

하지정맥류 환자의 정맥벽에서 정수압 스트레스에 따른 기질 금속단백분해효소 발현도 분석

경북대학교 의학전문대학원 외과학교실

허 승 · 최향희 · 김형기

The Expression of Matrix Metalloproteinase according to Hydrostatic Pressure in Varicose Veins

Seung Huh, M.D., Hyang Hee Choi, M.D., Hyung-kee Kim, M.D.

Division of Transplantation and Vascular Surgery, Department of Surgery, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) caused by hydrostatic pressure stress is important in the development of varicose veins (VVs). This study was performed to analyse the expression of various MMPs and TIMPs according to the hydrostatic stress and the anatomical level of human great saphenous vein (GSV).

Methods: Forty-nine vein samples were obtained from 10 patients with VVs (control group), and 34 samples from 7 VV patients after 1-hour hydrostatic stress just before surgery (stress group) at each anatomical site (proximal, Hunter, Dodd, and Boyd perforators) of GSV. Light microscopic examination and immunohistochemistry for MMP-1, -2, -9, -13 and TIMP-1, -2 were performed.

Results: Intimal hyperplasia, fragmentation and loss of elastic fibers, infiltration of collagen fibers, and disorganization of medial muscle layers were evident in most vein samples. The degree of vein wall degeneration was not different between the 2 groups, and the anatomical sites of GSV. By immunohistochemistry, the expression of MMPs and TIMPs was not significantly different according to the group and the site. The expression of MMP-9 was more intense than that of other MMPs and TIMPs in all samples. MMP-9 was well localized to endothelial cells, medial muscle layers, and adventitial vasa vasorum.

Conclusion: There are no distinct differences in the varicose vein samples after short-term postural blood stasis compared to the resting group. MMP-9 may be the key enzyme of the venous wall remodeling. (J Korean Surg Soc 2009;77:344-352)

Key Words: Varicose veins, Hydrostatic pressure, Matrix metalloproteinases

중심 단어: 하지정맥류, 정수압, 기질 금속단백분해효소

서 론

책임저자: 허 승, 대구시 중구 삼덕2가 50
☎ 700-721, 경북대학교병원 외과
Tel: 053-420-6520, 5605, Fax: 053-421-0510
E-mail: shuh@knu.ac.kr

접수일 : 2009년 7월 15일, 게재승인일 : 2009년 8월 24일
본 논문은 2008학년도 경북대학교 신입교수정착연구비에 의하여
연구되었음.

하지정맥류의 유병률은 인종, 국가 및 보고자에 따라 다
소 차이는 있으나, 서구의 보고에 따르면 남녀 구분 없이
전 인구의 1/3 이상에서 관찰되는 흔한 질환이다.(1,2) 하지
정맥류의 증상으로는 미용적 문제, 통증, 둔중감 및 피로,
하지부종, 근육경련, 가려움증 등이 있으나, 심한 경우에는

하지파행증과 같은 참을 수 없는 목적인 통증과 정맥울혈성 궤양을 초래하여 환자의 삶의 질을 심각하게 저하시킨다. 근래 국내에서도 생활의 질이 향상되고 미용에 대한 관심이 높아짐에 따라 이전에는 중요하게 여기지 않던 이 질환에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이에 따라 현재 임상각 과에서 광범위하게 이 질환에 대한 치료를 다양하게 시행하고 있다.

하지정맥류의 발생 위험인자 및 병태생리학적 원인으로 정맥판막의 기능부전 및 하지의 표재정맥에 미치는 정수압에 의한 구조적 변화, 기질-금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP) 및 다른 효소들에 의한 세포외기질의 변화, 유전적 소인 등이 있다.(3,4) 혈류역학적 자극이나 혈관내막의 손상은 MMP를 활성화시키는 것으로 알려져 있고, 특히 혈관내강의 압력 상승은 MMP에 의한 혈관벽의 재형성을 조기에 발생시키는 것으로 보고되고 있다.(5)

하지정맥류의 발생에 관여하는 MMP의 역할에 대해서는 아직 통일된 보고가 없으나, 하지정맥류 환자에서 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 MMP의 발현도 차이가 보고된 바 있고, 또한 하지정맥류 정맥내강에서 혈류 정체 후 혈장 pro-MMP-9의 상승이 보고된 바 있다.(6-11) 인간의 직립보행에 따른 지속적인 정수압 스트레스가 정맥내강의 압력 상승을 초래하게 되고, 이로 인한 세포외기질의 변화가 정맥벽의 변성과 하지정맥류의 발생에 깊은 관계가 있을 것으로 여겨지고 있으나 아직까지 이에 대한 정확한 기전은 밝혀진 바 없다.

이에 저자 등은 하지정맥류 환자의 정맥벽에서 이 질환의 발생과 관련되어 있는 MMP의 발현이 대복재정맥의 해부학적 위치 및 정수압 스트레스에 따라 어떤 변화를 보이는가를 알아보고자 하였다.

방 법

연구대상은 본원 혈관외과에서 대복재정맥의 역류로 인한 하지정맥류로 수술을 시행 받은 17명(20하지)이며, 이들 중 7명(9하지)에 대하여 수술 전 1시간 동안 기립 자세를 유지하게 하여 하지의 대복재정맥에 정수압 스트레스를 유발하였고, 다른 10명(11하지)에 대해서는 수술 전일 저녁 시간부터 수술 시간까지 침상에서 안정시켜 이들을 대조군으로 하였다. 대조군의 평균연령은 50세(38~60세), 남녀비는 4 (5하지) : 6이었으며, 스트레스군의 평균연령은 48세(34~59세), 남녀비는 5 (7하지) : 2였다. 대상 환자들은 만

성 하지정맥부전증에 대한 CEAP 분류법에서 임상적(clinical, C) 분류는 스트레스군 1명, 2하지(C₄, 과다색소 침착 및 피부염 증상을 동반)를 제외하고 모두 하지정맥류만 있는 C₂에 해당하였으며, 원인적(etiology, E), 해부학적(anatomy, A), 병태생리학적(pathophysiology, P) 분류에서는 모두 일차성이며, 표재정맥에 국한되고, 정맥혈의 역류에 의한 E_p, A_s, P_R로 분류되었다.

