

실험적 급성 폐색전증에서 Endothelin 수용체 길항제가 혈류 및 호흡 역학에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 서울 중앙병원 내과학교실, 아산 생명과학 연구소¹,
충북대학교 의과대학 내과학교실²

이지현, 전용갑¹, 최강현², 심태선, 임채만,
고윤석, 김우성, 김동순, 김원동, 이상도

= Abstract =

The Effects of Endothelin Receptor Antagonist on Hemodynamic and Respiratory Mechanics in Experimental Acute Pulmonary Thromboembolism

Ji Hyun Lee, M.D., Yong Gam Jeon¹, Kang Hyeon Choe, M.D.²,
Tae Sun Shim, M.D., Chae Man Lim, M.D., Younsuck Koh, M.D., Woo Sung Kim, M.D.,
Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D., Sang Do Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan,
Asan Institute for Life Science¹, Seoul, Korea,*

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea²

Background : Endothelin (ET) is the most potent vasoconstrictor and bronchoconstrictor. The plasma ET-1 level is elevated in patients with acute pulmonary thromboembolism (APTE). This finding suggest that ET-1 may be an important mediator in the cardiopulmonary derangement of APTE. But whether ET-1 is a pathogenic mediator or a simple marker of APTE is not known. The role of ET-1 in the pathogenesis of cardiopulmonary dysfunction in APTE (delete) was investigated through an evaluation of the effects of ET_A-receptor antagonist on APTE. The increase in local levels of preproET-1 mRNA and ET-1 peptide in the embolized lung was also demonstrated.

Methods : In a canine autologous blood clot pulmonary embolism model, ET_A-receptor antagonist (10 mg/kg

¹이 연구는 아산생명과학연구소 연구비(99-119)의 일부 보조로 이루어졌음.

Address for correspondence :

Sang Do Lee, M.D.

Department of internal medicine, Asan medical center

388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea

Phone : 02-2224-3140 Fax : 02-2224-6968 E-mail : sdlee@www.amc.seoul.kr

intravenously, n=6) was administered one hour after the onset of the embolism. Hemodynamic measurements, blood gas tensions and plasma levels of ET-1 immunoreactivity in this treatment group were compared with those in the control group (n=5). After the experiment, preproET-1 mRNA expression (using Northern blot analysis) and the distribution of ET-1 (by immunohistochemical analysis) in the lung tissues were examined.

Results : The increases in pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance of the treatment group were less than those of the control group. Decrease in cardiac output was also less in the treatment group. Complications such as systemic arterial hypotension and hypoxemia did not occur with the administration of ET_A-receptor antagonist. The plasma level of ET-1 like (ED : what does 'like' mean?) immunoreactivity was increased after embolization in both groups but was significantly higher in the treatment group. The preproET-1 mRNA and ET-1 peptide expressions were increased in the embolized lung.

Conclusion : ET-1 synthesis increases with embolization in the lung and may play an important role in the pathophysiology of cardiopulmonary derangement of APTE. Furthermore, ET_A-receptor antagonist attenuates cardiopulmonary alterations seen in APTE, suggesting a potential benefit of this therapy. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 210-222)

Key words : Acute pulmonary thromboembolism, Endothelin-1, Endothelin receptor antagonist.

서 론

급성 폐색전증에서 발생하는 대표적인 심폐기능 장애는 급작스러운 폐혈관 저항의 증가와 이로 인한 우심 부전이다. 폐혈관 저항의 증가는 색전에 의한 폐혈관 계의 물리적인 폐쇄와 폐색전에 따른 신경 체액성 반응에 의한 이차적인 혈관의 수축에 의해 발생한다. 그러므로 폐색전의 치료 전략은 크게 색전에 의한 물리적 폐쇄를 풀어주는 방법과 신경 체액성 반응에 의한 혈관 수축을 회복시키는 방법으로 나눌 수 있다. 신경 체액성 반응에 의한 심폐기능 장애를 완화시키는 치료 방법으로 여러 가지 혈관 이완제 및 체액성 물질의 길항제 등이 시도되었으나 아직까지 이에 관한 정립된 치료 방침은 없다.

이에 저자들은 강력한 혈관 수축 작용을 갖고 있으며 최근의 몇몇 보고에서 폐색전의 병인과 연관 가능성을 보인 ET-1이 급성 폐색전시 폐조직에서 생산이 증가되고 폐색전증에 동반되는 호흡 및 순환 장애의 중요한 신경체액성 물질로 작용할 것이라고 가정하였다. 이러한 가정 아래 ET_A 수용체 길항제가 기존의

혈관 이완제와는 달리 폐색전증에서 이차적으로 발생한 혈관의 변화를 특이적으로 억제해 색전증에 의해 발생하는 심폐 기능장애의 중요한 치료 수단이 될 수 있을 것이라고 생각하고 본 연구를 시작하였다.

재료 및 연구방법

1. 실험 동물

호흡기 및 심장 질환의 증거가 없는 체중 15 kg 내외의 한국산 잠견 11마리를 대상으로 임의적으로 6마리는 ET 수용체 길항제 투여군, 5마리는 대조군으로 나누어 실험하였다.

마취전 처치로 ketamine 5mg/kg을 사용하고 마취는 pentothal sodium을 시간당 체중 Kg 당 3 mg 지속적으로 정맥투여 하였다. 실험 동물을 양와위의 자세로 하고 기도내 삽관을 시행하고 인공 호흡기 (Servo 900)를 이용하여 분당 호흡수 15회, FiO₂ : 21%, Inspiration time % : 33%, pause time % : 10%, PEEP : 0 mmHg로 고정하여 PaCO₂를 35-

45 mmHg가 되도록 조절하였다. 좌측 대퇴 동맥에 catheter를 삽입하여 동맥압을 측정하고 좌측 외경 정맥 7 Fr.의 Swan-Ganz catheter (Baxter Healthcare Corporation)를 삽입하여 폐동맥압 및 심박출량을 측정하였다. 우측 외경 정맥으로 혈병 투여를 위해 직경 5 mm의 catheter를 삽입하여 우심방에 위치시켰다. Catheter가 혈병으로 막히는 것을 방지하기 위해 생리 식염수를 간헐적으로 catheter 내로 주입하였다. 자발 호흡을 방지하기 위하여 시간당 2 mg의 pancuronium을 투여하였다. 인공 호흡기의 exhalation valve에 1.5 liter의 mixing chamber를 연결하고 capnometer로 호기 평균 이산화탄소(mixed expired CO_2 ; $P_{ET}\text{CO}_2$)를 측정하였다.

