

내독소 혈증시 내독소의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

경북대학교 의과대학 병리학교실

박태인 · 박정자 ·곽정식 · 서인수

An Immunohistochemical Study on the Distribution of Endotoxin

Tae In Park, M.D., Jung Ja Park, M.D., Jyung Sik Kwak, M.D. and In Soo Suh, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea

This study was performed to investigate the distribution of endotoxin in various organs after intraperitoneal injection of *E. coli* homogenator(0111:B4, 3×10^9 cells/200 g of body weight). Sprague-Dawley rats were intraperitoneally injected with *E. coli* homogenator and sacrificed 1 and 3 hours after injection. The lung, liver, and kidney were immunohistochemically stained with avidin-biotin complex method and observed by light and electron microscopy.

On the light microscopy, granular deposits of reaction products of immunohistochemical stain were found on the cytoplasmic membrane of endothelial cells and some of parenchymal cells of all organs observed.

Electron microscopic study revealed finely granular reaction products on the surface of endothelial cells and some of parenchymal cells. The pinocytotic vesicles of endothelial cells demonstrated reaction products in the early phase of experiment. The distribution of reaction products were prominent in the liver among three organs. The Kupffer cells showed the most sensitive and strongest positive reaction. The hepatocytes and endothelial cells revealed weak positive reaction 3 hours later. The alveolar macrophages of the lung were also positive from the early phase of endotoxemia, while the pneumocytes and alveolar septa demonstrated weakly positive reaction in the later phase. The capillary endothelium of the kidney revealed positive reaction from the early phase.

According to above results, it is concluded that the endotoxin entered into the systemic circulation was captured in the liver and lung. And both mononuclear phagocytic system and endothelial cells could be activated or damaged by endotoxin. (**Korean J Pathol 1994; 28: 260~271**)

Key Words: *E. coli*, Endotoxin, Immunohistochemical stain, Electron microscopy

서 론

그람 음성균에 의한 패혈증은 각종 전신 장기에 심각한 장애를 유발하여 환자에게 치명적인 손상을 야기

하나 의학의 발달에도 불구하고 발생률 및 사망율은 여전히 높으며 이는 광범위 항생제의 남용과 내독소 자체의 복잡하고도 다양한 생물학적 작용에 기인한다¹⁾. 내독소의 생물학적 작용에 대해서는 Tal과 Goebel²⁾을 효시로 하여 활발한 연구가 이루어졌으며 지금까지 다양하고 복잡한 내독소의 생물학적 작용이 많이 밝혀지게 되었다^{3~7)}. 최근 연구에 의하면 실험 동물에 내독소를 주사하여 속과 파종성 혈관내 응고증(DIC)을 유발시켰으며 이는 내독소가 혈액응고계 및 보체계

접 수: 1993년 10월 20일, 게재승인: 1993년 11월 24일
주 소: 대구시 중구 동인동 2가 101, 우편번호 700-422
경북대학교 의과대학 병리학교실, 박태인

를 활성화시키는 물론 아라키돈산 대사를 조절하고 단핵구, 대식세포, 호중구 및 혈소판등 각종 염증관련세포를 활성화시켜 여러 가지 염증매개물질의 방출을 유도하며 면역계의 변화를 초래하는 등 다양한 작용을 할 뿐 아니라 이들은 상호 연관된 반응을 일으켜 개체에 복잡한 반응을 유발한다고 보고하였다⁸⁾. 그러나 생체내에서 내독소와 각종 염증세포 및 염증매개물질과의 상호작용에 대해서는 아직까지 확실하게 규명되어 있지는 않다.

