대한방사선의학회지 2001;44:475 - 483

가토를 실험모델로 한 간폐증후군에서 고해상 CT의 폐혈관 확장과 eNOS 발현에 대한 연구[1]

이기남 · 정원정 · 윤성국 · 남경진 · 곽종영[2] · 손춘희[3] · 최필조[4] · 김영훈[5]

목적: 가토를 실험모델로 총담관을 결찰한 후 간폐증후군을 유발시켜 고해상 CT에서 폐혈관 확장을 확인하고 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 발현과 관련이 있는지를 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 상복부 절개 후 총담관 결찰을 시행한 후 2주 이상 생존한 11마리 (2주 후, n=5; 3주 후, n=6)의 가토를 실험군으로 하고, 상복부 절개후 총담관 결찰없이 복막만 봉합하고 2주 경과한 4마리를 대조군으로 하였다. 총 15마리의 실험군 및 대조군을 대상으로 고해상 CT를 시행하여 폐상부와 하부의 폐혈관 확장 여부를 관찰하고, 상하부의 폐조직과 간조직에서 eNOS의 발현정도를 Western blot법으로 조사하였다. 또한 총담관 결찰 후 L - arginine의 투여 군 (n=5)과 비투여 군 (n=6)에서의 폐혈관 확장의 변화 정도를 비교하였다.

결과: 총담관 결찰 2주 후에 실시한 고해상 CT상 폐하부 혈관 확장이 3예 (60%)에서 관찰되었고, eNOS 발현의 증가는 폐하부에서 2예 (40%)에서 관찰되었다. 총담관 결찰 3주 후에 실시한 고해상 CT상 폐상부와 폐하부 혈관 확장은 각각 4예 (66.7%), 5예 (83.3%)였고 eNOS 발현 증가는 일치하였다. 고해상 CT상 폐혈관 확장은 폐상부보다 폐하부에서 더 많이 나타났고, 총담관 결찰 후 폐상부와 폐하부에서 고해상 CT상 폐혈관 확장과 eNOS 발현의 증가 사이에는 높은 연관성을 보였다 (폐상부, r=1.00, p=0.0001; 폐하부, r=0.83, p=0.0015). 대조군에서는 고해상 CT상 폐혈관 확장은 관찰되지 않았고, eNOS 발현도 없었다. 또한 총담관 결찰 후 L - arginine 투여 군은 비투여 군에 비해 폐혈관 확장이 더욱 증가하였다 (p<0.05).

결론: 가토의 총담관 결찰 후에 실시한 고해상 CT에서 폐혈관 확장과 폐조직의 eNOS 발현에는 높은 상관성을 보임으로써 가토를 실험모델로 한 간폐증후군에서 eNOS에서 유래된 NO가 폐혈관 확장에 크게 관여한다고 생각한다.

간폐증후군 (hepatopulmonary syndrome)이 있는 만성 간질환 환자에서는 동맥 내 저산소증과 호흡곤란이 일어나는데, 이는 환기 - 관류 불일치와 함께 폐내 단락 (intrapulmonary shunt)으로 인하여 발생된다 (1 - 4). 이러한 비정상적 가스교환은 저산소증에 대한 혈관수축 작용의 상실과 폐내혈관의 확장에 기인하는 것으로 추측하고 있다 (2, 5 - 7). 간폐증후군에 대한 발병기전은 명확히 밝혀진 바가 없다. Groszmann (8)에 의하면, 만성 간질환 환자에서 볼 수 있는 전신적 혈관확장에는 nitric oxide (NO)가 관여하고 있다고 보고하였고, 이를 바탕으로 간폐증후군의 발병기전에도 NO가 관여할 것이라는 견해가 대두되고 있다. 최근 Fallon 등 (9)은 간폐증후군의 발병기전으로 endothelial nitric oxide synthase(eNOS)가 관여할 것이라고 하였다. Chang과 Ohara (10)는 쥐의 총담관을 결찰하여 간폐증후군의 동물모델로 폐순환 변화를 보고한 바가 있다. Fallon 등 (11)은 간폐증후군의 실험모델로 쥐의 총담관 결찰후 폐혈관 확장 여부와 비정상적 가스교환과의 상관성을 검토하여 총담관 결찰 2주 후부터 폐혈관 확장이 진행되며 이는 간세포 손상 정도와 비정상적 동맥내 가스교환과 연관성이 있다고 보고하여, 총담관 결찰이 폐혈관 확장의 발병기전을 규명하는 유용한 실험모델이 된다고 하였다. 이러한 보고들은 미세폐혈관 확장에 국한된 것이며, 실제 육안적으로 검색이 가능한 모세혈관보다 굵은 말초 폐혈관의 확장에 관한 보고는 극히 드물다. 임상적으로 CT나 폐혈관조영술로 간폐증후군 환자의 말초 폐혈관 변화를 관찰하고자 많은 시도가 있었다 (12 - 14). 최근 Lee 등 (15)은 간폐증후군환자에서 정상 대조군과 비교하여, 폐하부에서 폐혈관의 확장이 나타나고, 중심

[1]동아대학교 의과대학 진단방사선과학교실
[2]동아대학교 의과대학 생화학교실
[3]동아대학교 의과대학 내과학교실
[4]동아대학교 의과대학 흉부외과학교실
[5]동아대학교 의과대학 일반외과학교실
이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었음 (KRF - 99 - 041 - F00266)
이 논문은 2001년 2월 20일 접수하여 2001년 4월 25일에 채택되었음.

성 폐혈관과는 달리 말초 폐혈관의 확장을 보인다고 하였으며, 이를 인접한 기관지와의 비를 측정하여 객관적으로 입증하였다.

