

제대정맥 내피세포의 무산소화 및 재산소화 후 형태학적 변화 및 시간에 따른 일산화질소 생성량의 변화

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

정재희 · 홍창균 · 박장상 · 김승남 · 고용복

Morphologic and Time Dependent Changes of Nitric Oxide Synthesis Following Anoxia and Reoxygenation of the Endothelial Cells of the Umbilical Vein

Jae Hee Jung, M.D., Chang Gyoon Hong, M.D., Jang Sang Park, M.D., Seung Nam Kim, M.D. and Yong Bok Koh, M.D.

Purpose: In order to clarify the exact role of nitric oxide for a ischemia-reperfusion (I/R) injury, we observed morphologic change of endothelial cells and a time dependent change of nitric oxide synthesis following anoxia and reperfusion injuries.

Methods: The experimental groups were divided into 4 sub-groups: a control group without any treatment, an anoxia group treated with anoxic air (93% N₂, 5% CO₂, 2% H₂) for 50 minutes, a reoxygenation group treated with 100% O₂ for 480 minutes, and an allopurinol group treated with allopurinol immediately prior to reoxygenation. Endothelial cells were isolated from a human fetal umbilical vein and cultured in M-199 medium. We observed a morphological change of the endothelial cells with inverted light microscopy and we studied the time dependent change of nitric oxide synthesis with microelectrode following anoxia and reperfusion injuries.

Results: Most significantly, the endothelial cells of the anoxia group were more flattened and detached than those of the control group. A more severe detachment of endothelial cells was found in the reoxygenation group than in the anoxia group. There was no significant difference in the morphological change between the allopurinol group and the anoxia group. Additionally, the concentration of NO in the anoxia group (2511.62 ± 428.60 nM/ 1×10^5 cells/ml) was lower than that of the control group (3505.14 ± 192.95 nM/ 1×10^5 cells/ml) ($P < 0.005$). The NO concentration of the

reoxygenation group reached its highest level of 2953.14 ± 90.98 nM/ 1×10^5 cells/ml at 180 minutes ($P < 0.05$) and decreased thereafter. There was no significant difference in the NO concentration between the allopurinol and anoxia groups.

Conclusion: The morphologic damage of endothelial cells in the reoxygenation group was significantly increased as compared with the anoxia group. Nitric oxide syntheses in the reoxygenation and anoxia groups was decreased as compared with the control group. (*J Korean Surg Soc* 2001;60:465-469)

Key Words: Ischemia-reperfusion injury, Anoxia and reoxygenation, Endothelial cells, Nitric oxide

중심 단어: 허혈-재관류 손상, 무산소화 및 재산소화, 내피세포, 일산화질소

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

서론

외상, 색전증 또는 혈전증 등으로 인해 급성으로 동맥 혈류가 차단되면 해당조직이 허혈상태에 이르면서 손상이 유발되며 혈류를 재개시킨 후에는 조직손상이 더 심하게 유발될 수 있다는 사실은 널리 인정되고 있다.(1) 이렇게 재관류 후에 더 심하게 일어날 수 있는 손상을 “허혈-재관류 손상”이라고 칭하고 이 손상은 혈관내피세포의 손상으로 시작된다.

최근 이러한 손상의 형태학적 소견을 확인한 보고는 있었지만 기능적 손상을 관찰한 실험 연구는 많지 않다. 혈관내피세포에서 생성되는 활성 물질중의 하나인 일산화질소의 생성량이 이 과정에서 증가 또는 감소하는지에 대하여는 정확하게 알려져 있지 않다.(2,3) 일산화질소는 정상적인 생리 과정에서는 혈관을 확장시키고 혈소판의 활성화 및 응고를 억제하는 데 중요한 역할을 하지만 허혈-재관류 손상 과정에서 나타나는 기능에 대하여서는 아직 확실하게 정립되어 있지 않아 손상을 더욱 심하게 한다는

책임저자 : 박장상, 서울시 서초구 반포동 505, ☎ 137-701
강남성모병원 외과
Tel: 02-590-1436, Fax: 02-595-2992
E-mail: johnpark@cmc.cuk.ac.kr

접수일 : 2001년 2월 14일, 게재승인일 : 2001년 4월 17일

결과 억제시킨다는 설로 상반된 주장이 제기되고 있다.(3-6)

본 실험에서는 태아의 제대 정맥의 내피세포를 채취하여 허혈 및 재관류가 혈관 내피세포에 미치는 형태학적 및 기능적 손상을 관찰하기 위하여, 제대 배양한 내피세포를 무산소화 및 재산소화 시킨 후 형태학적 변화를 확인하는 한편 재산소화 시킨 후에 일산화질소 생성량을 시간별로 측정하여 변화를 관찰하였다.

