6	0/6	0/4	0/3		

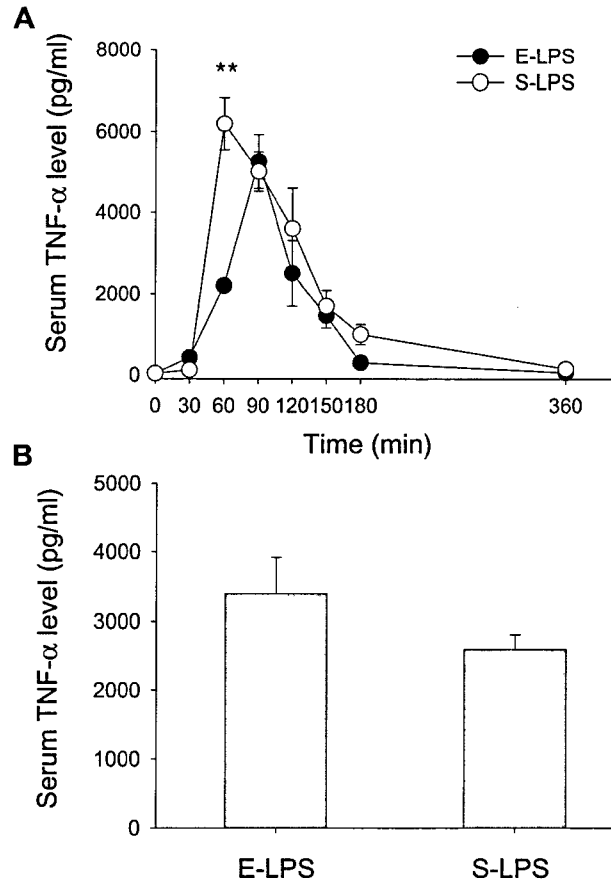


Fig. 1 - The serum level of TNF-α in E-LPS or S-LPS-treated ICR mice. Fasted mice [(A) ICR and (B) C57BL/6 mice] were intraperitoneal injected with E-LPS or S-LPS (1 mg/kg). After indicated times (ICR mouse) or 1 h (C57BL/6), blood was collected and serum samples were used to measure TNF-α levels by an ELISA kit. Data are expressed as the mean±S.D. of 6 animals. **p<0.01 represents significant difference compared to the same time point between S-LPS and E-LPS groups.

명하기 위해, 패혈증성 속의 주요 원인 물질로 알려진 TNF-α의 혈청내 분비정도를 측정 파라미터로 하여 이들 LPS에 의한 유도효과를 확인하여 보았다. 흥미롭게도, Fig. 1A는 E-LPS와 S-LPS간의 TNF-α 분비 정도가 다소 차이가 나고 있음을 보여주고 있다. 즉, 혈청내 TNF-α 분비량으로써, S-LPS는 약 6 ng/ml 정도를, E-LPS는 5.3 ng/ml의 정도를 분비한 것으로 나타나 S-LPS에서 더욱 많은 양의 TNF-α가 분비된 것으로 확인되었다. 특별히, 두 LPS간에는 서로 다른 분비곡선 형태를 보여 주었다. 즉, S-LPS는 최고 분비량이 한시간에서, E-LPS는 1시간 30분에서 각각 확인되었다. 또한, 한시간에서의 TNF-α 분비량은 두 LPS간에 뚜렷한 차이를 보여주었으며, S-LPS에서 4배 정도 높은 6 ng/ml를 나타냈다. 반면에, 두 LPS 그룹간에 패혈증성 속 치사에 있어서 유의적인 차이를 보이지 않았던 C57BL/6 생쥐에서, 두 LPS 처리에 의한 TNF-α 분비정도를 조사하여 Fig. 1B