수술 전 검사로 모든 환자는 이중주사초음파검사를 시행하여 대복재정맥의 역류를 확인하였으며, 이들 중 육안적으로 대퇴부 대복재정맥의 정맥류성 변화가 관찰된 경우는 대조군에서 2하지, 스트레스군에서 2명, 3하지였다. 정맥절편은 대복재정맥의 해부학적 위치에 따라 근위부, Hunter 관통정맥 부위, Dodd 관통정맥 부위, Boyd 관통정맥 부위에서 각각 0.5 cm 정도 구득 후 광학현미경검사 및 면역조직화학검사를 위하여 10% 포르말린에 고정하고 파라핀블록을 만들어 보존하였다. 수술 시 근위부 정맥절편은 서혜부 대복재정맥-대퇴정맥 접합부(saphenofemoral junction, SFJ)를 박리 시 구득되었으며, 그 외 부위는 대복재정맥을 함입 발거술 후 또는 각각의 해부학적 부위를 박리 후 구득되었다. 정맥절편은 대조군에서 근위부 11개, Hunter 관통정맥 부위 11개, Dodd 관통정맥 부위 9개, Boyd 관통정맥 부위 10개를 구득하였으며, 스트레스군에서는 근위부 및 Hunter 관통정맥 부위에서 각각 9개, 그 외 부위에서는 각각 8개를 구득하였다.

1) 광학현미경검사

채취된 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀에 포매한 후, 박절기를 이용하여 3 μ m 두께로 자른 뒤 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 각 부분 정맥의 내막, 중막 및 외막의 변화를 관찰하였고, Masson's trichrome 염색 및 Verhoff's elastic fiber 염색을 통하여 아교질 및 탄력소 섬유들의 조성 및 배열의 규칙성을 관찰하였다.

반정량적 분석을 위하여 내막의 변성 정도는 정상적으로 비대가 없는 경우를 0, 국소적 비대를 1, 미만성 경등도 비대를 2, 미만성 중등도 비대를 3으로 구분하여 조사하였고, 중막의 변성 정도는 내측, 중측, 외측 평활근세포층의 비대 및 불규칙한 배열의 정도, 이들 평활근층 사이로 아교질이 침착된 정도, 그리고 탄력소의 소실 및 분절화 정도에 따라서 정상적인 경우를 0, 규칙적인 평활근층 및 탄력소 배열에 아교질의 경등도 침착을 보이는 경우를 1, 평활근층의 배열이 불규칙하며 중등도의 탄력소 분절화와 아교질 침착

이 보이는 경우를 2, 평활근층 및 탄력소의 배열이 파괴되고 미만성으로 아교질이 침착된 경우를 3으로 구분하였다.

2) 면역조직화학검사

과라핀에 포매된 조직을 $3\mu\text{m}$ 두께로 박절하여 probe-on plus 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착시켜 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 마이크로웨이브 오븐을 이용하여 10 mM citrate buffer (pH 6.0) 용액을 5분간 먼저 가온 후에 슬라이드를 넣고 5분간 2회 가온 처리하여 항원을 표출하였다. 이후 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮추었으며 이어서 Tris 완충용액으로 세척하고 3% 과산화수소용액에 3분간 처리 후 Tris 완충용액으로 세 차례 세척하였다. 조직 내의 비특이항원을 차단하기 위해 정상 면양혈청에 7분간 반응시켰다. 단일클론 일차항체인 anti-MMP-1 (1 : 200), anti-MMP-2 (1 : 100), anti-MMP-9 (1 : 400), anti-MMP-13 (1 : 50), anti-TIMP-1 (1 : 50), anti-TIMP-2 (1 : 400) (Oncogene, Darmstadt, Germany) 등을 상온에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 Tris 완충용액으로 세 차례 세척하고 이차항체(UltraTech HRP, Cat No. 2391, France)를 10분간 반응시킨 후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent를 사용하여 실온에서 10분간 반응시켰다. Tris 완충용액에 세척한 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako, USA)로 발색하였다. 증류수에 수세한 후 Mayer hematoxylin으로 20초간 대조 염색한 후 봉입하여 슬라이드를 완성하였다.

면역조직화학적 염색의 평가는 혈관내피세포, 내막, 중막, 외막의 맥관벽혈관 등으로 구분하여 각각의 효소들의 발현 부위 및 정도를 비교 관찰하였으며, 이들의 발현도는 Ishikawa 등(12)이 사용한 분류법에 따라 판독하였다. 세포 내에서 완전한 음성 반응을 0, 분산된 상태로 5% 미만의 세포에 양성 반응을 보이거나 기질에 약한 양성 반응을 보일 때 1, 6~30% 사이의 세포에 양성 반응을 보이거나 기질에 중간 정도의 양성 반응을 보일 때 2, 2와 4사이의 중등도 이상의 세포 및 기질에 양성 반응을 보일 때 3, 50% 이상의 세포에 양성 반응을 보이거나 전반적으로 기질에 양성 반응을 보일 때 4로 하였다.