한편 개체내에서 방사선면역측정법⁹⁻¹¹⁾ 및 면역조직화학적¹²⁻¹⁶⁾을 이용한 내독소의 흡수, 분포 및 대사에 관한 연구들이 있으며 이를 통하여 내독소의 생물학적 작용, 특히 내독소와 세포간의 상호작용을 이해 하려는 많은 연구들이 있었다. Braude등¹⁷⁾은 토끼에게 Cr⁵¹ 표지 내독소를 투여한 후 방사선 활성도를 측정 한 결과, 내독소를 투여한 직후 혈장에서 강한 방사선 활성이 나타났으며 그 후 buffy coat와 간세포에서도 방사선활성을 관찰하여 보고하였는데 I¹³¹ 표지 내독소를 이용한 다른 연구에서도 비슷한 결과와 보고된 바 있다^{10,18)}. 또 Herring등¹⁹⁾은 Cr⁵¹ 표지 내독소를 이용하여 과립구, 조립구 및 혈소판등 혈중 세포에서의 내독소의 분포를 관찰하였으며 그 결과 혈소판에서 가장 초기에 방사선 활성을 나타내었다고 하였다. Cremer등¹²⁾은 면역형광법을 이용하여 패혈증 동물의 세망내피계에서 내독소의 탐식과정을 보고하였고 Rubenstein등¹⁶⁾도 면역형광법을 이용하여 말초 혈관벽에서 내독소의 분포를 연구하여 패혈증시 내독소가 혈관벽에 직접 작용하여 말초혈관 허탈을 일으킨다고 주장하였다. Mathison과 Ulevitch¹⁰⁾는 실험 동물에서 자가방사기록법을 이용하여 I¹³¹ 표지 E. coli를 투여한 후 5분 만에 Kupffer 세포의 세포질 내에서 방사선 활성을 측정하였고 전자현미경적 자가방사기록법을 이용하여 세포 소기관, 즉 Kupffer 세포의 미토콘드리아와 탐식 공포에서 silver grain을 관찰하고 보고하였다. 이와 같이 내독소의 분포에 관한 면역조직화학적 방법과 전자현미경적 방법이 발달함에 따라 세포 소기관내에서의 내독소 존재의 확인은 물론, 내독소에 대한 특이 항체가 개발되면서 내독소의 확인에 더욱 특이성을 띠게 되었고 이로서 초기 패혈증시 내독소의 생물학적 작용이 많이 밝혀지게 되었다.

체내에 들어온 내독소는 세망내피계, 특히 간의 Kupper세포에서 탐식되고 이런 탐식과정은 전자현미경적 관찰로 확인된 바 있으나^{15,20)} 간세포에선 내독소가 관찰되지 않았다^{10,12,17)}. 반면 Freudenberg등¹³⁾의 연구에 의하면 R-form lipopolysaccharide 투여 30분 후에 간세포와 Kupffer 세포에서 모두 내독소가 관찰되었다고 하였다. 또 내독소는 체내에서 혈액응고계에 작용하여 DIC를 유발하는데^{9,21)} 혈소판의 표면에는 내독소에 대한 수용체가 존재하여 내독소 혈증시 직접 혈소판이 활성화되어 혈전을 형성하게 된다²²⁾.

혈관 내피세포도 내독소에 의한 혈전 형성에 중요한 역할을 하는데 최근 연구에 의하면 실험동물에서 내독소 혈증 초기에 말초혈관 내피세포에서 내독소를 관찰하였고 그 자리에서 혈전이 형성되었다고 하였다^{16,23)}.

내독소의 생물학적 작용을 알기 위해 이상과 같은 많은 연구들이 다양한 방법으로 수행되어 왔다. Cr⁵¹, I¹³¹등을 이용한 방사선측정법, 면역형광법 및 특히 항체를 이용한 면역조직화학적 방법등 여러 방법을 이용하여 내독소의 분포에 관한 연구가 이루어졌으며 이로서 초기 내독소 혈증시 내독소와 세포 사이의 상호 관계에 대하여 많은 부분들이 밝혀지게 되었다. 그러나 내독소의 분포를 알기위한 방사선측정법, 면역형광법 및 면역조직화학적 방법등 각종 방법에서 여러 가지 문제점이 나타나고 있으며, 특히 형광물질 및 내독소에 대한 항체의 비특이성에 따른 위양성률과 아직 정립 되지 않은 방법론 등의 문제가 노출되었다. 그리고 최근에 보고되고 있는 전자현미경을 이용한 세포 소기관내의 내독소에 대한 연구는 아직 미흡한 형편이다.

