

Monocrotaline투여 백서 폐동맥고혈압에서 폐혈관내피세포와 폐신경내분비세포의 변화에 대한 형태학적 연구

연세대학교 의과대학 병리학교실 및 알버트 아인슈타인 의과대학 병리학교실*

양우익 · 조상호* · 최인준 · 이유복

A Morphological Study of the Pulmonary Endothelium and Neuroendocrine Cells in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension

Woo-Ick Yang, M.D., Sang-Ho Cho*, M.D., In-Joon Choi, M.D. and Yoo-Bock Lee, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

**Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine*

To investigate the mechanism of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension, authors performed immunohistochemical study using antibody to von Willebrand factor(vWF), cell kinetic study using 5-bromodeoxyuridine and ultrastructural study after single subcutaneous injection of monocrotaline(MCT) to Wistar rats. The results of this study demonstrated that the expression of vWF by pulmonary endothelial cells was markedly increased from day 3 until 2 months after MCT injection. The labeling index of pulmonary microvessel endothelium began to increase after six days and was maximal on the third weeks, and thereafter it remained slightly increased above basal level. Electron microscopic study revealed attachment of inflammatory cells and platelets to endothelium from 6 hours and degranulation of attached platelets 24 hours after MCT injection. Evidences of endothelial injury began to appear from 12 hours after MCT injection. Evidences of endothelial injury began to appear from 12 hours and was maximal after 48 hours. From the third day, ultrastructural changes of cell regeneration and hypertrophy began to appear and was continuously observed until 2 months. In addition, we evaluated the changes in the number of pulmonary neuroendocrine cells using antibody to gastrin releasing peptide but it demonstrated no change until 2 months suggesting no role of neuroendocrine cells in the development of pulmonary hypertension of Wistar rats at early stage.

In conclusion, the results indicate that pulmonary hypertension by MCT injection is due to increased vascular resistance caused by vasoconstriction and hyperplasia of endothelium with muscularization of the pulmonary arterioles induced by endothelial dysfunction and some biologic substances released from endothelium and platelets. (**Korea J Pathol 1992; 26: 582~592**)

Key Words: Monocrotaline, Pulmonary hypertension

서 론

폐동맥고혈압은 일단 병변이 진행하면 불가역적이며

치료가 용이하지 않아, 오래전부터 그 기전을 밝히고자 임상적 혹은 실험적으로 많은 연구가 이루어져왔다. 폐동맥압에 영향을 미치는 주요인자로는 폐동맥의 혈류, 혈관저항, 혈액점도가 있으나 폐동맥 고혈압은 주로 혈관저항 증가에 의해 발생한다¹⁻³⁾. 실험적으로는 저산소증과 monocrotaline(MCT) 투여가 폐동맥 고혈압을 일으키는 대표적인 방법이다⁴⁻⁶⁾. 이 중 MCT 투여에 의한 폐동맥 고혈압은 그 병인에 대한

접 수: 1992년 5월 28일, 게재승인: 1992년 9월 15일
주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 우편번호 120-752
연세대학교 의과대학 병리학교실, 양우익

실험적 연구가 계속되어왔으며, 이들 연구결과를 종합하면 초기의 혈관수축이 후기의 혈관중막의 비후, 비근성동맥의 근성화등 폐혈관 구조의 재구성으로 이어지면서 혈관저항이 높아져 폐동맥고혈압이 유발되는 것으로 이해되고 있다^{4~6,9~12}. 그러나 이들은 그 대부분이 일단 폐동맥 고혈압이 발생하여 진행된 이후의 형태학적 혹은 기능적 연구이며, 초기병변, 혈관내피세포의 역할 및 형태학적 변화, 혈관 수축 및 재구성에 관여하는 인자등 아직 밝혀지지 않은 점이 많다.

폐혈관 내피세포는 혈관의 크기 및 종류에 따라 특징적인 피복양상 및 형태를 지니며 MCT투여 폐동맥고혈압의 초기병변이 관찰되는 장소로 알려져있다^{5,13}. 폐혈관내피세포는 세포내 가스교환 및 체액여과등 고유한 기능외에 최근 폐혈관의 수축 및 이완에도 능동적으로 관여하고, 혈관 근육세포의 증식에도 관여하는 것으로 밝혀져 폐동맥고혈압의 병인에 관여하는 중요한 인자로 인식되고 있다¹⁴.

한편 Feyrter cell, Kultschitz sky cell, APUD cell등으로 명명되는 폐신경내분비세포는 주로 기관세지 주위에 날개 혹은 몇 개의 세포가 모여 neuroepithelial body로 존재한다. 이 세포의 기능은 Lauweryns등¹⁵이 세포질내에서 polypeptide substance를 증명한 이후 세포질내에 gastrin releasing peptide (GRP), serotonin, calcitonin등 혈관의 수축 및 이완, 혈관 평활근의 증식에 영향을 미칠수 있는 생물학적 물질을 포함하고 있는 것이 밝혀짐에 따라 paracrine기능을 할 것으로 추정되며^{16~21}, 1989년 Gosney등²²은 진행된 폐동맥고혈압 환자의 폐장에서 신경내분비세포가 증가한다는 것을 관찰한 후, 이 세포들이 폐동맥고혈압에 관여할 것으로 추정하였다.

따라서 저자는 MCT 투여로 유발된 폐동맥고혈압시 폐혈관의 수축 및 재구성에 관여할 수 있는 인자로 사료되는 폐혈관내피세포와 폐신경내분비세포의 변화를 통상적인 hematoxylin-eosin 염색외에 von Willebrand factor(vWF)와 gastrin releasing peptide (GRP)에 대한 면역조직화학염색, 전자현미경 관찰과 5-bromo deoxyuridine(BrdU)을 이용한 세포역동학적연구(cell kinetic study)를 시행하여 관찰함으로써 MCT 투여에 의한 실험적 폐동맥고혈압의 발생기전을 이해하고자 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

기초사육후 1주일간 환경에 적응시킨 체중 180~250 gm의 자성 Wistar백서 96마리를 대조군(24마리)과 실험군(72마리)으로 나누어 실험하였다. MCT 투여 실험군은 약물투여후 6시간, 12시간, 1일, 36시간, 2일, 3일, 6일, 9일, 2주, 1달, 2달에 각각 6마리씩 대조군 2마리와 함께 도살하였다.

2. 약물투여방법

대조군은 증류수 0.8 cc를, 실험군은 monocrotaline hydrochloride(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 2% 수용액 0.8 cc(60 mg/kg)를 1회 배부에 피하주사하였다. S-phase세포를 관찰하기위하여 실험군, 대조군 모두 도살 1시간전에 5-bromo deoxyuridine(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 0.1% 수용액 1 cc(5 mg/Kg)를 꼬리 정맥에 주사하였다.

3. 검사방법

1) 우심실혈압측정: 실험동물은 체중측정후 nembutal 30 mg/Kg를 복강내에 주사하여 마취시킨후 즉시 흉벽을 절개하여 우심실내로 23 G 바늘을 천자한 다음 Sein 484 Monitor에 연속된 압력변환기를 연결하여 우심실 압력을 측정하였다.

2) 광학현미경적관찰:

(1) Hematoxylin-eosin염색; 우심실 혈압측정후 우폐의 폐문부를 절찰하고 기관내로 10% 중성포르말린 1.5 cc를 주입한후 포르말린 용액에 하룻동안 고정 한 후 절단하였다. 광학현미경적 검사를 위하여 절단된 조직을 일반적 조직처리과정을 거친다음 파라핀에 포매후 5 micron두께로 세절하여 일반적인 형태학적 변화들 보기위한 hematoxylin-eosin염색을 시행하였다.