본 연구에서는 가토의 총담관을 결찰하여 만성 간병변을 유발시키고, 흉부 고해상 CT에서 말초 폐혈관 확장을 관찰하고, 그 확장기전으로서 eNOS의 발현이 관여하는지를 알아보고자 하였다. 또한 가토의 총담관을 결찰한 후 NO의 전구체로서 세포내 cyclic GMP를 통해 혈관확장 작용을 유발하는 L-arginine (16, 17)을 투여하여 흉부 고해상 CT에서 말초 폐혈관 확장과의 상관관계를 관찰하였다.

대상과 방법

실험동물

과립형복합사료로 사육한 체중 2-2.5 kg의 가토 (New Zealand, white rabbit)를 암수 구별없이 총 33마리를 사용하였다. 총 33마리의 가토중 상복부 절개 후 총담관 결찰을 시행한 29마리중 2주 이상 생존한 11마리를 실험군 (2주 군, 5마리; 3주 군, 6마리)으로 하고, 총담관 결찰없이 상복부 피부와 복막만 절개하여 봉합한 후 2주 이상 생존한 4마리를 그 대조군으로 하였다.

실험방법

1. 수술전 처치와 마취

총 33마리의 가토는 구입한 뒤에 실험실에서 10일 정도의 환경적응 기간을 두고 사육하였으며, 수술 전에 8시간의 금식을 시켰다.

가토의 마취는 가토의 둔부에 ketamine hydrochloride (Ketalar, 유한양행) 25 mg/kg, xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer)를 3 mg/kg씩 섞어 근육주사를 하였다. 마취유지는 필요시 ketamine hydrochloride를 매회 0.2 ml 씩 추가 근육주사하여 마취상태를 유지하였다.

2. 가토의 수술적 조작

마취 후에 가토의 상복부 털을 제거하고 앙와위로 틀에 고정시킨 후 오른쪽 12번째 늑연골과 유두사이 거리의 1/2 정도의 지점에서 늑골하 절개(subcostal incision)를 하여 근육과 복막을 열고 Richardson 견인기를 이용하여 시야를 확보한 후 담낭을 지표로 하여 총담관을 찾았다. 총담관은 6번 검정색 실크사로 3회 봉합결찰을 하였고, 결찰부 상부의 총담관의 팽륭이 생기는 것으로써 총담관의 완전 결찰을 확인하였다.

총 33마리의 가토 중 4마리의 대조군에는 총담관 결찰을 시행하지 않은 채 봉합하였고, 29마리 가토는 총담관의 완전 결찰을 시행하고 근육과 복막은 3번 덱손사로, 피부는 2번 나일론사로 봉합하였다.

3. 가토의 수술 후 처치 및 L-arginine 투여

수술 후 3차 세파계의 광범위항생제 cefotaxime (Cefotaxime, 한국 유나이트)을 가토의 둔부에 20 mg/kg로 매일 한차례 씩 투여하였다. 총담관결찰 후 2주 이상 생존한 가토 11마리 중 5마리에 L-arginine 2.25% (Sigma Chemicals. St. Louis, MO)을 물에 섞어 투여하였다. 물의 양은 L-arginine 투여 1주 전부터 가토의 하루 물의 섭취량을 관찰한 결과 300 ml 물에 과립형 L-arginine을 잘 섞어서 투입구에 넣어 임의로 섭취케 하였다.

4. 흉부 고해상 CT 촬영기법

가토를 희생시키기 직전 흉부 고해상 CT 촬영을 하였고, ketamine hydrochloride 25 mg/kg으로 마취시킨 후 복와위로 틀에 고정한 후 조영증강없이 자연 호흡상태로 촬영하였다. 사용한 CT기종은 GE model 9800 scanner (General Electric, Milwaukee, WI, U.S.A.)를 이용하였으며, 1.5 mm 절편두께와 5 mm 절편간격으로 140 kVp, 170 mA로 bone algorithm을 사용하여 폐첨부에서 폐기저부까지의 영상을 얻었다. 다양한 window 설정으로 영상을 확인한 후 가장 적합한 조건으로 window level -300 H, window width 1500 H로 하였다.

흉부 고해상 CT 영상소견의 분석

폐문부를 기준으로 폐상부와 하부로 나누었고, 각각에서의 폐혈관 확장여부를 조사하였다. 폐혈관 확장의 기준은 1) 사행혈관(tortuous vessel)이 관찰되는 경우와, 2) 주행하는 혈관이 늑막연까지 관찰되는 경우로 하였고, 대조군과 폐혈관 확장 정도를 비교하여 보았다. L-arginine을 투여한 뒤에 폐상부와 폐하부에서 각각의 폐혈관 확장정도의 등급은 대조군과 비교하여 폐혈관 확장이 보이지 않는 경우는 0점, 사행혈관이 관찰되는 경우를 1점, 주행하는 혈관이 늑막연까지 관찰되는 경우를 2점으로 하여 그 평균점수를 구하고, L-arginine 투여군과 비투여 군에서 평균점수를 서로 비교하여 보았다. 폐혈관 확장정도의 등급은 두 명의 방사선과 전문의가 eNOS 발현증가의 결과를 알지 못하는 상태에서 각각 독립적으로 폐혈관 확장정도를 분석하고, 폐혈관확장의 결과가 일치하지 않을 경우에는 합의하여 결정하였다.

조직의 처리

가토는 고해상 CT 촬영 후에 ketamine을 정맥 주사하여 희생시킨 후 간과 폐를 적출하였다. 적출한 폐상부, 폐하부 조직과 간조직을 소량 채취하여 플라스틱 원심분리 튜브에 넣어 즉시 -70°C에서 사용시까지 보관하였다. 적출한 뒤 냉동보관한 간조직 및 폐조직 1 g을 단백질 분해효소 억제제 (1 μg leupeptin, 1 μg pepstatin A, 1 μg aprotinin, 및 1 mM PMSF)가 첨가된 0.5 ml의 세포 용해 완충액 (1% Triton X-100, 1% cholic acid, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에서 조직분쇄기(Ultra-Turrax T25, IKA-Labor Technik)를 이용하여 30초간 3회 분쇄하였다. 이하 모든 조직의 처리는 4°C 하에서 시행하였다. 분쇄 후 다시 호모게나이저를 이

용하여 4 - 5회 처리한 다음 1시간 동안 방치하였다. 파괴된 조직과 세포를 함유하는 용액을 4。C 상태에서 원심 분리기를 이용하여 16,000x g로 10분간 원심분리하여 핵성분과 파괴되지 않은 세포, 및 조직성분 등을 침전시키고 상층액을 얻었다. 이 시료들의 단백질 양을 측정한 다음 전기영동을 이용하였다. 단백질 측정은 소혈청 알부민을 기준시료로 하여 측정하였다.

