

## 하지정맥류 환자 및 정상인에서 대복재정맥의 기질 금속단백분해효소 및 금속단백분해효소-조직억제제의 발현도 분석

경북대학교 의학전문대학원 외과학교실, <sup>1</sup>포항성모병원 외과, <sup>2</sup>서울대학교 의과대학 외과학교실

허 승 · 최향희<sup>1</sup> · 김형기 · 김상준<sup>2</sup>

### The Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Wall of Great Saphenous Vein in Patients with Varicose Veins

Seung Huh, M.D., Hyang Hee Choi, M.D.<sup>1</sup>, Hyung-kee Kim, M.D., Sang Joon Kim, M.D.<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Surgery, Pohang St. Mary's Hospital, Pohang, <sup>2</sup>Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Although varicose veins are very common in adults, the mechanism of the disease has not been established. Degradation of the extracellular matrix is regulated by various matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs). This study was performed to analyse the relationship between venous wall degeneration and expression of these matrix proteinases.

**Methods:** Twelve great saphenous vein (GSV) segments from 7 patients without varicose veins (control) and 86 GSV segments from 18 patients (22 limbs) with varicose veins (C<sub>2,4,5</sub>E<sub>P</sub>A<sub>S</sub>P<sub>R</sub>) were used for this study. Light microscopic examination was used in the evaluation of vein wall degeneration, immunohistochemistry and Western blotting for the expression of MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9 and MMP-13) and TIMPs (TIMP-1 and TIMP-2), and zymography for gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 were performed.

**Results:** MMP-9 was more strongly expressed in the vein wall of both control and patient groups, especially in the endothelial cells and medial muscle layers and TIMP-2 followed. The expression of MMP-9 was closely related to the degree of venous wall degeneration. Activated MMP-2 and MMP-9 were observed in both groups and expressed more in the proximal GSV of the patients. In the Western blotting, the expression of MMP-9 and TIMP-1 were significantly higher than other MMPs and TIMP-2 in the patients with varicose veins.

**Conclusion:** MMP-9 is much more expressed in the wall of degenerative veins. This matrix-degrading enzyme may play an important role in the degeneration of venous wall followed by its remodeling. (J Korean Surg Soc 2010;79:S16-25)

**Key Words:** Varicose veins, Matrix metalloproteinase, Tissue inhibitor of metalloproteinase

중심 단어: 하지정맥류, 기질 금속단백분해효소, 금속단백분해효소 조직억제제

책임저자: 허 승, 대구시 중구 동덕로 200  
☎ 700-721, 경북대학교병원 외과  
Tel: 053-420-6520, 5605, Fax: 053-421-0510  
E-mail: shuh@knu.ac.kr

접수일 : 2010년 5월 27일, 게재승인일 : 2010년 9월 28일  
본 논문의 요지는 2008년 제60차 대한외과학회 추계 통합학술대  
회에서 발표되었음.

## 서 론

하지정맥류의 발생은 정맥판막의 기능부전 또는 정맥벽  
의 선천적인 이상 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 왔으  
나, 최근의 연구들은 이들 외에도 여러 가지 복합적인 요인

에 따른 정맥벽의 변성이 이 질환과 관련이 있는 것으로 보고하고 있다.(1-3) 이러한 혈관벽의 조성 변화에는 세포 외 기질대사에 관여하는 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 이 효소의 조직억제제(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(4)

Parra 등(5)이 하지정맥류 환자의 서혜부 대복재정맥-대퇴정맥 접합부(saphenofemoral junction, SFJ)에서 구득된 정맥절편에서 MMP와 TIMP의 발현을 조사한 이후 이들과 하지정맥류와의 관계에 대한 여러 연구들이 있었으나 연구방법의 차이로 인하여 아직까지 통일된 결과를 나타내지는 못하고 있다.(6-10) 또한 이제까지 인체에서 구득된 정맥절편은 주로 SFJ에 근접한 근위부 대복재정맥에 얻어진 것으로 하지정맥류가 주로 많이 발생하는 무릎 직하부의 Boyd 관통정맥 부위나 정맥혈의 역류 시 중요한 통로로 작용하는 대퇴부 대복재정맥의 다른 해부학적 위치에서 구득된 정맥절편을 사용한 예는 찾아보기 힘들다.

이에 저자 등은 하지정맥류 환자의 대퇴부 대복재정맥의 해부학적 위치에 따른 MMP와 TIMP의 발현도를 조사해 보고자 하였으며, 또한 이들의 결과를 역류가 없는 대복재정맥에서의 발현도와 비교하고자 하였다.

## 방 법

본원에서 일차성 하지정맥류로 수술 받은 18명(22하지)의 환자군에서 구득한 86개의 정맥절편(proximal 22, Hunter 22, Dodd 21, Boyd 21)과 대조군으로 혈관우회술을 시행받은 7명의 환자에서 구득한 12개의 정맥절편(proximal 6, Dodd 3, Boyd 3)을 가지고 연구를 시행하였다.

하지정맥류 환자군은 남자 10명(12하지), 여자 8명(10하지)으로 평균연령은 55.7세였고, 대조군은 남자 6명, 여자 1명으로 평균연령은 66.6세였다. 하지정맥류 환자군을 만성 하지정맥부전증의 임상적 분류법인 CEAP 분류법으로 구분해 보면 임상적(clinical, C) 분류에서 C2 (varicose vein) 12하지, C4 (hyperpigmentation, dermatitis) 7하지, C5 (healed venous ulceration) 3하지였다. 원인적(etiology, E), 해부학적(anatomy, A), 병태생리학적(pathophysiology, P) 분류에서는 모두 일차성이며, 표재정맥에 국한되고, 정맥혈의 역류에 의한 E<sub>p</sub>, A<sub>s</sub>, P<sub>R</sub>로 분류되었다. 이들 중 육안적으로 대퇴부 대복재정맥 주간부가 구불구불하게 정맥류성 변화를 보인 예는 6하지에서 있었다(Table 1). 대조군 중 동맥우회술을

**Table 1.** Comparison between the clinical category and the number of severely dilated venous valves of the patients with varicose veins (n=22 limbs)

Category	No. of dilated venous valve				
	Proximal	Hunter	Dodd	Boyd	Total
CEAP*					
C2 (n=12)	2	5	6	5	18
C4 (n=7)	2	5	6	4	17
C5 (n=3)	0	1	2	1	4
Truncal varicosity					
(-) (n=16)	4	6	9	7	26
(+) (n=6)	0	5	5	3	13
Total	4	11	14	11	39

\*CEAP (C = clinical; E = etiological; A = anatomical; P = pathophysiological), represented by an ad hoc committee of the American Venous Forum, 1994.