2. 급성 폐색전증의 유발

자가 혈병을 이용한 색전은 실험동물의 피를 30 ml 뽑아 실온에서 2시간 응고시킨 후 이를 원심분리 하여 무균적으로 혈병을 얻어 생리식염수로 세척하여 5 mm의 입방체로 잘라 만들었다. 우심방에 위치한 catheter를 통해 혈병을 평균폐동맥압이 45 mmHg가 될 때까지 서서히 주입하였다.

3. ET 수용체 길항제의 투여

혈병 주입 1시간후에 폐동맥 혈압이 안정되면 혈역학 및 호흡 역학에 관련된 지표들을 확인하고 (PreRx), 수용체 길항제 투여군은 ET_A 특이 수용체 길항제, ZD2574 (Zeneca, Cheshire) 10 mg/kg을 10분에 걸쳐 서서히 정주하였고 대조군은 생리 식염수를 투여하였다.

4. 혈류 및 호흡역학 변수의 측정

실험 동물이 안정된 후 (Baseline) 심박수, 평균 동맥압, 폐모세 혈관 설압, 심박출량을 측정하고 가스 분석을 위하여 동맥혈과 혼합정맥혈을 채취하였다. 혈

역학적 변화의 지표로 심박수, 평균 동맥압, 평균 폐동맥압, 폐모세혈관설압, 심박출량을 측정하였다. 압력의 측정은 catheter를 pressure transducer에 연결하여 측정하였고, 심박출량은 cardiac output computer COM-1 (American Edward Laboratories)를 이용해 측정하였다. 심박출량은 thermodilution 기법으로 호흡 주기 중 호기말에 맞추어 3회 측정하여 이들의 평균치로 하였다. 호흡 역학의 변화 지표로 호기 평균 이산화 탄소 분압을 측정하고 동맥혈 및 혼합 정맥혈의 가스 분석, 혈색소를 측정하였다. 이를 근거로 폐혈관 저항 (pulmonary vascular resistance), 생리적 단락 (physiologic shunt; venous admixture), 생리적 사강호흡 (physiologic dead space; V_D/V_T)을 계산하였다.

폐혈관 저항¹, 생리적 단락², 사강 호흡³의 계산에 이용된 공식은 다음과 같다.

$$\text{Pulmonary vascular resistance (dynes} \cdot \text{sec} \cdot \text{m}^2/\text{cm}^5) = (\text{MPAP} - \text{PCWP}) \div \text{C.O.} \times 80$$

MPAP : mean pulmonary arterial pressure (mmHg)

PCWP : pulmonary capillary wedge pressure (mmHg)

C.O. : cardiac output (L/min)

$$\text{Physiologic shunt (\%)} = (\text{CcO}_2 - \text{CaO}_2) / (\text{CcO}_2 - \text{CvO}_2) \times 100$$

-CaO₂ : arterial blood O₂ content (ml/dL)

-CvO₂ : mixed venous blood O₂ content (ml/dL)

-CcO₂ : pulmonary end-capillary O₂ content (ml/dL)

*PcO₂ is assumed equal to the alveolar PO₂

$$\text{PAO}_2 = \text{PIO}_2 - \text{PaCO}_2 / R(1 - \text{FiO}_2(1 - R))$$

$$\text{O}_2 \text{ content (ml/dl)} = \text{Hb} \times 1.34 \times \text{SaO}_2 + 0.003 \times \text{PaO}_2$$

$$*SO_2 = \{100(PO_2^3 + 2.667 * PO_2)\} / \{PO_2^3 + 2.667 * PO_2 + 55.47\}$$

단 PO_2 의 단위는 kilopascals ; saturation은 % (1 kPa=7.5 mmHg)

$$\text{Physiologic dead space ; } V_D/V_T (\%) \\ = (PaCO_2 - P_{ET}CO_2) / PaCO_2$$

혈역학적 변화 및 동맥혈 및 혼합 정맥혈 가스 분석은 색전증 유발전 (Baseline)과 유발 1시간 후 ZD2574 투여 직전 (PreRx)에 측정하고 이후 30분 간격으로 210분간 측정하였다.

5. 혈청 ET-1 농도 증가의 증명

색전전 (Baseline)과 색전 1시간후 (PreRx) 그리고 ZD2574 투여 210분후에 5 ml의 동맥혈 및 혼합 정맥혈을 채취하여 각각 EDTA와 aprotinin (500 U/ml)이 섞여 있는 tube에 담고 이후 300 g로 20 분간 4 °C에서 원심분리하여 상층액을 siliconized tube에 담아 -40 °C에서 보관하였다. 동맥 및 혼합 정맥혈의 ET-1의 측정은 ELISA (human ET-1 immunoassay, QuantiGlo, R&D system, U.S.A.)를 이용하였다. 각각의 시간에서 동맥과 혼합 정맥혈의 ET-1 농도와 농도비 (동맥혈/혼합 정맥혈)를 시간에 따라 비교하였다.

6. 폐내 ET-1 발현의 증명 (면역조직화학염색 ; Immunohistochemistry)

실험이 끝난후 개흉하여 폐조직을 얻어 10%의 formalin 용액에 24시간 보관하였다가 paraffin에 embedding하여 tissue block을 만들었다. 이후 block을 5 μ m이하로 얇게 자른 뒤 각각의 slide를 70 °C에서 30분간 deparaffin하였다. Deparaffin한 slide를 human ET-1에 대한 항체 (primary antibody to ET-1, Dako, Denmark)가 들어 있는 용액에 담

그어 40분 동안 반응시킨 뒤 3차 증류수로 세척하였다. Biotin이 결합된 이차 항체가 들어 있는 용액에 담그어 10분 동안 반응시킨 뒤 3차 증류수로 세척하였다. Chromogen을 적절량 떨어뜨려 반응시킨 뒤 3차 증류수로 반응 시켜 발색을 시킨 뒤 stop solution으로 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 slide를 mounting하여 현미경으로 관찰하고 색전을 일으키지 않은 정상 개의 폐조직과 비교하였다.

