주산기 가사가 백서의 폐에서 내피성 nitric oxide 생산에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

조 희 숙

주산기 가사가 백서의 폐에서 내피성 nitric oxide 생산에 미치는 영향

지도 임 백 근 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2001년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 희 숙

조희숙의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ ㊞

심사위원 _____ ㊞

심사위원 _____ ㊞

연세대학교 대학원

2001년 7월 일

감사의 글

이 논문을 완성하며 제게 도움을 주신 여러 분들께 감사의 마음을 전합니다. 먼저 항상 학자로서의 기본 자세를 몸소 보여 주시고 제가 소아과학이란 학문의 길로 들어설 수 있게 도와주신 임백근 교수님, 저의 논문에 깊은 관심과 조언을 보내 주신 이중우 교수님, 황성오 교수님께 감사를 드립니다. 실험을 도와주시고 조언을 아끼지 않으신 송기학 선생님, 항상 저의 연구를 격려해 주시고 부족한 면을 도와주신 소아과학 교실의 모든 분들께도 감사를 드립니다. 실험과정 중에 저를 도와주신 해부학 교실의 강호석 교수님, 동물 실험실의 최인규님, 김주남, 홍순무 선생에게 이 글을 통하여 다시 한번 심심한 감사를 드립니다.

제가 대학원 과정을 무사히 마칠 수 있도록 저를 이해하고 도와주신 아버님, 어머님께 감사를 드리며 저를 낳고 길러 주신 부모님과도 이 기쁨을 함께 하고자 합니다. 끝으로 항상 제게 든든한 후원자인 남편에게도 이 글을 통해 고마움을 전합니다.

저자 씀

차 례

그림 차례 · iii
국문요약 · 1
I. 서론 · 3
II. 재료 및 방법 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 4
1. 실험동물 · 4
2. 주산기 가사 유발 · · · · · · · · · · · · · · · · 5
3. 면역조직화학염색 · · · · · · · · · · · · · · · · 5
4. 영상분석 및 통계 · · · · · · · · · · · · · · · · 6
III. 결과 · 7
IV. 고찰 · 12
V. 결론 · 15
참고문헌 · 16
영문요약 · 19

그 림 차 례

Fig 1. Results of pH in various conditions of asphyxia; 0 min group(n=3), 10 min group(n=3), 20 min group(n=3), and living group(n=3). 8

Fig 2. Results of pO_2 in various conditions of asphyxia; 0 min group(n=3), 10 min group(n=3), 20 min group(n=3), and living group(n=3). 9

Fig 3. Results of eNOS staining intensity in arteries(50-60um diameter); 0 min group, 10 min group, 20 min group, and living group. 10

Fig 4. Immunohistochemistry with eNOS antibody. 11

국문요약

주산기 가사가 백서의 폐에서 내피성 nitric oxide 생산에 미치는 영향

Nitric oxide (NO)는 분자량이 30 정도 되는 기체로서 체내의 모든 기관에 존재하며 폐혈관에서 혈관 평활근을 이완하여 폐혈관 저항을 감소시켜 폐 혈압을 낮추는 작용을 한다. 특히 출생 시 일어나는 폐 저항 감소에 중요한 작용을 하며 저산소증에 노출되었을 때 초래되는 폐혈관 수축과 관련하여 NO의 역할에 대해서는 아직까지도 많은 논란이 있다. 출생 직후 저산소증이 있을 때 폐혈관에서 NO의 생성이 증가한다는 주장과 NO가 감소한다는 상반되는 의견이 존재하고 있다. 그러나 이러한 상반된 대부분의 연구가 실험 대상 동물을 인위적인 뇌졸중(stroke) 상태를 유발하거나, 또는 대기 산소 농도보다 낮은 산소 분압으로 인공호흡을 시키며 관찰한 것으로 자궁 내 생활에서 자궁 외 환경으로 이행되는 주산기 시기에 가사를 유발하여 NO의 생산을 조사한 보고는 없다.

이에 저자는 신생 백서에서 주산기 가사가 진행되는 과정에서 NO 생산을 확인하기 위하여 Nitric oxide synthase(NOS)의 생산량을 측정하였다. 각 실험군을 대조군과 가사 10분, 20분, 생존군으로 나누어 분류한 후 신생 백서의 폐를 적출하여 면역조직화학염색을 시행한 후 영상 분석기를 이용하여 염색정도를 정량하였다. 이들 결과를 토대로 주산기 가사에 따른 NOS 생산량을 비교해 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 만삭의 어미 쥐에서 제왕 절개로 출산된 신생 쥐를 자궁 채로 적출한 후 온수에 담가 주산기 가사를 유도하였다. 10분, 20분 가사군에서 대조군에 비하여 pH와 pO_2가 의미 있는 감소를 보였다. (pH=대조군 7.24±0.04,

10분 가사군 7.08±0.02, 20분 가사군 6.87±0.05, pO_2=대조군 37.6±1.4 mmHg, 10분 가사군 20.0±1.1 mmHg, 20분 가사군 9.6±1.2 mmHg, $p<0.05$)

2. 신생 백서의 폐 조직을 eNOS양을 측정하기 위하여 면역 조직 화학 염색 후 염색정도를 측정하여 10분, 20분 가사군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 의미 있는 감소를 보였다.(대조군 149.85±1.12, 10분 가사군 142.46±0.77, 20분 가사군 145.85±0.98, $p<0.05$)
3. 대조군에 비하여 생존군에서 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다.(대조군 149.85±1.12, 생존군 152.11±0.92, $p=0.127$)
4. 10분 가사군과 20분 가사군의 폐 조직에서 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 의미있는 증가를 보였다.(10분 가사군 142.46±0.77, 20분 가사군 145.85±0.98, $p<0.05$)

이상의 결과로부터 백서에서 주산기 가사에 따른 eNOS 발현은 초기에는 감소하였으며 주산기 가사가 점차 진행됨에 따라 증가하였다.