방 법

1) 실험군

아무런 자극 없이 실내공기에 노출시킨 내피세포에서 생성되는 일산화질소를 측정할 대조군(control group), 무산소로 50분간 처리한 무산소화군(anoxia group), 50분간 무산소 처리한 후 재산소화한 재산소화군(reoxygenation group), 재산소화 직전에 allopurinol 20 $\mu\text{mol/liter}$ 를 투여한 allopurinol군(allopurinol group)으로 나누었다. 재산소화군과 allopurinol군에서는 재산소화 후 30분, 60분, 120분, 180분, 240분, 300분, 360분, 420분, 480분에 일산화질소 생성량을 각각 측정하여 비교하였다(n=11).

2) 제대 정맥 내피세포의 채취 및 배양

혈관 내피세포를 Jaffe등(7)의 방법에 따라 출생직후의 사람의 제대정맥에서 분리하여 배양하였다. 즉 정상 분만 시 얻은 정상 제대를 무균적으로 제대 양쪽을 절찰한 뒤 Ca^{+2} , Mg^{+2} 이 포함되어 있지 않은 제대 완충액(0.14 M의 NaCl, 40 mM의 KCl, 11 mM의 glucose가 함유된 1 mM의 인산완충액, pH 7.4)에 넣은 다음 무균 조작하에 손상된 부위를 포함하여 절찰된 제대 양쪽 끝을 잘라내고 제대 정맥을 30 ml의 완충액으로 관류하여 세척한 후 제대 한쪽 끝을 절찰하고 다른 쪽으로 0.2%의 collagenase가 함유된 완충액을 주입하고 37°C에서 15분간 방치하였다. 혈관 내피세포를 함유한 collagenase 용액을 30 ml의 제대 완충액으로 관류하여 유출액을 모은 후 2000×G에서 10분간 원침하여 혈관 내피세포들만을 모았다. 수집된 내피세포들을 20% 우태아 혈청(bovine fetal serum), penicillin 200 U/ml, streptomycin 200 $\mu\text{g/ml}$, HEPES 25 mM, L-glutamine 2 mM, ECGF (endothelial cell growth factor) 25 mg (Boehringer Mannheim Co., Sandhofer, Germany), heparin 5 U/ml, 중탄산염 2 g/liter가 포함된 M-199 배양액(Gibco, Grand Island, N.Y. USA)으로 5% 이산화탄소, 37°C에서 배양하였다. 혈관 내피세포의 증식과 오염상태를 관찰하기 위하여 매일 도립현미경으로 관찰하였으며 본 실험에서는 2~3회 제대배양된 내피세포를 사용하였다.

3) 혈관 내피 세포의 확인

제대배양한 세포들이 서로 층을 이루었을 때 배양액을

제거하고 phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, rand Island, N.Y. USA)으로 3회 세척한 후 영하 20°C의 메탄올로 세포를 5분간 반응시켜 고정시켰다. PBS로 3회 세척한 후 첫 번째 항체인 anti-human von Willebrand factor rabbit IgG (Boehringer Mannheim Co.) 15 μl 와 45분간 상온에서 반응시켰다. PBS로 30분 간격으로 5회 세척한 후 두 번째 항체인 anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate conjugate (Boehringer Mannheim Co.) 30 μl 와 37°C에서 45분간 반응시켰다. 이 세포들을 PBS로 3회 이상 세척한 후 포매 매질(medium)을 세포 위에 점적하고 커버유리로 덮어, 실온 암실에서 2시간 동안 건조시킨 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

4) 무산소화 및 재산소화 방법

제대배양한 내피세포 배양 flask에 고무마개 뚜껑을 덮은 후 2개의 22-gauge 바늘을 찔러 산소를 포함하지 않은 5% 이산화탄소와 95% 질소를 함유한 혼합가스를 4 liter/min 속도로 50분간 주입하여 무산소 상태를 유발시키고, 그 후 같은 속도로 100% 산소를 480분간 주입하여 재산소화시킨다.