7. 폐내 preproET-1 mRNA 발현의 증명(RNA 분리와 Northern blot)

실험이 끝난후 개흉하여 채취한 폐조직은 즉시 -70 °C의 냉창고에 보관하였다가 사용하였다. 폐동맥 내 피세포에서 RNA의 분리는 Chomczynski와 Sacchi의 방법⁴을 따랐다. 전체 RNA (20 μ g)를 1% agarose/6% formaldehyde denaturing gel 전기영동으로 분획화한 후 positively charged nylon membrane (Sure Blot ; Oncor, Gaithersburg, MD)에 옮기고 membrane을 Rapid-Hyb buffer (Amersham Corp., Arlington Heights, IL)로 65 °C에서 20분간 prehybridization하였다. Ovine preproET-1 cDNA probe (550bp)의 plasmid (pOET1.9)는 Dr. Steven Abman (University of Colorado School of Medicine)에게서 기증 받아 사용하였다. Probe는 random prime labeling kit (Amersham Corp.)를 이용해 [α -³²P] deoxy-CTP로 labeling하고 prehybridization용액에 1×10^6 dpm/ml로 하였다. 65 °C에서 2시간 교잡후 실온에서 $2 \times$ SSC/0.1% SDS로 15분씩 세 번 세척후 65 °C에서 $1 \times$ SSC/0.1% SDS로 30분씩 두 번 세척하였다. Autoradiography 후 scanning densitometry로 분석하였다. β -actin으로 RNA loading을 정량화 하였다.

8. 통계처리

자료는 평균과 표준 오차로 표시하였다. 통계처리는

Table 1. Hemodynamic response to embolization and ZD2574

Parameter	Group	Baseline	After embolization			
			PreRx	AfterRx 60min	AfterRx 120min	AfterRx 210min
HR,	Control	178 ± 14	177 ± 10	160 ± 3	162 ± 2	173 ± 4
beats/min	ZD2574	177 ± 8	169 ± 10	160 ± 10	164 ± 12	170 ± 17
Psa,	Control	147 ± 12	149 ± 12	158 ± 13 [†]	159 ± 13	159 ± 14
mmHg	ZD2574	154 ± 12	147 ± 13	152 ± 13	154 ± 12	150 ± 9
Ppa,	Control	12 ± 1	25 ± 1 [*]	25 ± 2 [*]	26 ± 2 [*]	28 ± 3 [*]
mmHg	ZD2574	13 ± 1	25 ± 1 [*]	20 ± 1 [†]	20 ± 1 [†]	21 ± 1 [†]
Pcwp,	Control	4 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	5 ± 1
mmHg	ZD2574	4 ± 1	4 ± 0	4 ± 1	5 ± 0	5 ± 1
CO,	Control	3.3 ± 0.3	2.8 ± 0.2 [*]	2.3 ± 0.2 [†]	1.9 ± 0.2 [†]	1.8 ± 0.1 [†]
L/min	ZD2574	3.3 ± 0.2	2.9 ± 0.2 [*]	3.0 ± 0.3 [*]	2.8 ± 0.3 [*]	2.5 ± 0.2 ^{*†}
PVR,	Control	216 ± 19	608 ± 59 [*]	789 ± 100 [†]	988 ± 99 [†]	1043 ± 79 ^{*†}
dyne·sec·m ² /cm ⁵	ZD2574	215 ± 14	583 ± 22 [*]	420 ± 37 [†]	440 ± 16 [†]	480 ± 18 [*]

Definition of abbreviations : HR=heart rate ; Psa=mean systemic arterial pressure, Ppa=mean pulmonary arterial pressure ; Pcwp=pulmonary capillary wedge pressure ; CO = cardiac output ; PVR=pulmonary vascular resistance ; Data are presented as mean ± SEM. Before autologous blood clot embolization (Baseline) ; 1h after embolization and immediately before administering ZD2574 (PreRx) ; 60 min, 120 min, and 210 min after administering ZD2574, hemodynamic data were measured. Data are compared to animals not receiving ZD2574. * : p<0.05 for differences in time matched between-group contrasts. † : p<0.05 compared with preRx. * : p<0.05 preRx versus baseline.

SAS 통계 program을 이용하였고 색전전 (Baseline)과 색전후 1시간 (PreRx)의 변화는 paired t-test로 비교하였고, 치료후의 두군간의 변화는 GENMOD procedure를 이용하여 Liang and Zeger's GEEs 분석을 실시하였다. P value 0.05 미만을 통계적으로 의미 있다고 간주하였다.

결 과

1. 자가 혈병 폐색전의 효과

색전전 두군간 평균 폐동맥압, 심박출량, 및 폐혈관 저항의 차이는 없었으며 색전 1시간후 (PreRx) 대 조군과 수용체 길항제 투여군의 평균 폐동맥압은 각각

25 ± 1 mmHg와 25 ± 1 mmHg로 증가하였고, 심박출량은 각각 2.8 ± 0.2 L/min과 2.9 ± 0.2 L/min로 감소하였으며, 폐혈관 저항은 608 ± 59 dynes · sec · m²/cm⁵, 583 ± 22 dynes · sec · m²/cm⁵로 증가하였고 이 세가지 변수의 두군간 차이는 보이지 않았다. 또한 동맥혈 및 혼합 정맥혈 산소압은 색전전에 비해 색전 1시간후 두군 모두에서 감소하였으며 색전 전후 두군간의 차이는 없었다. 동맥혈 이산화탄소 농도, 생리적 단락은, 및 사강호흡은 색전전에 비해 색전 1시간후 의미 있게 증가하였으며 이들 변수 또한 두군간 유의한 차이는 보이지 않았다. 평균 전신 혈압은 색전 전후 변화를 보이지 않았다(Table 1, Table 2).

