

내독소 전 처치된 쥐의 격리 폐에서 저산소성 폐혈관 수축의 변화

서울대학교 의과대학 마취통증의학교실, *서울중앙의원

김 지 연 · 김 성 덕 · 고 흥*

= Abstract =

Changes of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Isolated Endotoxin-Treated Rat Lungs

Ji Yeon Kim, M.D., Seong Deok Kim, M.D., and Hong Go M.D.*

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Seoul National University,
and Joongang Hospital, Seoul, Korea

Background: Several investigations have studied hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) during endotoxemia and there is an increase in nitric oxide (NO) in pulmonary vessels. However, these studies yielded conflicting or at times contradictory results, since reference has been made to both enhancement and inhibition of HPV. Our objective was to determine the changes of hypoxic pulmonary vasoconstriction on the isolated blood-perfused lung of endotoxemic rats.

Methods: Pulmonary arterial pressure (PAP) was measured in a blood-perfused lung preparation from Sprague-Dawley rats in normoxia (21% O₂, 5% CO₂, balanced N₂) and hypoxia (5% O₂, 5% CO₂, balanced N₂). We studied the effect of normoxia and hypoxia in a control group, Escherichia coli lipopolysaccharide group (LPS) and LPS with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester group (L-NAME).

Results: The Baseline PAP was higher in LPS (15.0 ± 4.0 mmHg) compared with control group (10.9 ± 2.9 mmHg) and L-NAME (11.1 ± 3.6 mmHg). In hypoxia, HPV was higher in L-NAME (109.6 ± 100.2%) compared with control group (59.9 ± 31.6%) and LPS (58.8 ± 33.8%)(P < 0.05).

Conclusions: We conclude that NO is an important factor to impair HPV during endotoxemia. (Korean J Anesthesiol 2003; 44: 111~115)

Key Words: Endotoxemia; hypoxic pulmonary vasoconstriction; L-NAME; lipopolysaccharide; nitric oxide.

서 론

저산소성 폐혈관 수축(hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV)은 환기가 잘 안 되는 폐 부위의 폐혈관을 수축시킴으로써 환기가 잘 이루어지는 폐부위로 혈류를 이동시켜 환기/관류 비를 개선하고 동맥혈 저산소혈증을 예방해주는 일종의 생체 방어기전이다.¹⁾ HPV는 체내의 혈관 중 폐동맥 소혈관에서만 볼 수 있는 특이한 반응으로 폐동맥이 저산소에 노

논문접수일 : 2002년 9월 11일
책임저자 : 김지연, 서울시 종로구 연건동 28
서울대학교병원 마취통증의학과
우편번호: 110-744
Tel: 02-760-2467, Fax: 02-747-5639
E-mail: k jy1448@snu.ac.kr.
석사학위 논문임.

출된 후 수 초 안에 수축이 일어나며 수 분 내지 수 시간동안 지속된다. 폐에서 저산소에 대한 반응으로 혈관이 수축되기 위해서는 저산소를 감지하고 반응하는 기전이 있어야 하는데 현재 이에 대해 명확히 밝혀진 것은 없다. 또한 저산소가 폐동맥의 평활근에 직접 작용하여 혈관을 수축시키는지, 내피세포에 작용하여 매개물질을 분비시켜 혈관 수축을 유발하는지도 아직 불명확하다. 현재 내피세포에서 분비되는 매개물질로는 leukotriens, prostanoid, endothelin-1, nitric oxide (NO) 등이 제시되고 있지만 그 역할에 대해서는 상반된 결과가 있어 계속 연구가 진행되고 있다.²⁻⁷⁾

임상에서 HPV의 억제로 저산소혈증을 보이는 대표적인 예로 폐혈증이 있다. 폐혈증 환자에서 HPV 억제의 원인이 되는 물질에 대하여 그간 많은 연구가 있어 왔으며,⁸⁻¹²⁾ 그 중의 한 물질로서 NO가 주장되고 있다. NO는 저분자의 혈관 이완제로 성인성 호흡 곤란증이나 폐고혈압을 가진 환자에 사용하여 환기/관류 불균형을 개선함으로써 폐동맥을 통한 산소의 공급을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{12,13)} 폐혈증 환자에서 NO synthase의 증가가 보고되고 있지만^{5,7)} 폐에서의 NO의 역할에 대해서는 관계가 없다는 연구와^{7,10)} 또는 주 작용물질이라는 연구¹¹⁻¹³⁾ 등 상반된 결과를 보이고 있다.