(2) 면역조직화학적염색; 혈관내피세포를 관찰하기 위해서는 Factor VIII-related antigen(vWF)에 대한 항체(Dako Laboratory, Santa Barbara, CA.), 폐신경내분비세포를 관찰하기 위해서는 gastrin releasing peptide(GRP)에 대한 항체(Dako Laboratory), S-phase세포를 관찰하기 위해서는 도살 1시간 전 정맥투입한 5-bromo deoxyuridine(BrdU)에 대한 항체(Dako Laborator)를 일차항체로 사용하여 면역조직화학적염색을 시행하였다. 면역조직화학적염색은 GRP와 BrdU인 경우는 labeled streptavidin biotin(LSAB) 방법을 이용하였으며 발색제로는 각기 Amino ethylcarbazole(AEC)(Dako Laboratory)와 Diaminobezidine(DAB)(Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo)를 사용하였고, vWF에 대한 면역조직화학적염색인 경우는 발색제로 Fast Red(Bio Genex Laboratories, San Ramon, CA)를 사용하였다.

(3) 전자현미경적관찰; 전자현미경검사를 위해서는 우심실혈압측정 직후 좌폐의 일부를 1 mm³ 크기로 세절하여 24시간동안 glutaraldehyde에 고정하였다. 1% OsO₄에 2시간 재고정한 후 배수알콜로 탈수하였으며 epon에 포매하여 500~600 Å 두께로 세절한 후 uranyl acetate와 lead citrate 복염색을 하여 Hitachi H-500형 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 우심실수축기혈압

대조군의 평균 우심실수축기혈압은 23.5 ± 2.6 mmHg 이었고 MCT 투여군은 투여 6일이 30.2 ± 3.2 mmHg, 투여 9일이 30.7 ± 3.9 mmHg, 투여 2주가 34.2 ± 4.2 mmHg, 투여 1달이 32.0 ± 4.0 mmHg, 투여 2달이 32.5 ± 3.6 mmHg로서 약물투여 6일후부터 수축기 혈압이 상승하여 뚜렷한 우심실 수축기 고혈압을 보였으며 이는 2달까지 지속되었다(Table 1).

2. 광학현미경적소견

1) Hematoxylin-eosin염색소견:

(1) 대조군; 생리식염수를 투여한 대조군에서는 도살시기에 상관없이 폐동맥과 폐포에 유의할만한 변화

가 없었다.

(2) Monocrotaline투여군; Hematoxylin-eosin (H-E) 염색상 MCT투여군에서는 약물투여 6시간후에 백혈구의 혈관내 포식형성(pavementing)이 발생하였고(Fig. 1), 12시간 후부터 국소적인 폐포내부종이 관찰되기 시작하였으며, 4일 후부터는 미세폐동맥의 중막비후가 관찰되기 시작하여 중막의 비후는 실험기간이 경과할수록 현저해졌다(Fig. 2). 실험 전 과정을 통해 외막내 염증세포침윤과 섬유화, 괴사성 동맥염이나 피브린(fibrin) 및 혈소판 혈전은 관찰할 수 없었다.

2) 면역조직화학염색:

(1) 폐혈관내피세포의 von Willebrand factor 표현양상:

가. 대조군; 생리식염수를 투여한 대조군의 폐동맥(Fig. 3, right) 및 폐정맥의 혈관내피세포는 폐혈관의

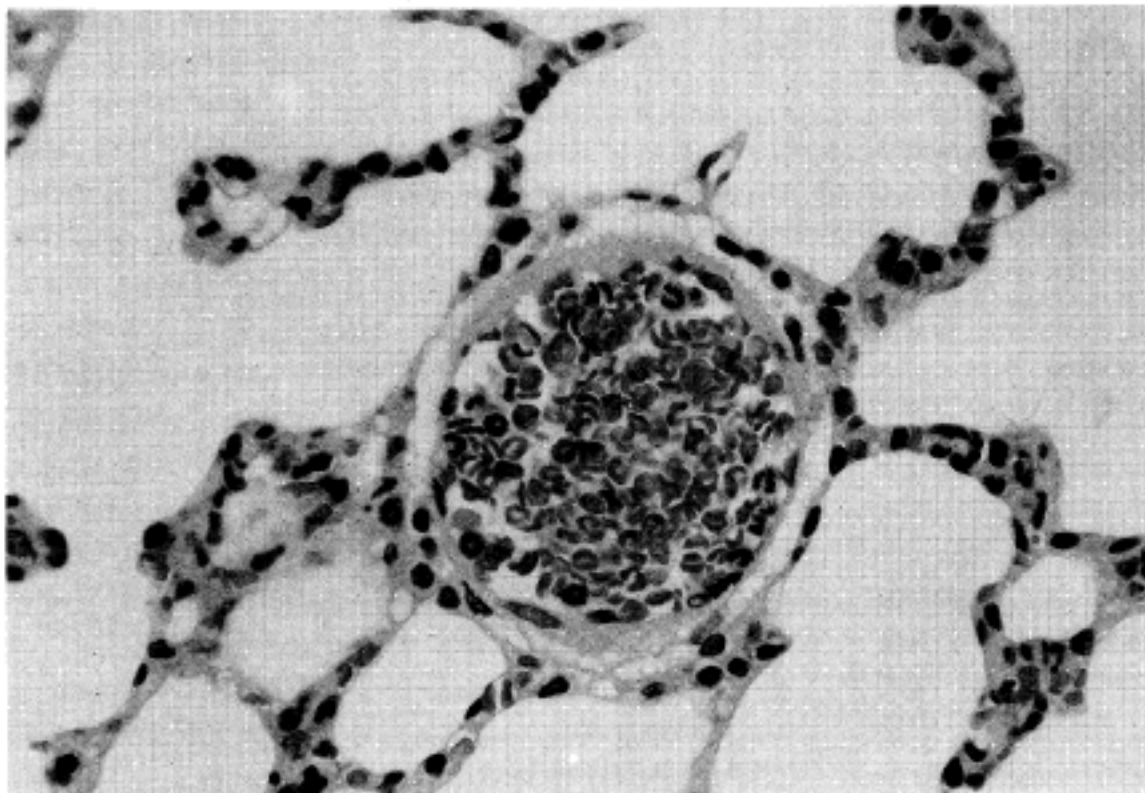


Fig. 1. Pavementing of leukocytes in small pulmonary artery 6 hours after MCT injection.

Table 1. Mean right ventricular systolic pressure

Days after MCT Injection								
	1	3	6	9	14	21	30	60
Control (n=16)	23.5 ± 2.6							
MCT Treatment (n=48)	22.7 ± 2.7	22.8 ± 0.3	$30.2^* \pm 3.2$	$30.7^* \pm 3.9$	$34.2^* \pm 4.2$	$31.3^* \pm 5.0$	$32.0^* \pm 4.0$	$32.5^* \pm 3.6$

*p<0.001 Student t test, compared with control
MCT: Monocrotaline

크기에 상관없이 vWF에 대한 면역조직화학적색결과 비연속적인 미세한 과립형태의 미약한 염색반응을 보였다.

나. **Monocrotaline투여군:** MCT 투여군에서는 약물투여 3일 후부터 폐동맥(Fig. 3, left) 및 폐정맥의 혈관내피세포가 혈관의 종류와 크기에 관계없이 연속적이고 굵은 과립형태의 대조군에 비해 증가된 뚜렷한 염색반응을 보았으며 이는 2달 후까지 계속되었다.

(2) 5-Bromo deoxyuridine을 이용한 동역학;

가. 대조군: 대조군의 각 예에서 직경 150 micron

이하 폐동맥의 혈관내피세포 200개, 폐포상피세포 500개당 BrdU에대한 면역조직화학적색결과 양성반응을 보이는 핵의 수를 구한바, 혈관내피세포의 labeling index는 0.19 ± 0.26 , 폐포상피세포의 labeling index는 1.15 ± 0.54 였다(Table 2).