5) 일산화질소량의 측정

각 군의 내피세포의 배양액에서 미세탐침(microelectrode)을 포함한 일산화질소 측정기인 nitric oxide measuring system model NO-501 (Inter Medical Co., Nagoya, Japan)을 사용하여 정량분석 하였다.(8)

6) 통계 처리

측정값은 평균±표준 편차로 표시하였고, 각 군에서 일산화질소 생성량의 통계적 유의성을 보기 위하여 혼합모형을 이용한 반복측정 분산분석(ANOVA)과 Banferroni의 다중비교(multiple comparison)로 각각 검정하였고 p값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) 대조군, 무산소화군, 재산소화군의 혈관내피세포의 현미경 소견

배양된 혈관내피세포는 형광 현미경 소견상 두 가지 형태에 염색되어 노란색으로 빛나고 있었고, 도립 현미경 소견 상 세포핵이 뚜렷하고 다각형이면서 크기가 비슷한 세포가 세포들 사이에 잘 연결되면서 세포가 증식됨을 알 수 있었다. 위상차 현미경 소견 상 무산소화군에서는 전반적으로 내피세포가 납작해지고 세포 전체의 모양이 변형되면서 부분적으로 탈락되고 용해되는 소견을 보였으며, 특히 무산소화군보다 재산소화군에서 더욱 이러한 소

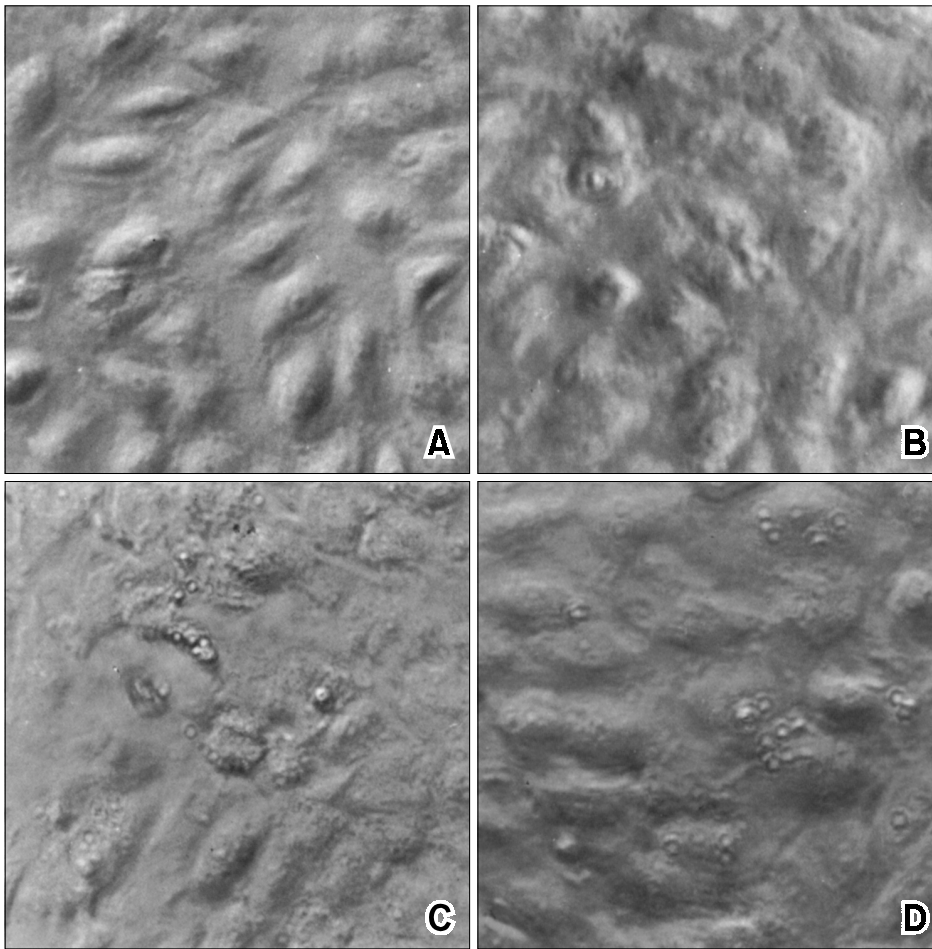


Fig. 1. Phase contrast light micrographs taken from endothelial cell culture after 5 days incubation. A, Control cells: partial conjunction between endothelial cell and regular smooth nuclei with protrusion; B, cells incubated in anoxic state for 50 minutes: partial destruction of normal morphology with detachment and lysis; C, cells incubated in reoxygenated state for 480 minutes: almost complete detachment and lysis; D, cells with allopurinol: no significant difference compared with the anoxia group ($\times 400$).