본 연구에서는 E. coli lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 폐혈증을 유도한 후에 비 선택적 NO synthase 억제제인 N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)를 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 나누어 폐동맥압을 비교하고 저산소 농도에서 HPV가 일어났을 때 두 군의 폐동맥압의 변화를 비교하여 폐혈증에서의 HPV 억제의 원인이 NO와 관련이 있는지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

체중 270-330 g의 음성 specific pathogen free Sprague-Dawley rat을 대상으로 하였다. 관류용액은 생리적 염용액에 insulin, albumin, dextrose를 첨가한 용액과 쥐의 혈액을 사용하여 총량은 50 ml가 되도록 하였다(Table 1). Cyclooxygenase 저해제인 sodium meclofenamate monohydrate를 25 μ g/ml로 첨가하여 내피 세포에서 분비되는 prostaglandins에 의한 혈관 수

축을 방지하였다.¹⁴⁾ 쥐의 혈액은 diethyl ether로 마취된 쥐의 심장을 23 gauge needle의 heparin화(100 IU/10 ml)된 주사기로 직접 천자하여 채혈하였고, 작은 혈액응고 덩어리와 세포 등을 제거하기 위해 소아용 혈액 여과세트(Pall Medical, USA)에 여과시켰다.

관류로는 pump, silastic tube, 혈액 여과세트, 기포 제거장치로 구성하였다. 관류는 Harvard peristaltic pump (Model 2912, Harvard Apparatus Co, USA)를 이용하여 silastic tube로 만들어진 관류관을 통하여 분당 15 ml로 하였고, 폐동맥에 기포가 들어가는 것을 방지하기 위해 10 ml 용량의 기포제거 장치를 거치하였다. Magnetic stirrer and heater (Sigma chemical Co., MO, USA)를 이용하여 관류액의 온도를 36-38°C로 유지하였고, 적혈구의 침전이 생기지 않도록 하였다. Sodium bicarbonate를 첨가하여 관류용액의 pH를 7.35-7.40으로 유지하였다.

폐의 환기는 Harvard rodent ventilator (Model 683, Harvard apparatus Co, USA)로 정상산소(21% O₂, 5% CO₂, balanced N₂)와 저산소(5% O₂, 5% CO₂, balanced N₂) 혼합가스를 교대로 연결하여 시행하였다. 폐 허탈을 방지하기 위해 2 cmH₂O의 PEEP를 가하고 일회 호흡량은 2 ml, 호흡횟수는 90/min로 유지하였고 환기기에 3 way를 연결하여 기도압을 측정

Table 1. Composition of the Perfusate

Physiologic salt solution			
NaCl	7.6554 g/L	(131.0 mmol/L)	
KCl	0.3504 g/L	(4.70 mmol/L)	
MgSO ₄	0.2884 g/L	(1.17 mmol/L)	
NaHCO ₃	1.9000 g/L	(22.61 mmol/L)	
KH ₂ PO ₄	0.1606 g/L	(1.18 mmol/L)	
CaCl ₂	0.4704 g/L	(3.20 mmol/L)	
Sodium meclofenamate	0.0050 g/L		
Stock solution		Perfusate	
Physiologic salt solution	100 ml		
Dextrose	0.2 g	Stock solution	30 ml
Insulin	20 mU	Rat whole blood	20 ml
Albumin	3 g		

Table 2. Pulmonary Artery Pressures (PAP) in Normoxia and Hypoxia in Control, LPS-treated and LPS and L-NAME-treated Groups

	Normoxic PAP (mmHg)	Hypoxic PAP (mmHg)	Ratio (%)
Control (n = 19)	10.9 ± 2.9	6.2 ± 3.1	59.9 ± 31.6
LPS (n = 15)	15.0 ± 4.0*	9.1 ± 5.9	58.8 ± 33.8
LPS + L-NAME (n = 15)	11.1 ± 3.6	11.4 ± 7.6	109.6 ± 100.2* [†]

LPS: lipopolysaccharide, L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester. Data are expressed as mean ± SD. Normoxic PAPs' are mean values of 3 normoxic responses and hypoxic PAPs' are mean values of 3 hypoxic responses. Ratio is % increase in hypoxic PAP compared to normoxic PAPs'. *p < 0.05 vs control group, [†]p < 0.05 vs LPS-treated group.