나. **Monocrotaline투여군:** MCT투여군에서는 약물 투여 6일 후부터 혈관내피세포의 labeling index가 1.75 ± 0.76 으로 증가하기 시작하여 3주 후 5.75 ± 2.21 로 최고치를 보였으며(Fig. 4), 1달 및 2달 후까지도 약물 투여 6~9일 수준으로 증가되어 지속

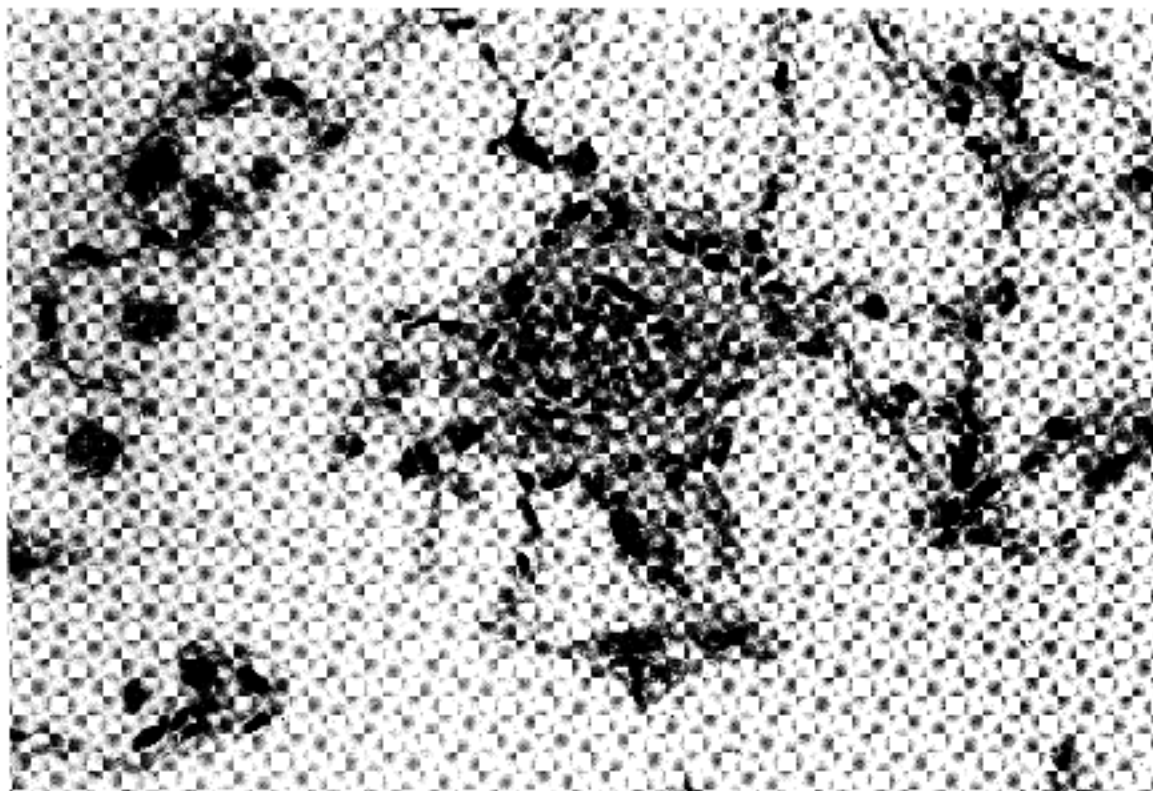


Fig. 2. Small pulmonary artery showing medial thickening 1 month after MCT injection.

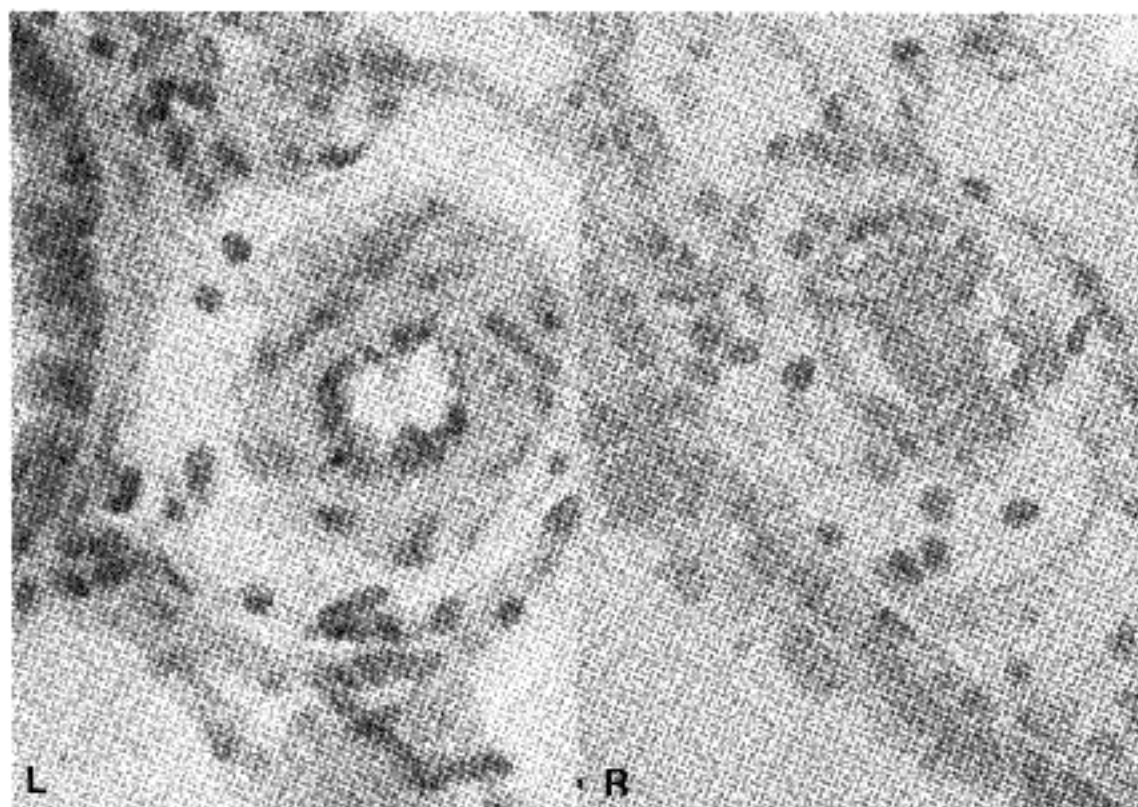


Fig. 3. Increased expression of vWF by endothelium of small pulmonary artery showing medial thickening 9 days after MCT injection(left) compared with control section(right)(Fast Red, Hematoxylin).

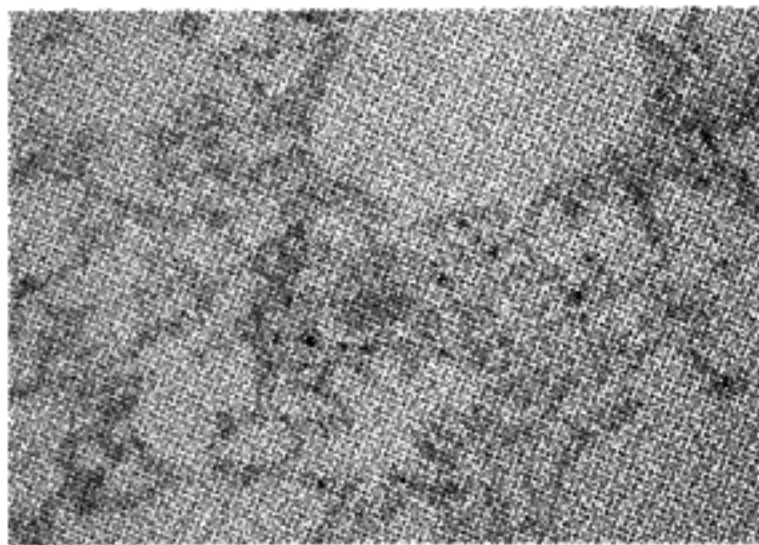


Fig. 4. Immunostaining to BrdU 3 weeks after MCT injection showing positive nuclear staining of endothelium lining small pulmonary artery (DAB, Hematoxylin).