에 제시하였다. 이들 두 LPS는 ICR 생쥐의 1/2 정도 수준인 2.5에서 3.5 ng/ml 정도의 낮은 분비효과를 나타냈으며, 이들 두 그룹간은 통계적으로는 유의적이지 않았다. 따라서 본 결과로 미루어 볼 때, ICR 생쥐에서의 높은 패혈증성 속 치사율은 기존에 보고된 것과 동일하게 상대적으로 증가된 TNF- α 분비량과 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. 이 외에도 interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-12 및 interferon- γ 등이 패혈증과 관련된 사이토카인으로 보고되고 있기 때문에 이들에 대한 관련성은 차후에 더욱 진행할 예정이다.²⁰⁾

대식세포 암세포주(RAW264.7 cells)에서 TNF- α 분비효과 LPS는 LPS-binding protein과 함께 대식세포 표면에 CD14에

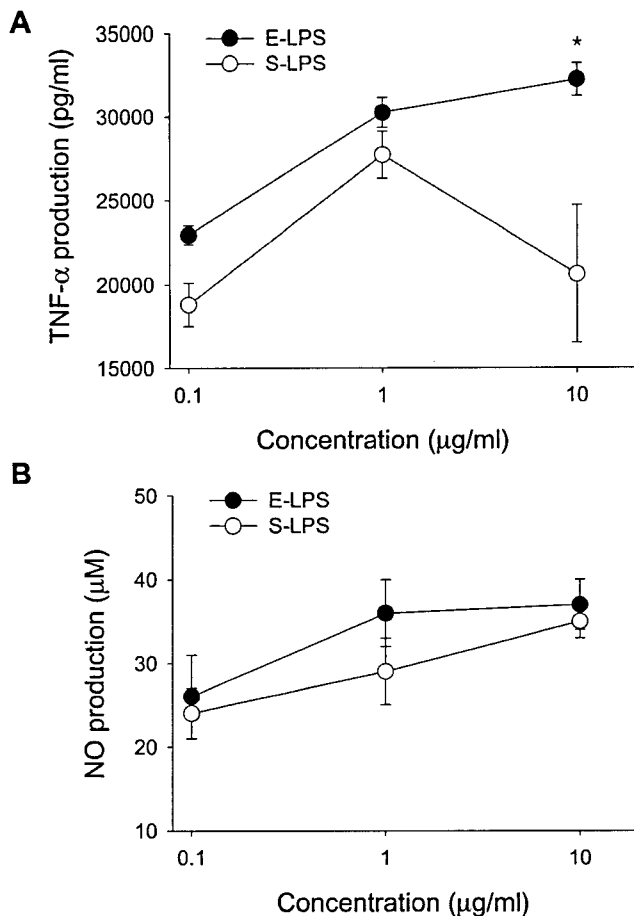


Fig. 2 – The effect of E-LPS or S-LPS on the production of TNF- α and NO from RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated by indicated concentrations of E-LPS or S-LPS for 6 h [(A) TNF- α production] or 24 h [(B) NO production]. Culture supernatants were then collected to determine the level of TNF- α or NO by an ELISA or a Griess assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5). **p<0.01 represents significant difference compared to the same concentration point between S-LPS and E-LPS groups.