Table 2. Gas exchange response to embolization and ZD2574

Parameter	Group	Baseline	PreRx	After embolization		
				AfterRx 60min	AfterRx 120min	AfterRx 210min
PaO ₂ , mmHg	Control	117 ± 6	60 ± 6*	65 ± 6	66 ± 5	67 ± 6
	ZD2574	103 ± 3	56 ± 5*	60 ± 6 [†]	65 ± 7	67 ± 6
PaCO ₂ , mmHg	Control	36 ± 1	52 ± 3*	51 ± 4	51 ± 3 [†]	48 ± 4 [†]
	ZD2574	37 ± 2	57 ± 5*	53 ± 6	52 ± 7	50 ± 5
PvO ₂ , mm Hg	Control	52 ± 2	41 ± 4*	40 ± 4	38 ± 3	38 ± 3
	ZD2574	48 ± 3	40 ± 3*	40 ± 2	41 ± 2	40 ± 2
pHa	Control	7.39 ± 0.02	7.25 ± 0.03*	7.25 ± 0.03	7.26 ± 0.03	7.29 ± 0.03
	ZD2574	7.36 ± 0.02	7.22 ± 0.04*	7.23 ± 0.04	7.23 ± 0.04	7.23 ± 0.03
VD/VT, %	Control	52 ± 1	63 ± 4*	61 ± 5	60 ± 4	58 ± 5
	ZD2574	44 ± 4	60 ± 3*	57 ± 7 [†]	60 ± 5 [†]	55 ± 4
Physiologic shunt, %	Control	2 ± 1	40 ± 8*	28 ± 3 [†]	23 ± 3 [†]	27 ± 5
	ZD2574	3 ± 1	46 ± 7*	35 ± 9	32 ± 7 [†]	26 ± 6

Definition of abbreviations : PaO₂=arterial oxygen tension ; PaCO₂=arterial carbon dioxide tension ; PvO₂= mixed venous oxygen tension ; pHa=arterial pH ; V_D/V_T=fraction of dead space ventilation ; Data are presented as mean ± SEM. Before autologous blood clot embolization (Baseline) ; 1h after embolization and immediately before administering ZD2574 (PreRx) ; 60 min, 120 min, and 210 min after administering ZD2574, blood gas tension data were measured. Data are compared to animals not receiving ZD2574. * : p<0.05 for differences in time matched between-group contrasts. [†] : p<0.05 compared with preRx. * : p<0.05 preRx versus baseline.

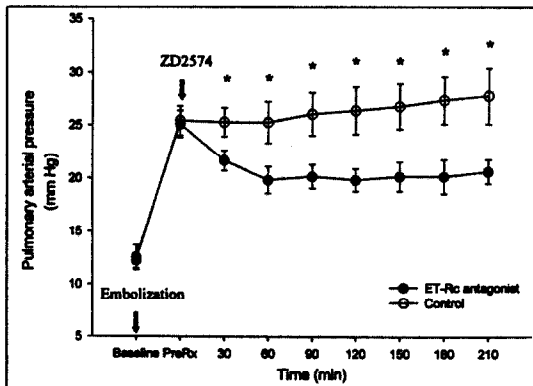


Fig. 1. Effects of embolization and ZD2574 on mean pulmonary arterial pressure at baseline; PreRx; and after administering ZD2574 (q 30min for 210 min) * : p<0.05 for differences in time matched between-group contrasts.

2. ET_A 수용체 길항제의 효과

1) 평균 폐동맥압

색전으로 상승된 폐동맥압은 수용체 길항제 투여군에서는 ET_A 수용체 길항제 투여후 의미있게 감소하였고 대조군에서는 시간에 따른 변화를 보이지 않았다. 두군간 평균 폐동맥압의 차이는 ET_A 수용체 길항제 투여 30분 후부터 유의하여 대조군은 25 ± 1 mmHg, 수용체 길항제 투여군은 22 ± 1 mmHg (p=0.041) 였으며 이러한 현상은 210분까지 (28 ± 3 vs. 21 ± 1 mmHg, p=0.027) 지속되었다(Fig. 1, Table 1).

2) 심박출량

대조군은 색전후 시간이 지남에 따라 심박출량이 계속적인 감소를 보인 반면 수용체 길항제 투여군에서는

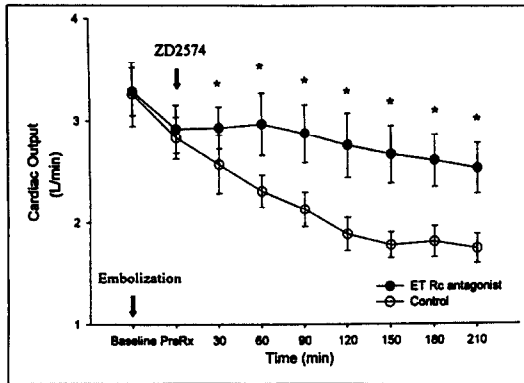


Fig. 2. Effects of embolization and ZD2574 on cardiac output at baseline ; PreRx ; and after administering ZD2574 (q 30min for 210 min)
* : $p < 0.05$ for differences in time matched between-group contrasts..

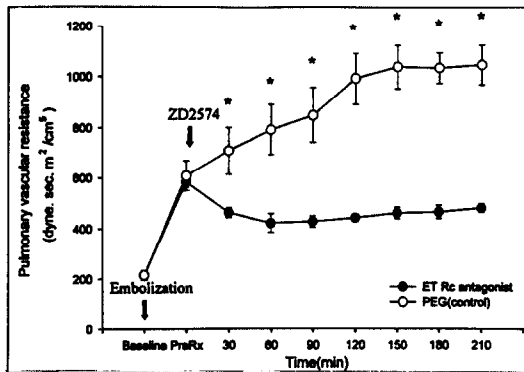


Fig. 3. Effects of embolization and ZD2574 on mean pulmonary vascular resistance at baseline ; PreRx ; and after administering ZD2574 (q 30min for 210 min) * : $p < 0.05$ for differences in time matched between-group contrasts..

길항제 투여 150분까지는 심박출량의 유의한 감소를 보이지 않다가 이후에는 대조군보다 완만하게 감소하였다. 대조군과 길항제 투여군의 심박출량은 수용체 길항제 투여 30분 후 각각 2.6 ± 0.3 L/min, 2.9 ± 0.2 L/min로 유의한 차이를 보이기 시작하여 210분까지 유지되었다(1.8 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 L/min, $p = 0.043$) (Fig. 2, Table 1).

043) (Fig. 2, Table 1).

3) 폐혈관 저항

수용체 길항제 투여군에서는 길항제 투여 30분 후부터 통계적으로 유의한 감소를 보인 반면 대조군은 길항제 투여 60분부터 지속적으로 폐혈관저항의 증가를 보였다. 두군간의 폐혈관저항은 수용체 길항제 투여 30분후 대조군은 706 ± 93 dynes \cdot sec \cdot m²/cm⁵, 수용체 길항제 투여군은 462 ± 20 dynes \cdot sec \cdot m²/cm⁵로 차이를 보이기 시작하여 210분후에는 각각 1043 ± 79 dynes \cdot sec \cdot m²/cm⁵, 480 ± 18 dynes \cdot sec \cdot m²/cm⁵ ($p = 0.002$)로 더욱 차이를 보였다 (Fig. 3, Table 1).