Western blotting에 의한 Nitric oxide synthase의 발현

eNOS의 발현을 보기 위하여 시료의 전기영동을 관찰한 다음 Western blotting을 시행하였다. 전기영동은 polyacrylamide 겔을 사용하여 조사하고자 하는 단백질의 분자량에 대한 적당한 이동도에 맞는 농도를 이용하였는데 7.5% 겔을 사용하였다. 30 mA에서 1시간 동안 전기영동 한 후 겔의 단백질을 전기 영동으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 전이 후 nitrocellulose membrane을 10 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% 탈지유를 포함하는 블록 완충액으로 1시간 처리하였다. 1차 항원 - 항체결합에 사용하는 항체는 1:1000으로 블록 완충액에 희석하여 실온에서 12시간 이상 반응시켰다. 사람의 eNOS에 특이적인 토끼항체(Santa - Cruz, California, U.S.A.)를 1차 항원으로 본 실험에 사용하였다. 위의 모든 일차 항체들은 각각 사람의 단백질에 대한 항체이다. 2차 항체로는 알칼리성 인산효소(alkaline phosphatase)가 결합된 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응을 시키고 블록 완충액으로 15분간 3회 세척한 다음 NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium / 5 - Bromo - 4 - Chloro - 3 - Indolyl Phosphate) 발색방법으로 전개시켰다.

통계학적 분석

고해상 CT에서 폐혈관 확장과 폐 eNOS 발현간의 상관성에 대한 통계학적 분석은 SAS 프로그램 (SAS Institute, Cary, South California, U.S.A.)을 이용한 Spearman 방법을 사용하였고, L - arginine 투여 군과 비투여 군간의 혈관 확장의 등급 비교는 Kruskal - Wallis 방법을 사용하였다. p값이 0.05보다 작을 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

고해상 CT에서의 폐혈관 확장

가토의 총담관 결찰 2주와 3주 후에 시행한 흉부 고해상 CT에서 실험군 11마리 중 폐상부혈관 확장을 보인 경우는 4예 (36.4%)였고 (Fig. 1A), 폐하부혈관 확장을 보인 경우는 8예 (72.7%)였다 (Fig. 1B). 이 중 총담관 결찰 2주 후 조사한 5마리 중에서 고해상 CT에서 폐하부혈관 확장은 3예 (60%)였으나 폐상부에서는 혈관확장이 보이지 않았다. 3주 후 조사한 6마리 중에서 고해상 CT에서 폐상부와 폐하부혈관 확장은 각각 4예 (66.7%) 및 5예 (83.3%)로 나타나 총담관 결찰 후 기간이 경과할수록 폐혈관확장 빈도는 높았고, 특히 폐하부의 혈관확장이 폐상부에서 보다 빈도가 높게 나타났다 (Table 1). 대조군 4마리의 고해상 CT에서 폐상부와 폐하부에서 혈관확장은 없었다 (Fig. 1C, D).

폐조직과 간조직에서 eNOS의 발현

총담관 결찰 2주와 3주 후에 폐조직에서 eNOS의 발현이 증가하였다. 실험군 11마리 중 eNOS 발현이 폐상부에서 증가된 경우는 4예 (36.4%), 폐하부에서 증가된 경우는 7예 (63.6%)에서 나타났다. 이 중 총담관 결찰 2주 후 조사한 5마리 중에서 eNOS 발현은 폐하부에서 2예 (40%) 보였으나 폐상부에서는 eNOS 발현이 없었다 (Fig. 2A). 총담관 결찰 3주 후 조사한 6마리 중에서 eNOS증가는 폐상부와 하부에서 각각 4예 (66.7%), 5예 (83.3%)로 나타나서 (Fig. 2B) (Table 1), 총담관 결찰 후의 기간이 길수록 eNOS 발현이 증가되는 빈도는 높았다. 대조군 4마리의 폐상부와 폐하부 조직에서 eNOS의 발현 증가는 없었다. 또한 총담관결찰 2주와 3주 후 각각의 간조직에서는 eNOS의 발현은 없었다.

고해상 CT에서 폐혈관 확장과 eNOS 발현 증가와의 연관성

총담관 결찰을 시행한 실험군 11마리중 고해상 CT에서 폐상부혈관 확장을 보인 4예에서 모두 폐조직의 eNOS 발현이 증가되었고, 고해상CT에서 폐하부혈관 확장을 보인 8예에서 폐조직의 eNOS 발현이 증가된 경우는 7예였다. 따라서 고해상 CT에서 폐혈관 확장과 eNOS 발현 증가간에는 통계학적

Table 1. Results of Peripheral Pulmonary Vascular Dilatation on High Resolution CT and Increase in eNOS Expression in 11 Rabbits Subjected to Common Bile Duct Ligation and 4 Control Rabbits

Rabbit No.	Duration of CBDL	Peripheral Pulmonary Vascular Dilatation		Increase of eNOS Expression	
		Upper Lobe	Lower Lobe	Upper	Lower
1	2-week	N	N	-	-
2		N	N	-	-
3		N	Y	-	+
4		N	Y	-	+
5		N	Y	-	-
6	3-week	Y	Y	+	+
7		Y	Y	+	+
8		N	Y	-	+
9		Y	Y	+	+
10		Y	Y	+	+
11		N	N	-	-
12	Control	N	N	-	-
13		N	N	-	-
14		N	N	-	-
15		N	N	-	-