이러한 과정은 모두 경북대학교 임상시험 윤리위원회의 인가를 얻은 연구방법에 따라 환자의 서면 동의를 받은 후 시행되었다. 통계처리는 SPSS 14.0 프로그램을 사용하였으며 각 군 간의 평균 및 빈도의 비교는 Student T-test 및 Mann-Whitney U test를 사용하였으며, 세 군 이상의 비교는 one-way ANOVA test 및 Kruskal-Wallis test를 사용하였다. 모든 결과는 $P < 0.05$ 에서 각 항목의 유의성을 검증하였다.

결 과

1) 광학현미경검사

기본염색 결과 비교적 내막의 증식이 없고, 탄력소층이 잘 유지되며, 중막의 변성이 적은 경우도 있었으나, 거의 대부분의 정맥절편에서 내막의 국소적 비대, 탄력소층의 분

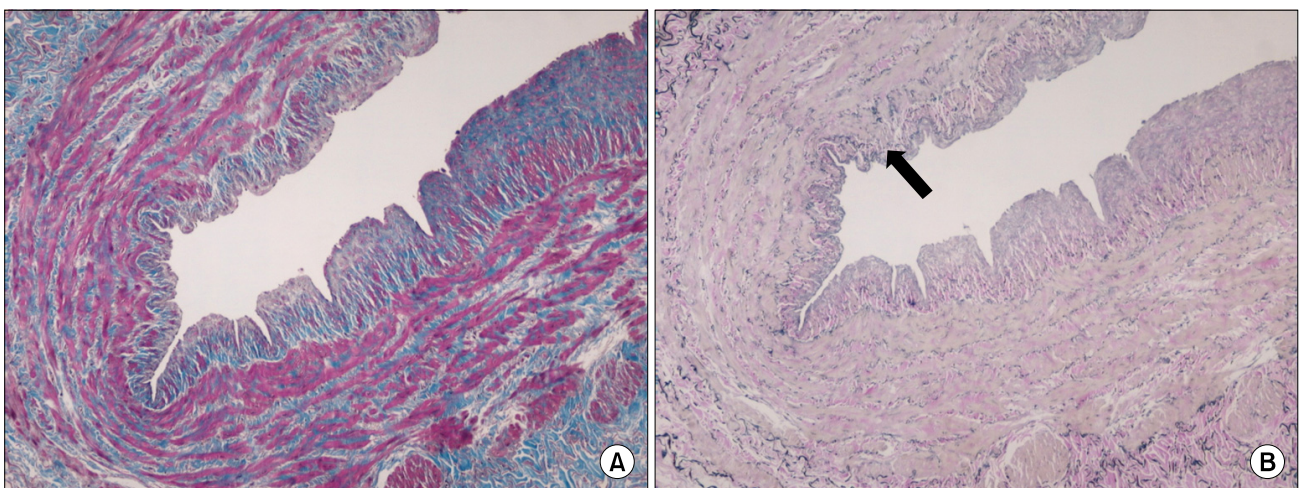


Fig. 1. Histochemical staining of section of varicose vein shows changes of intimal and medial connective tissue elements. Diffuse intimal hyperplasia and disorganization of medial smooth muscle layers are seen (A) (Masson's trichrome; $\times 100$). Black-stained elastic fibers are fragmented and lost in internal elastic lamina (black arrow) and medial smooth muscle layers (B) (Verhoeff's elastic fiber; $\times 100$).

절화, 중막 근육층 내로의 아교질 침착 등이 관찰되었다 (Fig. 1). 이러한 변화는 대조군 및 스트레스군 모두에서 동일하게 관찰되었으며, 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 내막 및 중막의 변성도에서 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다 (Table 1). 그러나 대조군에서는 대복재정맥의 원위 부인 Dodd 및 Boyd 관통정맥 부위에서 내막 및 중막의 변성이 심한 경향이 관찰되었고, 스트레스군에서는 근위부와 Boyd 관통정맥 부위의 내막에서 변성도가 높게 관찰되었다 (Fig. 2).

2) 면역조직화학검사

전체적인 발현도에서 MMP-9이 정맥절편 전층에서 가장 강하게 발현되었으며, TIMP-2가 다음으로 강하게 발현되었고, TIMP-1은 전체 정맥절편에서 발현을 관찰할 수 없었다

Table 1. Mean degree of degeneration of varicose veins according to the wall and anatomical sites

Site	Wall	Control group (n=11*)	Stress group (n=9 [†])
Proximal	Intima	2.00±0.77	2.11±1.05
	Media	2.00±0.78	2.11±0.33
Hunter	Intima	1.82±0.75	1.89±0.93
	Media	2.09±0.70	2.22±0.67
Dodd	Intima	2.20±0.79	1.78±1.09
	Media	2.40±0.70	2.11±0.60
Boyd	Intima	1.91±1.04	2.22±1.09
	Media	2.45±0.69	2.22±0.67

*n=9 in Dodd, n=10 in Boyd; [†]n=8 in Dodd and Boyd.

(Table 2, 3). 그 외 대조군에서는 MMP-1, -2, -13 간에 발현도 차이를 관찰할 수 없었으나, 스트레스군에서는 MMP-1, -13, -2 순으로 발현도에 유의한 차이가 있었다. 스트레스군의 근위부에서 다른 부위에 비하여 유의하게 높은 발현도를 나타내었던 MMP-2를 제외하고는 대조군 및 스트레스군 모두에서 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 전체적인 발현도의 차이를 관찰할 수 없었다.