4) 전신 혈압

수용체 길항제 투여군과 대조군 모두 시간에 따른 전신 혈압의 약간의 변동은 있었으나 두군간 차이는 보이지 않았다 (Table 1).

5) 혈액 가스

수용체 길항제 투여군과 대조군 모두 동맥혈 및 정맥혈의 산소 분압의 변동은 없었으며 두군간 차이도 보이지 않았다 (Table 2).

6) 생리적 단락(physiologic shunt) 및 생리적 사강 호흡(physiologic dead space)

수용체 길항제 투여후 두군간에 모두 시간에 따른 생리적 단락 및 생리적 사강의 변동은 있었으나 두군간 차이는 보이지 않았다 (Table 2).

7) 동맥혈 및 정맥혈의 ET-1 농도

색전전(Baseline) 두군의 동맥혈 및 혼합정맥혈의 ET-1 농도는 차이를 보이지 않았으며, 색전 1시간후 수용체 길항제 투여전(PreRx) 동맥혈 및 혼합 정맥혈의 ET-1 농도는 색전전에 비해 두군 모두에서 의미 있는 증가를 보였으나 두군간 차이는 보이지 않았다. ET-1의 농도는 색전후 양군 모두에서 시간에 따

Table 3. Effect of embolization and ZD2574 on the circulating level and arterial to venous ratio of endothelin-1

	Arterial ET-1(pg/ml)		Venous ET-1(pg/ml)		Ratio(A/V)	
	Control	ZD2574	Control	ZD2574	Control	ZD2574
Baseline	2.1±0.2	2.4±0.4	2.2±0.3	2.9±0.6	0.95	0.86
PreRx	4.0±0.6*	3.6±0.7*	4.2±0.8*	4.2±1.0*	0.96	0.89
AfterR×210m	5.6±0.8**	33.0±5.7**	5.0±0.9**	32.8±6.2**	1.18	1.02

Data presented as means±SEM.

∗: p<0.05 for differences in time matched between-group contrast.

∗∗: p<0.05 compared with baseline.

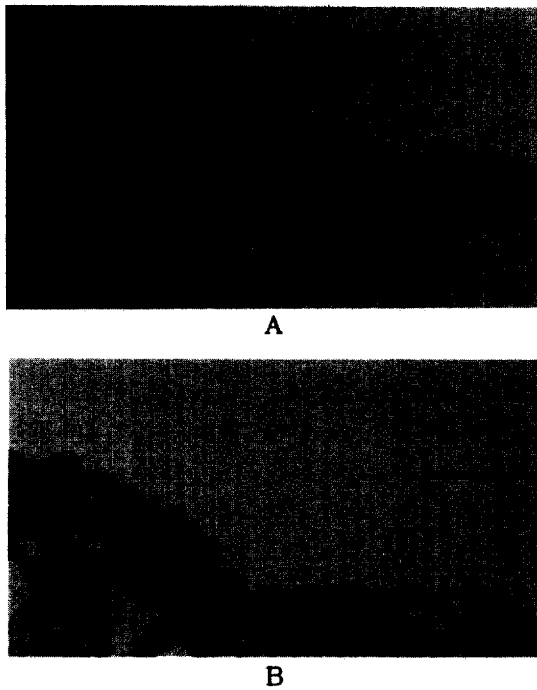


Fig. 4. ET-1-like immunoreactivity in embolized lung and normal lung tissue. Embolized lung shows immunoreactivity (brown staining with antibody to the C-terminal of ET-1) in the vascular endothelium of pulmonary artery. This finding did not present in normal lung.

라 의미있게 증가하였으나 수용체 길항제 투여 210분 후 동맥혈의 ET-1 농도는 대조군이 5.6 ± 0.8 pg/ml, 수용체 길항제 투여군이 33.0 ± 5.7 pg/ml로, 혼

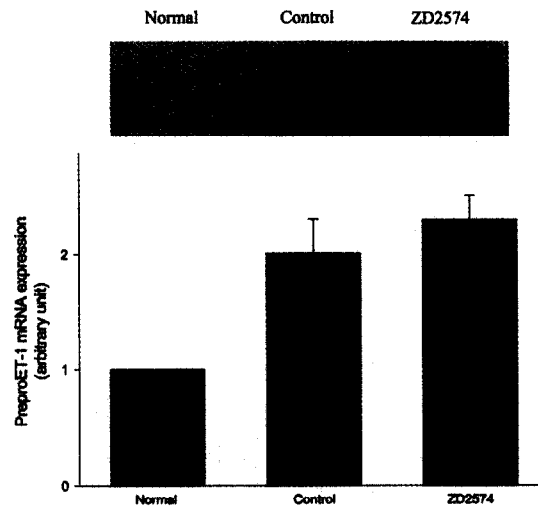


Fig. 5. Effects of embolization on preproET-1 mRNA expression in normal, control, and treatment group lungs (Northern blot analysis).

합정맥혈은 대조군이 5.0 ± 0.9 pg/ml, 수용체 길항제 투여군이 32.8 ± 6.2 pg/ml로 수용체 길항제 투여군에서 대조군에 비해 의미있는 높은 농도를 보였다. 동맥혈 대 혼합 정맥혈의 ET-1 농도의 비는 대조군과 수용체 길항제 투여군에서 모두 색전전에 비해 색전후 시간에 따라 증가하는 추세였으나 통계적인 의미는 없었다(Table 3).

8) 폐내 ET-1 발현

색전이 일어난 폐조직의 폐혈관 내피세포, 혈관 평활

근세포, 기도 상피세포, 제2형 폐세포 등에서 ET-1에 대한 면역조직화학염색 양성을 보였으며 이는 색전이 일어나지 않은 정상 개의 폐조직에서는 관찰되지 않는 소견이었다(Fig 4).

9) 폐내 preproET-1 mRNA 발현

색전이 일어난 폐조직의 prepro ET-1 mRNA 발현은 정상개의 폐조직에 비하여 대조군의 경우 2.2배, 수용체 길항제 투여군의 경우 2.4배의 증가를 보였다(Fig. 5).