결합하여 최종 수용체인 toll like receptor(TLR)-4에 결합하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 특별히 관련 신호전달 체계 중 TLR-4의 extracellular domain과 분자적 친화성을 가지고 있는 MD-2라는 물질이 이들 작용에 절대적으로 중요하다고 보고된 바 있다.²²⁾ 상기에서 얻어진 S-LPS에 의한 TNF- α 분비 항진효과가 단순히 TLR-4와의 높은 친화성에 의해서 기인되는지를 조사하기 위하여, *in vitro* 시험법에 많이 사용되는 대식세포주인 RAW264.7 세포를 이용하여 NO 생성 및 TNF- α 분비 정도를 비교하여 보았다. Fig. 2에서 확인할 수 있듯이, 두 LPS간에 대식세포 반응성은 패혈증성 속모델 결과와는 상이한 현상을 보였다. 즉 TNF- α 의 경우, S-LPS는 E-LPS보다 동일 농도에서 낮은 TNF- α 생성 정도를 보였으며, 이와 같은 경향은 NO 생성정도에서도 유사하게 확인되었다. 즉 통계적으로는 유의적이지 않지만, 전체적으로 E-LPS가 S-LPS보다 더 높은 NO 분비수준을 보였다. 따라서 본 결과로 미루어 볼 때, 대식 암세포주인 RAW264.7 세포에서의 LPS 효능은 S-LPS보다는 E-LPS가 더 뛰어난 것으로 판단되었다. 이는 ICR 생쥐에서의 높은 치사율 유도 효과는 S-LPS가 가지는 수용체 TLR-4간의 상호작용에서 기인된 것이 아니고, 그 외 다른 요인에 의한 효과가 있음을 시사한다고 하겠다. 체내 동태 관점에서 대상 생쥐가 갖는 LPS의 분포 및 대사능²³⁾ 이나 혹은 LPS 수용체를 이용한 면역세포와의 반응성 관점에서 대상 면역세포와의 상호작용 등이 LPS에 의한 패혈증 유도시 주요 요인들로 고려된다. 본 결과는 대상 생쥐 내에서 각 LPS간의 체내 동태 차이점 관점에서 ICR 생쥐에서의 효과를 해석하는 것이 더 설득력 있는 방법으로 사료된다. 따라서 ICR 생쥐에서의 분포 및 대사능 관련 실험들을 추가적으로 진행할 예정이다. 한편 대조약물로 사용된 pentoxifyllin 및 prednisolone은 이전에 보고¹⁴⁾ 한 바와 같이 각각 263 및 49 μ M의 IC₅₀ 수치를 보이면서 TNF- α 생성을 억제하였다(data not shown).

ICR 생쥐 유래 splenocyte로부터 LPS-민감성 lymphocyte 분열 효과

S-LPS에 의한 높은 패혈증성 속 치사율 기전 확인을 위해 LPS가 보이는 면역능 중 하나인 B 세포 증식 효능을 ICR 생쥐 유래 splenocyte로부터 확인하여 보았다. 또한 C57BL/6와 Balb/C 유래 splenocyte를 이용하여 각 결과들을 비교 하였다. Fig. 3A는 흥미롭게도 S-LPS가 E-LPS 보다 높은 splenic B 세포 mitogenic effect가 있음을 보여주었다. 그러나 이와 같은 두 LPS간의 차이는 패혈증성 속 현상이 크게 발생되지 않았던 Balb/C와 C57BL/6에서는 확인되지 않았다(Fig. 3B and C). 따라서 본 결과로 미루어 볼 때, ICR 생쥐에 있는 비장 유래 B 세포 중에는 S-LPS에 대해 반응성이 큰 세포집단이 있는 것으로 판단된다. 물론 패혈증성 속 모델에서 B 세포의 역할에 관한 연구는 많이 진행되어 있지 않지만, secretory leukoprotease inhibitor라