시행 받은 5명은 죽상경화성 동맥폐색증 환자 4명, 외상에 의한 동맥폐색증 환자 1명이었으며, 그 외 만성 간질환으로 생체간이식술을 시행 받은 1명, 반대측 하지의 만성 하지정맥부전증으로 정맥우회술을 시행 받은 1명이었다.

수술 전 이중주사초음파검사로 환자군의 대복재정맥 전장에 걸쳐 역류를 확인하였으며, 마찬가지로 대조군 대복재정맥에 역류가 없는 것을 확인하였다. 환자군은 수술 중 대복재정맥을 함입받거술 후 또는 각각의 해부학적 부위를 직접 박리하여 정맥절편을 구득하였고, 대조군은 혈관우회술 전에 박리된 대복재정맥으로부터 정맥절편을 구득하였다. 이들을 광학현미경검사 및 면역조직화학검사를 위하여 정맥관막이 존재하는 근위부 및 주요 관통정맥 분지부를 0.5 cm 정도 분리하여 10% 포르말린에 고정된 뒤 파라핀블록을 만들어 보존하였고, 주요 관통정맥 분지부 이하의 정맥절편 3~5 cm 가량을 각각 표기한 후 액화질소에 얼리고 영하 70°C의 초저온냉동기에 보존하였다. 냉동된 정맥절편은 zymography 및 웨스턴블롯시험을 위하여 단백질을 분리하여 보존하였다. 대조군의 경우 근위부 또는 원위부 정맥절편을 1~2 cm 가량 구득하여 환자군과 마찬가지로 0.1 cm 정도는 분리하여 파라핀블록을 만들고 나머지는 초저온냉동기에 보존하였다.

정맥벽의 변성, 아교질 침착, 탄력소층 등을 보기 위하여 hematoxylin & eosin 염색, Masson's trichrome 염색, Verhoeff's elastic fiber 염색 등을 시행하였고, MMP-1, -2, -9, -13 그리고 TIMP-1, -2에 대하여 면역조직화학검사를 이전의 연구와 동일한 방법으로 시행하였으며, 광학현미경검사 및 면

역조직화화검사의 반정량적 분석 또한 이전의 분석방법을 사용하였다.(11) 단백질 추출, zymography, 웨스턴블롯시험 등의 방법은 다음과 같다.

### 1) 단백질 추출

영하 70°C의 초저온냉동기에 동결 보관되어 있던 정맥절편을 액체질소를 소량씩 넣으며 막자사발로 분쇄하여 분말로 만들었다. 각각의 조직표본에서 80 mg을 취하여 400  $\mu$ L의 protein extraction buffer (Tris-HCL 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, 0.05% Brij-35 (detergent), PMSF (cystein protease inhibitor) 2 mmol/L, 0.02% NaNO<sub>3</sub>, 2% DMSO)를 넣어 균질화하였다. 균질화된 조직을 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리를 시행한 후 상층액을 회수하였다. 추출된 단백질의 농도는 protein assay kit (BCA method, Pierce, USA)를 이용한 ELISA reader기로 측정하여 zymography와 Western blotting을 시행하였다.

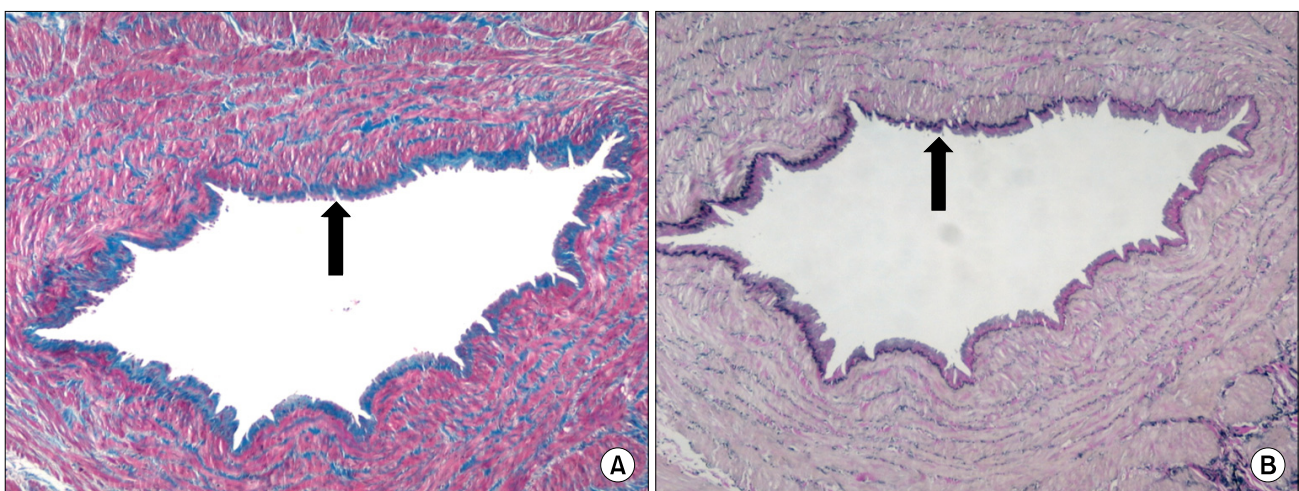
### 2) Zymography

환자군과 대조군의 MMP 및 TIMP의 젤라틴 용해활성도 (gelatinolytic activity)를 확인하고자 각각의 정맥절편에 대한 zymography를 시행하였다. 실험에 앞서 각각의 절편에 대한 단백질 정량과정으로 균일한 양의 단백질을 계산하여 실험에 이용하였다. Gelatin zymogram gel (ELPIS BIOTECH, 10% Tris-glycine gel with 0.1% gelatin)에 추출물과 Tris-Glycine zymo sample buffer (2 $\times$ , bio-rad) 동일 양을 섞은 각

각의 검체를 각 라인마다 투여하고 130 V의 일정한 전압으로 running buffer (Tris Base 29 g, Glycine 144 g, SDS 10 g, distilled water to 1 L)를 더하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel을 renaturing buffer (Triton X-100, 25% (V/V) in water)에 담가 상온에서 30분간 방치한 후 renaturing buffer를 버리고 zymogram developing buffer (Tris Base 12.1 g, Tris HCL 63.0 g, NaCl 117 g, CaCl<sub>2</sub> 7.4 g, Brij 35 0.2% (w/v), distilled water to 1 L)로 갈아주었다. 상온에서 30분간 zymogram developing buffer로 평형 상태를 유지시킨 후 다시 새로운 developing buffer로 갈아준 후 37°C에서 24~48시간 동안 배양하였다. 이후 0.5% Coomassie blue R-250으로 30분간 염색하고 MMP-2, MMP-9에 해당되는 66 kD, 86 kD의 밴드를 찾아서 정맥절편 각 부위에 해당되는 이들의 활성도를 Chemi imager 5500 (Alpha Innotech Co., USA)을 이용하여 계산하고 상대적 비로써 비교 분석하였다.