고 찰

1. 연구 배경

급성 폐색전증은 정맥계에서 생긴 혈전이나 미립자물이 폐혈관계를 폐쇄하여 발생하는 질환으로 부검 환자의 8-25%에서 발견되며 미국의 경우 관상동맥 질환과 뇌졸중에 이어 세 번째로 많은 심혈관계 질환이다⁵. 지금까지 이에 대한 치료 방침은 1960년대와 비교할 때 크게 달라지지 않았으며 현재의 방침대로 제대로 치료가 되어도 사망률이 10% 정도 되어⁶, 최근 30년간 폐색전증의 치사율은 이전과 비교하여 볼 때 크게 감소하지 않았다^{7,8}. 폐색전증에서 발생하는 심폐기능의 장애는 색전에 의한 폐혈관계의 물리적 폐쇄⁹와 신경 체액성 반응으로 매개되는 이차적인 혈관 및 기관지 수축으로 인한 급성 폐고혈압과 저산소증에 기인한다고^{10,11} 알려져 있으며, 사망의 원인은 이로 인한 급성 우심실 부전이 대부분이다⁸. 따라서 치명적인 대량 급성 폐색전증의 치료 목표는 우심실의 후부하를 빨리 감소시키는 것이다. 이에 대한 방법으로 물리적인 폐쇄를 직접 풀어주는 방법과 이차적인 신경체액성 반응에 의한 심폐기능 장애를 완화시키는 방법이 있다. 신경 체액성 반응에 의한 심폐기능 변화를 호전시키는 방법으로 한때 nitroglycerin, sodium nitroprusside, calcium channel blocker 등의 혈관 확장제가 시도되었다. 이들은 폐동맥압을 저하시킬 수

있었으나 비특이적으로 전신 혈관에도 작용하여 혈압을 떨어뜨리고 환기 관류 불균형을 증가시켜 가스 교환 장애를 악화시키는 등의 부작용이 보고되어 더 이상 이용되지 않고 있다^{11,12}. 이외에도 활성화된 혈소판에서 분비되는 serotonin이 급성 폐색전증의 폐고혈압에 기여한다고 알려졌고¹³⁻¹⁵, 그 수용체 길항제인 ketanserin¹⁶을 투여할 경우 급성 폐색전증에서의 심폐기능이 유의하게 호전됨이 알려져¹⁷, 급성 폐색전증에서 신경체액성 반응에 의한 심폐기능 변화를 호전시키는 중요한 치료 방법으로 이용될 가능성을 보였으나 아직까지 이의 치료 효과는 확실히 정립되어 있지 않다.

최근 폐색전증의 병인에 기여할 것으로 추측되는 물질로 endothelin (이하 ET라 약함)이 알려져 있다. ET은 현재까지 알려진 물질 중 가장 강력한 혈관 및 기관지 수축 작용을 가진 peptide이다^{18,19}. 사람의 폐에서 ET은 폐혈관 내피세포, 기도 상피세포 및 제 2형 폐세포 등에서 만들어지며 ET 수용체가 폐혈관 근세포, 섬유아세포, 기도 및 기도신경 등에서 발견되는 것으로 보아 폐의 여러 생리적 및 병리적 기전에 작용하리라고 추측되고 있다²⁰.

아직까지 급성 폐색전증의 병인에서 ET-1의 역할에 대해서는 확실하게 밝혀져 있지 않으나 이와 관련된 몇가지 연구 결과들을 볼 때 그 연관의 가능성은 매우 크다. 우선 급성 폐색전증에서 활성화된 혈소판과 이에서 분비되는 transforming growth factor (TGF) beta-1에 의해 폐혈관 내피세포에서 ET의 분비가 증가된다는 보고가 있었다²¹. 또한 급성 폐색전증 환자에서 동맥 및 혼합 정맥혈에서 ET의 농도가 증가되고, 동맥혈과 정맥혈의 ET 농도비가 증가함이 밝혀져 급성 폐동맥 색전증시 폐에서 ET의 생산이 증가하거나 대사가 저하되는 등의 장애가 발생할 가능성이 제시된 바 있었다²². 최근 한 보고에서는 유리 구슬로 유발된 폐색전증의 'ex vivo' isolated heart and lung model에서 폐관류액(pulmonary effluent)내 big ET-1 농도의 증가가 관상동맥의 수축 항진과 심장의 수축력 감소를 매개할 가능성이 있다는 것을 ET

수용체 길항제를 이용하여 제시한 바 있었다²³. 이는 폐색전증의 병리 기전중 중요한 우심실 기능 부전에 ET이 관여함을 시사하는 것이다. 이상을 종합하여 볼 때 ET이 폐색전증의 병리 기전에 관여하며 ET 수용체 길항제가 폐색전증에서 사망률을 감소시킬 수 있는 치료제로서의 가능성이 충분히 있으리라 생각된다. ET 수용체 길항제는 기관지 천식²⁴, 저산소증으로 유발된 폐고혈압²⁵, monocrotalin으로 유도된 폐고혈압²⁶ 및 폐이식후 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)²⁷ 등 이미 ET이 증가된 폐질환에서 치료제로서의 가능성을 시사한 바 있다. 그러나 아직까지 급성 폐색전증에서 이의 효과에 대하여 보고된 바는 없었다.

본 연구에서는 급성 폐색전증에서 혈중 ET-1 농도의 증가가 폐에서의 생산 증가에서 기인한 것인지를 밝히고, ET-1이 폐색전증에 동반되는 호흡 및 순환 장애를 일으키는 원인 물질인지를 규명하고자 하였다. 또한 폐색전증에 ET 수용체 길항제가 치료제로서의 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

2. 가설에 접근하는 방법에 대한 개요

1) 급성 폐동맥 색전증을 만드는 방법

실험동물에서 급성 폐동맥색전증을 일으키는 방법으로 봉합사, 유리구슬 등을 이용하는 여러 방법이 있으나 이들은 대부분 이중 물질로 실제 임상에서 접하는 급성 폐색전증과는 다르다. 특히 급성 폐색전증의 심폐기능장애에 혈소판의 활성화가 중요한 역할을 한다는 점을 고려할 때, 실제 임상례와 보다 유사한 실험 모델로 자가 혈병을 이용한 폐색전 모델을 사용하였다. 색전의 크기는 Delcroix 등의 보고에 근거하여 subsegmental pulmonary artery의 폐쇄를 목적으로 5 mm로 정하였다²⁸.