그래서 저자들은 실험적으로 내독소 혈증을 일으킨 흰쥐에서 폐, 간 및 신장을 적출하여 그 조직에서 E. coli에 대한 특이 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행한 후 광학현미경 및 전자현미경 시간경과에 따른 내독소 분포를 각 장기에서 관찰하여, 패혈증 초기에 간, 폐 및 신장의 모세혈관 내피세포 및 실질세포와 내독소와의 상호관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200~250 g 되는 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐들을 일정 기간 동안 사육하여 건강이 양호하다고 생각되는 4마리를 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

초음파로 분쇄시킨 E. coli(0111:B4, 3×10⁹/200 g)를 실험 동물의 복강내에 주사한 후 임상적 소견을 관찰하면서 1시간 및 3시간후에 각각 두 마리씩 도살하여 육안적으로 관찰한 후 폐, 간 및 신장을 채취하였으며 각각의 조직을 면역조직화학적 염색을 하여 광학 현미경 및 투과전자현미경으로 검색을 하였다.

3. 면역조직화학적 염색

광학현미경적 재료로 채취한 각 장기를 아세톤에 고정하고 파라핀에 포매한 후 4 μm의 두께로 박절하여 조직 절편을 만들었고, avidine-biotinylated peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 염색하였다. 먼저 조직 절편을 xylene에 담구어 파라핀을 제거하고 계열 alcohol을 거쳐 증류수로 함수시켰다. 조직 절편

을 0.1M phosphate buffered saline(PBS)으로 5 분간 세척한 후 0.3% H₂O₂를 도포하여 30분간 둔 후, 0.1M PBS로 20분간 수세하였다. 1차 및 2차 항체의 비특이적 결합을 막기 위하여 정상 goat 혈청을 20분간 작용시킨 후 1차 항체인 Anti-*E. coli* Ab(미국 Chemicon사제, Antibody to *E. coli* 0111:B4)를 0.1 M PBS에 50배 희석하여 1시간 도포하고 0.1 M PBS로 수세하였다. 그 후 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG를 도포하여 30분간 둔 후, 0.1 M PBS로 수세한 후 avidin-biotin peroxidase reagent를 30분간 작용시켰다. 다시 수세후 발색체인 DAB(diaminobenzidine 4HCl, 미국SIGMA사제) 0.02 mg과 기질액인 H₂O₂ 0.02 ml를 Tris-buffer (pH 7.2) 100 ml에 섞어서 5분간 반응시키고, methyl green으로 대조 염색후 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경적 재료로는 채취한 각 장기를 5×5×2 mm 크기로 자른 후 Paraformaldehyde-leucine-periodate 용액에 6시간 고정하였다. 고정된 조직은 10%, 15% 및 20% sucrose PBS용액에 각각 4 시간씩 거친 후 액체 질소로 얼구어 10 μm의 동결 절편 조직을 만들었다. 동결 절편 조직을 실온에서 30분 동안 말린 후 10% sucrose PBS로 20분간 세척하고 정상 goat 혈청으로 30분간 반응시켰다. 그 후 1차 항체인 Anti-*E. coli* Ab를 6시간 동안 반응시키고 세척 후 2차 항체를 다시 6시간 동안 도포하였다. 이어서 10% sucrose PBS로 30분간 세척한 후 ABC reagent로 6시간 동안 반응시키고 세척 후 1% glutaldehyde 용액으로 5분 동안 고정하였다. 그 후 DAB 용액(20 mg/100 ml tris-HCl, 0.005% H₂O₂)에서 30분간 반응시키고 세척 후 2% OsO₄ 용액으로 2시간 동안 후고정한 다음 계열 알콜로 탈수, propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법²⁴⁾에 따라 epon mixture에 포매하였다. Epon 중합후 조직을 Porter Blum MT-2B ultramicrotome으로 DuPont diamond knife를 사용하여 40~60 nm로 초박절하고 Reynolds 방법²⁵⁾에 따라 lead citrate로 단염색하여 Hitachi H-7000 전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 광학현미경적 소견

E. coli 투여 후 초기에 폐포 모세혈관내에 호중구, 대식세포 및 단구등 염증세포의 은둔이 관찰되었고 간 조직에서 Kupffer 세포의 증식도 관찰되었다. 시간의 경과에 따라 폐포 모세혈관내 염증세포의 은둔과 Kupffer 세포의 증식이 더욱 뚜렷해졌고 폐포모세혈관 내피세포, 간세포 및 신 세뇨관 상피세포의 종창과 괴사가 일어났다.