정맥벽의 구조에 따른 발현도의 차이는 두 군 모두에서 관찰되었다. 대조군의 경우 비록 전체적인 발현의 정도는 미약했으나 MMP-1, -2, -13 및 TIMP-2가 외막의 맥관벽혈관에서 다른 부위에 비하여 가장 강하게 발현되었고, 스트레스군의 경우에는 MMP-1, -2, -13 및 TIMP-2가 외막의 맥관벽혈관 외에 혈관내피세포에서도 가장 강하게 발현되었다 (Fig. 3). 다른 효소들에 비하여 유의하게 높은 발현 양상을 보였던 MMP-9은 대조군 및 스트레스군 모두 혈관내피세포, 중막의 근육층 및 세포외기질, 맥관벽혈관 등에서 강하게 발현되었으나, 내막에서 다른 부위에 비하여 낮은 발현도가 관찰되었다 (Fig. 4).

대조군 및 스트레스군 비교에서는 MMP-1이 스트레스군에서 유의하게 많이 발현되었으나 (P=0.009), 전체적인 발현의 정도는 미약하였으며, 가장 강하게 발현되었던 MMP-9의 경우에는 통계적 유의성은 없었으나 대조군에서 보다 강하게 발현되는 경향을 나타내었다 (P=0.07). 정맥벽 각각의 구조에 따른 분석에서 MMP-1이 스트레스군의 혈관내피세포에서, MMP-2 및 -9은 대조군의 중막에서 유의하게 높은 발현도를 나타내었다 (P=0.009, P=0.037, P=0.021).

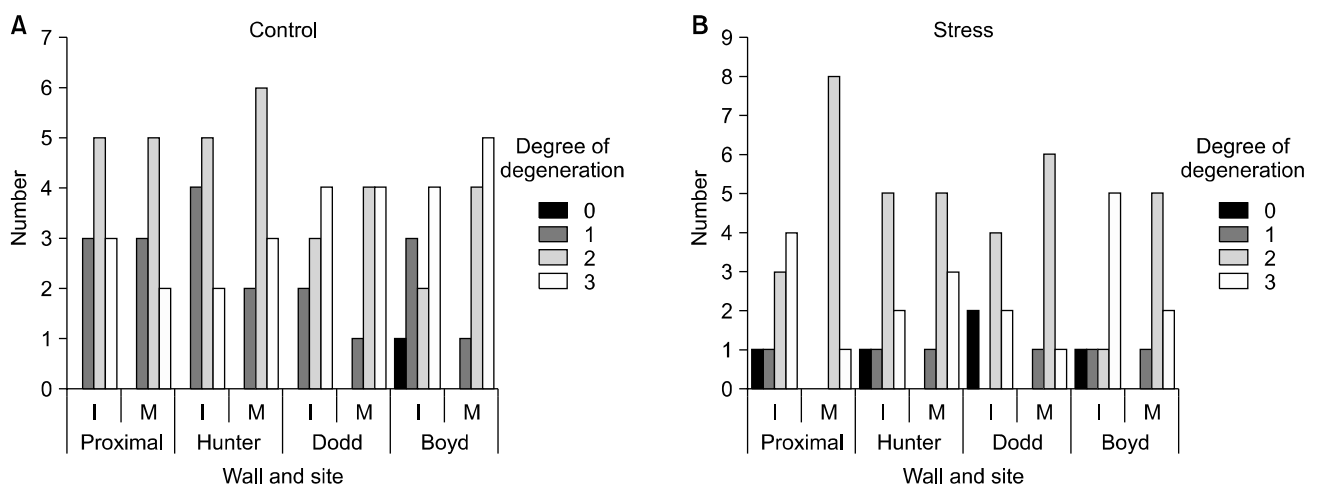


Fig. 2. By histologic analysis, degenerative changes of the vein walls are more severe in both of intimal and medial layers of Dodd and Boyd sites in control groups (A), whereas in the intimal layers of proximal and Boyd sites in stress groups (B). I = intima; M = media.

Table 2. Mean expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in control group

Site	Wall	MMP-1	MMP-2	MMP-9	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2
Proximal (n=11)	EC*	0.64±0.81	0.55±1.29	2.91±1.22	0.91±1.04	0	1.27±1.10
	Intima	0.27±0.65	0.36±0.81	1.64±0.89	0.18±0.60	0	0.73±1.01
	Media	0.55±1.04	0.45±0.82	2.73±0.48	0.55±0.82	0	0.91±0.94
	Vasa [†]	1.00±1.00	0.73±1.01	2.82±0.75	1.18±1.33	0	2.00±1.00
Hunter (n=11)	EC*	0.73±0.79	0.36±0.67	2.27±1.10	0.36±0.67	0	1.18±1.08
	Intima	0.36±0.67	0.45±0.82	1.15±0.93	0.36±0.81	0	0.91±0.94
	Media	0.55±1.04	0.64±1.12	2.91±0.54	0.82±1.40	0	1.36±1.29
	Vasa [†]	0.73±0.79	0.82±1.08	3.09±0.70	0.64±1.03	0	1.73±1.01
Dodd (n=9)	EC*	0.67±1.12	0.11±0.33	2.67±0.87	0.33±0.71	0	1.22±1.09
	Intima	0.22±0.67	0	1.44±1.01	0	0	1.56±0.88
	Media	0.56±1.13	0.44±0.73	2.89±0.78	0.56±1.33	0	1.78±1.30
	Vasa [†]	0.56±0.73	0.67±0.87	2.78±0.67	0.78±0.97	0	1.89±1.17
Boyd (n=10)	EC*	0.40±0.52	0.20±0.42	2.60±0.97	0.60±0.97	0	1.50±0.53
	Intima	0.40±0.70	0.20±0.63	2.00±1.16	0.20±0.63	0	1.30±0.68
	Media	0.30±0.68	0.40±0.84	3.00±0.67	0.30±0.95	0	1.00±0.94
	Vasa [†]	0.60±0.84	0.50±1.08	2.80±1.03	0.70±1.06	0	1.50±0.97
Total [‡]		0.54±0.82	0.44±0.85	2.50±1.00	0.54±0.96	0	1.35±1.03

*EC = endothelial cell; [†]Vasa = vasa vasorum; [‡]MMP-9>TIMP-2>MMP-1=MMP-2=MMP-13>TIMP-1 (P<0.05).