### 3) 웨스턴블롯검사

앞서 준비한 추출물을 5 $\times$  SDS sample buffer (Biosesang Inc., Seongnam, Korea)에 4분간 가열한 후 각각의 단백질 농도를 protein assay kit (BCA method)를 이용하여 ELISA reader기로 분석하였다. 한 라인에 각각의 항체마다 동일량(15~20  $\mu$ g)의 단백질을 더하여 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) vertical slab mini-gels에서 분리한 다음 Semi-Dry transfer (bio-rad)를 이용하여 50분간 15 V의 전압에서 nitrocellulose membrane fil-



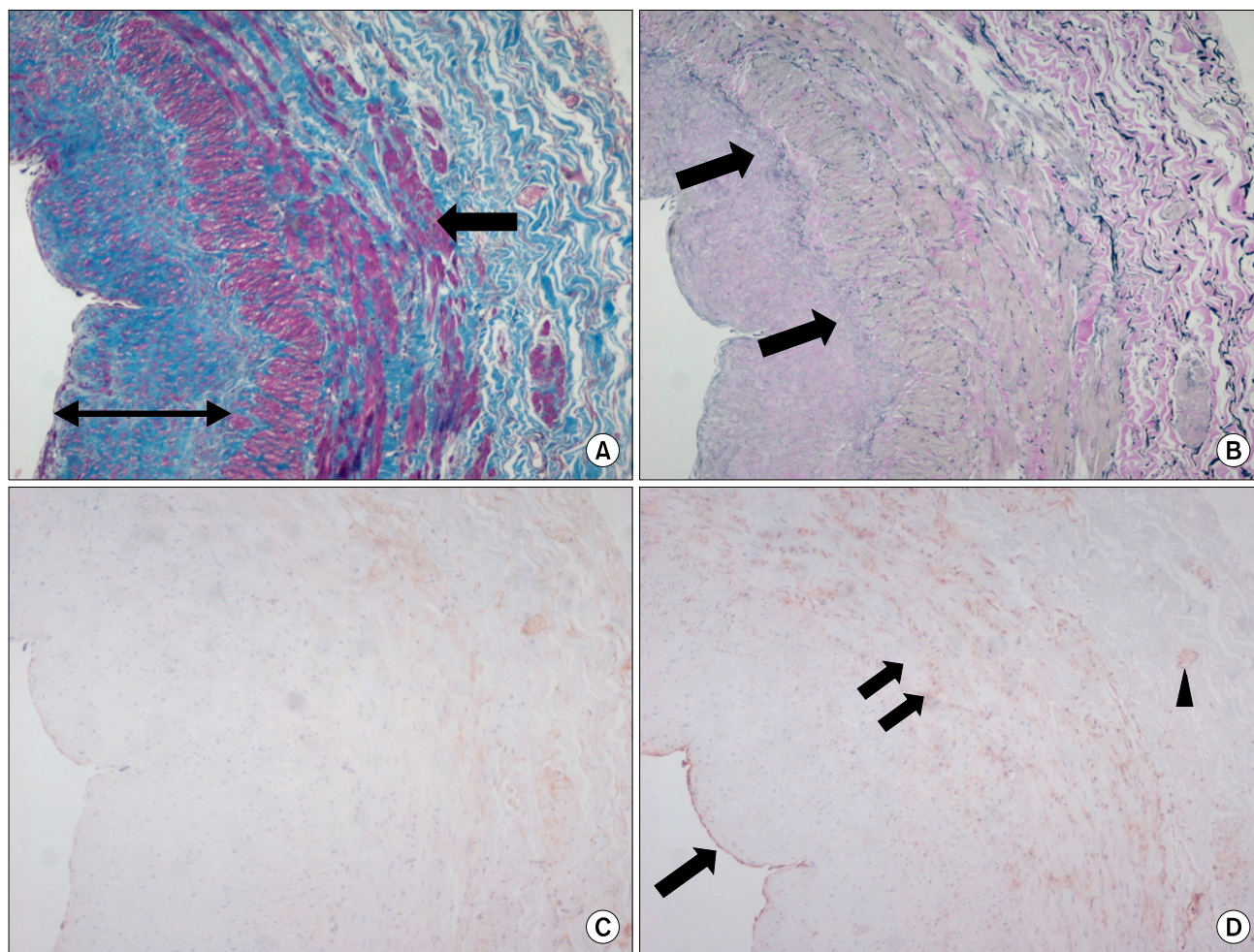
**Fig. 1.** These photos show histological findings of the proximal segment of the great saphenous vein without axial reflux obtained from a 49-year-old male (control) who underwent living-related liver transplantation. The intimal (black arrow) and medial muscle layers are relatively well preserved (A) (Masson's trichrome stain,  $\times 100$ ). Also the internal elastic lamina (black arrow) and black-colored elastin fibers in medial muscle layers are not disrupted (B) (Verhoff's elastic fiber stain,  $\times 100$ ).



ter로 이동시켰다. 단백질을 이동시킨 후 흡착지를 1× TBST (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% Tween20, pH 7.5)로 3회 수세한 후 비특이적인 항원-항체 복합반응을 방지하기 위하여 membrane을 5% non-fat dry milk (casein)가 포함된 TBST에 희석된 blocking buffer에 넣고 상온에서 1~2시간 동안 반응시켰다. 다음으로 일차항체를 각각의 비율 (1 : 1,000 [anti-MMP-1, anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-MMP-13, anti-TIMP-1], 1 : 500 [anti-TIMP-2])로 TBST에 희석하고,  $\beta$ -actin 항체는 1 : 10,000으로 TBST에 희석하여 4°C에서 밤새 반응(shaker-incubation) 시켰다. 수세 후 이차항체로 HRP (horseradish peroxidase)-conjugated mouse (or

rabbit) IgG antibody를 1 : 5,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분간 3회 세척한 후 면역학적 활성대를 확인하기 위하여 Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham, USA)을 이용하여 membrane을 기질용액에 30초간 배양하고 X-ray 필름에 2분간 감광시켰다. 감광시킨 필름을 scan 후 Scion Image를 이용하여 각각의 시료에 대한 정량적 밀도분석(densitometric analysis)을 시행하고 각각의 시료의 발현도를  $\beta$ -actin의 발현도와의 비로써 정량하였다.