면역조직화학적 염색에도 *E. coli* 투여 1 시간후 간의 Kupffer 세포와 폐의 폐포 대식세포에서 양성 반응이 일어났고 또 간 동양혈관, 폐포 모세혈관 및 신 사구체 모세혈관의 내피세포에서도 뚜렷한 양성 반응이 관찰되었으나 신 사구체 세뇨관에서는 양성 반응이 일어나지 않았다. 시간이 경과하면서 Kupper 세포, 폐포 대식세포 및 모세혈관 내피세포의 양성 반응은 지속되었고(Fig. 1~3) *E. coli* 투여 3시간 후 간세포, 폐포세포 및 신 세뇨관 상피세포에서도 양성반응이 일어났다. 또 폐의 간질조직과 간 문맥 주위에 섬유조직의 증식과 다양한 형태의 염증세포의 침윤이 있었고 염증세포와 섬유조직에서도 약한 양성 반응이 관찰되었다. 이와 같은 양성 반응은 각 장기 마다 다소의 차이는 있었지만 처음의 양성 반응이 시간의 경과 후에도 계속 지속되었다.

2. 전자현미경적 소견

Kupffer 세포와 폐포 대식세포에서 탐식공포내에 내독소에 대한 항원항체반응의 양성 소견을 나타내는 전자 밀도가 높은 입자(이하 양성입자)가 관찰되었다. 각 장기의 모세혈관 내피세포의 세포막 표면에서도 많은 양성입자들이 관찰되었고 이런 양성입자는 pinocytosis작용으로 내피세포의 세포질내로 함입되었다. 신세뇨관 상피세포, 간세포 및 폐포세포의 세포막 표면에서도 양성입자들이 관찰되었다.

간에서는 *E. coli* 투여 1시간 후 Kupffer 세포와 동양혈관 내피세포의 표면에서 *E. coli*에 대한 양성입자들이 관찰되었고(Fig. 4) Kupffer 세포의 탐식공포내에서도 양성입자들이 관찰되었다. 모세혈관 내피세포의 세포막 근처 세포질내에 양성입자로 채워진 약간의 pinocytotic vesicle이 있었고 세포막에서도 pinocytosis에 의해 함몰된 세포막 표면에서도 양성입자들이 분포되어 있었다. *E. coli* 투여 3 시간 후에는 문맥 주위에 섬유조직의 증식과 염증세포의 침윤이 있었고 내피세포의 세포질내에 pinocytotic vesicle의 수가 현저하게 증가되었고 간세포 표면에서의 양성입자의 분포도 더욱 뚜렷해졌으나(Fig. 5) 간세포의 세포질내에서는 관찰되지 않았다.

신장에서는 *E. coli* 투여 1 시간 후에 간질의 모세혈관 내피세포의 세포막 표면에서 항원항체반응 양성입자들이 관찰되었고(Fig. 6) 3시간 후 이러한 양성입자의 분포가 더욱 뚜렷해졌다(Fig. 7). 세뇨관의 근위 굴곡부 상피세포의 핵자연 표면에서도 양성입자의 흡착이 관찰되었다. 또 모세혈관내에 은둔된 각종 염증세포의 표면에서도 양성 입자가 분포하였다.