Table 3. Mean expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in stress group

Site	Wall	MMP-1	MMP-2	MMP-9	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2
Proximal (n=7)	EC*	1.14±0.69	1.00±0.82	2.29±1.11	0.71±0.49	0	1.71±0.49
	Intima	0.86±0.90	0.29±0.76	1.86±0.69	0.43±0.79	0	1.57±0.54
	Media	0.71±0.95	0.29±0.76	2.71±0.76	0.29±0.76	0	0.57±0.79
	Vasa [†]	1.00±1.00	1.14±1.07	2.29±1.11	0.86±0.69	0	1.00±0.82
Hunter (n=7)	EC*	1.00±1.00	0.43±0.79	2.71±0.49	0.71±0.49	0	1.57±0.79
	Intima	0.57±0.54	0	1.71±0.76	0.14±0.38	0	1.29±0.95
	Media	0.43±0.54	0	2.57±0.54	0.14±0.38	0	0.57±0.54
	Vasa [†]	1.00±1.00	0.71±0.95	3.00±0.82	1.00±1.00	0	1.43±0.98
Dodd (n=7)	EC*	1.14±0.90	0.43±0.79	2.09±0.76	0.57±0.54	0	1.43±0.79
	Intima	0.43±0.54	0	1.57±0.79	0.14±0.38	0	1.29±0.95
	Media	0.43±0.79	0.14±0.38	2.29±0.49	0.14±0.38	0	0.43±0.79
	Vasa [†]	1.00±0.82	0.43±0.79	2.57±0.79	0.71±0.49	0	1.43±0.79
Boyd (n=7)	EC*	1.14±0.69	0.14±0.38	2.86±0.69	0.71±0.49	0	1.43±0.54
	Intima	0.43±0.79	0	1.71±0.49	0	0	1.29±0.76
	Media	0.14±0.38	0	2.57±0.54	0	0	0.29±0.49
	Vasa [†]	1.00±0.82	0.43±0.79	2.71±0.76	0.57±0.54	0	1.29±0.95
Total [‡]		0.78±0.80	0.34±0.69	2.36±0.82	0.45±0.60	0	1.16±0.83

*EC = endothelial cell; [†]Vasa = vasa vasorum; [‡]MMP-9>TIMP-2>MMP-1>MMP-13>MMP-2>TIMP-1 (P<0.05).

고 찰

하지정맥류의 발생과 관련하여 MMP와 TIMP의 역할에 대한 많은 연구들이 진행되었으나 아직 그 기전이 명확히 밝혀진 바 없으며, 각각의 연구 결과들 역시 상이한 결과를

보고하고 있다.(6-12) 이러한 상이한 결과들은 연구방법의 차이 및 구득된 정맥 절편의 차이에서 비롯된 것으로 생각되며, 하지정맥류 환자들의 개개인의 특성으로 인하여 명확한 통계적 분석이 어렵기 때문으로 여겨지고 있다. 본 연구에서 시행한 광학현미경검사 및 면역조직화학검사는 하지정맥류와 관련된 MMP 및 TIMP의 발현도를 분석하기 위한