환자군 및 대조군 모두 본원 임상시험 윤리위원회의 인가를 얻은 연구방법에 따라 서면 동의를 받은 후 임상 자료를 수집하고 정맥절편을 구득하였다. 통계처리는 SPSS 14.0



**Fig. 2.** These photos show histochemical findings of the proximal segment of diseased saphenous vein obtained from a 57-year-old male with varicose vein. There are abundant intimal hyperplasia (black arrow,  $\leftrightarrow$ ) and disorganized mid and outer medial muscle layers (black arrow,  $\leftarrow$ ) with increased blue-colored collagen fibers and fibrosis (A) (Masson's trichrome stain,  $\times 100$ ). Also the internal elastic lamina is disrupted (black arrow) and black-colored degenerative elastin fibers in medial muscle layers are fragmented (B) (Verhoff's elastic fiber stain,  $\times 100$ ). The matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) is not expressed (C) ( $\times 100$ ), whereas MMP-9 is strongly expressed (brown color) through endothelial cells (single black arrow), mid-outer medial muscle layers (double black arrows) and vasavasorum (black arrow head) (D) ( $\times 100$ ).

프로그램을 사용하였으며 각 군간의 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.

## 결 과

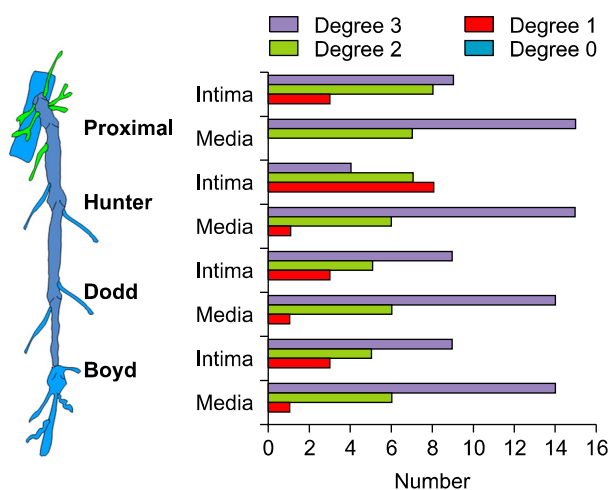
### 1) 광학현미경검사

역류가 없었던 대조군의 기본염색 결과 비교적 내막의 증식이 없고, 탄력소층이 잘 유지되며, 중막의 변성이 적은 경우도 있었으나(Fig. 1), 반 수 이상에서 내막의 국소적 비대, 탄력소층의 분절화, 중막 근육층 내로의 아교질 침착 등 하지정맥류 환자에서 관찰되는 조직학적 변성을 보이는 경우도 있었다. 2명의 70세 이상 고령 환자에서는 중등도 이

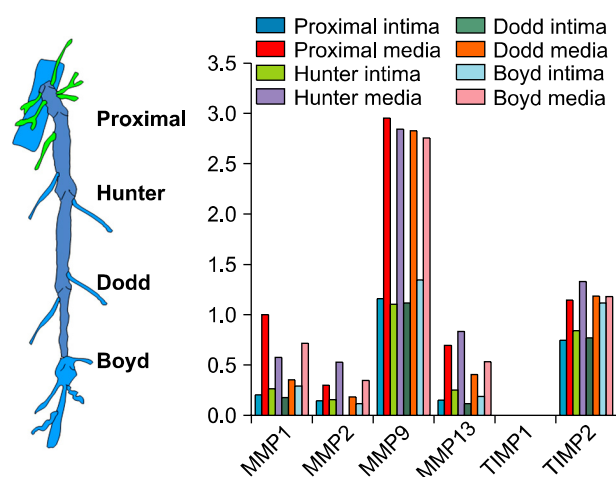
상의 변성이 관찰되었다.

섬유화 및 아교질 침착의 정도에 따른 변성도 분석에서 환자군의 거의 모든 예에서 내막과 중막의 변성이 관찰되었으며(Fig. 2A, B), 대조군에 비하여 유의하게 높은 수치를 나타내었다. 환자군에서 내막보다 중막 평활근층의 변성도가 유의하게 높은 것으로 관찰되었으나(Fig. 3), 연령, 정맥 절편의 위치, 정맥류성 변화에 따른 차이 등은 관찰되지 않았다.

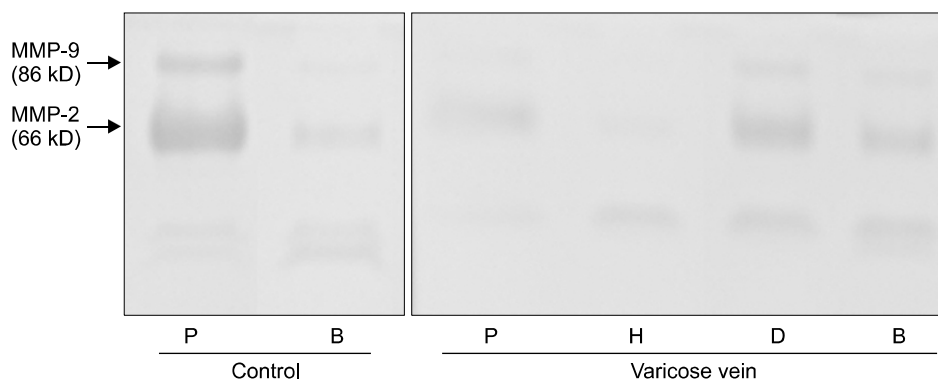
대조군과 환자군의 정맥절편에서 정맥관막의 형태 및 두터워진 정도를 관찰한 결과 환자군에서 변성의 정도가 대조군에 비하여 높은 경향을 보였으나, 두 군 모두에서 경미한 정도의 변성이 관찰되었고 관막 주위로의 염증세포 침윤 소견은 관찰되지 않았다. 관막첨판(valve leaflet) 부착부



**Fig. 3.** Degree of degeneration in vein wall according to sites and layers of patients with varicose veins. The changes of medial layers are more prominent than intimal layers regardless of the sites of vein segments ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** The degree of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) according to the sites and the layers of the patients with varicose veins. The expression of MMP-9 is much higher than other MMPs and TIMPs regardless of the sites of vein segments ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 5.** This photo shows zymographic activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in control and varicose veins. P = Proximal; H = Hunter; D = Dodd; B = Boyd.