폐에서는 *E. coli* 투여 1시간 후에 모세혈관 내피세포 세포막 표면에서 양성입자들이 관찰되었고 대식세포의 탐식공포내에서도 탐식된 양성입자들이 관찰되었다(Fig. 8 및 9). 모세혈관 내피세포에서는 초기에 양성입자가 세포막의 표면에서 관찰되었고 곧이어 세포

막의 함몰이 일어나고 그 후 세포질내에 많은 수의 pinocytotic vesicle이 나타났으며 공포내에서도 항원항체반응 양성입자들이 관찰되었다(Fig. 10 및 11). 폐포 모세혈관내에 단구, 다핵구 등 여러 종류의 세포의 은둔이 있었고 은둔된 호중구, 단구, 임파구, 형질 세포, 대식세포 등 혈소판을 제외한 대부분의 세포 표면에 항원항체반응 양성입자들이 분포하였다(Fig. 12 및 13). 간질조직, 특히 세기관지 주위의 간질조직에 다양한 염증세포의 침윤이 있었으며 이러한 염증세포와 II형 폐포세포 뿐 만 아니라 I형 폐포세포의 표면에서도 양성입자 관찰되었다. *E. coli* 투여 3시간 후에는 내피세포, 대식세포 등 여러 세포에서 양성입자의 분포가 더욱 뚜렷해졌고 pinocytotic vesicle도 현저히 증가하였다.

고 찰

내독소 혈증시 일어나는 세포 상해의 발병기전에 대해서 최근 많은 연구들에 의해 어느 정도 밝혀지게 되었고 그 기전은 호중구를 위시한 다수의 염증세포와 보체계, 혈액응고계, kinin계, 면역계 등이 복합적으로 관여하여 세포에 손상을 준다는 것은 인정된 사실이다. Mizer²⁶⁾과 Dorinsky²⁷⁾은 내독소 혈증시 활성화된 호중구가 폐, 심장, 뇌, 장관계 및 간에 은둔하며 혈전과 괴사가 동반된 세포 상해가 유발되고 폐의 미세 혈관계에 손상을 준다고 보고하였다. 그러나 생체내에서 내독소와 각종 염증세포 및 염증매개 물질과의 상호작용에 대해서는 아직까지 이론이 많으며 이에 대하여 개체내에서 내독소의 흡수, 분포, 및 대사에 관한 연구로 내독소의 생물학적 작용 뿐만 아니라 내독소와 염증세포 및 각 장기 세포간의 상호작용을 이해하려는 많은 연구들이 진행되어 왔다.

최근 Hoffmann²⁸⁾은 내독소를 투여한 실험으로 간조직에서 내독소가 Kupffer세포에 탐식되는 과정을 전자현미경으로 관찰하여 보고 하였으며 또 자가방사선측정법, 면역형광법 및 면역화학법 등 여러 방법이 연구되어 내독소의 분포에 관한 연구들이 활발하게 진행되어왔다. 그러나 방사선측정법에서 내독소와 결합했던 방사선 표지물이 숙주의 방어작용에 의해서 내독소로 부터 떨어져 나오고 탈락된 방사선 대사물이 조직에 축적되어 특이성을 떨어뜨린다는 주장²⁹⁾이 있고 또 형광물질 및 내독소에 대한 항체의 비특이성에 따른 위양성율 등, 각각의 방법에 따른 문제점이 제기되고 있다.

본 실험은 내독소 혈증의 초기에 내독소와 각종 세포간의 상호작용을 알아보기 위하여 내독소를 투여한 후 시간경과에 따른 각 장기에서 내독소 분포의 변화를 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰하였다. 먼저 체내에 들어온 *E. coli*는 단핵탐식구계 특히 간의 Kupffer세포와 폐포 대식세포에 탐식되며 이러한 탐

식과정은 본 실험의 전자현미경적 관찰에서 대식세포의 탐식공포내에 탐식된 내독소에 대한 양성입자들이 관찰되었다. 그후 *E. coli*는 폐에 은둔된 호중구와 각 장기에 침윤된 각종 염증세포 표면에서 관찰되었고 각 장기의 모세혈관 내피세포의 표면에서도 관찰되었으며 이런 활성화된 호중구, 대식세포 및 단구와 *E. coli*에 의해 직접 손상을 받은 내피세포가 초기 내독소 혈증시 세포상해에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 특히 본 실험의 전자현미경적 검색에서는 모세혈관 내피세포 표면에 부착된 내독소에 대한 양성입자들의 pinocytosis 과정이 관찰되었으며 또 모세혈관내에 은둔된 여러 종류의 염증세포의 표면에서도 양성입자들이 관찰되었다.