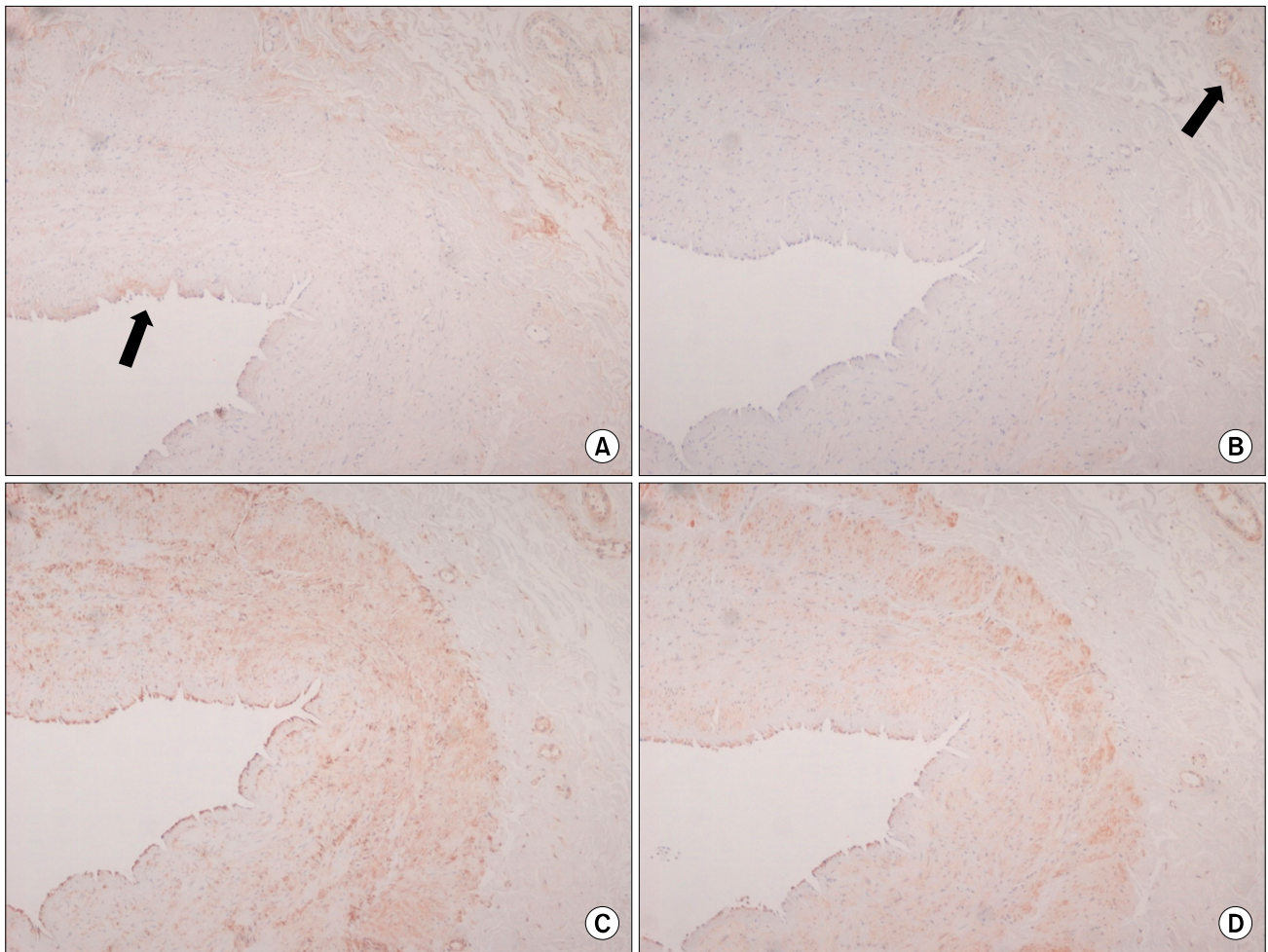


Fig. 3. Immunohistochemical staining of varicose vein for matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) ($\times 100$). Focal brown-stained endothelial cells (black arrow) expressing MMP-1 (A), and tiny stained vasa vasorum (black arrow) expressing MMP-2 (B) in the sections of varicose vein. The MMP-9 expression is more diffuse and intense in the whole vein wall (C), and that of TIMP-2 is less than MMP-9 (D).

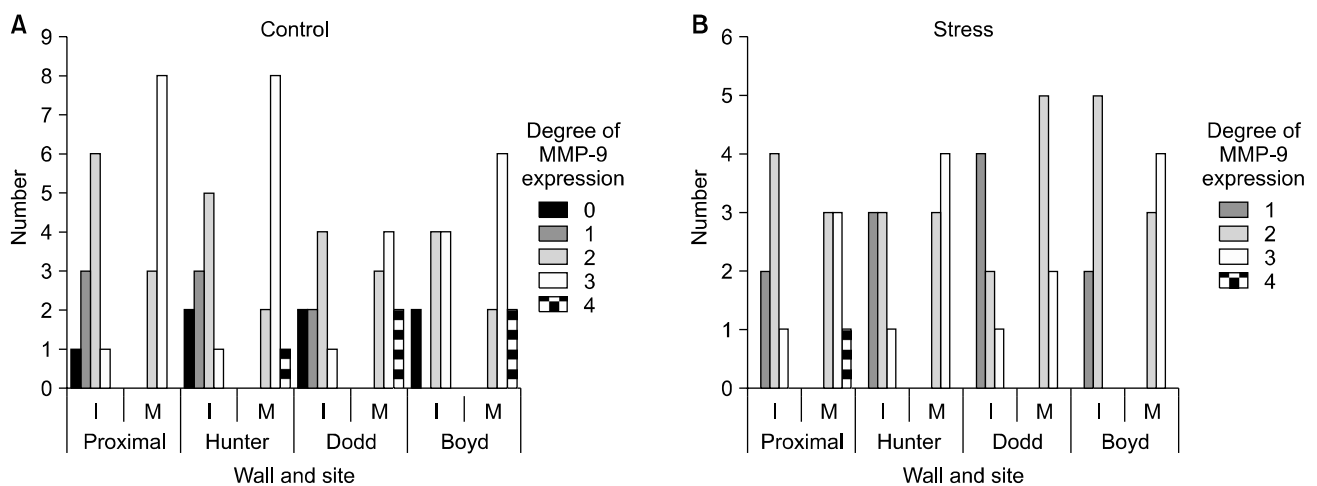


Fig. 4. By immunohistochemical analysis, the MMP-9 expression is more intense at medial layer compared to intima in both control and stress groups. I = intima; M = media.

기본적인 검사라고 할 수 있다.

근래 Naoum 등(4)이 제시한 하지정맥류의 병태생리학적 기전은 크게 정맥벽의 구조적 변화, 세포외기질의 변화, 그리고 유전적 소인 등으로 구분된다. 이 중 정맥벽의 변성과 직접적으로 관련이 있는 환경적 요인으로 정맥판막부전증이나 정수압에 의한 정맥압의 변화가 있으며, 이러한 압력 스트레스에 따른 MMP 및 TIMP의 작용으로 야기되는 세포외기질의 변화가 하지정맥류 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.