하였다.

대조군(n = 19), LPS군(n = 15), LPS와 L-NAME 혼합군(n = 15)으로 나누어 실험을 하였다. Sodium pentobarbital 30 mg/kg을 복강내 주사하여 마취를 유도한 후 양와위로 고정하고 기관절개하여 15-gauge의 stainless 관을 삽입하여 인공호흡을 시행하였다. 정중 흉골 절개 후 흉선과 지방조직을 제거하여 심장을 노출한 후에 200 IU의 heparin을 좌심실에 직접 주사하여 혈액이 응고되는 것을 예방하였다. Hemostat를 사용해 폐동맥과 상행대동맥 뒤에 silk 실을 거치 한 후 우심실을 절개하였다. T-piece 모양의 15-gauge의 stainless관을 우심실을 통해서 폐동맥 안으로 삽입한 후 미리 거치 한 실로 폐동맥과 상행대동맥을 폐동맥 관과 같이 결찰하여 폐순환만 이루어지게 하였다. 폐동맥으로 삽입된 T-piece의 한쪽 끝으로는 폐동맥압을 측정하고 한쪽 끝은 폐관류로 이용하였다. 폐를 관류한 혈액이 좌심방에서 cannula를 통하여 저장고로 흐르게 하기 위하여 좌심실을 절개하고 14-gauge polyethylene cannula를 승모관을 통과하여 좌심방에 거치 한 후 결찰하였다. 쥐의 개방된 흉강은 생리식염수로 채워서 폐의 습도를 유지하고 적외선 램프와 heater를 이용하여 관류액의 온도를 36-38°C로 유지하였다. 폐동맥압, 좌심방압, 기도압은 각 관의 side arm을 통해 압력 변환기(Abbott pressure transducer, Abbott Co, USA)를 연결해 감시장치(Datex, Finland)로 측정하였고 모든 압력의 측정은 좌심방 높이에서 영점을 맞추었다.

폐동맥압이 안정되고 체온이 36-38°C로 유지되면 angiotensin II 1µg을 관류로에 주사해 폐동맥의 수축성을 확인하였다. 폐동맥압이 기저 값으로 돌아와 안정이 되면 5분 간격으로 3회 연속 저산소(5% O₂,

5% CO₂, balanced N₂)와 정상산소(21% O₂, 5% CO₂, balanced N₂)에 교대로 노출시켜 각각 폐동맥압을 구하고 기저 폐동맥압에 대한 HPV시의 폐동맥압의 비를 백분율로 나타내었다. 이 군을 대조군으로 하였다. LPS군은 복강 내로 LPS를 30 mg/kg을 주입한 후 3시간 뒤에 쥐를 마취하여 동일한 방법으로 실험하였다. L-NAME 군은 복강 내로 LPS를 30 mg/kg와 L-NAME 15 mg/kg을 주입한 후 3시간 뒤에 쥐를 마취하여 동일한 방법으로 실험하였다.

결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계적인 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 Turkey's multiple range test로 실시하고 P값이 0.05 이하인 경우를 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

기저 폐동맥압은 LPS군(n = 15)에서는 15.0 ± 4.0 mmHg로 대조군(n = 19)의 10.9 ± 2.9 mmHg와 LPS와 L-NAME 혼합군(n = 15)의 11.1 ± 3.6 mmHg에 비하여 의미 있게 증가하였다(p < 0.05).

저산소에서의 폐동맥압 증가를 기저 폐동맥압에 대한 백분율로 나타내어보면 LPS와 L-NAME 혼합군은 109.6 ± 100.2%로 대조군의 59.9 ± 31.6%와 LPS군의 58.8 ± 33.8%와 비교하였을 때 의미 있게 증가하였다(Table 2)(p < 0.05).