에서는 특징적으로 내막 및 내측 세로평활근층(inner longitudinal muscle)의 비후가 두 군 모두에서 관찰되었다.

## 2) 면역조직화학검사

MMP 및 TIMP의 발현도를 조사한 결과 대조군 및 환자군 모두에서 MMP-9의 발현이 유의하게 가장 광범위하고 강하게 나타났으며, TIMP-2가 다음으로 유의하게 발현도가 높았다. TIMP-1은 대조군에서 약하게 발현되었을 뿐 환자군에서는 전 슬라이드에서 발현되지 않았으며, MMP-1, MMP-2, MMP-13의 발현도에는 차이가 없었다(Fig. 2C, D, 4). 혈관내피세포, 정맥벽혈관을 포함한 정맥벽 전층에 가장 강하게 발현된 MMP-9은 내막에 상대적으로 약하게 발현되었으며, 대복재정맥의 위치에 따른 발현도의 차이는 없었으나, 정맥벽의 변성도가 높을수록 유의하게 강하게 발현되었다(Fig. 4).

## 3) Zymography

젤라틴분해능을 알아보기 위한 zymography 결과 MMP-2와 MMP-9의 밴드가 환자군 및 대조군에서 다양하게 발현되었으며(Fig. 5), 전체적으로 대조군의 활성도가 환자군에

비하여 높게 측정되었다. MMP-2와 MMP-9의 상대적 발현도 수치에서는 MMP-2가 MMP-9에 비하여 높게 관찰되었다(Table 2). 환자군에서는 MMP-2 및 MMP-9의 활성도가 연령, 변성도 등에서는 차이를 보이지 않았으나, 대복재정맥의 근위부 및 Boyd 관통정맥 부위에서 다른 부위에 비하여 강하게 발현되는 경향을 보였다. MMP-2 및 MMP-9 모두 근위부 정맥절편에서 유의하게 높게 발현되는 것으로 분석되었다(Table 2).

## 4) 웨스턴블롯검사

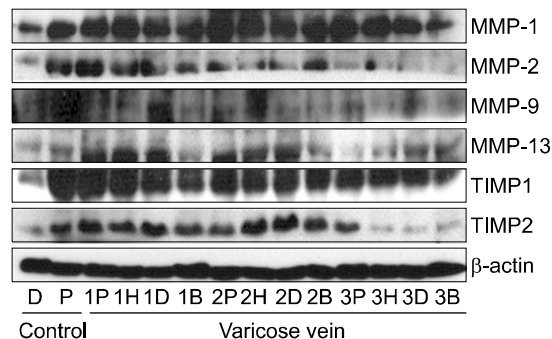
단백질 정량을 위한 웨스턴블롯검사에서 대조군 및 환자군 모두에서 다양하게 정량되었다(Fig. 6). 대조군 및 환자군 비교에서 MMP-1이 환자군에서 대조군에 비하여 높은 수치를 나타내었으나, 그 외 MMPs 및 TIMPs에서는 대조군에서 높은 발현양을 나타내었다. MMP-13과 TIMP-2에서는 유의한 차이를 보였으나, 그 외 MMPs 및 TIMPs에서는 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

환자군을 따로 분석하였을 때 MMP-9이 TIMP-1을 제외한 MMP-1, -2, -13 및 TIMP-2에 비하여 유의하게 높은 수준으

**Table 2.** The zymographic activities of the controls and the patients

	Degree of activity (mean)	
	MMP-2*	MMP-9
Control (n=5)	16.37±9.68	18.17±14.91
Patient (n=57)	7.22±7.08	5.26±5.22
Proximal (n=16)	10.18±8.99 <sup>†</sup>	7.28±5.73*
Hunter (n=13)	4.17±2.46	3.33±2.36
Dodd (n=13)	5.06±2.56	3.59±1.90
Boyd (n=15)	8.59±8.85	6.22±7.37

\*MMP = matrix metalloproteinases; <sup>†</sup>The activities of proximal site are higher than those of Hunter and Dodd sites (P<0.05).



**Fig. 6.** This photo shows Western blotting expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, MMP-9, MMP-13, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 protein in control and varicose veins. P = proximal; H = Hunter; D = Dodd; B = Boyd.

**Table 3.** The results of Western blotting in the patients with varicose veins

Site	MMP*-1	MMP-2	MMP-9	MMP-13	TIMP <sup>†</sup> -1	TIMP-2
Proximal (n=13)	0.37±0.38	0.26±0.18	0.39±0.27	0.20±0.10	0.28±0.20	0.30±0.31
Hunter (n=13)	0.29±0.28	0.32±0.65	0.49±0.40	0.23±0.17	0.38±0.22	0.20±0.16
Dodd (n=12)	0.36±0.36	0.39±0.60	0.57±0.47 <sup>†</sup>	0.23±0.17	0.31±0.23	0.16±0.08
Boyd (n=12)	0.31±0.30	0.33±0.46	0.25±0.18 <sup>†</sup>	0.16±0.10	0.26±0.15	0.13±0.08
Total (n=50) <sup>§</sup>	0.33±0.32	0.32±0.49	0.43±0.36	0.20±0.14	0.3±0.20	0.20±0.19

\*MMP = matrix metalloproteinases; <sup>†</sup>TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinase; <sup>†</sup>P =0.045; <sup>§</sup>The total amounts of MMP-9 and TIMP-1 are more than those of other MMPs and TIMP-2 (P<0.05).