혈관내강의 압력 변화에 따른 혈관벽 재형성에 MMP의 활성이 중요한 역할을 하는 것으로 여러 연구에서 보고되고 있다. Patterson 등(13)은 배양된 인체의 복재정맥에 다양한 형태의 진단력을 가하고 이에 따른 MMP 및 TIMP의 활성도를 측정하였다. 그 결과 MMP-2, -9 및 TIMP-2가 혈류 속도를 증가시키에 따라 고속의 혈류에서 발현이 증가함을 관찰하였고, 반면에 TIMP-1은 혈류 속도의 증가에 따라 발현이 감소함을 관찰하였다. 또한 Lehoux 등(14)은 배양된 쥐의 경동맥에 압력을 가하여 동맥벽의 확장과 MMP의 발현과의 상관관계를 조사하였는데, 그 결과로 높은 압력에서 MMP-9의 발현이 동맥의 확장력 및 동맥벽의 재형성과 관련이 있음을 보고하였다.

동물실험 모델에서 동정맥루를 만들어 인위적으로 정맥 고혈압을 발생시킨 후 정맥의 변성과 시기에 따른 MMP의 발현도를 조사한 Pascarella 등(15)의 보고에 따르면, MMP-2와 MMP-9이 정맥벽 및 정맥판막에서 수술 후 21일 및 42일에 강하게 발현되었으며, 정맥판막의 부전에 의한 정맥혈 역류의 비율도 이 시기에 동일하게 증가한 것으로 나타났다. 특히 MMP-9의 경우에는 MMP-2와는 달리 수술 후 1일째에도 발현이 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 이들은 정맥의 형태학적 변화에서도 정맥부전증 환자에서 구획한 정맥에서 보이는 것과 유사한 정맥 변성이 관찰됨을 보고하면서 정맥압의 변화에 따라 발생하는 정맥판막의 점차적인 변성이 정맥혈의 역류와 관련이 있으며, 이러한 변화에 정맥벽 세포외기질의 재구성에 관여하는 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 관련이 있음을 시사하였다. 또한 Berceli 등(16)은 동물실험을 통해 동맥우회술에 사용된 정맥이식편의 혈관벽 재형성과 MMP의 발현에 관하여 연구한 결과로 정맥이식편에서 초기에 일시적인 pro-MMP-9의 발현 증가가 있었으며, 이후 정맥이식편의 내막증식과 더불어 수술 후 7일부터 14일까지 활성화된 MMP-2의 증가를 관찰하였고, 이러한 활성화 MMP-2의 증가는 고속의 동맥혈류 모델에서 보

다 저속의 동맥혈류 모델에서 더욱 뚜렷함을 보고하였다.

이러한 연구들의 결과로 혈관내강의 혈류역학적 변화에 따른 MMP 및 TIMP의 발현이 혈관벽 재형성에 관여한다는 사실은 관찰되었으나, 그 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 또한 급성으로 높은 압력이나 고속의 혈류를 사용하여 나타난 이러한 연구 결과들이 실제 하지정맥류의 발생과 관계가 깊은 만성적이고 낮은 압력의 혈류 정체 모델에서 나타날 수 있는 결과들과는 차이가 있을 것으로 생각된다. Jacob 등(11)은 하지정맥류 환자의 정맥류 내에 혈류를 30분간 앓은 자세에서 정체시킨 후 이를 채취하여 MMP의 발현을 조사한 결과로 혈장 내에 pro-MMP-9의 발현과 함께 단백질 분해 산물들이 증가함을 관찰하였고, 이러한 결과는 혈류정체에 따른 다핵구의 활성화에 기인하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 1시간 가량의 정수압 스트레스 후 대조군과 스트레스군에서 정맥을 채취하여 MMP와 TIMP에 대한 면역조직화학검사를 시행하였으나, 두 군 간에 뚜렷한 차이를 관찰하지는 못하였다. 이는 MMP 및 TIMP의 정맥벽 내 발현이 단 시간의 혈류역학적 자극에 의해서는 별다른 차이를 보이지 않음을 의미하는 것으로 하지정맥류의 발생이 만성적이고 지속적인 자극에 의해서 이루어지는 것과 관련이 있을 것이다.

임상에서 하지정맥류가 가장 많이 발생하는 곳은 무릎 직하방 내측부로 해부학적으로 Boyd 관통정맥이 대복재정맥으로 유입되는 부위이며, 또한 대복재정맥이 육안적으로 구불구불하게 확장되는 변화를 주로 보이는 곳은 무릎 직상방의 Dodd 관통정맥부위에서 Boyd 관통정맥 부위이다. 이러한 차이를 규명하기 위한 연구는 드물며, Gillespie 등(10)은 하지정맥류 환자 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 MMP의 발현을 조사한 결과 MMP-1 및 -13의 발현이 원위부보다 근위부에서 증가되어 있는 것을 관찰하였다. 본 연구에서는 대조군의 Dodd 및 Boyd 관통정맥 부위의 정맥 절편에서 정맥 변성이 심한 경향이 관찰되었으나, 육안적으로 정맥류성 변화를 보이지 않은 대복재정맥에서 해부학적 위치에 따른 뚜렷한 차이는 관찰할 수 없었다.