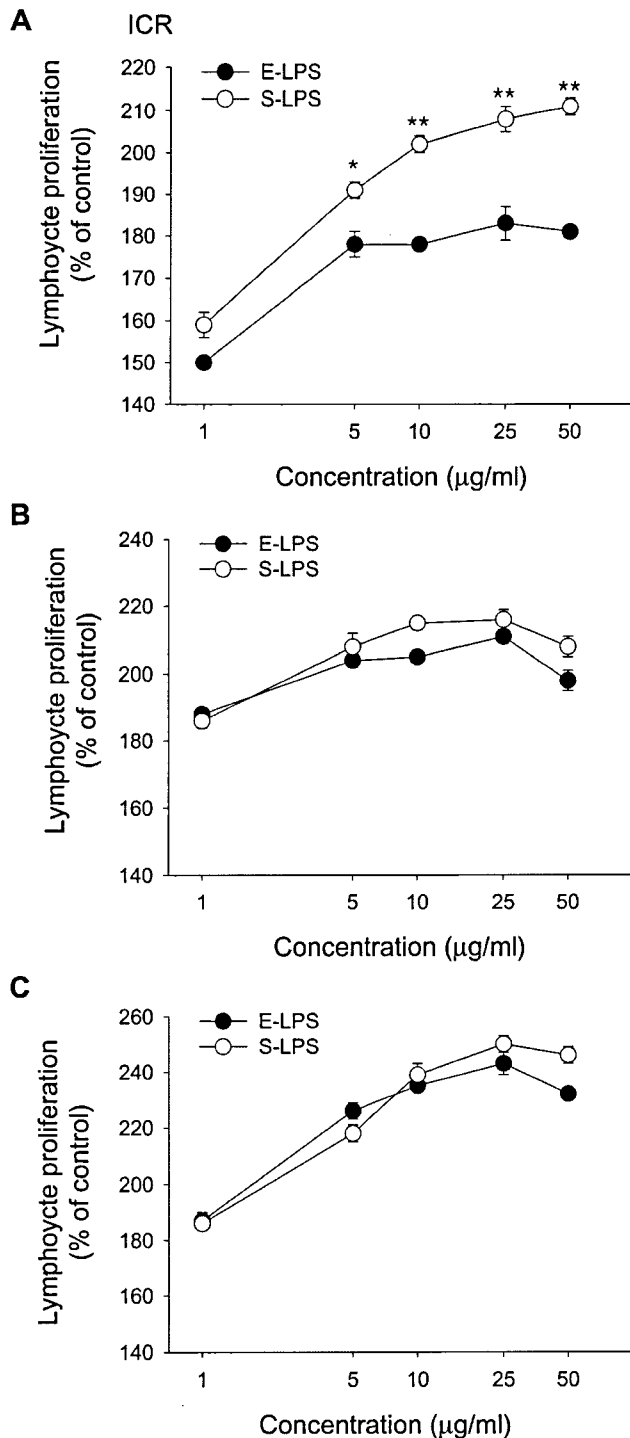


Fig. 3 – The effect of E-LPS or S-LPS on the proliferation of splenic lymphocytes prepared from ICR (A), Balb/C (B) and C57BL/6 (C). Splenocytes (5×10^6 cells/ml) were stimulated by indicated concentrations of E-LPS or S-LPS for 48 h. The extent of splenocyte proliferation was assessed by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ represent significant difference compared to the same concentration point between S-LPS and E-LPS groups.

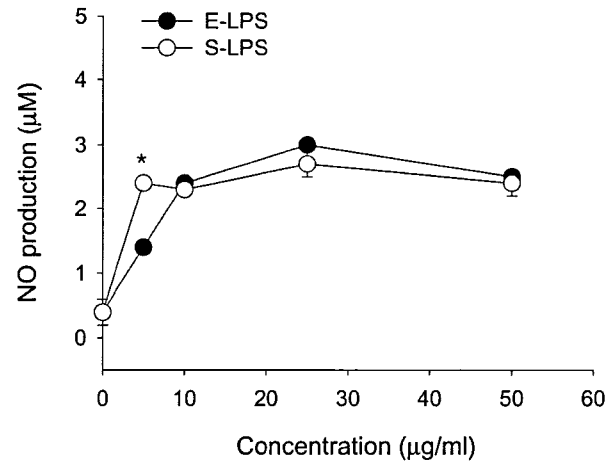


Fig. 4 – The effect of E-LPS or S-LPS on the production of NO from ICR mouse splenocytes. Splenocytes (5×10^6 cells/ml) were stimulated by indicated concentrations of E-LPS or S-LPS for 24 h. Culture supernatants were then collected to determine the level of NO by Griess assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5). * $p < 0.05$ represents significant difference compared to the same concentration point between S-LPS and E-LPS groups.

는 단백질의 결합시 LPS에 의해 과도하게 활성화된 B cell들이 패혈증성 질환유도에 매우 중요한 병리적 역할을 수행하는 것으로 확인²⁴⁾ 됨에 따라, B 세포들의 역할에 새롭게 주목하고 있는 실정이다. B cell 매개에 의한 면역반응은 adaptive immunity에 속하면서, 주로 항체를 매개로 하는 체액성 면역반응을 유도하므로, LPS에 의해 증가된 LPS-민감성 B 세포 집단을 이용한 관련 면역학적 특징들을 차후에 비교 분석할 예정이다.