로 발현되었다(Table 3). 정맥절편의 해부학적 위치, 변성도에 대한 발현양 조사에서 MMP-9은 해부학적 위치에서 Dodd 관통정맥 부위가 Boyd 관통정맥 부위에 비하여 유의하게 높은 발현양을 보였으며, TIMP-1은 변성도 3에서 발현양이 유의하게 증가된 것으로 나타났다. CEAP 분류에 따른 MMP-2와 TIMP-2는 C5에서 유의하게 높은 발현양을 나타내었고, TIMP-2는 C4-5에서 C2에 비하여 높은 발현양을 나타내었다. MMP-9은 C2에서 발현양이 가장 높았으나 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다. 육안적으로 정맥절편이 변형된 정도에 따른 조사에서는 TIMP-1의 발현양이 구불 구불한 정맥절편에서 유의하게 높게 관찰되었다.

## 고 찰

젊은 연령층의 정상 대복재정맥의 정맥벽 구조는 혈관내 피세포를 포함하는 내막, 세층의 평활근세포들로 이루어진 중막, 맥관벽혈관을 포함하는 외막의 형태를 가지고 있다.(12) 내막의 외층은 비교적 균일한 탄력소층으로 둘러싸여 있으며, 군데군데 이들 탄력소층은 분절화된 양상을 보일 수 있다. 본 연구에서도 하지정맥류 환자 및 일부 대조군의 정맥절편에서 탄력소층의 분절 및 변성이 광범위하게 관찰되었으며, 이러한 변성은 곧 정맥벽의 탄력도 감소와 밀접한 관련이 있을 것으로 여겨진다. 주로 아교질의 침착과 조직의 섬유화로 인하여 발생하는 내막의 변성은 국소적으로 발생할 수 있으며, 따라서 정상적인 내막과 변성되어 두터워진 내막이 동시에 관찰될 수 있다.(13) 세층의 평활근세포들 중 내층과 외층은 정맥의 축에 평행하게 세로로 배열되어 있으며, 중층은 가로로 배열되어 있다. 비교적 균일하게 배열되어 있는 이들 중막의 근육층들은 연령의 증가, 정맥내강의 혈류역학적 자극 등에 의하여 섬유화되고 세포외 기질의 침착이 증가되어 점점 세포의 배열이 불규칙해지며, 정상적인 형태를 소실하게 된다.(14,15) 이러한 변화는 본 연구에서도 관찰되었으며, 특히 고령 환자들의 역류가 없는 대복재정맥에서도 정맥벽 변성이 관찰됨을 알 수 있었다.

하지정맥류에서 관찰되는 평활근세포층 내 아교질 침착의 증가는 주로 1형 아교질의 증가에 의한 것으로 알려져 있고, 정맥벽의 확장능에 관여하는 3형 아교질의 경우에는 오히려 감소하는 것으로 보고되고 있는데, 이러한 1형 및 3형 아교질의 불균형이 정맥벽의 약화와 탄성도 감소에 기여하는 것으로 여겨지고 있다.(16-19) 본 연구에서는 이러

한 점에 착안하여 정맥벽 각 층의 아교질 침착 및 섬유화에 따라 각각의 변성도를 반정량적으로 계량화하여 그 차이를 보고자 하였다. 비록 반정량화에 따른 결과 산출의 오류가 있을 수 있으나, 이러한 방법으로 정맥벽 각 층에 대한 변성의 형태를 크게 구분할 수 있었다는 점에서 의의가 있다고 하겠다. 내막 및 중막 중층의 변성도는 거의 전 슬라이드에서 측정 가능하였으나, 중막 내층 및 외층의 경우에는 슬라이드에 따라 배열이 불규칙하여 관찰 및 측정이 불가능한 경우가 있었다. 이런 경우에는 이로 인한 오류가 발생할 수 있어서 비교적 분명하게 이들 평활근세포들이 관찰되는 부위의 변성도를 측정하여 오류를 줄이고자 하였다. 외막의 경우에는 분포가 불규칙하고 세포들의 밀도가 조밀하지 않아서 아교질 침착에 따른 변성도를 구분하는 것이 어려워 이 연구에서는 변성도 조사 대상에서 제외하였다.

면역조직화학검사에서 Parra 등(5)은 MMP-9의 발현이 환자군이나 대조군에서 단지 외막에 국한되어 경미하게 나타났다고 보고하였고, Woodside 등(9)은 하지정맥류의 형태학적 특성을 연구한 보고에서 MMP-1은 정맥의 외막을 제외한 전층에서 대조군보다 광범위하게 발현되었으며, MMP-2는 발현되지 않았고, MMP-9의 경우에는 대조군 및 환자군 모두에서 정맥벽의 전층에 걸쳐서 발현되었으나, 중막의 평활근세포층에서 보다 강하게 발현되었음을 보고하였다. 이들의 연구에서 TIMP-1 및 TIMP-2는 전혀 발현되지 않았다. 또한 Sansilvestri-Morel 등(20)은 MMP-1 및 MMP-2는 환자군에서 보다 강하게 내막과 중막에서 발현되었고, TIMP-1은 중막 및 내막에서, TIMP-2는 중막에서만 발현되었으며, 대조군의 경우에는 TIMP-1 및 TIMP-2 모두 내막 및 중막에서 발현되었으나, TIMP-1은 환자군보다 약하게, TIMP-2는 환자군보다 강하게 발현되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 MMP-9이 정맥벽 전층에서 비교적 강하게 발현되었으나, 상대적으로 내막에서의 MMP-9의 발현이 낮음을 알 수 있었다. TIMP-1은 전혀 발현되지 않았다. 이러한 차이점에 대해서 아직 그 이유가 밝혀진 바 없으며, 검사방법의 차이 및 육안적 결과 해석에 따른 것으로 여겨진다. 다만 본 연구의 결과에서도 나타난 것처럼 하지정맥류 및 대복재정맥의 역류 유무와 관계없이 정맥벽의 변성이 다양하게 관찰되고 있어서 정맥벽의 변성 정도에 따라 아직 그 기전이 명확히 밝혀져 있지 않은 각각의 MMP와 TIMP의 발현도가 달라질 수 있을 것으로 생각된다.