현재 인체에서 28 종류의 MMP가 발견되고 있으며, 이들은 자연적 억제제인 TIMP와 더불어 복부대동맥류, 죽상동맥경화증, 하지정맥류 등의 혈관질환을 비롯하여 여러 종류의 질환과 관련되어 있는 것으로 알려지고 있으나, 아직 이들의 정확한 작용 기전은 밝혀져 있지 않다.(17-19) 하지정맥류의 발생 및 이와 관련된 MMP연구에서 Woodside 등(9)은 대조군보다 하지정맥류 환자군에서 MMP-9의 발현이

감소된 경향을 보였으나 결과의 변이가 커서 통계적 차이를 도출해 내지는 못했다고 보고하였다. 반면에 Kosugi 등(8)은 73명의 하지정맥류 환자에서 구득한 110개의 대복재정맥 절편과 85개의 정맥류 절편에서 대조군보다 MMP-9의 발현이 유의하게 많았음을 보고하였으며, 이러한 결과는 Nomura 등(20)의 연구에서도 동일하게 나타났다. 본 연구에서도 두 군 모두에서 MMP-9의 발현이 다른 효소들에 비하여 유의하게 높게 나타나 앞서 두 연구의 결과와 마찬가지로 하지정맥류의 정맥벽 변성에 MMP-9이 관여하는 것으로 추정된다. 여러 연구에서 하지정맥류 발생에 관여하는 MMP의 역할에 대하여 명확히 규명하지 못하는 것은 하지정맥류의 발생이 만성적이고도 지속적인 혈류역학적 자극과 함께 여러 가지 유전적, 환경적 요인이 복합적으로 작용하며, 또한 MMP 및 TIMP 연구에서 정상 대조군을 구하기에 애로점이 많아 비교적 고령의 환자에서 역류는 없으나 연령에 따른 정맥벽의 변성이 있는 정맥절편을 대조군으로 사용하였기 때문으로 여겨지고 있다.

본 연구는 하지정맥류 환자에서 구득한 정맥절편에서 정수압 스트레스가 하지정맥류의 발생에 미치는 영향을 알아보려고 하였으나 유의한 차이는 도출해 내지 못하였다. 그러나 인체에서 구득한 정맥절편을 이용하여 현재 하지정맥류와 관련이 있을 것으로 보고되고 있는 모든 종류의 MMP와 TIMP에 관한 연구를 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 분석을 시도했다는 점에서 의미가 있을 것으로 여겨지며, 또한 이러한 결과가 향후 연구를 위한 실험모델 구축에 있어서 기초적인 자료로 의미 있게 이용될 수 있을 것으로 여겨진다. 하지정맥류에 대한 수술 방법이 점차 비침습적으로 시행되고 있는 현 상황에서는 더 이상 인체에서 대규모 정맥절편을 구득하기가 어려울 것으로 생각되며, 따라서 향후 하지정맥류의 병태생리학적 기전을 밝히기 위한 연구 방법 구축에 있어서는 혈액 샘플에서 발현되는 초기 효소들에 대한 분석과 Sansilvestri-Morel 등(21,22)이 시행한 세포 배양을 통한 연구가 유용할 것으로 여겨진다. Bergan 등(23)은 정맥결찰 모델, 동정맥루 모델 등 정맥고혈압을 유발시키는 실험모델들을 고찰하면서 이러한 병태생리학적 기전을 이해하는 것이 만성정맥질환들의 진행을 효율적으로 지연시키거나 예방할 수 있고, 또한 이들의 원인 질환을 치료할 수 있는데 도움이 될 것이라고 하였다.

이상의 결과에서 일시적인 정수압 스트레스에 의해서 하지정맥류 정맥벽에서의 MMP 및 TIMP의 발현도 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 대조군 및 스트레스군 두 군 모두에

서 MMP-9의 발현도가 가장 높게 나타나 이 효소가 하지정맥류 발생에 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.

REFERENCES

- 1) Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg* 1994; 81:167-73.
- 2) Evans CJ, Fowkes FG, Ruckley CV, Lee AJ. Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:149-53.
- 3) Pascarella L, Schmid Schonbein GW. Causes of telangiectasias, reticular veins, and varicose veins. *Semin Vasc Surg* 2005;18:2-4.
- 4) Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res* 2007;141:311-6.
- 5) Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 2006;259:381-92.
- 6) Parra JR, Cambria RA, Hower CD, Dassow MS, Freischlag JA, Seabrook GR, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg* 1998;28:669-75.
- 7) Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000;192:105-12.
- 8) Kosugi I, Urayama H, Kasashima F, Ohtake H, Watanabe Y. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2003;17:234-8.
- 9) Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA, et al. Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg* 2003; 38:162-9.
- 10) Gillespie DL, Patel A, Fileta B, Chang A, Barnes S, Flagg A, et al. Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J Surg Res* 2002;106:233-8.
- 11) Jacob MP, Cazaubon M, Scemama A, Prie D, Blanchet F, Guillin MC, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation* 2002; 106:535-8.
- 12) Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, Ito K, Akasaka Y, Masuda T, et al. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Arch* 2000;437:138-48.
- 13) Patterson MA, Leville CD, Hower CD, Jean-Claude JM, Seabrook GR, Towne JB, et al. Shear force regulates matrix metalloproteinase activity in human saphenous vein organ culture. *J Surg Res* 2001;95:67-72.

- 14) Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 2004;109:1041-7.
- 15) Pascarella L, Schmid-Schonbein GW, Bergan J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. *J Vasc Surg* 2005;41:303-11.
- 16) Berceli SA, Jiang Z, Klingman NV, Schultz GS, Ozaki CK. Early differential MMP-2 and -9 dynamics during flow-induced arterial and vein graft adaptations. *J Surg Res* 2006;134:327-34.
- 17) Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
- 18) Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:2-13.
- 19) Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;75:346-59.
- 20) Nomura S, Yoshimura K, Akiyama N, Mikamo A, Furutani A, Aoki H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce matrix metalloproteinase-9 activity in human varicose veins. *Eur Surg Res* 2005;37:370-8.
- 21) Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, et al. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res* 2001;38:560-8.
- 22) Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jaisson S, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells. *Circulation* 2002;106:479-83.
- 23) Bergan JJ, Pascarella L, Schmid-Schonbein GW. Pathogenesis of primary chronic venous disease: Insights from animal models of venous hypertension. *J Vasc Surg* 2008;47:183-92.