¹³¹I이 표지된 *E. coli*를 이용한 Mathison¹⁰⁾의 실험에서는 Kupffer 세포의 세포질 내에서 방사선 활성을 측정하였으나 간세포 내에서는 측정되지 않았다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 *E. coli* 투여 3시간 후에 간세포, 신 사구체 상피세포 및 2형 폐포세포에서 강양성 반응이 관찰되었고 전자현미경 관찰에서도 이들 세포의 세포막과 근위세뇨관의 세포면에서 내독소에 대한 항원항체반응 양성입자들이 관찰되었다. 이는 내독소가 각종 염증세포 및 내피세포를 활성화시킬 뿐만 아니라 조직내로 침투되어 폐, 간 및 신세포에도 직접 영향을 줄 것으로 생각된다. 또 시간 경과에 따라 간질조직에 나타난 염증세포와 섬유 조직에서도 약한 양성반응을 보였다.

내독소에 의한 세포상해 기전은 매우 복잡하여 한마디로 설명하기는 어려우나 Morrison 및 Ulevitch⁸⁾에 의하면 내독소의 생물학적 작용은 세포면역성 기전에 의하여 비만세포, 호염구, 호중구, 혈소판, 단핵구, 대식세포 및 내피세포 등과 T 림프구와 B 림프구가 활성화되며 체액면역성 기전에 의해 보체계와 혈액응고계가 활성화되어 그 결과 방출된 각종 화학매개인자들이 숙주에 대해 방어작용을 하거나 또 상해를 초래하기도 하며 각 인자들 간에 서로 복잡한 상호작용을 일으킨다고 한다. 이렇게 광범위하고 복합적인 내독소의 작용을 감안할 때 초기 내독소혈증시 내독소의 분포에 관한 본 실험의 결과만으로 복잡한 내독소의 생물학적 작용을 이해하기에는 부족한 것으로 생각하나 내독소에 의해서는 단핵탐식구계가 초기에 가장 먼저 내독소에 자극받는다 고 생각된다.

결 론

내독소 혈증초기에 내독소와 세포 사이의 상호작용에 관한 연구에 중요한 지표가 되는 내독소의 조직 또는 세포 소기관내의 분포를 알아보기 위하여 Sprague-Dawley계의 흰쥐에 초음파로 분쇄시킨 *E. coli* (0111:B4, 3×10^9 /200 g)를 복강내로 주사한 후 1, 3 시간에 신, 간 및 폐조직을 채취하여 *E. coli*에 특이성

을 가진 특이항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 광학현미경 및 투과전자현미경으로 검사를 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

E. coli 투여 1시간 후에 간의 Kupffer세포와 폐의 폐포 대식세포에서 광학현미경 소견상 강양성 반응이 일어났고 이와 같은 반응은 3시간 후까지 지속되었다. 시간이 경과하면서 대식세포와 내피세포뿐 아니라 간세포, 폐포세포 및 신 사구체 상피세포에서도 강양성 반응이 일어났고 또 폐의 간질조직과 간문맥 주위에 섬유조직의 증식과 각종 염증세포의 침윤이 있었으며 염증세포와 섬유 조직에서도 약한 양성 반응이 일어났다. 전자현미경 관찰에서도 초기에 간의 Kupffer세포와 폐포 대식세포 표면과 탐식공포내에서 내독소에 대한 양성입자가 관찰되었고 또 간 동양혈관 내피세포와 폐포 모세혈관 내피세포 및, 사구체 모세혈관 내피세포의 표면에서도 양성입자가 관찰되었으며 세포막 표면의 양성입자들은 pinocytosis 작용에 의해 내피세포의 세포질내로 함몰되어 세포질내의 pinocytotic vesicle내에서 관찰되었다. *E. coli* 투여 3시간 후에는 1, 2형 폐포세포와 간세포의 표면 및 근위세노관 상피세포 체자연에서 *E. coli*에 대한 양성입자들이 분포하였다.