CBDL ; common bile duct ligation
N ; lack of peripheral pulmonary vascular dilatation
Y ; peripheral pulmonary vascular dilatation
- ; absence of eNOS expression
+ ; presence of eNOS expression

으로 높은 상관성이 있었다 (폐상부, r = 1.00, p = .0001; 폐하부, r = .83, p = .0015). 이 중 총담관 결찰 2주 후 5마리 중에서 고해상 CT에서 폐상부혈관 확장은 없었고, eNOS 발현증가도 없었으며, 폐하부혈관 확장을 보인 3예에서 eNOS가 증가된 경우는 2예였고, 1예에서는 eNOS 변화가 없었다. 총담관 결찰 3주 후에 조사한 6마리 중에서 고해상 CT에서

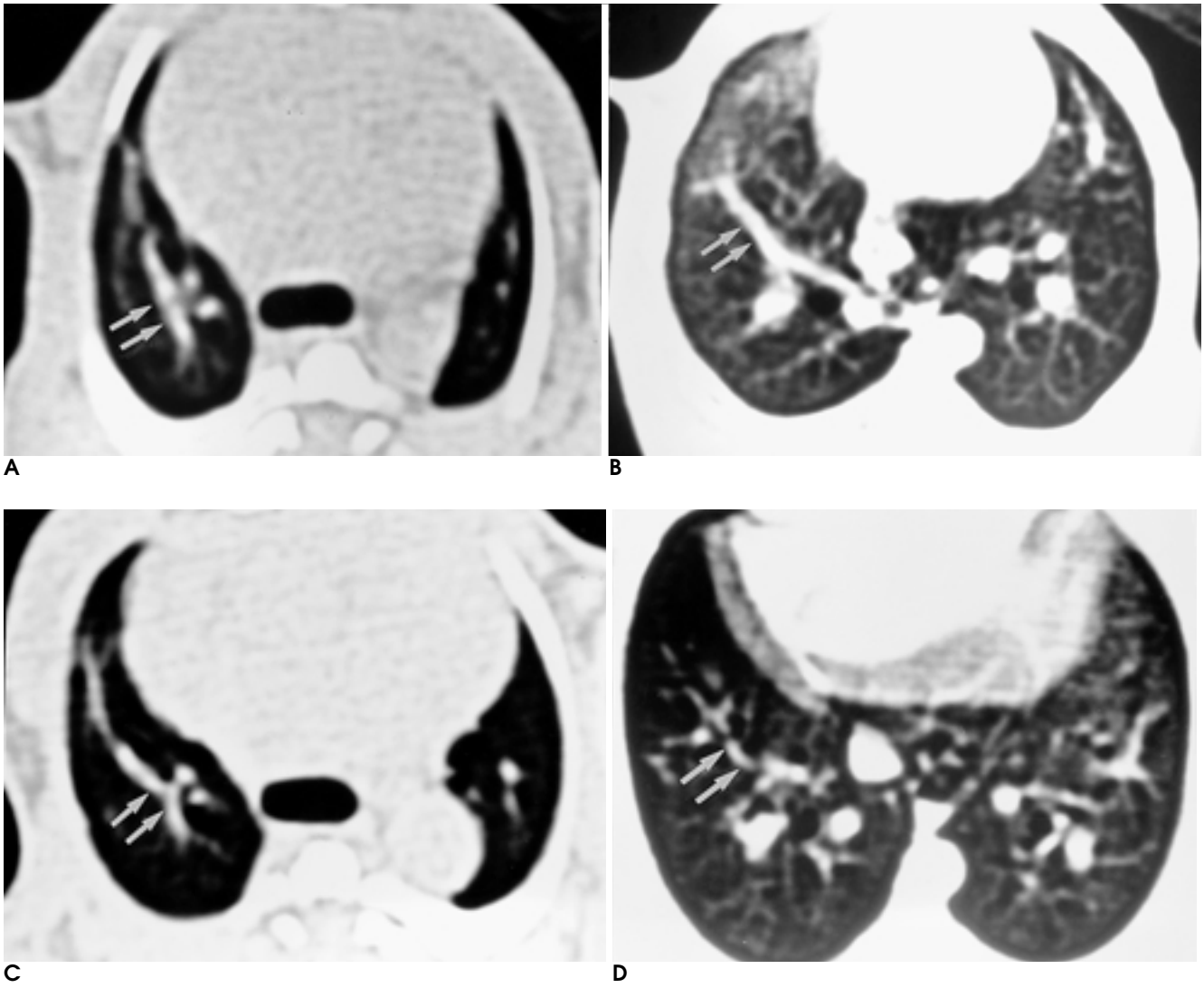
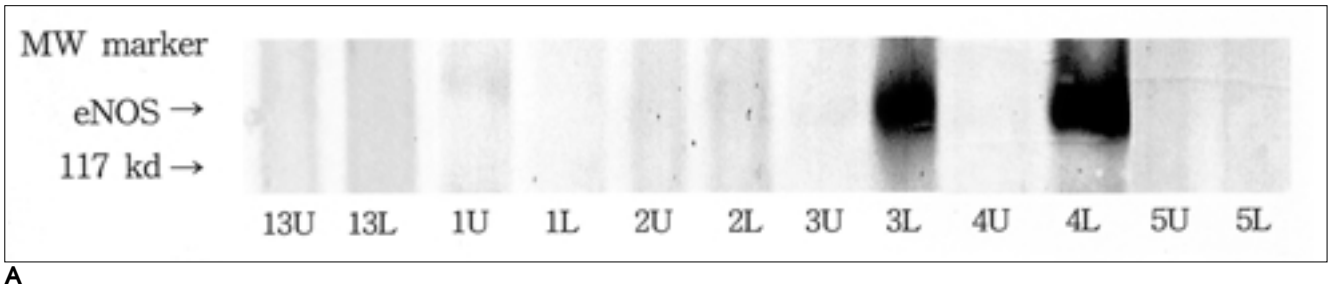
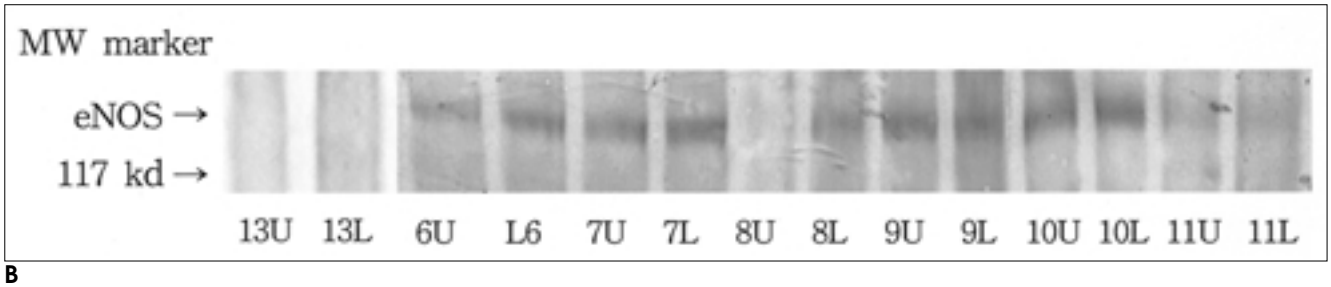