2) 혈청 ET-1 농도 증가의 증명

색전전과 색전 1시간후 그리고 수용체 길항제 투여 210분후 동맥혈 및 혼합정맥혈의 ET-1 농도와, 동맥

혈과 혼합정맥혈의 ET-1 농도비가 색전전에 비해 증가를 보였다. 이러한 현상들은 폐고혈압 환자를 대상으로 한 Stewart 등²⁹나 Sofia 등²²의 보고와 일치하는 현상으로 색전후 특히 폐조직에서 ET-1의 생산이 증가했거나 대사가 감소한 것을 의미한다. 또한 수용체 길항제 투여 210분 후에는 ET 수용체 길항제 투여군에서 대조군과 비교할 때 통계적으로 의미 있는 ET-1 농도의 상승을 보였다. 이것 역시 ET 수용체 길항제를 사용한 다른 실험들에서도 관찰되는 현상으로 수용체 봉쇄로 인해 ET-1의 생산이 증가했거나 혹은 대사가 감소하였다고 추측할 수 있는 현상이다²⁷.

3) 폐내의 ET-1 및 preproET-1 mRNA 발현의 증명

ET-1에 대한 면역조직화학염색 검사에서 색전을 일으키지 않은 정상개의 폐조직에 비하여 색전이 일어난 폐조직의 폐혈관 내피 세포, 혈관 평활근 세포, 기도 상피 세포, 제 2형 폐세포, 등에서 양성을 보였는데 이는 정상개의 조직에서는 관찰되지 않는 소견이었다. 또한 색전이 일어난 폐조직의 preproET-1 mRNA의 발현도 색전이 일어나지 않은 정상개의 조직에 비해 2배 이상 증가되었다. 이러한 현상은 혈중 ET-1 농도 증가와 ET-1 농도비 (동맥혈/혼합정맥혈)의 증가가 폐조직에서의 ET-1 생성 증가에서 기인한 것을 뒷받침 하여주는 결과라고 할 수 있다.

4) ET 수용체 길항제의 선택

현재까지 알려진 ET는 크게 세종류로 그중에서 ET-1가 가장 많이 연구되었고 또 가장 강력한 혈관 수축 작용을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 ET-1이 폐색전과 동반된 폐고혈압의 심폐 장애의 원인 물질이라 가정하고 이에 가장 친화력이 높고 주로 폐혈관근 세포에 분포하여 혈관 수축을 매개하는 것으로 알려진 ET_A 수용체에 대한 특이 길항제를 사용하였다. 연구 결과 ET_A 수용체 길항제 투여로 혈류역학

및 호흡역학에 호전을 보인 현상은 ET-1이 급성폐색전증의 심폐기능 장애에 기여하는 중요한 원인 물질임을 증명하는 한편, 급성 폐색전증의 치료에서 ET-1의 작용 억제제가 새로운 치료전략으로 이용될 수 있는 근거를 제시한 것이라 사료된다.

3. 연구 결과에 대한 고찰

그동안 폐색전증에서의 혈관 수축으로 인한 폐고혈압 및 폐성심(cor pulmonale)을 치료하기 위해 여러 혈관 확장제들이 시도되었다. 그러나 이들 대부분이 폐고혈압을 낮추는 것 외에도 비특이적으로 작용하여 전신 혈압을 하강시키고, 환기-관류 불균형을 악화시켜 저산소증을 더욱 심화시키는 등의 부작용이 보고되어 실제 임상에서는 이용되지 못하는 실정이었다. 하지만 본 연구에서 ET_A 수용체 길항제는 전신 혈압의 하강 없이 폐색전에 의해 발생한 폐고혈압 및 폐혈관 저항을 감소시키고 심박출량의 감소를 약화시켰다. 이는 ET-1에 의해 매개되는 폐색전의 심폐기능 장애를 ET_A 수용체 길항제가 특이적으로 억제할 수 있었기 때문으로 생각된다. 한편 ET_A 수용체 길항제의 투여가 혈류 역학은 호전시키면서 가스교환에는 영향을 미치지 않았던 현상에 대하여는 다음과 같이 추론하였다. 우선 ET-1이 폐동맥의 평활근에 작용하기 때문에 ET_A 수용체 길항제에 의한 혈관저항의 감소가 주로 상위 부위의 muscular artery에서 발생하여 실제 가스 교환에 참여하는 폐모세혈관에는 직접 작용하지 않았기 때문으로 생각하였고, 또한 수용체 길항제 투여군에서 폐혈관 저항의 감소가 폐혈압의 감소보다도 주로 심박출량의 유지에 있었던 것도 원인이 될 수 있으리라 생각하였다. 하지만 이의 정확한 기전에 대해서는 향후 더욱 연구가 진행되어야 할 것이다.

폐색전에 의한 심박출량의 감소가 ET 수용체 길항제의 투여로 약화되는 것은 Dschietzig 등의 보고²³와도 일치하는 소견으로 ET-1이 폐색전과 동반된 혈관 수축 이외에도 심근 수축력의 감소에 기여할 가능성을 뒷받침하는 것이다.

4. 향후 연구 방향

ET은 여러 조직에서 분비되지만 ET의 효과는 조직마다 또 종(species)마다 다르게 보고된다. 이는 ET의 분비 조절 및 기능 수행을 조절하는 요인들이 조직이나 종에 따라 다르기 때문으로 해석되고 있다. 따라서 실제 사람의 급성 폐색전증에서 ET의 역할을 개를 대상으로 한 실험 결과만으로 결론 짓기는 힘들며 향후 이에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

5. 요 약

한국산 잠견 11마리를 대상으로 자가 혈액을 이용한 급성 폐색전증을 만들고 ET 수용체 길항제를 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈병 투여후 폐동맥압은 상승하였고 심박출량은 감소하였으며 폐혈관 저항은 증가하였다. 동맥혈 산소 분압과 혼합 정맥혈의 산소 분압이 감소하였고 사강호흡이 증가하였고 생리적 단락이 증가하였으나 전신혈압은 변동이 없었다. 모든 측정치는 수용체 길항제 투여군과 대조군간에 차이를 보이지 않았다. 2. ET-1 수용체 길항제 투여후 전신혈압, 동맥 및 혼합정맥혈 산소 분압, 동정맥 단락, 및 사강호흡의 정도는 두군간에 차이를 보이지 않았으나, 폐동맥압, 심박출량, 폐혈관 저항은 길항제 투여 30분후부터 수용체 길항제 투여군과 대조군간에 차이를 보이기 시작하여 210분후까지 지속되었다. 3. ET-1의 농도는 색전전(Baseline)에 비하여 색전후 동맥혈, 혼합정맥혈, 및 그 비 (동맥혈/혼합정맥혈)가 증가를 보였고, 수용체 길항제 투여후 투여군에서는 대조군에 비해 ET-1의 농도 증가가 의미 있게 높았다. 4. 면역조직화학염색상에서 폐색전증이 유발된 개의 폐혈관 및 폐조직에서 색전을 투여하지 않은 정상 개의 조직에 비해 ET-1의 발현이 증가되었다. 5. Northern blot 상에서 폐색전이 일어난 폐조직의 preproET-1 mRNA 발현은 색전이 일어나지 않은 개의 폐조직에 비하여 증가되었다.