이상과 같은 성격으로 미루어 내독소 혈증 초기에 단핵탐식구계, 특히 Kupffer세포와 폐포 대식세포가 가장 먼저 *E. coli*를 탐식하며 각장기에 은둔된 각종 염증세포가 활성화되고 또 내독소는 직접 각 장기의 모세혈관 내피세포와 실질세포에 영향을 미쳐서 폐부종 등 여러 장기에 손상을 준 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Lichenberg FV. *Viral, Chlamydial, and Bacterial Disease. In Robbins Pathologic Basis of Disease, edd by RS Cotran, V Kumar and SL Robbins, 4th ed, WB Saunders Co. Tokyo, 1989; 345.*
- 2) Tal C, Goebel WF. *On the nature of the toxic component of the somatic antigen of Shigella paradysenteriae type (Flexner). J Exp Med 1950; 92: 25-34.*
- 3) Yoshikawa T, Tanaka KR, Guez LB. *Infection and disseminated intravascular coagulation. Medicine 1971; 50: 237-258.*
- 4) Yin ET, Galanos L, Kinsky S, Bradshaaw RA, Wessler S, Loderitz O, Salmiento ME. *Picogram sensitive assay for endotoxin; relation of Limulus polyphomus blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from gram negative bacteria. Biochem Biophys Acta 1972; 261: 284-289.*
- 5) Cho YW. *Direct cardiac action of E. coli endotoxin. Proc Exp Biol Med 1972; 141: 705-707.*
- 6) Dinarello CA, Goldin NP, Wolff SM. *Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. J Exp Med 1974; 139: 1369-1381.*

- 7) Fine DP. *Activation of the classic and alternate complement pathways by endotoxin. J Immunol 1974; 112: 763-769.*
- 8) Morrison DC, Ulevitch RJ. *The effect of bacterial endotoxins on host mediation system. Am J Pathol 1978; 93: 526-617.*
- 9) Brunning RD, Woolfrey BF, Schrader WH. *Studies with tritiated endotoxin II. Endotoxin localization in the formed elements of the blood. Am J Pathol 1964; 44: 401.*
- 10) Matchison JC, Ulevitch RJ. *The clearance, tissue distribution and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. J Immunol 1979; 123: 2133.*
- 11) Schrader WH, Woolfrey BF, Bruning RD. *Studies with tritiated endotoxin III. The local Shwarzman reaction. Am J Pathol 1964; 44: 597.*
- 12) Cremer N, Watson DW. *Influence of stress on distribution of endotoxin in RES determined by fluorescein antibody technic. Proc. Soc Exp Biol Med 1957; 95: 510.*
- 13) Freudenberg N, Freudenberg MA, Bandara K, Galanos C. *Distribution and localization of endotoxin in the RES and in the main vessels of the rat during shock. Pathol Res Pract 1982; 179: 517.*
- 14) Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C. *Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lung, and kidneys of rats. Br J Exp Pathol 1982; 63: 56.*
- 15) Freudenberg N, Freudenberg MA, Gutzman J, Mittermayer CH, Bandara K, Galanos C. *Identification of endotoxin positive cells in the rat lung during shock. Virch Arch[A] 1984; 404: 197.*
- 16) Rubenstein H, Fine J, Coons AH. *Localization of endotoxin in the wall of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 111: 458.*
- 17) Braude AI, Carey FJ, Zalesky M. *Studies with radioactive endotoxin II, Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal dose of E. coli endotoxin labelled with radioactive sodium chromate. J Clin Invest 1955; 34: 858-866.*
- 18) Barnes FW, Lupfer H, Henry SS. *The biochemical target of Flexner dysentery somatic antigen; studies on the rat using antigen labeled with I¹³¹. J Biol Med 1952; 24: 384-400.*
- 19) Herring WB, Herion JC, Walker RI, Palmer JG. *Distribution and clearance of circulation endotoxin. J Clin Invest 1963; 42: 79-87.*