젤라틴분해능을 보기 위한 zymography와 각 효소들의 정량적 분석을 위한 웨스턴블롯검사는 MMP 및 TIMP 연구에



있어서 가장 많이 시행되고 있는 실험방법들이다. 이전의 결과들을 보면 Parra 등(5)은 MMP-2와 MMP-9에 해당하는 것으로 여겨지는 66 kD과 96 kD의 밴드가 zymography에서 뚜렷이 나타나는 것을 관찰하였고, 이들의 발현은 환자군이나 대조군에서 차이가 없음을 보고하였다. Woodside 등(9)은 웨스턴블롯검사에서 환자군 및 대조군 모두에서 MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12의 발현을 관찰하였고, zymography에서 MMP-2, MMP-9, MMP-12의 활성을 관찰하였다. 이들의 연구에서 TIMP-1과 TIMP-2의 발현은 환자군 및 대조군 모두에서 다른 효소들에 비하여 낮은 수준의 발현을 보였으며, MMP-9 및 MMP-12의 발현이 대조군에서 환자군보다 높음을 보고하였다. 그러나 이들은 실험에 사용된 정맥조직의 다양성으로 인하여 이러한 연구 결과들에 통계적 의미를 부여하는데 대한 한계점을 지적하였으며, 실제 이전의 많은 연구들에서 면역조직화학검사 결과와 zymography 및 웨스턴블롯검사 결과가 동일하지 않음을 알 수 있다. 본 연구에서는 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 형태인 66 kD과 86 kD에 해당하는 밴드가 zymography에서 발현되었다. 대조군에서 환자군보다 높게 발현되었으며, MMP-2가 MMP-9에 비하여 활성도가 높았다. 그러나 대조군의 수가 적고 각각 정맥절편의 결과들 중 95%의 신뢰구간을 벗어나는 수치를 보인 경우가 적지 않아서 이에 대해 통계적 유의성을 부여하기는 어려울 것으로 생각된다. 단지 MMP-2 및 MMP-9의 발현도가 근위부에서 통계적으로 유의하게 높았는데, 이러한 결과의 원인 분석을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 웨스턴블롯검사의 경우 MMP-9이 유의하게 많은 발현양을 나타내어 면역조직화학검사의 결과와 일치함을 보여주었으나, 면역조직화학검사에서는 발현되지 않았던 TIMP-1의 발현양이 상대적으로 높게 나타나 이 두 검사의 결과가 항상 일치하지 않음을 알 수 있었다. 이전의 여러 연구방법과 동일한 방법으로 반복적인 실험을 시행했음에도 불구하고 이러한 차이가 발생한 것은 연구방법의 오류 및 연구에 사용된 항체의 민감도 차이 등에 기인하는 것으로 여겨지나 정확한 이유는 분명하지 않다. MMP-9의 경우 Dodd 관통정맥 부위에서 Boyd 관통정맥 부위보다 높게 발현되었고, 또한 CEAP 분류에서 C2에서 보다 높은 발현양이 관찰되었다. 반면에 TIMP-1의 경우에는 비교적 임상양상이 진행된 C4-5에서 발현양이 높았으며, 또한 육안적으로 구불구불한 정맥에서 발현양이 증가된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 하지정맥류의 진행 정도 및 해부학적 스트레스에 따라 작용하는 효소들이

다를 수 있음을 시사하지만 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이전까지 하지정맥류 환자군 및 정상 대조군의 비교연구에 사용된 정맥조직을 보면, 환자군에서 구득된 정맥절편은 서혜부의 근위부 대복재정맥이나 무릎 직하방의 Boyd 관통정맥 부위의 정맥절편을 사용하였고, 대조군의 정맥절편은 하지동맥 폐색증으로 인한 동맥우회술이나 관상동맥 우회술 시 사용되는 대복재정맥에서 구득된 정맥절편을 사용하였다.(5,7,9) 또한 15명의 환자군에서 30개의 정맥절편을 얻은 Gillespie 등(7)의 연구와 Kosugi 등(8)의 연구를 제외하고는 최대 13개의 정맥절편을 사용하여 연구를 시행하였으며, 정상 대조군의 정맥절편의 개수는 이보다 적은 수였다. 이러한 연구들에서 사용된 정상 대조군의 정맥절편은 젊은 연령층에서 얻어진 정상 정맥절편과는 차이가 있을 것으로 여겨진다. 본 연구에서도 나타난 바와 같이 역류가 없는 대복재정맥에서도 대조군의 연령 및 동반질환에 따라 정맥벽의 변성이 있을 것으로 여겨지며, 이러한 사실이 이전의 여러 연구들의 결과가 상이한데 대한 이유를 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 정맥절편의 다양성을 고려하면 통계적인 분석을 하기에는 표본의 수가 너무 적은 것으로 생각되며, 이러한 관점에서 본 연구에서 사용된 대조군 및 하지정맥류 환자 25명에서 구득된 총 98개의 정맥절편은 비교적 많은 수의 표본이라 할 수 있겠다.

젤라틴분해효소로 알려진 MMP-2와 MMP-9는 복부대동맥류, 고혈압, 하지정맥류 등의 혈관질환에서 그 작용이 가장 많이 알려져 있다.(4) 이들의 활성화 과정에서 proMMP-2는 세포 표면에 존재하는 막형 MMP인 MMP-14에 의해 MMP-2로 활성화되는데, 이 과정에 TIMP-2가 복합적으로 작용하며, proMMP-9의 경우에는 세포표면에서  $\alpha 2$ -integrin과 결합하거나 단독으로 MMP-9로 활성화되는데 이에는 플라스민이 관여하게 된다.(21) 본 연구에서 대조군 및 환자군 모두에서 가장 강하게 발현된 MMP-9은 MMP-2와 더불어 동맥우회술이나 동정맥루 형성을 이용한 인위적인 정맥 고혈압 상태에서 초기의 정맥벽 변성이나 정맥판막 변성에 작용하는 것으로 보고되고 있다.(22-24) 특히 MMP-9에 대해서 Lehoux 등(25)은 MMP-9 결핍 생쥐를 이용한 실험에서 MMP-9이 MMP-2와는 달리 압력에 의해 유발된 동맥벽의 확장능에 중요한 요소로 작용함을 보고하였고, Nomura 등(26)은 MMP-2와 달리 MMP-9이 하지정맥류 환자군에서 젤라틴분해능 및 단백질의 양이 대조군에 비하여 증가되어 있으며, 정맥벽 탄성도 소실과 관계있는 탄력소가 소실된



부위에서 MMP-9이 강하게 발현되고 있음을 보고하여 MMP-9이 탄력소의 변성에도 관계가 있음을 시사하였다. 또한 Jacob 등(27)은 하지정맥류 환자에서 30분간 정맥류 내 혈류를 저류시킨 다음 정맥류 내 혈액을 채취하여 시행한 검사에서 pro-MMP-9의 발현이 대조군인 정상 상완정맥 내 혈액에서 채취한 결과보다 증가되어 있음을 관찰하였다. 이러한 연구 결과들은 MMP-9이 혈관벽 및 하지정맥류 환자의 정맥벽의 변화와 관련이 있음을 나타내고 있으며, 본 연구에서도 MMP-9이 정맥벽의 변성에 보다 관련이 있음이 관찰되었다.