Fig. 1. High resolution CT findings of the lung in the rabbits 3-weeks after common bile duct ligation.
Peripheral pulmonary vessels in the right upper lobe (**A**) and lower lobe (**B**) (arrows) are more dilated than those seen at the same level in control group (**C, D**) (arrows), which were done by sham operation.
E. After administration of L-arginine, peripheral pulmonary vessels (arrows) are tortuous and located in the subpleural region (scoring as grade 2) in the right lower lobe.



A



B

Fig. 2. Comparison of eNOS expression in the upper and lower lobe 2 or 3 weeks after common bile duct ligation and in the control group.
A. 2-weeks after common bile duct ligation, eNOS expression was noted in #3 and #4 lower lobe. There was no expression of eNOS in other lobes.
B. 3-weeks (n = 6) after common bile duct ligation. eNOS expression was noted in both upper and lower lobe of #6,#7,#9,#10 and in the lower lobe of #8. But there was absence of eNOS expression in the upper lobe of #8 and both upper and lower lobe of #11.
The first two rows (13U,L) represented from control group (U, upper lobe; L, lower lobe).

폐상부혈관 확장을 보인 4예와 폐하부혈관 확장을 보인 5예 모두에서 eNOS 발현이 증가되었다 (Table 1).

L-arginine 투여 군과 비투여 군간의 HRCT상 폐혈관 확장 정도 비교

L-arginine 투여 군 5마리에서 폐혈관 확장 정도의 평균점수는 폐상부가 0.8점, 폐하부가 1.8점 이었고 (Fig. 1E), L-arginine 비투여 군 6마리에서 폐상부는 0점, 폐하부가 0.7점으로 L-arginine 투여 군이 L-arginine 비투여 군에 비해 폐상부와 폐하부에서 혈관 확장 정도의 평균점수가 높았으며, 이는 통계학적으로 유의하였다 (폐상부, p = .0088; 폐하부, p = .0316) (Table 2).

Table 2. Grade of Peripheral Pulmonary Vascular Dilatation on High Resolution CT Following Administration of L-arginine in Rabbits Subjected to Common Bile Duct Ligation

Rabbit No.	L-arginine Administration	Grade of Peripheral Pulmonary Vascular Dilatation	
		Upper Lobe	Lower Lobe
3	with L-arginine	0	2
6		1	2
7		1	2
9		1	1
10		1	2
1	without L-arginine	0	0
2		0	0
4		0	2
5		0	1
8		0	1
11		0	0

고 찰

간폐증후군의 가장 큰 특징은 1) 만성 간질환 2) 폐포-동맥 산소 분압의 증가, 3) 폐혈관 확장 등을 들 수 있다 (18-23). 간폐증후군 환자의 흉부 단순사진 촬영소견에 대한 보고에 의하면 폐하부에 간질성 혹은 결절성 음영이 관찰된다고 하였다 (24-26). Oh 등 (12)은 이 음영을 폐혈관의 확장에 기인한다고 하였고, Krowka 등 (13)은 간폐증후군 환자의 폐혈관조영 촬영상에서 동정맥 문합과 같은 비정상적 폐혈관조영 소견을 보고한 바 있다. McAdams 등 (14)은 간폐증후군 환자의 고식적 CT와 고해상 CT에서 폐하부에 비정상적으로 혈관이 점차 감소되지 않는, 확장된 폐혈관이 관찰된다고 보고하였다. 특히 최근 Lee 등 (15)은 건강한 정상대조군이나 정상 산소분압을 가진 간질환 환자와 비교하여 간폐증후군 환자에서 말초폐혈관의 확장이 뚜렷하였으며, 이러한 말초 폐혈관 확장은 간기능 저하를 나타내는 혈중 빌리루빈 수치나 알부민 수치와는 상관없이 동맥내 산소분압과 연관성이 있음을 증명하였다. 또한 폐혈관 확장과 비정상적 동맥내 산소분압간에 연관성이 있음을 쥐를 이용한 동물모델에서 담관 결찰 후 간폐증후군에서 동일한 결과를 밝힌 바 있다 (9).