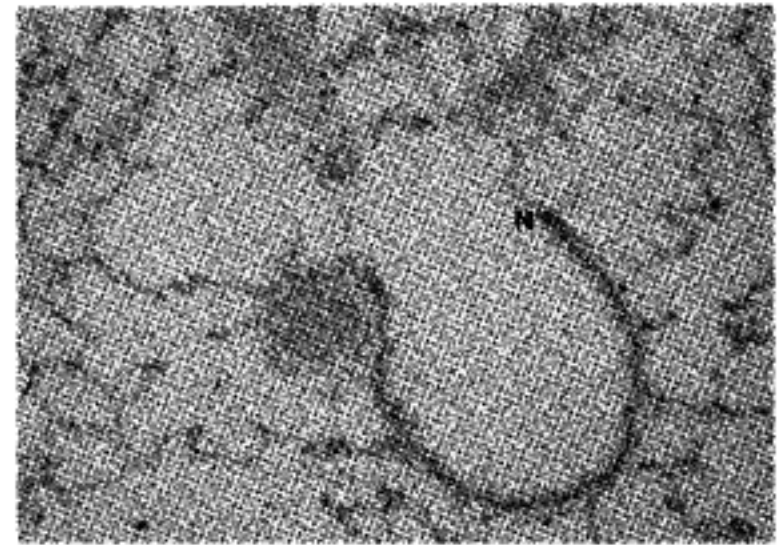


Fig. 5. Immunostaining to GRP showing a pulmonary neuroendocrine cell(N) at terminal bronchiole (AEC, Hematoxylin).

Table 2. Labeling index of endothelium

Group	Days after MCT injection								
	1	3	6	9	14	21	30	60	
Control (n=8)	0.19±0.26								
MCT Treatment (n=48)	0.25 ±0.27	0.33 ±0.26	1.75* ±0.76	2.33* ±0.88	4.83* ±1.18	5.75* ±2.20	2.25* ±0.94	1.42* ±0.74	

*p<0.001 Student t test, compared with control
MCT: Monocrotaline

Table 3. Labeling index of pneumocytes

Group	Days after MCT injection								
	1	3	6	9	14	21	30	60	
Control (n=8)	1.15±0.54								
MCT Treatment (n=48)	0.93 ±0.47	0.93 ±0.53	5.33* ±1.40	6.67* ±2.03	12.17* ±3.33	14.00* ±2.35	5.83* ±1.92	6.07* ±0.54	

*p<0.001 Student t test, compared with control
MCT: Monocrotaline

되었다(Table 2).

폐포상피세포의 labeling index도 약물투여 6일 후부터 5.33 ± 1.4 로 증가하기 시작하여 3주 후 최고치를 보였으며, 1달 및 2달 후까지도 대조군에 비해 증가된 6~9일 후의 수치들 나타냈다(Table 3).

(3) 폐신경내분비세포의 수적 변화;

가. 대조군; 각 예당 3장의 절편을 만들어 GRP에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였으나 한 예에서만 폐신경내분비 세포를 발견할 수 있었다.

나. Monocrotaline투여군; 각 예당 3장의 절편을 만들어 GRP에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학적염색을 시행한바 MCT투여 1달군의 1예에서만 종말기관세지가 가지를 치는 지점에서 폐신경 내분비 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

3) 전자현미경적 소견: MCT투여 6시간 후부터 폐소동맥 및 폐세동맥의 혈관내피세포에 혈소판 및 염증세포의 부착이 관찰되기 시작하였으나 혈관내피세포의 변화는 관찰되지 않았다. 약물투여 12시간 후에는 혈관내피세포 세포막의 myelin figure(Fig. 6)와 하방

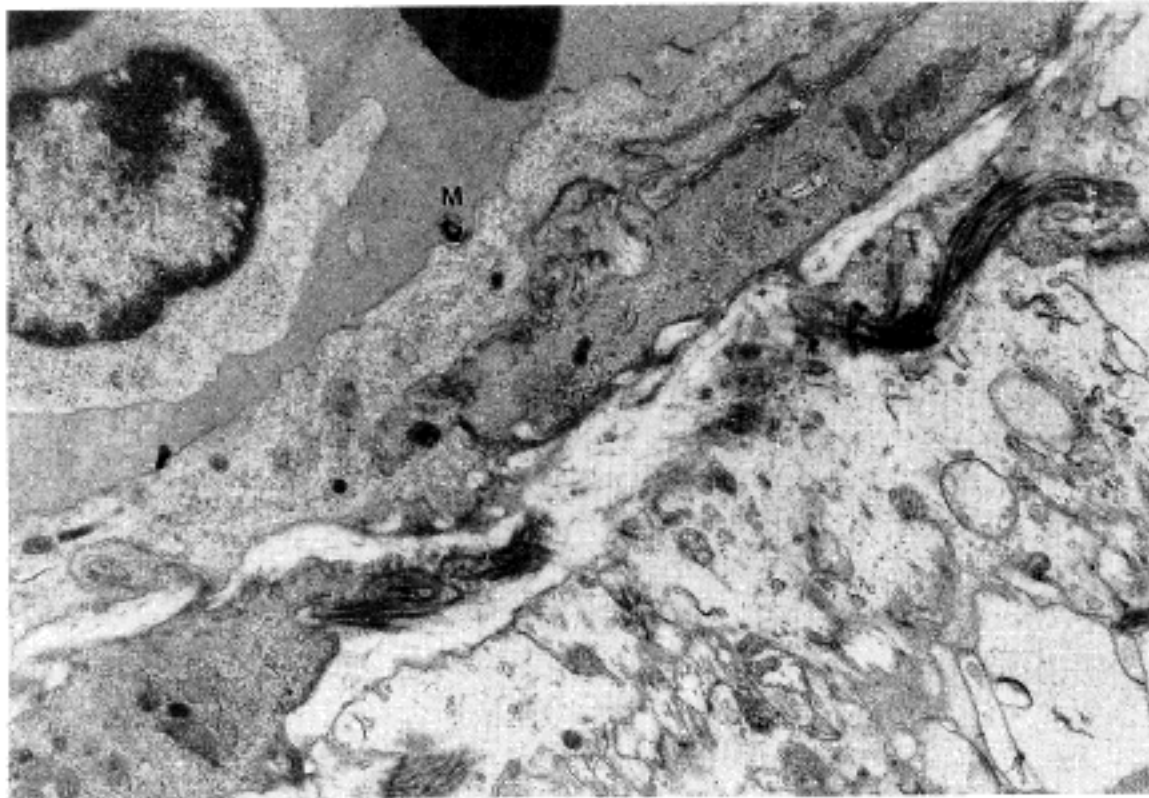


Fig. 6. Myelin figure(M) at cell membrane of endothelium 12 hours after MCT injection (Uranyl acetate & Lead citrate, $\times 6,000$)