실험 대조군으로 사용된 A77,1726 및 L-cycloserine은 concanavalin A($1 \mu\text{g/ml}$) 처리시 얻어진 lymphocyte 증식 정도를 6.7 및 $4.8 \mu\text{M}$ 농도의 IC_{50} 수치를 보이면서 농도 의존적으로 억제하였다(data not shown).

ICR 생쥐 유래 splenocyte의 LPS 처리시 NO 분비 효과

또한 B cell에 관한 반응성이 비장내 대식세포의 활성화에서 기인하는지를 확인하기 위해, 비장 splenocyte로부터 E-LPS 및 S-LPS에 반응한 NO 분비 효과를 확인하였다. Fig. 4에서 확인할 수 있듯이, 비장유래 세포로부터 LPS에 의한 NO 분비 정도는 두 LPS간에 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 ICR 생쥐에서의 E-LPS와 S-LPS 차이는 대식세포의 활성화에서 기인된 것이 아니라는 것을 시사한다고 하겠다.

결론

ICR 생쥐를 이용한 패혈증성 속 모델에서 두가지 다른 그림을

성균에서 유래된 내독소(E-LPS 및 S-LPS)를 이용하여 패혈증 유발에 의한 치사율과 그 기전을 비교분석하여, 다음과 같은 결론을 얻었다. 1) S-LPS는 E-LPS 보다 ICR 생쥐에서 높은 치사율 유도 효과를 보였다. 2) 이들 작용은 E-LPS보다 신속하고 보다 높은 수준의 TNF- α 분비 유도에 의한 것으로 판단된다. 또한 3) S-LPS는 E-LPS보다 ICR 생쥐 유래 splenocyte로부터 LPS-민감성 lymphocyte 증식을 더욱 촉진하였다. 그러나 이들 효과는 4) ICR 생쥐 유래 splenocyte내 존재하는 대식세포의 활성화에서 기인하지는 않은 것으로 사료되었다. 이외에도, 두 LPS 간에 보여준 차이점을 보다 정확히 이해하기 위해서는, 1) TNF- α 이외 관련 사이토카인(IL-1 α 및 IL-6 등) 분비효과, 2) S-LPS의 ICR 생쥐 내에서의 전신동태 및 3) LPS-민감성 B cell 관련 활성 비교 실험 등이 추가적으로 진행될 예정이다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 지방대 육성지원사업(2004-C0015)에 의해 수행되었으므로, 이에 감사드립니다. 동물실험을 진행해 준 이준구 연구원에게 감사드립니다.