고 찰

폐혈증 환자의 증상은 저혈압과 빈맥, 의식의 저하, 핏뇨 등으로 모든 장기에서 이상이 나타난다. 성인성 호흡 곤란증에 의한 호흡 부전이 주 사망 원인

으로 알려져 있다. 폐혈증의 증상은 내독소에 의해 arachnoid와 kinin, kallikrein, TNF- α , interleukin 등 cytokinin이 생성되어 혈관 반응도와 혈관 투과도 등을 변화시키고, 백혈구와 혈소판의 응집 등에 영향을 주기 때문이다. 이렇게 생성되는 물질 중의 하나인 NO는 폐혈증의 주 증상인 저혈압과 심기능저하를 유발하고 포식세포(phagocytic cell)에서 cytokine 분비를 증가시킨다. 또한 장관과 미세 혈관의 혈류량을 증가시키고 혈소판의 응집과 백혈구의 응집을 억제하여 혈류의 정체와 혈전의 생성을 방지한다. 이런 폐혈증에서 성인성 호흡곤란증의 치료로 흡입 NO의 사용을 시도하기도 한다. 그러나 그 효과가 적고 요즘에는 폐혈증에 의한 저혈압에 대한 치료로 NO 생성 억제제를 이용하여 동맥압을 상승시켜 각 장기의 혈류를 유지하려 하기도 한다. 폐혈증에서 폐동맥압의 상승은 NO에 의한 혈관 확장으로 인한 심박출량의 증가로 인한 것이거나 또는 폐혈관 저항 증가 등에 의한 것으로 알려져 있다.^{6,12,15)}

이번 연구에서는 정상 산소농도에서 LPS군만이 기저 폐동맥압이 증가하였고 L-NAME과 LPS를 같이 주입한 군에서는 기저 폐동맥압이 증가하지 않았다. 또한 HPV로 인한 폐동맥압의 증가는 LPS군은 대조군과 차이가 없지만 LPS와 L-NAME를 같이 주입한 경우에는 HPV로 인한 폐동맥압의 증가는 의미 있게 증가하였다.

정상 산소농도에서의 각 군은 대동맥을 결찰하였기 때문에 폐를 제외한 장기로 가는 혈류는 없었고 관류 속도를 분당 15 ml로 일정하게 하였기 때문에 전신 순환을 유지한 다른 실험과 비교해 보았을 때 심박출량과 전신혈관 저항의 감소 등에 영향을 받지 않았다. 이는 정상 산소농도에서 LPS군의 기저 폐동맥압의 증가는 폐혈관 저항의 증가로 인한 것이라 할 수 있다. 전신 순환을 유지한 다른 연구에서는 폐혈증에서 폐동맥압의 증가는 혈관 저항의 증가로 인한 것이 아니라 심박출량의 증가로 인한 것이라고도 하며,^{6,17)} 다른 실험에서는 오히려 폐혈관저항이 감소하였다고 하였다. 이는 폐혈증에서의 폐혈관 저항을 증가시키는 다른 물질이 폐동맥압 상승의 주원인이 된다고 할 수 있다.^{7,16,17)}

저산소 농도에서는 LPS군보다 LPS와 L-NAME 혼합군에서 HPV가 강화되었다. 이번 연구에서는 LPS와 L-NAME를 동시에 주입하였는데 다른 연구에서

는 LPS로 폐혈증을 유발한 다음에 L-NAME를 주입하여 폐동맥압의 변화와 HPV의 반응의 정도를 실험하였다.^{18,19)} 이들에서 LPS군의 폐동맥압은 증가하였고 시간이 지날수록 HPV의 반응은 억제되었고 L-NAME를 주입하면 정상 산소 농도에서의 기저 폐동맥압의 증가는 없었고 HPV의 반응은 LPS군보다 증가되었지만 완전히 회복되지는 않았다. 이 군에서는 대조군보다 저산소 농도에 대한 폐동맥압의 반응이 증가되었다. 이는 L-NAME 자체의 혈관 수축 효과와 L-NAME와 저산소증이 NO synthase의 억제제로 작용하여 HPV가 더 강화되었다고 할 수 있다.^{20,21)} LPS 주입 후 L-NAME를 주입한 군은 HPV가 원상태로 되지 않는 것이 다른 혈관확장제의 존재- atrial natriuretic peptide, TNF, platelet activating factor, IL-1 IFN- γ 에 의한 것이라고 하였으나¹⁰⁾ 이번 실험에서 HPV가 더 강화되는 것을 보았을 때 폐혈관에서의 혈관확장제의 역할이 적으리라고 생각된다.