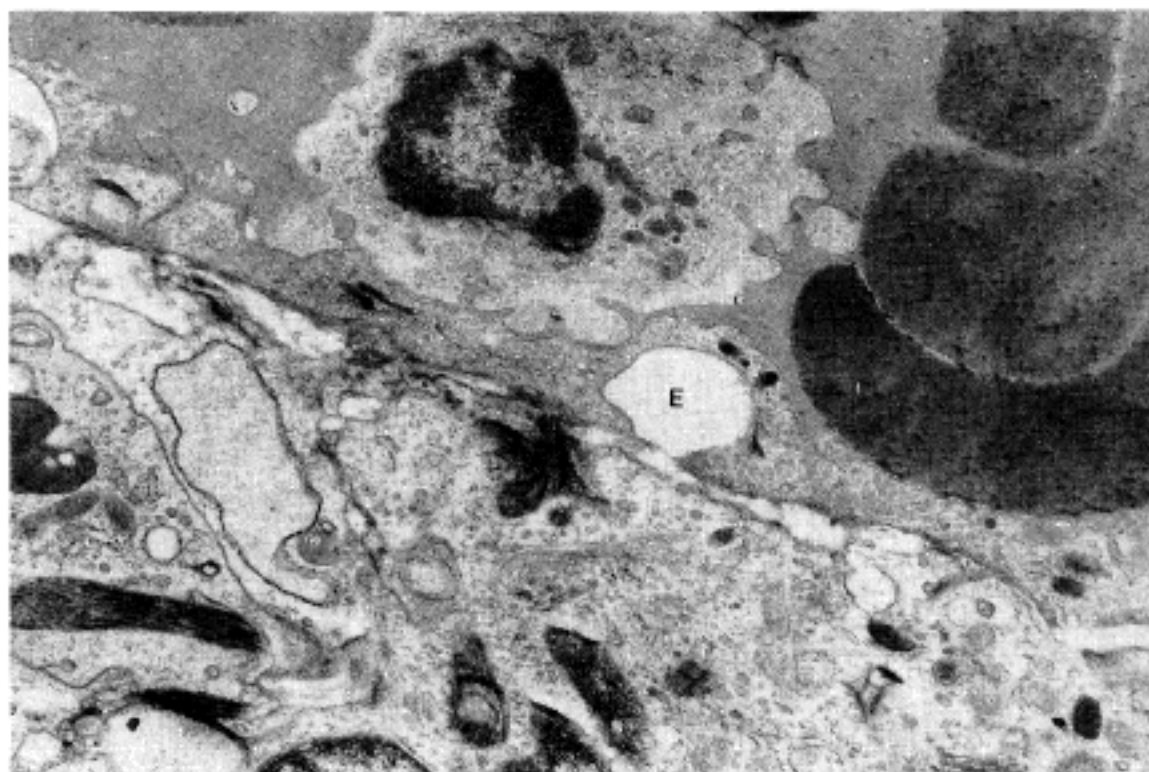


Fig. 7. Endothelial Vesicle(E) formation 24 hours after MCT injection (Uranyl acetate & Lead citrate, $\times 6,000$).

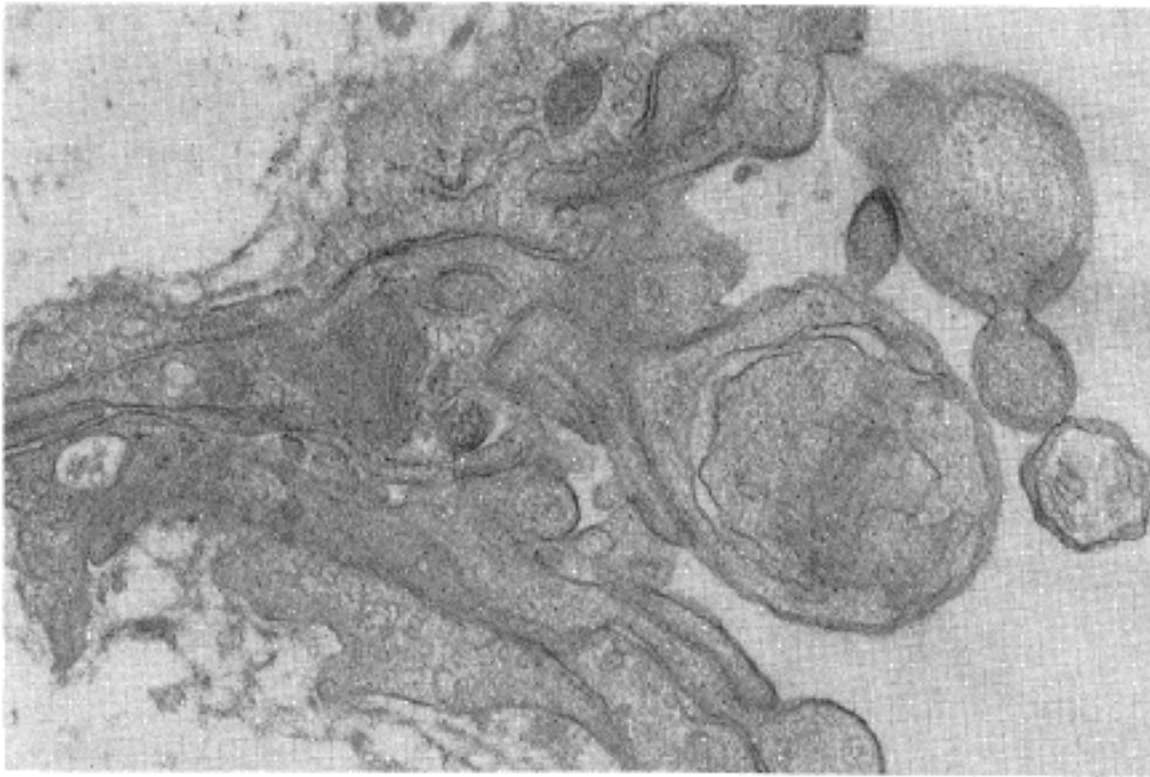


Fig. 8. Endothelium showing irregularity of cell membrane, swelling of mitochondria 2 days after MCT injection(Uranyl acetate & Lead citrated, $\times 17,000$).

간질조직에 부종액의 축적이 관찰되기 시작하여 세포 손상이 시작됨을 알수 있었다. 약물투여 24시간 후부터는 염증세포와 혈소판의 부착 및 탈과립, 간질조직의 부종외에 혈관내피세포의 세포막이 불규칙해지고 세포질내 'endothelial vesicle'의 형성이 관찰되기 시작하였으며(Fig. 7), 48시간 후에는 세포막의 불규칙성과 'endothelial vesicle'의 형성이 더욱 뚜렷해졌으며 mitochondria등 세포 기능질의 팽윤도 관찰되어 가장 뚜렷한 세포 손상의 미세구조 변화를 나타냈다(Fig. 8).

MCT 투여 3일 후부터는 핵이 커지고 핵막이 불규칙해지며 염색질이 증가하는 핵비대 소견이 관찰되기 시작하였으며, 세포질의 양과 세포질내 소포체, Weibel-Palade body등 소기관(organelle)의 증가가 관찰되기 시작하였다(Fig. 10). 약물투여 1주일 후부터 실험이 끝나는 2달까지 폐혈관내피세포에서 지속적으로 핵과 세포질의 비대를 관찰할 수 있었다(Fig. 11).

고 찰

MCT 투여는 저산소증과 함께 실험적으로 폐고혈압을 일으키는 대표적인 방법으로 1961년 Lalich 및 Merkow가²³⁾ 백서에 Crotalia를 투여하여 폐동맥염을 관찰한 것을 계기로 원발성 폐고혈압의 병인을 규명할 수 있는 실험적 방법으로 활발히 이용되고 있다. 그러나 MCT이 어떠한 기전으로 폐동맥압을 상승시키는지는 원발성 고혈압의 병인처럼 아직 확실히 밝혀져 있지 못하며, 이들 연구의 대부분은 일단 폐고혈압이 발생한 이후의 혈관 구조변화에 관한 것들이다^{4-6,9,12)}. 본 교실에서도 과거 MCT 투여에 의한 폐

동맥고혈압에 대한 연구가 시행되었으며, 이들 연구결과를 종합하면 초기의 기능적혈관수축이 후기의 미세폐동맥의 중막비후, 비근성동맥의 근성화, 단위면적당 폐동맥의 수효감소등 혈관구조의 재구성으로 이어져 혈관저항의 상승에 의해 폐동맥고혈압이 발생하는 것으로 해석하고 있다^{10,11)}.