하지정맥류에서 TIMP의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 Badier-Commander 등(6)은 하지정맥류 환자의 대복재정맥에서 대조군에 비하여 TIMP-1/MMP-2 및 TIMP-2/MMP-2의 비율이 증가되어 있음을 관찰하고 이들 효소들간의 발현비의 변화가 하지정맥류의 발생과 관계가 있을 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 면역조직화학검사에서 TIMP-1은 대조군 및 환자군에서 모두 발현되지 않았으나, TIMP-2는 비교적 강하게 발현되었고, 웨스턴블롯 검사에서는 TIMP-1이 유의하게 발현양이 많음을 관찰할 수 있었다.

본 연구의 한계점으로 대조군의 수가 너무 적어 대조군과 환자군과의 비교가 이루어지지 않은 점이다. 앞서 기술한 바와 같이 비록 이전의 연구들에서 정상 대조군으로 여겨졌던 역류가 없는 대복재정맥이라도 실제 젊은 연령층의 정상 성인에서 구득된 정맥절편과는 차이가 있을 것으로 여겨진다. 역류가 없는 대복재정맥도 연령이 증가할수록 변성이 발생하는 것으로 알려져 있고, 직업이나 환경에 따라 지속적으로 정수압에 의한 자극을 받으면 중막 평활근 세포의 변성이 초래되는 것으로 여겨지고 있다. 본 연구에서도 역류가 없는 대복재정맥 절편에서 정맥벽 변성이 확인되었으며, 이러한 정맥에서의 MMP 및 TIMP 발현도는 환자군과 다르지 않았다. 따라서 정맥류의 진행에 따른 정맥벽의 변성도를 연구하기 위해서는 여러 연령층에서 정맥절편을 구득할 필요가 있으나 여기에는 현실적인 제약이 있다.

실험결과 역류가 없는 정상인의 대복재정맥에서도 정도의 차이는 있으나 정맥벽의 변성이 관찰되었으며, 이러한 정맥벽의 변성이 MMP 및 TIMP의 발현도와 관련이 있는 것으로 관찰되었다. 면역조직화학검사에서 MMP-9이 대조군 및 환자군에서 가장 강하게 발현되었으며, 주로 혈관내 피세포와 중막 중층에서 보다 강하게 발현되었다. TIMP-2

역시 강하게 발현되었으나 그 정도는 MMP-9에 비하여 약했으며, 다른 효소들은 비교적 약하게 발현되었다. 젤라틴 분해능 분석을 위한 zymography에서는 MMP-2 및 MMP-9이 대조군 및 환자군에서 모두 발현되었으며, 웨스턴블롯 검사에서는 MMP-9 및 TIMP의 발현양이 유의하게 많았다. MMP-9 및 TIMP-1의 발현양이 정맥절편의 위치 및 임상양상에 따라 차이를 보였으나, 이를 제외한 다른 효소들에서는 해부학적 위치에 따른 차이를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과에서 환자군이나 대조군 모두에서 정맥벽의 변성에 따른 정맥벽의 재구조화에 여러 종류의 MMP 및 TIMP가 작용할 것으로 추정되나, 이들 중 특히 MMP-9이 주요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

## ACKNOWLEDGEMENT

본 연구를 수행하는데 도움을 주신 (주)정일약품, 경북대학교병원 생명의학연구소 김태구 선생님, 최봉림 연구원에게 감사의 뜻을 전합니다.

## REFERENCES

- 1) Rose SS. Anatomic observation on causes of varicose veins. In: Goldman MP, Weiss RA, Bergan JJ, editors. Varicose Veins and Telangiectasias: Diagnosis and Treatment. 2nd ed. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1999. p.12-41.
- 2) Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, Al-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2007;6: 219-24.
- 3) Golledge J, Quigley FG. Pathogenesis of varicose veins. Eur J Vasc Endovasc Surg 2003;25:319-24.
- 4) Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol 2008;75:346-59.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

- 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) Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, Gacko M. Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol* 2004;23:164-9.
- 11) Huh S, Choi HH, Kim HK. The expression of matrix metalloproteinase according to hydrostatic pressure in varicose veins. *J Korean Surg Soc* 2009;77:344-52.
- 12) Mozes G, Carmichael SW, Gloviczki P. Development and anatomy of the venous system. In: Gloviczki P, Yao JST, editors. *Handbook of Venous Disorders: Guidelines of the American Venous Forum*. 2nd ed. New York: Arnold; 2001. p.11-24.
- 13) Milroy CM, Scott DJ, Beard JD, Horrocks M, Bradfield JW. Histological appearances of the long saphenous vein. *J Pathol* 1989;159:311-6.
- 14) Leu HJ, Vogt M, Pfrunder H. Morphological alterations of non-varicose and varicose veins (A morphological contribution to the discussion on pathogenesis of varicose veins). *Basic Res Cardiol* 1979;74:435-44.
- 15) Somers P, Knaapen M. The histopathology of varicose vein disease. *Angiology* 2006;57:546-55.
- 16) Maurel E, Azema C, Deloly J, Bouissou H. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta* 1990;193:27-37.
- 17) Venturi M, Bonavina L, Annoni F, Colombo L, Butera C, Peracchia A, et al. Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res* 1996;60: 245-8.
- 18) 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.
- 19) Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res* 2007; 141:311-6.
- 20) Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond)* 2007;112:229-39.
- 21) Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006;69:614-24.
- 22) 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.
- 23) Rotmans JJ, Velema E, Verhagen HJ, Blankensteijn JD, de Kleijn DP, Strokes ES, et al. Matrix metalloproteinase inhibition reduces intimal hyperplasia in a porcine arteriovenous-graft model. *J Vasc Surg* 2004;39:432-9.
- 24) Pascarella L, Schmid-Schönbein GW, Bergan J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. *J Vasc Surg* 2005;41:303-11.
- 25) Lehoux S, Lemarié CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 2004;109:1041-7.
- 26) 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.
- 27) Jacob MP, Cazaubon M, Scemama A, Prié 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.