이로 미루어 보건대 격리폐 모델에서 폐혈증에서 정상 농도에서의 폐동맥압의 증가는 다른 작용 물질에 의한 폐혈관 저항의 증가로 인한 것이며 HPV의 억제는 주로 NO의 작용으로 인한 것이라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. 김성덕, 김광우: 저산소성 폐혈관 수축의 기전에 관한 연구. *인간과학* 10; 1986: 676-92.
2. Voekel NF: Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 1186-95.
3. Fox GA, Paterson NA, McCormark DG: Cyclooxygenase inhibition and vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28: 30-5.
4. Morganroth ML, Reeves JT, Murphy RC: Leukotriene synthesis and receptor blockers block hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 1984; 56: 1340-6.
5. Zelenkov P, McLoughlin T, Johns RA: Endotoxin enhances hypoxic constriction of rat aorta and pulmonary artery through induction of EDRF/NO synthase. *Am J Physiol* 1993; 254: L346-54.
6. Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, Schaffer MS, Wolfe RR, Abman SH: Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:

- 519-22.
7. Rai TU, Chen P: The role of eicosanoids in hypoxic vasoconstriction in isolated lamb lungs. *Am J Physiol* 1987; 253: H26-33.
 8. Grimminger F, Priestersbach R, Weissmann N: Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer perfused rabbit lungs. *Am J Physiol* 1995; 78: 1509-15.
 9. Pannen BH, Bauer M, Zhang JX, Robotham JL, Clemens MG: A time-dependent balance between endothelins and nitric oxide regulating portal resistance after endotoxin. *Am J Physiol* 1996 Nov; 271: H1953-61.
 10. Frank DU, Lowson SM, Roos CM, Rich GF: Endotoxin alters hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1996; 81: 1316-22.
 11. Zhao L, Crawley DE, Hughes JM, Evans TW, Winter RJ. Endothelium-derived relaxing factor activity in rat lung during hypoxic pulmonary vascular remodeling. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1061-5.
 12. Sylvain T, Delphin R, Attila B: Hypoxic contraction of small pulmonary arteries from normal and endotoxemic rats: Fundamental role of NO. *Am J Physiol* 1999; 276: H1207-14.
 13. Ullrich R, Bloch KD, Ichinose F, Steudel W, Zapol WM: Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged NOS2-deficient mice. *Eur J Clin Invest* 1999; 104: 1421-9.
 14. Fischer LG, Hollmann MW, Horstman DJ, Rich GF: Cyclooxygenase inhibitors attenuate bradykinin -induced vasoconstriction in septic isolated rat lungs. *Anesth Analg* 2000; 90: 625-31.
 15. Fox GA, Paterson NA, McCormack DG: Effect of inhibition of NO synthase on vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis. *Am J Physiol* 1994; 267: H1377-82.
 16. Edward JP, Brian DS, David AF: Differential inducible nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary vessel after endotoxin. *Am J Physiol* 2000; 278: R1232-9.
 17. Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW: Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis* 1991; 142: 32-7.
 18. Holzmann A, Manktelow C, Taut FJ, Bloch KD, Zapol WM: Inhibition of nitric oxide synthase prevents hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide in lungs from endotoxin-challenged rats. *Anesthesiology* 1999; 91: 215-21.
 19. Javier C, Antonio I, Luis T: Hypoxic pulmonary vasoconstriction increases during endotoxemia in the perfused rat lung. *J Trauma* 2001; 50: 882-6.
 20. 이가영, 김성덕: 쥐의 격리된 폐관류 모델에서 유발된 저산소성 폐혈관 수축 시 c-AMP와 관련된 폐혈관 이완 기전의 규명. *대한마취과학회지* 1999; 37: 311-9.
 21. 오아영, 김성덕: 흰쥐에서 glibenclamide와 L-NAME이 저산소성 폐혈관 수축에 미치는 영향. *대한마취과학회지* 2001; 41: 741-7.