본 실험에서는 MCT 투여에 의한 폐고혈압시 폐혈관 수축 및 재구성에 영향을 미칠수있는 histamine, serotonin, prostaglandin, gastrin releasing peptide등의 물질을 분비할 수 있는 혈관내피세포, 폐신경경내분비세포, 혈소판, 탐식구, 비만세포중 혈관내피세포와 폐신경내분비세포의 변화를 규명하고자 인체 폐혈관과 조직학적 구조가 유사한 것으로 밝혀진 백서들 실험동물로 사용하여 MCT을 1회 피하주사한 후 폐동맥의 변화, 폐혈관 내피세포의 미세구조변화 및 vWF의 표현양상, 약물투여후 폐혈관 내피세포 및 폐포상피세포의 동역학과 폐신경내분비세포의 수적변화를 초기변화에 중점을 두어 비교 관찰하여 보았다.

MCT 투여 후의 형태학적 변화중 후기변화인 폐단위 면적당 혈관의 감소, 중막의 비후, 비근성동맥의 근성화등 혈관구조의 재구성에 대해서는 이견이 없으나, 초기 변화인 동맥염 및 혈전의 유무, 혈관 외막의 염증세포 침윤여부 등에 관해서는 연구 결과마다 차이가 있다^{4-6,9-12,23,24)}. 본 실험에서는 MCT을 Wistar 백서에 1회 피하주사하여 폐동맥 고혈압을 유발시켰는데, 혈관염, 혈전, 혈관 외막의 염증세포 침윤은 관찰할수 없었다. 이는 Wistar 백서가 비교적 MCT에 저항성이 있는 점²⁵⁾과 약물의 용량 및 투여방법 차이에 의한 것으로 사료되며, 혈관염과 혈전이 후기 혈관 재구성의 필요 요건은 아닌 것을 알수 있었다. Miller

등¹³⁾은 MCT 투여 12시간에 thorotrast가 폐혈관 밖으로 유출되는 것을 전자현미경으로 확인하여 간접적으로 혈관내피세포의 손상을 증명하였는데, 본 실험에서는 약물투여 6시간 후부터 폐혈관내피세포에 염색세포 및 혈소판의 부착이 관찰되기 시작하였고, 12시간 후부터 혈관내피세포 세포막의 myelin figure, 극소적인 세포내 부종 및 혈관내피세포 하방 간질조직에 부종액의 침착이 관찰되어 MCT 투여 12시간 후부터 혈관내피세포 손상이 시작됨을 알 수 있었다. 약물 투여 24시간 후부터는 혈관내피세포의 형태 및 세포막이 불규칙해지고 세포질내 'Endothelial vesicle'의 형성이 관찰되기 시작하였으며 이는 2일 후 가장 뚜렷하였으며, 3일 후부터는 세포 손상의 소견외에 핵의 비대, 세포질내 Weibel-Palade body, 소포체를 포함한 소기관의 증가등 세포 비대의 미세구조적 변화가 관찰되기 시작하였다. 이러한 세포 비대의 소견은 MCT 투여 2달 후까지 관찰할 수 있어 MCT 투여에 의한 폐혈관내피세포 손상은 형태학적으로 재생후에도 지속적인 혈관내피세포의 비대를 유발하는 것으로 생각되었다.

vWF는 혈관내피세포와 거핵구에서 형성되는 물질로서 혈소판의 응집 및 혈관벽 부착에 관여하며, 혈관내피세포에서만 관찰되는 특이한 미세 구조인 Weibel-Palade body에 존재하여 Weibel-Palade body와 함께 혈관내피세포의 표식인자로 이용된다²⁶⁻²⁹⁾. vWF는 방사선 조사, 신부전, 뇌동맥 혈전증등 혈관내피세포 손상을 유발하는 경우 혈중치가 증가하며³⁰⁻³²⁾, 내독소 및 balloon catheter에 의한 손상시에도 혈관내피세포내 표현이 증가되는 것으로 밝혀져 있다³³⁾. 본 실험에서는 MCT 투여 후 혈관내피세포의 vWF 표현 양상을 면역조직화학염색을 시행하여 관찰한 바, MCT 투여 3일 후부터 폐혈관의 종류와 크기에 관계없이 혈관내피세포의 염색상이 뚜렷해지기 시작하였는데, 이는 전자현미경적 관찰상 혈관내피세포내 Weibel-Palade body등 기능질이 증가하는 시기와 일치하였다. 증가된 vWF의 염색상은 실험이 끝난 2달 후까지 지속되어 전자현미경적으로 관찰된 지속적인 세포비대의 소견과 일치하였고, MCT 투여에 의한 혈관내피세포의 손상은 지속적인 vWF의 증가등 폐혈관내피세포의 기능 이상을 초래하는 것을 알 수 있었으며, vWF의 증가등 폐혈관내피세포의 기능 이상을 초래하는 것을 알 수 있었으며, vWF가 혈소판의 응집 및 부착에 관여하는 인자라는 점으로 미루어 MCT투여후 혈관내피세포내 증가된 vWF는 혈소판 응집의 요인이 될 수 있을 것으로 사료되었다.

폐혈관내피세포는 증식과 비대에 의한 혈관내강의 축소라는 물리적 요인외에 그기능의 이상에 의해서도 폐고혈압의 병인에 관여할 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 즉 폐혈관내피세포는 5-hydroxytryptamine등 혈관 수축 물질의 대사를 담당하고³⁴⁾, 혈전 생성기전

에 관여하여 혈소판에서 분비되는 물질에 의한 혈관내강 축소 및 수축을 유발할 수 있고³⁵⁻³⁸⁾, endothelium-derived relaxing factor등 혈관평활근에 작용하여 혈관을 수축 및 이완시킬 수 있는 물질을 분비하는 것이 밝혀져있고^{39,40)}, 또한 혈관평활근, 섬유아세포와 혈관내피세포 자체의 증식을 유발하는 platelet derived growth factor도 분비하는 것으로 알려져⁴¹⁾ 폐고혈압의 병인에 중추적 역할을 할 것으로 사료되고 있다. 본 실험에서는 thymidine의 유사체인 Brdu를 사용하여 MCT 투여후 폐혈관내피세포와 폐포상피세포의 동역학을 관찰한 바, 이들 모두 약물투여 6일후 labeling index의 증가를 보이기 시작하여 3주후 최고치를 보였으며, 1달 및 2달까지도 약물 투여 6~9일후의 증가된 labeling index를 보여 약물 투여 초기 폐혈관내피세포의 손상에 의한 재생은 3주후 가장 활발함을 알 수 있었고 MCT 투여 1달 이후에는 세포 증식보다는 폐혈관내피세포의 기능 이상과 비대가 폐동맥 고혈압의 병인에 관여하는 것으로 생각되었다. ³H-thymidine을 이용한 실험결과에 의하면 폐소엽내 폐동맥 혈관내피세포의 labeling index는 약물 투여 2주 후 최고치를 보였으며 4주 후 2차 증가를 나타내어⁴²⁾, 본 실험의 결과와는 다소 차이를 보였으나 이는 MCT 투여방법의 차이에 기인할 것으로 사료되었다. MCT은 투여 직후 체외로 배설되어 조직내에는 거의 남아있지 않음이 밝혀졌으나⁴³⁾, 혈관내피세포의 증식은 계속됨을 알 수 있었는데, 이는 혈관내피세포 및 혈소판에서 유리된 성장인자인 platelet derived growth factor에 의한 것으로 사료되었으며 이들 성장인자에 대한 항체를 이용한 추가적인 연구에 의해 밝혀질 수 있으리라 생각되었다. MCT 투여 후의 형태학적 변화에 대한 연구들은 주로 폐동맥에만 국한되어 왔으나 vWF의 표현이 폐동맥 뿐 아니라 폐정맥에서도 증가하고 폐포상피세포의 labeling index도 혈관내피세포와 동일한 양상을 보이는 본 실험의 결과에 의하면 MCT에 의한 폐손상은 폐동맥에만 국한되지 않는 광범위한 과정임을 알 수 있었으나 폐정맥 혈관내피세포의 변화는 혈관벽의 비후를 초래하지 않아 폐고혈압의 발생에는 깊이 관여하지 않을 것으로 생각되었다.