견이 심해지면서 전체적으로 내피세포가 탈락되고 변형되어 세포의 정상 모양을 유지하지 못하게 손상되었음을 확인할 수 있었으며, allopurinol군에서는 재산소화군보다 손상이 덜 하고 무산소화군과 유사함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2) 일산화질소량의 변동

대조군 및 무산소화군에서 생성된 일산화질소의 양은 각각 3505.14 ± 192.95 nM/ 1×10^5 cells/ml, 2511.62 ± 428.60 nM/ 1×10^5 cells/ml로 무산소화군에서 대조군에 비하여 유의 있게 낮았다($P < 0.005$). 재산소화군에서도 대조군에 비해서 모두 유의 있게 낮았으나($P < 0.005$), 180분 후에만 무산소화군에 비하여 유의 있게 높았다($P < 0.05$). Allopurinol군에서는 2652 ± 324 nM/ 1×10^5 cells/ml로 무산소화군과 의미 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 재산소화군의 일산화질소량의 시간적 변화를 보면 30분 후에 2416.99 ± 96.30 nM/ 1×10^5 cells/ml, 60분 후에서 2504.04 ± 125.01 nM/ 1×10^5 cells/ml, 120분 후에는 2638.49 ± 126.68 nM/ 1×10^5 cells/ml, 그리고 180분 후에는 2953.14 ± 90.98 nM/ 1×10^5 cells/ml로 점점 증가하여 180분 후에 최대치를 보여

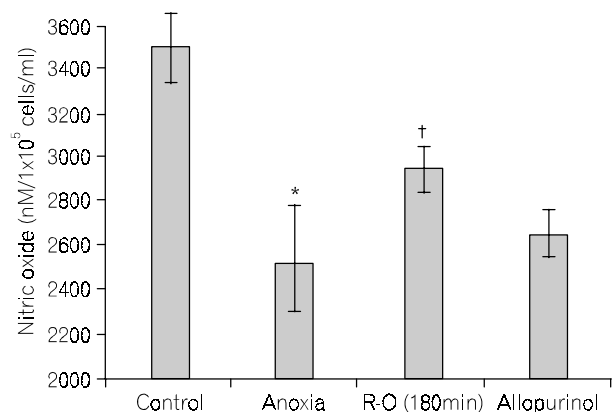


Fig. 2. Comparison of nitric oxide levels in control group, anoxia group (anoxia for 50 minutes), R-O group (anoxia and reoxygenation for 480 minutes) and allopurinol group (anoxia and reoxygenation for 480 minutes, treated with allopurinol) ($n=11$). * $p < 0.005$ (anoxia group vs. control group), † $p < 0.05$ (reoxygenation group vs. anoxia group).

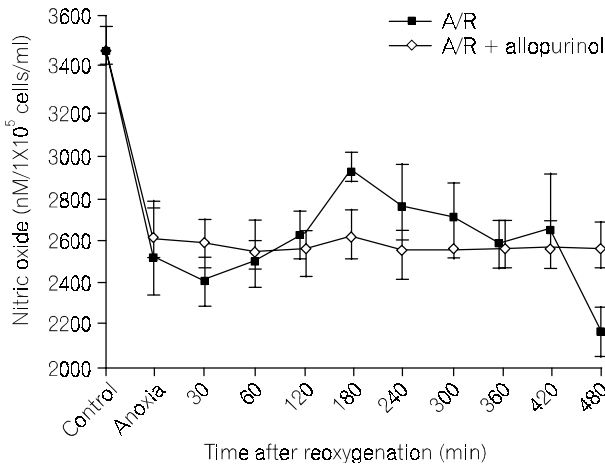


Fig. 3. Time-course changes of nitric oxide levels after anoxia/ reoxygenation (A/R). Endothelial cells of umbilical vein were exposed to 50 minutes of anoxia and then reoxygenated. Nitric oxide level was determined in control group, anoxia group, reoxygenation group, allopurinol group, each value represents mean \pm SD of 11 experiments.