참고문헌

- Hewett, J. A. and Roth, R. A. : Hepatic and extrahepatic pathology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol. Rev.* **45**, 381 (1993).
- Vadas, M. A. and Gamble, J. R. : Regulation of the adhesion of neutrophils to endothelium. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1683 (1990).
- Salyer, J. L., Bohnsack, J. F., Knape, W. A., Shigeoka, A. O., Ashwood, E. R. and Hill, H. R. : Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha alteration of PMN adhesion and migration. *Am. J. Pathol.* **136**, 831 (1990).
- Bautista, A. P., Schuler, A., Spolarics, Z. and Spitzer, J. J. : Tumor necrosis factor-alpha stimulates superoxide generation by perfused rat liver and kupffer cells. *Am. J. Physiol.* **261**, G891 (1991).
- Hewett, J. A. and Roth, R. A. : The coagulation system, but not circulating fibrinogen, contributes to liver injury from gram-negative bacterial endotoxin (LPS). *Toxicologist* **12**, 65 (1992).
- Yamaguchi, Y., Yamaguchi, K., Babb, J. L. and Gans, H. : *In vivo* quantitation of the rat liver's ability to eliminate endotoxin from portal vein blood. *J. Reticuloendothel. Soc.* **32**, 409 (1982).
- Freudenberg, M. A. and Galanos, C. : Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-Galactosamine-treated mice. *Infect. Immun.* **59**, 2110 (1991).
- Stone, R. : Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* **264**, 365 (1994).
- Zentella, A., Manogue, K. and Cerami, A. : The role of cachectin/TNF-alpha and other cytokines in sepsis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **367**, 9 (1991).
- Beutler, P. B. : *Tumor Necrosis Factors: The molecules and their emerging role in medicine.* Raven press, New York (1992).
- Cho, J. Y., Park, J. S., Baik, K. U., Lee, J. G., Kim, H. P., Yoo, E. S. and Park, M. H. : Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Res.* **49**, 423 (2004).
- Ogura, S., Umegaki, O., Genovese, F., Fernando, L. P., Cochran, J. B., Romeo, C. M. and Cook, J. A. : Protective effect of typhostin AG-556 on shock induced by endotoxin or grampositive bacteria. *Shock* **12**, 105 (1999).
- Cho, J. Y., Yeon, J. D., Kim, J. Y., Yoo, E. S., Yu, Y. H. and Park, M. H. : Hepatoprotection by human epidermal growth factor (hEGF) against experimental hepatitis induced by D-galactosamine (D-galN) or D-GalN/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1243 (2000).
- Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H. and Park, M. H. : *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **398**, 399 (2000).
- Kumagai, T., Ikezoe, T., Gui, D., O'Kelly, J., Tong, X. J., Cohen, F. J., Said, J. W. and Koeffler, H. P. : RWJ-241947 (MCC-555), a unique peroxisome proliferator-activated receptor-gammaligand with antitumor activity against human prostate cancer *in vitro* and in beige/nude/X-linked immunodeficient mice and enhancement of apoptosis in myeloma cells induced by arsenic trioxide. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1508 (2004).
- Hwang, Y. H., Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M. S., Park, S. C., Hwang, M. H. and Yun, H. I. : Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. *Eur. J. Pharmacol.* **556**, 166 (2006).
- Kang, Y. J., Seo, S. J., Yun-Choi, H. S., Lee, D. H., Kim, Y. M. and Chang, K. C. : A synthetic isoquinoline alkaloid, 1-(beta-naphthylmethyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (YS 51), reduces inducible nitric oxide synthase expression and improves survival in a rodent model of endotoxic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 561 (2002).
- Kakutani, M., Takeuchi, K., Waga, I., Iwamura, H. and Wakitani, K. : JTE-607, a novel inflammatory cytokine synthesis inhibitor without immunosuppression, protects from endotoxin shock in mice. *Inflamm. Res.* **48**, 461 (1999).
- Lopez-Urrutia, L., Alonso, A., Nieto, M. L., Bayon, Y., Orduna, A. and Sanchez Crespo, M. : Lipopolysaccharides of *Brucella*

- abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 1740 (2000).
- 20) Lu, J. Y., Sadri, N. and Schneider, R. J. : Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev.* **20**, 3174 (2006).
- 21) Richer, M. J., Fang, D., Shanina, I. and Horwitz, M. S. : Toll-like receptor 4-induced cytokine production circumvents protection conferred by TGF-beta in coxsackie virus-mediated autoimmune myocarditis. *Clin. Immunol.* **121**, 339 (2006).
- 22) Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. and Miyake, K. : Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**, 667 (2002).
- 23) Moulin, F., Copple, B. L., Ganey, P. E. and Roth, R. A. : Hepatic and extrahepatic factors critical for liver injury during lipopolysaccharide exposure. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G1423 (2001).
- 24) Nakamura, A., Mori, Y., Hagiwara, K., Suzuki, T., Sakakibara, T., Kikuchi, T., Igarashi, T., Ebina, M., Abe, T., Miyazaki, J., Takai, T. and Nukiwa, T. : Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J. Exp. Med.* **197**, 669 (2003).