1940년 Frolich에 의해 처음 기술된 폐신경내분비세포의 생체내 기능은 아직 확실하게 밝혀져있지 않으나 1969년 Lauweryns등¹⁵⁾이 신경내분비세포에서 polypeptide substance를 증명한 이후 전자현미경적연구, 면역조직화학염색, 분자유전학적 연구등을 통해 세포질 내에 serotonin, gastrin releasing peptide(GRP), calcitonin, leu-enkephalin등을 지닌 분비과립을 포함하는 것이 밝혀짐에 따라 폐신경내분비세포는 세포의 폐장내 위치 및 감각신경과의 연관성 등에 의해 추정되었던 저산소증에 대한 감지세포로서의 역할보다는 주변세포의 기능에 영향을 미치는 par-

acrine 역할을 할 것으로 추정되고 있다^{18,19,21,44-47}. 폐신경내분비세포는 그 기능뿐 아니라 동물의 종류에 따른 정상 분포에 관해서도 이견이 많다^{17,48-50}. 폐신경내분비세포는 태아시기나 태생적후에 주로 기관지가 분지하는 부위에서 관찰되고, 태아시기 출현양상이 폐가 성숙함에 따라 폐의 중앙부위에서 변방부로 이동되며 성숙된 폐에서는 거의 관찰되지 않아 태생기 폐의 발달에 관여한다는 보고도 있으나, 성숙된 폐에서 거의 관찰되지 않는 것은 폐의 팽창에 따른 회석효과에 의한다는 반론도 있다^{16,18,21}. 본 실험에서는 폐신경내분비세포를 증명하고자 백서의 폐신경내분비세포내에 존재하는 것으로 밝혀진 GRP에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학적염색을 시행하였다. GRP는 양서류의 피부에서 처음 추출되어 bombesin이라 명명되었던 물질로, 포유류의 신경세포 및 장관의 신경내분비세포에 주로 존재한다^{51,52}. GRP의 기능은 다양하여, gastrin, insulin, glucagon 등 호르몬의 분비를 촉진하고, 평활근을 수축시키며, 성장촉진인자의 역할도 한다²¹. 본 실험에서는 혈관수축 기능이 있는 GRP를 지니고 있는 폐신경내분비세포가 MCT 투여에 의한 폐동맥고혈압의 병인에 관여할 수 있다는 가정하에 GRP에 대한 면역염색을 시행하여 폐신경내분비세포의 수적 변화를 관찰한 바 MCT 투여군에서 폐신경내분비세포의 증가를 관찰할 수 없었다. 정상 대조군의 백서에서도 GRP에 대한 면역염색 결과 양성인 폐신경내분비세포를 거의 발견할 수 없었는데, 이는 성숙된 백서에서는 폐신경내분비세포가 기관(trachea) 주위에서만 드물게 발견된다는 보고와 일치하였다⁵³. 만성폐고혈압시 폐신경내분비세포가 증가된다는 보고와²² 본 실험 결과와의 차이는 흥미있는 사실이며, 이는 개체차 혹은 폐신경내분비세포가 폐고혈압의 발생보다는 유지, 지속에 관여하기 때문이라고 사료되었다.

이상의 문헌고찰과 본 연구결과를 종합하면, MCT에 의한 폐고혈압은 초기 폐미세혈관 내피세포의 손상, 혈소판 부착 및 활성화로 아마도 platelet derived growth factor가 유리되어 혈관내피세포와 중막 평활근의 증식을 유발 지속시키고, 혈관내피세포의 기능장애에 의한 혈관수축과 함께 혈관 저항을 증가시켜 발생하는 것으로 사료된다. MCT 투여 1달 후부터는 BrdU의 labeling index가 약물투여 9일 후의 수준으로 급격히 변화하는 점으로 보아 약물투여 4주 후의 폐고혈압 지속은 초기변화에 의해 이미 진행된 불가역적인 혈관구조의 재구성에 의한 것으로 사료된다. MCT은 폐동맥 미세혈관에 특이하게 작용하지 않으며, 폐신경내분비세포는 후기까지 증가가 관찰되지 않는 점으로 MCT투여에 의한 Wistar 백서의 폐고혈압 발생기전에는 관여하지 않는 것으로 사료된다.

결 론

자성 Wistar백서에 폐동맥고혈압의 대표적인 실험적 방법인 monocrotaline을 투여하여 폐혈관내세포의 형태학적 변화 및 약물 투여 후의 동역학과 폐신경내분비세포의 수적변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) MCT 투여 3일 후부터 폐혈관내피세포가 폐혈관의 종류와 크기에 관계없이 vWF에 대한 면역조직화학적염색에 뚜렷한 염색상을 보이기 시작하였으며, 이는 2달 후까지 지속되었다.

2) 폐소동맥 및 폐세동맥의 혈관내피세포에 MCT 투여 6시간 후부터 혈소판 및 염증세포의 부착이 관찰되기 시작하였으며, 24시간 후에는 혈소판의 탈과립 현상이 관찰되었다. MCT투여 12시간 후부터 미세구조상 myelin figure 등 혈관내피세포의 손상 소견이 관찰되기 시작하여 48시간 후 가장 뚜렷해졌다. MCT투여 3일 후부터는 핵과 세포 기능질의 비대소견이 관찰되기 시작하였으며 이는 2달까지는 지속되었다.

3) MCT 투여 6일 후부터 폐소동맥 및 폐세동맥 혈관내피세포의 BrdU labeling index가 증가하기 시작하여 3주 후 최고치를 보였으나 1달과 2달 후에도 MCT 투여 6~9일 후의 수준으로 증가되어 유지되었다.

4) GRP에 대한 면역조직화학적염색상 양성인 폐신경내분비세포는 성숙된 백서 폐장에서는 거의 관찰할 수 없었으며, MCT 투여군에서도 증가하지 않았다.

이상의 결과로 MCT 투여에 의한 폐고혈압은 초기 폐미세혈관 내피세포의 손상, 혈소판 부착 및 활성화로 아마도 platelet derived growth factor가 유리되어 혈관내피세포와 중막 평활근의 증식을 유발 지속시키고, 혈관내피세포의 기능장애에 의한 혈관수축과 함께 혈관저항을 증가시켜 발생하는 것으로 사료된다. 폐신경내분비세포는 병변 후기까지 증가가 관찰되지 않아 MCT 투여에 의한 폐동맥고혈압의 발생기전에 관여하지 않을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Wagenvoort CA, Wagenvoort N. *Pathology of the pulmonary hypertension*. John Wiley & Sons, New York: 1977; 9-16.
- 2) Reid LM. *Structure and function in pulmonary hypertension*. New perceptions. *Chest* 1986; 89: 279-88.
- 3) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*. 4th ed. Philadelphia: W B Saunders Co., 1989; 764-5
- 4) Kay JM, Heath D. *Observations on the pulmonary*