무산소화군에 비하여 유의있게 높았고($P < 0.05$), 그 후 감소하다가 420분 후에는 2665.22 ± 845.06 nM/ 1×10^5 cells/ml로 다시 증가하였으나 무산소화군에 비해서는 유의한 차이를 보이지 않았다. Allopurinol 군에서는 480분 동안 재산소화시키는 동안 일산화질소 생성량의 시간적 변화가 거의 없었고 무산소화군과 의미있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

허혈 및 재관류 후에 유발되는 손상이 허혈 손상보다 더 심할 수 있음이 확인되면서 재관류 후 손상받는 조직 중 내피세포가 비교적 초기에 손상된다는 주장에 관심이 모아지고 있다.(9,10)

혈관 내피 세포에서 분비하는 이완인자가 산화질소라고 알려진 이후, 이 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 산화질소는 대기중의 독성 화학물질로 체내에서는 소량으로 존재하지만 많은 생리작용을 하는데, 특히 혈관 내피 세포에서 분비되는 산화질소는 혈관이완 기능외에도 대식세포의 활성화, 혈소판 유착 및 응집의 억제, 기본혈압의 조절 등 다양한 생리작용을 갖는다.(11) 최근에는 일산화질소가 배양된 혈관벽 평활근 세포의 이동 및 증식을 억제한다는 실험결과도 보고되고 있다.(12,13)

일산화질소는 L-arginine으로부터 일산화질소 합성효소에 의해 합성되며 1기압 20°C, 2 mM의 농도에서는 안정된 무색의 부자기 가스(paramagnetic gas)로 존재하나, 용액 내에서는 아질산염 또는 질산염으로 빠르게 산화되어 반

감기가 4분내로 추정된다. 특히 생물학적 체계에서는 반감기가 더 짧아 단지 3~30초 정도로 알려져 있다. 안정성은 온도, 생리적 환경에서의 수소이온농도, 반응성 산소유래성 자유기 유무 및 thiol 군의 유용성 등과 같은 여러 가지 주위 인자에 따라 반감기에 차이가 심한 편이다.

일산화질소를 측정하는 방법에는 oxyhemoglobin assay 방법, GC-MS detection 방법, nitrosyl-hemoglobin 형성을 electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy로 측정하는 방법, chemiluminescence 분석방법의 간접적인 측정방법이 제안되고 있으며 최근에는 초미세 탐침을 활용하여 측정하는 직접방법이 이용되고 있다. 이 방법은 Shibuki (14)에 의해서 처음으로 시도된 후 Malinski등(15)이 개발하여 활용하고 있으며 국내에서는 1998년 박등(8)이 처음으로 배양된 제대정맥의 혈관내피세포에서 분비되는 일산화질소를 정량 측정하였다.

이 방법은 온도, 수소이온농도 및 소음 등에 민감하여 용액에서 측정하기 전에 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 용액 등으로 보정을 정밀하게 해야하는 단점이 있으나 측정이 가능한 일산화질소의 농도 범위가 10 nmol/liter에서 1 mmol/liter 까지로 비교적 넓으며 연속적으로 농도의 변화를 측정할 수 있어 정확하고도 유용한 측정방법이다.

허혈-재관류 손상을 포함한 많은 병태생리 과정에도 또한 영향을 미친다고 알려져 있으나, 재관류 손상 과정에서 방지효과가 있는 지 손상을 더욱 악화시키는지는 아직 논란이 되고 있다. Hirano등(16)은 쥐에서 일산화질소 억제제를 이용하여 췌장의 허혈-재관류 손상이 감소됨을 증명한 반면 Kubes등(5)은 고양이에서 장간막 동맥을 결찰한 후 재관류 직전 N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)를 투여하여 일산화질소의 생성을 억제시키면 내피세포의 허혈-재관류 손상을 증가시켰음을 관찰하였으며, 일산화질소의 전구체인 L-arginine을 투여하여 내인성 일산화질소의 생성을 강화시키면 재관류 손상이 뚜렷하게 약화됨을 확인하였고, Shimamura등(6)은 개의 간에서 허혈 및 재관류 손상시 일산화질소가 손상을 약화시킨다고 하였다.

허혈 후 재관류 시에 일산화질소 생성량의 증감에 대하여서도 논란이 있어, Vinten-Johansen등(2)과 Masini등(17)은 심 혈관내피세포에서 허혈 및 재관류 후 일산화질소의 생성량이 대조군에 비하여 감소함을 확인하였지만, Zweier등(18)은 심장에서 electron paramagnetic resonance spectroscopy를 이용하여 재관류 후 일산화질소의 생성량이 증가함을 관찰하였고, Kumura등(19)과 Nagafuji등(20)도 뇌허혈 후 재관류시켰을 경우 일산화질소의 생성량이 증가한다고 보고하였다.