- 20) Hoffmann EO, Di Luzio NR, Holper K, Brettschneider L, Coover J. *Ultrastructural changes in liver of Baboons following lead and endotoxin administration. Lab Invest* 1975; 30: 311.
- 21) Morrison DC, Cochrane CG. *Direct evidence for Hageman factor(factor XII) activation by bacterial endotoxin. J Exp Med* 1974; 140: 797.
- 22) Morrison DC, Oades ZG. *Mechanisms of lipopolysaccharide initiated rabbit platelet responses II. Evidence that lipid A is responsible for binding of lipopolysaccharide to the platelet. J Immunol* 1979; 122: 753.
- 23) Uragoh K, Sueishi K, Nakamura T, Iwamaga S. *A novel immunohistochemical method for in vivo detection of endotoxin using horseshoe crab factor D. J Histochem Cytochem* 1988; 36: 1275-1283.
- 24) Luft JH. *Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophys Biochem Cytol* 1966; 14: 291-302.
- 25) Reynolds ES. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol* 1963; 17: 208-212.
- 26) Mizer LA, Weisbrode SE, Dorinsky PM. *Neutrophil accumulation and structural changes in nonpulmonary organs after acute lung injury induced by phorbol myristate acetate. Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1017-1026.
- 27) Dorinsky PM, Costello JL, Gadek JE. *Oxygen distribution and utilization after phorbol myristate acetate induced lung injury. Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1454-1463.

KEY FOR ABBREVIATIONS

En: Endothelial cell
Kf: Kupffer cell
Ep: Epithelial cell
Ne: Neutrophil

He: Hepatocyte
Am: Alveolar macrophage
Cl: Capillary lumen
Ly: Lymphocyte

LEGEND FOR FIGURES

- Fig. 1.** Liver, rat, 3 hours after *E. coli* injection. Immunostain for anti-*E. coli* antibody demonstrates strong positive reaction in the Kupffer cells and sinusoidal surface(Avidin-biotin complex).
- Fig. 2.** Lung, rat, 3 hours after *E. coli* injection. Immunostain for anti-*E. coli* antibody reveals positive reaction in the alveolar capillary walls and interstitium(Avidin-biotin complex).
- Fig. 3.** Kidney, rat, 3 hours after *E. coli* injection. Immunostain for anti-*E. coli* antibody shows positive reaction in the glomerular capillary lumen(Avidin-biotin complex).
- Fig. 4.** Liver, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The surface of hepatocyte reveals immunoreaction positive electron-dense particles(arrow).
- Fig. 5.** Liver, rat, 3 hours after *E. coli* injection. The surface of hepatocyte reveals heavy stain of electron-dense particles(arrow).
- Fig. 6.** Kidney, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The endothelial cells of interstitium shows small amount of electron-dense particles(arrow) on the surface.
- Fig. 7.** Kidney, rat, 3 hours after *E. coli* injection. The endothelial cell shows linear distribution of marked electron-dense particles(arrow) on the surface.
- Fig. 8.** Lung, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The surface of capillary endothelial cell and neutrophil reveals small amount of electron-dense particles(arrow).
- Fig. 9.** Lung, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The surface of macrophage shows linear positive reaction(arrow).
- Fig. 10.** Lung, rat, 1 hour after *E. coli* injection. Electron-dense particles(arrow) and small amount of pinocytotic vesicles(arrow head) are noted on membrane of capillary endothelial cell.
- Fig. 11.** Lung, rat, 3 hours after *E. coli* injection. Numerous pinocytotic vesicles(arrow head) and protrusion of cell membrane are noted in capillary endothelial cell.
- Fig. 12.** Lung, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The surface of sequestered neutrophils shows linear distribution of electron-dense particles(arrow).
- Fig. 13.** Lung, rat, 1 hour after *E. coli* injection. The surface of sequestered lymphocyte and capillary endothelial cell shows definite positive reaction(arrow).