- arteries and heart weight of rats fed on *Crotalaria spectabilis* seeds. *J Path Bact* 1966; 92: 385-94.
- 5) Kay JM, Smith P, Heath D. *Electron microscopy of the Crotalaria pulmonary hypertension*. *Thorax* 1969; 24: 511-26.
 - 6) Hislop A, Reid L. *Arterial changes in Crotalaria spectabilis induced pulmonary hypertension in rats*. *Br J Exp Path* 1974; 55: 153-63.
 - 7) Fishman AP. *Hypoxia on the pulmonary circulation: How and where it acts*. *Circ Res* 1976; 38: 221-31.
 - 8) Meyrick BO, Reid LM. *Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of ³H-Thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls*. *Am J Pathol* 1982; 106: 84-94.
 - 9) Lalich JJ, Johnson WD, Racz iak TJ, Shumaker RC. *Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole induced cor pulmonale in rats*. *Arch Pathol Lab Med* 1977; 101: 69-73.
 - 10) 신동환, 이유복. *Monocrotaline* 투여로 인한 백서 폐혈관 변화의 형태학적 및 형태계측학적 연구. 연세의대 논문집 1987; 20: 312-20.
 - 11) 김선용. *Verapamil*과 *Aspirin*이 *Monocrotaline* 투여로 인한 백서 폐혈관 변화에 미치는 효과에 대한 형태학적 연구. 연세의대 학위논문집 1989; 45.
 - 12) Wilson DW, Segall HJ, Pan LCW, Dunston SK. *Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats*. *Microvasc Res* 1989; 38: 57-80.
 - 13) Miller WC, Rice DL, Kresusel RG, Bedrossian CWM. *Monocrotaline model on noncardiogenic pulmonary edemas in dogs*. *J Appl Physiol* 1978; 45: 962-5.
 - 14) Jaffe EA. *Cell biology of endothelial cells*. *Hum Pathol* 1987; 18: 234-9.
 - 15) Lauweryns JM, Peuskens JC. *Argyrophilic(kinin and amine producing²) cells in human infant airway epithelium*. *Life Sci(I)* 1969; 8: 577-85.
 - 16) Cutz E, Chan W, Track NS. *Bombesin, calcitonin, and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of human lung*. *Experientia* 1981; 37: 765-7.
 - 17) Sisson MCJ, Gosney JR. *Pulmonary endocrine cells immunoreactive for calcitonin in the lungs of fetal and neonatal rats*. *Thorax* 1985; 40: 862-5.
 - 18) Stahlman MT, Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME. *Ontogeny of neuroendocrine cells in human fetal lung. II. An immunohistochemical study*. *Lab Invest* 1985; 52: 52-50.
 - 19) Lauweyns JM, Van Ranst L, Verhofstad AAJ. *Ultrastructural localization of serotonin in the intrapulmonary neuroepithelial bodies of neonatal rabbits by use of immunoelectron microscopy*. *Cell Tissue Res* 1986; 243: 455-9.
 - 20) Johnson DE, Wobken JD, Landrum BG. *Changes in bombesin, calcitonin, and serotonin immunoreactive pulmonary neuroendocrine cells in cystic fibrosis and after prolonged mechanical ventilation*. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 123-31.
 - 21) Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. *Gastrin-releasing peptide(Mammalian bombesin) gene expression in health and disease*. *Lab Invest* 1988; 59: 5-24.
 - 22) Gosney J, Heath D, Smith P, Harris P, Yacoub M. *Pulmonary endocrine cells in pulmonary arterial disease*. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 337-41.
 - 23) Lalich JJ, Merkow L. *Pulmonary arteritis produced in rats by feeding Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* 1961; 10: 744-50.
 - 24) Merkow L, Kleiner mam J. *An electron microscopic study of pulmonary vasculitis induced by monocrotaline*. *Lab Invest* 1966; 15: 547-64.
 - 25) Lalich JJ. *Influence of rat strain on pulmonary vascular response to monocrotaline feeding*. *Pathologia Microbiol* 1964; 27: 965-82.
 - 26) Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. *Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium*. *Nature* 1979; 279: 636-8.
 - 27) Morisato DK, Gralnick HR. *Selective binding of the factor VIII/von Willebrand factor protein to human platelets*. *Blood* 1980; 55: 9-15.
 - 28) Bolhuis PA, Sakariassen KS, Sander HJ, Bouma BN, Sixma JJ. *Binding of factor VIII-von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adhesion and enhances platelet spreading*. *J Lab Clin Med* 1981; 97: 568-76.
 - 29) Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. *Immunolocalization von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *J Cell Biol* 1982; 95: 355-60.
 - 30) Warrell R, Hullin MB, Coller BS. *Increase factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in renal failure*. *Am J Med* 1979; 66: 226-8.
 - 31) Zheng L. *Increased factor VIII related antigen in cerebral thrombosis*. *Thromb Res* 1983; 32: 321-4.
 - 32) Sporn LA, Rubin P, Marder UJ, Wagner DD. *Irradiation induces release of von Willebrand protein from endothelial cells in culture*. *Blood* 1984; 64: 567-70.
 - 33) Reidy MA, Chopek M, Chao S, McDonald T, Schwartz SM. *Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells*. *Am J Pathol* 1989; 134: 857-64.

- 34) Junod AF. *Uptake, metabolism and efflux of ¹⁴C-5-hydroxytryptamine in isolated perfused rat lungs.* *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 183: 341-55.
- 35) Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. *Synthesis of prostaglandin I₂(prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3922-6.
- 36) Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA. *Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H₂ and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells.* *J Bio Chem* 1978; 253: 7138-41.
- 37) Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA. *Stimulation of endothelial prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A23187.* *J Clin Invest* 1978; 62: 923-30.
- 38) Declerk F, Van Nueten JM. *Platelet-mediated vascular contractions; Inhibitions of the serotonergic component by ketoserin.* *Throm Res* 1982; 27: 713-27.
- 39) Furchgott RF. *Role of endothelium in response of vascular smooth muscle.* *Cir Res* 1983; 53: 557-73.
- 40) Furchgott RF. *The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxation factor.* *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 257-70.
- 41) DiCorleto PE, Bowen-Pope DF. *Cultured endothelial cells produce multiple growth factors for connective tissue cells.* *Exp Cell Res* 1984; 153: 167-72.
- 42) Meyrick B, Reid L. *The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study.* *Lab Invest* 1978; 38: 188-200.
- 43) Hayashi Y. *Excretion and alteration of monocrotaline in rats after a subcutaneous injection.* *Fed Proc* 1966; 25: 688-688.
- 44) Lauweryns JC, Peukens JC, Cokelaere M. *Argyrophil, fluorescent, and granulated(peptide and amine producing?) AFG cells in human infant bronchial epithelium. Light and electron microscopic studies.* *Life Sci(I)* 1970; 9: 1417-21.
- 45) Cutz E. *Neuroendocrine cells of the lung, An overview of morphologic characteristics and development.* *Exper Lung Res* 1982; 3: 185-208.
- 46) Yoshizaki K, de Bock V, Solomon S. *Origin of bombesin-like peptides in human fetal lung.* *Life Sci* 1984; 34: 835-43.
- 47) Miller YE. *The pulmonary neuroendocrine cell A role in adult lung disease?* *Am Rev Respi Dis* 1989; 140: 283-4.
- 48) Edmondson NA, Lewis DJ. *Distribution and ultrastructural characteristics of Feyrter cells in the rat and hamster airway epithelium.* *Thorax* 1980; 35: 371-374.
- 49) Lauweryns JW, Ranst LV. *Calcitonin gene related peptide immunoreactivity in rat lung: light and electron microscopic study.* *Thorax* 1987; 42: 183-9.
- 50) Cho T, Chan W, Cutz E. *Distribution and frequency of neuro-epithelial bodies in post-natal rabbit lung: Quantitative study with monoclonal antibody against serotonin.* *Cell Tissue Res* 1989; 255: 353-62.
- 51) Erspamer V, Melchiorri P. *Active polypeptides of the amphibian skin and their synthetic analogues.* *Pure Applied Chem* 1973; 35: 463-6.
- 52) Panula P. *Histochemistry and function of bombesin-like peptides.* *Med Biol* 1986; 64: 177-92.
- 53) Jaffery PK, Reid L. *New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopical study.* *J Anat* 1975; 120: 295-320.