결 론

급성 폐색전증으로 폐내 ET-1 생산은 증가되었으며, ET 수용체 길항제가 호흡 변수들의 악화나 전신 혈압 감소등의 부작용 없이 폐고혈압, 심박출량, 폐혈관 저항을 호전시킬 수 있었다. 이러한 현상은 ET-1이 폐색전증으로 발생하는 심폐기능 장애의 중요한 매개체로 작용하는 것을 의미할 수 있으며 ETA 수용체 길항제가 급성 폐색전증의 치료제로서 가능성을 시사하는 것이라고 하겠다.

참 고 문 헌

1. Marino PL. The ICU book. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins;1997.
2. Hodgikin JE. Appendix B. Equations and "Rule of thumb" for management of patients. In : Burton GG, Hodgikin JE, Ward JJ. Respiratory care ; A guide to clinical practice. 3rd ed. Philadelphia : J.B. Lippincott Company ; 1991.
3. Hlastala MP, Berger AJ. Physiology of respiration. New York : Oxford University Press;1996.
4. Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-159.
5. Goldhaber SZ. Thrombolysis for pulmonary embolism. Prog Cardiovasc Dis 1991;34:113-34.
6. Carson JL, Kelley MA, Duff A, Weg JG, Fulkerson WJ, Palevsky HI, et al. The clinical course of pulmonary embolism. N Engl J Med 1992;326:1240-45.
7. Lilienfeld DE, Chan E, Ehland J, Godbold H, Landrigan PJ, Marsh G, et al. Mortality from pulmonary embolism in the United States. : 1962 to 1984. Chest 1990;98:1067-72.
8. Goldhaber SZ. Contemporary pulmonary embolism thrombolysis. Chest 1995;107:45S-51S.
9. Elkins RC, Lane M, Greenfield LJ. Pulmonary vascular response to experimental embolism and reversal by embolectomy. J Surg Res 1978;25: 135-42.
10. Gurewith V, Cohen ML, Thomas DP. Humoral factors in massive pulmonary embolism : an experimental study. Am Heart J 1968;76(6):784-94.
11. Priebe HJ. Efficacy of vasodilator therapy in canine model of acute pulmonary hypertension. Am J Physiol 1988;255(5 Pt 2):H1232-39.
12. Packer M, Greenberg B, Massie B, Dash H. Deleterious effect of hydralazine in patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1982;306 (22):1326-31.
13. Puckett CL, Gervin AS, Rhodes GR, Silver D. Role of platelets and serotonin in acute massive pulmonary embolism. Surg Gynecol Obstet 1973; 137:618-22.
14. Smith GT, Dexter L, Dammin GJ. Postmortem quantitative studies in pulmonary embolism. In: Sasahara ed. Pulmonary embolic disease. New York : Grune and Stratton 1965;120.
15. He GW, Yang CQ, Mack MJ, Acuff TE, Ryan WH, Starr A. Interaction between endothelin and vasodilators in the human internal mammary artery. British J Clin Pharmacol 1994;38(6):505-12.
16. Vanhoutte PM, Amery A, Birkenhager W, et al. Serotonergic mechanism in hypertension : Focus on the effects of ketanserin. Hypertension 1988;11:111-15.
17. 이상도, 이영현, 한성구, 심영수, 김진열, 한용철. 실험적 급성 폐동맥 색전증에서 Ketanserin과 Positive End-Expiratory Pressure Ventilation 이 혈류 역학 및 환기에 미치는 영향. 결핵 및 호

- 흡기 질환 1993;40(2):135-42
18. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332(6163):411-15.
 19. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:374-8.
 20. Barnes PJ. Endothelins and pulmonary diseases. *J Appl Physiol* 1994;77(3):1051-9.
 21. 이상도, 심태선, 권석운, 류진숙, 이재담, 임채만 등. 혈소판이 소 폐동맥 내피세포에서 Endothelin 생산에 미치는 효과. *결핵 및 호흡기 질환* 1997; 44(5):1114-24.
 22. Sofia M, Faraone S, Alifano M, Micco A, Albisinni R, Maniscalco M, et al. Endothelin abnormalities in patients with pulmonary embolism. *Chest* 1997;111:544-9.
 23. Dschietzig T, Laule M, Alexio K, Schror K, Baumann G, Stangl K. Coronary constriction and consequent cardiodepression in pulmonary embolism are mediated by pulmonary big endothelin and enhanced in early endothelial dysfunction. *Crit care Med* 1998;26:510-7.
 24. Finsnes F, Christensen G, Lyberg T, Sejersted OM, Skjongsberg OH. Increased synthesis and release of endothelin-1 during the initial phase of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 1):1600-6.
 25. Underwood DC, Bochnowicz S, Osborn RR, Loudon CS, Hart TK, Ohlstein EH, et al. Chronic hypoxia-induced cardiopulmonary changes in three rat strains : inhibition by the endothelin receptor antagonist SB 217242. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S453-5.
 26. Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997;83(4):1209-15.
 27. Shennib H, Allan G, Lee L, Kuanhg JQ, Yanagisawa M, Ohlstein H, et al. Efficacy of administering an Endothelin-receptor antagonist (SB209670) in ameliorating ischemia-reperfusion injury in lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1975-81.
 28. Delcroix M, Melot C, Vanderhoeft P, and Naeije R. Embolus size affects gas exchange in canine autologous blood clot pulmonary embolism. *J Appl Physiol* 1993;74(3):1140-8.
 29. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, and Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension : Marker or mediator of disease? *Ann Int Med* 1991;114:464-9.