한편, 쥐를 이용한 간폐증후군에서 사람에서의 간폐증후군

과 마찬가지로 총담관 결찰 후에 생기는 간손상과 문맥압 항진으로 인해 폐의 내인성 병변이 없을지라도 폐혈관 확장이 일어나고, 폐혈관 확장의 시작이나 폐혈관 확장의 정도는 비정상적 가스 교환이 발생하는 시기와 정도 (severity)에 일치한다고 하였다 (11). 또한 사람이나 동물모델에서 폐혈관 확장의 시작이 항상 말기 간병변이 동반하여야 하는 것은 아니고, 인체와는 달리 총담관 결찰을 한 동물모델에서는 경한 정도의 비정상적 가스교환에도 충분한 폐혈관 확장이 일어난다고 하였다 (11). 사람의 경우 간경화가 있는 10 - 20% 정도가 비정상적 가스교환이 있고 폐혈관 확장이 일어나 간폐증후군의 기준에 맞는데 (15, 21), 이들 환자의 대부분이 저산소 분압증 (PaO_2, 70 mmHg 이하)이며 증상을 호소하지 않는 환자들은 폐혈관 확장 여부에 대한 분석에서 제외되었을 가능성이 높다. 따라서 증상을 기초로 하여 동맥내 산소 분압을 측정하고 폐혈관 확장 여부를 살펴본 사람과는 달리 동물모델에서 간폐증후군의 빈도차이는 다를 것으로 생각된다. Fallon 등 (11)은 총담관 결찰로 인한 간조직의 손상과 문맥압 항진의 증가가 폐혈관 확장의 방아쇠 작용을 하며 그 기전은 잘 알려져 있지 않지만 만성 간질환에서 혈관작용성 매개체의 폐내 생성의 불균형이 야기되고 그 결과 폐혈관 장력이 감소하여 폐혈관 확장이 일어나는 것으로 간주되고 있다. 이런 점에서 총담관 결찰이 이러한 잠재적인 기전을 알아보기 위한 모델로 유용하다고 사료된다.

본 연구에서 가토의 총담관 결찰후 2주와 3주에 시행한 흉부 고해상 CT에서 폐상부혈관 확장이 36.4%, 폐하부혈관 확장이 72.7%로 관찰되었고 이러한 결과는 간폐증후군 환자에서 보고한 결과 (14, 15, 19, 27)와 일치한다. 아직 그 이유에 대해 밝혀진 바는 없으나, 중력에 의하여 야기된 것이 아닌가 추측된다. 사람의 경우와는 달리 가토의 폐상부에서도 비록 빈도는 폐하부보다 낮지만 폐혈관 확장이 야기되는 것은 가토는 직립보행을 하지 않기 때문으로 추측한다.

간폐증후군에서 폐혈관의 확장기전에 대해 아직 정확히 알려진 바는 없으나, 최근 동물모델에 대한 실험결과 강력한 국소 혈관확장 작용을 일으키는데 NO가 관여할 것이라고 제안되었다 (28, 29). NO는 자유기 (free radical)로 반감기가 6초 내지 10초로 매우 불안정하며 반응성이 강한 화학물질이다. 이러한 NO는 포유동물에서 NO 생성효소 (NO synthase, 이하 NOS)에 의해 L - arginine의 terminal guanidino nitrogen으로 부터 L - citrulline으로 변환되는 과정에서 생합성이 되어 여러 가지 생물학적 활성을 갖는다 (17). 특히 혈관내피세포에서 분비되어 주위 평활근에 직접 작용하여 강력한 혈관확장 효과를 갖는 신호전달 물질인 내피기원 확장인자 (endothelium - derived relaxing factor: EDRF)가 바로 NO임이 이미 밝혀졌다 (30 - 33). 현재까지 밝혀진 NOS는 세가지 형태가 있다. Type I NOS는 neuronal NOS (nNOS)라 하며, 대식세포에서 처음 확인된 Type II NOS는 immunologic NOS (iNOS), 그리고 Type III NOS는 endothelial NOS (eNOS)로 명명되었다 (34, 35). 또한 이들은 활성도에 따라 크게 구조성 (constitutive) NOS와 유도성 (inducible) NOS의 두가지 형태로 존재한다. eNOS와 nNOS등은 구조성 NOS로서 칼슘 의존성으로 Ca^{2+}/ calmodulin의 작용에 의하여 조절되고, iNOS는 칼슘 비의존성으로 면역반응 및 염증반응에 의하여 발현된다. eNOS와 nNOS 등의 구조성 NOS를 함유하는 세포가 acetylcholine, bradykinin, ADP, histamine, glutamate 등의 물질에 의해 수용체가 활성화되면 세포막의 채널이 열려 세포내 칼슘이온의 농도가 증가하게 되며, 이때 증가된 세포내 칼슘이온은 calmodulin과 반응하여 NOS를 활성화시켜서 NO 생성을 촉진한다. eNOS에 의해 생성된 NO는 혈관내피세포 바로 하연에 존재하는 평활근에 작용하여 혈관이완 작용을 유발한다. 작용기전은 NO가 평활근의 guanylyl cyclase의 heme에 부착되면 세포내에서 cyclic GMP가 생성되는데 이 cyclic GMP는 근육의 이완을 유발시킨다 (32).

Fallon 등 (9)은 쥐를 모델로 한 간폐증후군의 발병기전으로 eNOS가 관여한다고 하였는데 총담관 결찰 후에 폐포 - 동맥간의 산소분압차가 클수록 eNOS양의 증가가 관찰되고, 면역조직화학적 연구에서 eNOS 염색은 동맥내피세포와 섬모성 기관 상피세포에서 확인되어 eNOS가 간폐증후군에서 폐혈관의 확장을 일으키는 요인이라고 주장하였다. 본 연구에서는 가토의 총담관 결찰 2주 이후에 eNOS 발현은 폐하부에서 40%였고, 3주 이후에 eNOS 발현은 폐상부와 폐하부에서 각각 66.7%, 83.3%로 나타났는데, 비록 총담관 결찰의 기간과 eNOS 발현 빈도간에는 실험개체수의 한계로 인해 통계학적 의의를 판단하기 어려우나 빈도만으로 본다면 총담관 결찰 후의 기간이 길수록 eNOS 발현의 빈도는 높게 나타났다. 이는 Fallon 등 (9)이 보고한 쥐의 총담관 결찰 후 2주에 비해 5주에서 폐 eNOS의 발현이 높게 나타나 총담관 결찰의 기간이 경과될수록 eNOS의 역가가 높게 나타났다는 결과와 일치한다. 본 연구에서 eNOS가 발현된 경우에 고해상 CT에서 폐혈관의 확장이 전 예에서 관찰되어 eNOS에 의해 생성된 NO가 폐혈관 확장에 관여하였을 것이라는 사실을 시사한다.