본 실험에서는 대조군에 비하여 무산소화 및 재산소화 후 내피세포의 형태적 손상이 심함을 알 수 있었으며 특히 재산소화 후 더욱 심한 손상이 관찰되었다. 일산화질

소의 생성량은 무산소화군 및 재산소화군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 재산소화 이후는 무산소화 시에 비하여 유의한 차이가 없었으나 재산소화 180분에 가장 높은 값을 보이면서 무산소시에 비하여 유의하게 증가하였다. allopurinol은 크산틴산화효소(xanthine oxidase)의 작용을 억제함으로써 세포내 자유기의 생성을 감소시켜 재관류 손상을 방지한다고 알려져 왔고, (21) 저자도 allopurinol을 재산소화 약 3분전에 20 μ mol/liter를 투여하여 손상이 약화됨을 확인하였다.

허혈 및 재관류 후의 시간에 따른 일산화질소의 생성량 변화, 특히 재산소화 180분에서 무산소군에 비해 의미있는 상승을 보인 소견이 허혈 재관류손상에 어떠한 영향을 미치는 지에 대하여 정확한 해답은 얻을 수 없었다. 이에 대한 명확한 기전을 밝히기 위해서는 재산소화 180분 전후의 형태적 변화를 H-E 염색 후 광학현미경으로 관찰하거나, 세포내의 미세구조 중 어느 부분에서 주로 손상이 시작되는 지를 관찰하기 위하여 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰하는 노력이 필요하며, 페록시아질산염(ONOO-) 항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행한 후 확인함으로써 일산화질소 생성량 변화와 비교하는 등의 더 진전된 실험이 요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Granger DN, Sennet M, McElearney. Effect of local hypertension on cat intestinal capillary permeability. *Gastroenterology* 1980;79:474-81.
- 2) Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Nakamura M, Jordan JE, Ronson RS, Thourani VH, et al. Nitric oxide and the vascular endothelium in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:354-70.
- 3) Saito M, Miyagawa I. Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J Urol* 1999;162:1490-95.
- 4) Beckman JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991; 15:53-9.
- 5) Kubes P. Ischemia/reperfusion in the feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1993;264:G143-9.
- 6) Shimamura T, Jin MB, Suzuki T, Iida J, Kishida A, Furukawa H, et al. Nitric oxide enhancement attenuates ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplant Proc* 1999;31: 1065-7.
- 7) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-6.
- 8) Kim NI, Kim KS, Park JS, Kim SN, Koh YB. The inhibitory effect of nitric oxide on intimal hyperplasia after rat carotid artery injury. *J Kor Vasc Surg* 1998;14:1-8.
- 9) Jennische E. Post-ischemic calcification in skeletal muscle: a light microscopic study in the rat. *Acta pathol Microbiol Immunol Scand(A)* 1984;92:139-43.
- 10) Parks DA, Granger DN. Contribution of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250: G749-53.
- 11) Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-27.
- 12) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-Bromo cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1993;83:1174-9.
- 13) Lee JS, Adric C, Jacob HJ, Roberts JD, Zapol WM, Bloch KD. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. *Circ Res* 1996; 78:337-41.
- 14) Shibuki K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci Res* 1990;9:69-76.
- 15) Malinski T, Ciszewski A, Bennett J, Fish JR, Czuchajowski L. Characterization of conductive polymeric nickel (II) tetra kis (3-methoxy-4-hydroxy-phenyl) porphyrin as an anodic material for electrocatalysis. *J Electrochem Soc* 1991;138:2008-15.
- 16) Hirano T. Possible involvement of nitric oxide as a free radical in the pathogenesis of pancreatic ischemia-reperfusion injuries in rats. *Vas Surg* 1998;32:353-60.
- 17) Masini E, Salvemini D, Ndisang JF, Gai P, Berni L, Moncini M, et al. Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischemia reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Inflamm Res* 1999;48:561-8.
- 18) Zweier JL, Wang P, Kuppusamy P. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1995;270: 304-7.
- 19) Kumura E, Kosaka H, Shiga T, Yoshimine T, Hayakawa T. Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:487-91.
- 20) Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T, Muto A, Naito S. Nitric oxide synthase in cerebral ischemia. Possible contribution of nitric oxide synthase activation in brain microvessels to cerebral ischemic injury. *Mol Chem Neuropathol* 1995;26:107-57.
- 21) McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987;46:2402-6.