본 연구에서는 간조직에서 eNOS는 발현되지 않았으며, 그 기전에 대하여는 확실히 알 수는 없으나, 간세포 손상에 의한 내피세포 손상으로 eNOS 발현에 영향을 주었을 것으로 생각한다. 이러한 결과와 유사하게 그 이전 다른 연구자들의 보고에 의하면 간경화가 있는 쥐를 이용한 실험에서 간에서의 eNOS 생성이 감소되었다는 보고가 있고 (36), 향후 만성 간병변이 있는 간조직에서의 유도성 NOS 발현에 대한 연구가 앞으로의 과제로 남았다.

L - arginine은 NO의 전구체로서 세포내 cyclic GMP를 통해 강력한 혈관확장 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다 (16, 17). L - arginine 투여는 NO 생성을 촉진시키고 내피세포 의존성 혈관확장을 증가시키는 것으로 (37), 고콜레스테롤혈증이 있는 사람과 가토에 L - arginine 투여가 내피세포 의존성 관상동맥 확장을 유발시킨다는 보고가 있다 (38, 39). 또한 허혈상태의 하지혈관에 L - arginine 투여시 하지혈관 확장이 유발되고 소변에서 NO의 대사산물인 NO_3^-가 증가되어 L - arginine투여로 NO 생성이 촉진되어 NO 의존성 혈관확장을 일으켰다는 보고도 있다 (40). 간폐증후군의 동물모델을 이용한

실험에서 L - arginine 투여를 시도한 실험은 없었는데, 본 연구에서는 L - arginine을 투여하여 NO의 생성을 더욱 증가시키고 폐혈관 확장 정도를 더욱 증가시키기 위한 목적으로 실시하였다. 비록 가토의 혈중 L - arginine 농도를 정량적으로 측정하지 못한 제한점은 있으나, L - arginine 투여 군이 비투여 군에 비해 폐혈관 확장의 정도가 더욱 뚜렷하여 간폐증후군에서 폐혈관 확장에 L - arginine - NO 통로가 관여함을 시사한다.

결론적으로 간폐증후군에서 폐혈관 확장의 기전을 알기 위하여 시행한 실험모델로 가토의 총담관 결찰 후에 흉부 고해상 CT에서 폐혈관 확장이 보였고, 폐혈관 확장이 있는 부위의 폐조직에서 eNOS가 발현되었다. 고해상 CT에서 폐혈관 확장과 폐조직의 eNOS 발현간에는 통계학적으로도 높은 상관성을 보였다. 또한 NO의 전구체인 L - arginine 투여 군이 비투여 군에 비해 고해상 CT에서 폐혈관 확장의 정도가 의미있게 확장되었다. 가토를 실험모델로한 간폐증후군에서 폐혈관 확장의 원인은 eNOS에 의해 유래된 NO가 크게 관여한다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Rodman T, Sobel M, Close HP. Arterial oxygen unsaturation and the ventilation-perfusion defect of Laennec 's cirrhosis. *N Eng J Med* 1960;263:73-77
2. Krowka MJ, Cortese DA. Pulmonary aspects of chronic liver disease and liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1985;60:407-418
3. Rodriguez-Roisin R, Roca J, Agusti AGN, Mastai R, Wagner PD, Bosch J. Gas exchange and pulmonary vascular reactivity in patients with liver cirrhosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1085-1092
4. Agusti AGN, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Mastai R, Wagner PD, Bosch J. Pulmonary hemodynamics and gas exchange during exercise in cirrhosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:485-491
5. Daoud FS, Reeves JT, Schaefer JW. Failure of hypoxic pulmonary vasoconstriction in patients with liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1972;51:1076-1080
6. Naeije R, Hallemans R, Mols P, Melot C. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in liver cirrhosis. *Chest* 1981;80:570-574
7. Naeije R, Melot C, Hallemans R, Mols P, Lejeune P. Pulmonary hemodynamics in liver cirrhosis. *Semin Respir Med* 1985;7:164-170
8. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994;20:1359-1363
9. Fallon MB, Abrams GA, Luo B, Hou Z, Dai J, Ku DD. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 1997;113:606-614
10. Chang SW, Ohara N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis: an animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1982;145: 798-805
11. Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and the hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997;272: 779-784
12. Oh KS, Bender TM, Bowen A, Ledesma-Medina J. Plain radiographic, nuclear medicine and angiographic observations of hepatogenic pulmonary angiodysplasia. *Pediatr Radiol* 1983;13:111-115
13. Krowka MJ, Dickson ER, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome: clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest* 1993;104:515-521
14. McAdams HP, Erasmus J, Crockett R, Mitchell J, Godwin JD, McDermott VG. The hepatopulmonary syndrome: radiologic findings in 10 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1996;166:1379-1385
15. Lee KN, Lee HJ, Shin WW, Webb WR. Hypoxemia and liver cirrhosis (hepatopulmonary syndrome) in eight patients: comparison of the central and peripheral pulmonary vasculature. *Radiology* 1999;211:549-553
16. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-666
17. Leaf CD, Wishnok JS, Tannenbaum SR. L-arginine is a precursor for nitrate biosynthesis in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:1032-1037
18. Krowka MJ, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome: an evolving perspective in the era of liver transplantation. *Hepatology* 1990;11:138-42
19. Krowka MJ, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome: current concepts in diagnostic and therapeutic considerations. *Chest* 1994;105:1528-1537
20. Rodriguez-Roisin R, Agusti AGN, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax* 1992;47:897-902
21. Lange PA, Stoller JK. The hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 1995;122:521-529
22. Agusti AGN, Roca J, Bosch J, Rodriguez-Roisin R. The lung in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1990;10:251-257
23. Eriksson LS, S derman C, Ericzon BG, Eleborg L, Wahren J, Hedenstierna G. Normalization of ventilation/perfusion relationships after liver transplantation in patients with decompensated cirrhosis: evidence for a hepatopulmonary syndrome. *Hepatology* 1990;12:1350-1357
24. Hourani JM, Bellamy PE, Tashkin DP, Batra P, Simmons MS. Pulmonary dysfunction in advanced liver disease: frequent occurrence of an abnormal diffusing capacity. *Am J Med* 1991;90:693-700
25. Stanley NN, Woodgate DJ. Mottled chest radiograph and gas transfer defect in chronic liver disease. *Thorax* 1972;27:315-323
26. Krowka MJ, Cortese DA. Severe hypoxemia associated with liver disease; Mayo clinic experience and the experimental use of almitrine bismesylate. *Mayo Clin Proc* 1987;62:164-173
27. Barbe T, Losay J, Grimon G, Devictor D, Sardet A, Gauthier F, Houssin D, Bernard O. Pulmonary arteriovenous shunting in children with liver disease. *J Pediatr* 1995;126:571-579
28. Perrella MA, Edell ES, Krowka MJ, Cortese DA, Burnett JC Jr. Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia. *Am J Physiol* 1992;263:45-50
29. Sieber CC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993;104:1750-1754
30. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142
31. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376
32. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:9265-9269
33. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526
34. Marletta M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:12231-12234

35. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase. roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918
36. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-351
37. Egashira K, Hirooka Y, Kuga T, Mohri M, Takeshita A. Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *Circulation* 1996;94:130-134
38. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1992;90:1248-1253
39. Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D. Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. response according to treatment duration, anatomic site, and sex. *Circulation* 1996;94:498-506
40. Bode-B ger SM, B ger RH, Alfke H, Heinzel D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K, Fr lich JC. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. a randomized, controlled study. *Circulation* 1996;93:85-90

대한방사선의학회지 2001;44:475 - 483

J Korean Radiol Soc 2001;44:475 - 483

Correlation of Pulmonary Vascular Dilatation on HRCT to Expression of eNOS in a Rabbit Model of Hepatopulmonary Syndrome[1]

Ki-Nam Lee, M.D., Won-Jung Jung, M.D., Seong Kuk Yoon, M.D., Kyung-Jin Nam, M.D., Jong-Young Kwak, M.D.[2], Choon Hee Son, M.D.[3], Phil Jo Choi, M.D.[4], Young Hoon Kim, M.D.[5]

[1]*Department of Diagnostic Radiology, College of Medicine, Dong-A University*
[2]*Department of Biochemistry, College of Medicine, Dong-A University*
[3]*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dong-A University*
[4]*Department of Chest Surgery, College of Medicine, Dong-A University*
[5]*Department of General Surgery, College of Medicine, Dong-A University*

Purpose: To investigate the correlation between pulmonary vascular dilatation on high-resolution computed tomography (HRCT) and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) after common bile duct ligation (CBDL) in the rabbit as a model of hepatopulmonary syndrome.

Materials and Methods: CBDL was done in 11 rabbits (2 weeks after CBDL, n = 5; 3 weeks after CBDL, n = 6). Four rabbits were done by abdominal incision with peritoneal suture only as a control group. HRCT scans were performed in the both groups. We evaluated peripheral pulmonary vascular dilatation in the upper and lower lobe. Tissue samples were immediately obtained from both upper and lower lobes of the lung and the liver after sacrifice. Dilatation of peripheral pulmonary vessel was correlated with the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) determined by Western blot. We also compared the degree of pulmonary vascular dilatation between the groups with administration of L-arginine (n = 5) and without administration of L-arginine (n = 6) after CBDL.

Results: Two weeks after CBDL, pulmonary vascular dilatation on HRCT was seen in three rabbits (60%) and the increase of eNOS expression was shown in two rabbits (40%) in the lower lobe. Three weeks after CBDL, pulmonary vascular dilatation on HRCT was seen in four rabbits (66.7%) and five rabbits (83.3%) each upper and lower lobe, respectively. Expression of eNOS was coincidently increased. The pulmonary vascular dilatation was noted more frequently in the lower lobe than in the upper lobe. Pulmonary vascular dilatation on HRCT was highly correlated with increase of expression of eNOS in the upper ($r = 1.00$, $p = .0001$) and lower lobe ($r = .83$, $p = .0015$). In contrast, control group of four rabbits developed neither pulmonary vascular dilatation on HRCT nor increase of eNOS expression. The grade of pulmonary vascular dilatation in the group with L-arginine administration was higher than that without administration of L-arginine ($p < .05$).

Conclusion: Pulmonary vascular dilatation on HRCT is significantly correlated with increase of eNOS expression in a rabbit lung after CBDL. These results suggest that NO, derived from pulmonary eNOS, contributes to pulmonary vascular dilatation in a rabbit model of hepatopulmonary syndrome.

Index words : Lung, CT
Lung, effect of drugs on
Lung, vascular disease

Address reprint requests to : Ki-Nam Lee, M.D., Department of Diagnostic Radiology, Dong-A University Hospital, 1,3-ga, Dongdaesin-dong, Seo-gu, Pusan 602-103, Korea.
Tel. 82-51-240-5375 Fax. 82-51-253-4931