핵심되는 말: Nitric oxide, Nitric oxide synthase, 면역 조직화학염색, 주산기 가사, 저산소증

주산기 가사가 백서의 폐에서 내피성 nitric oxide 생산에 미치는 영향

<지도 임백근 교수>

연세대학교 대학원 의학과

조 희 숙

I. 서론

Nitric oxide(NO)는 체내의 모든 기관에 존재하는 중요한 세포 내, 세포간 전달자(messenger)로서 분자량이 30정도 되는 기체이다. 체내에 존재하는 NO는 L-arginine에서 nitric oxide synthase(NOS)의 작용으로 L-citrulline이라는 부산물과 함께 만들어진다. NOS는 세 가지 형으로 존재하여 type I은 신경세포에서, type II는 활성화된 백혈구 내에서, type III는 혈관의 내피세포에서 발견된다. NO는 iron과 iron을 포함하는 compound에 매우 높은 결합력을 나타낸다. 혈관 내피세포에서 NO가 생성되면 곧 혈관의 평활근 세포로 확산되어 들어가 guanylate cyclase 내의 iron과 반응을 일으키게 되고 이렇게 활성화된 guanylate cyclase는 guanosine monophosphate (GMP)를 cyclic GMP로 변환시킨다. cGMP는 평활근 세포가 이완되도록 하고 이로써 혈관이 확장되고 혈관 저항이 감소하게 된다. NO가 혈류로 유입되면 곧 혈색소의 iron과 반응을 일으켜서 Methemoglobin으로 변화되고 곧이어 methemoglobin reductase에 의해 nitrite(NO^{2-})나 nitrate (NO^{3-})로 분리되어 혈관에 대한 작용이 없이 신장을 통해 배설된다.[1]

태아에서 NO 생산은 임신 초기에서 후기로 진행되는 동안 점차 증가하고 출생

후에도 계속 증가한다. 이러한 NO 생산 증가는 NOS의 증가에 기인하며 태아 순환에서 성인 순환으로 전환되는 과정에서 폐 저항이 감소되는 현상과 밀접한 관련이 있다.[2-4]

신생아에서 가사에 의한 폐 고혈압은 흔히 동반되는 증상이다. 이러한 폐혈관 저항의 증가가 있을 때 NO의 생산에 대해서는 아직 논란이 계속되고 있다. 체내에서 저산소증이 일어나면 NO 생산이 감소되어 폐혈관 수축과 폐 고혈압이 유발된다는 주장[5-10]과 이와 반대로 NO 생산이 증가되어 혈관 수축에 의한 저항 증가를 억제한다는 주장[11-14]도 있다. 그러나 이러한 연구결과는 모두 저산소증을 인위적 뇌졸중(stroke) 형태로 유발하여 실험하거나 대기 산소 농도보다 낮은 산소 분압으로 인공 호흡을 시키며 관찰한 것으로 자궁 내 생활에서 자궁 외 환경으로 이행되는 주산기 가사에 의한 저산소증 유발 후 NO 생산 증가 여부를 관찰한 연구는 없다. 그러므로, 본 연구에서는 주산기 가사가 진행되는 시간 경과에 따른 nitric oxide 생산량을 측정하여 비교하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

연세대학교 원주 의과대학 동물 실험실에서 분양된 250-300gm의 백서(Rat, Sprague-Dawley)를 이용하였다. 자성 백서(virgin)를 웅성 백서와 교배하여 다음날 아침 질 도말 검사로 정충이 존재하는지를 확인한 후 수태기간 21일째(만삭 21.7일)에 임신한 어미 쥐에게 ether를 흡입시켜 마취하고 재빨리 개복하여 자궁 전체를 적출하여 37℃ water bath에 담근 후 즉시 제왕절개술을 시행하여 신생 백서를 분만하였다. 대조군과 실험군은 모두 같은 어미 쥐에서 태어난 것을 이용하며 체중이 4.5g 이상인 것을 사용하였다.

2. 주산기 가사 유발

신생 쥐가 담수된 상태에서 제왕 절개되어 시간별로 분만되는 순서에 따라 시간 군을 나누어 가사를 유발하였다. 질식된 쥐는 체중을 단 후 개흉하여 우심실에서 0.1ml의 혈액을 채취하여 portable clinical analyzer(i-stat, Abbott lab. inc, USA)를 이용하여 pH와 pO_2를 측정하였다. 폐를 적출한 후 액화질소에서 급속 냉각한 후 -70℃로 얼려 보관하였다. 각 군의 동물은 각각 3마리씩 희생시켰다.

생존군 ; 출생 후 정상 산소농도로 호흡한 경우
대조군 ; 출생 후 호흡 개시 직전의 경우
10분 가사군 ; 10분간 가사 유발시킨 경우
20분 가사군 ; 20분간 가사 유발시킨 경우

3. 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

냉동된 폐 조직을 OCT compound를 이용하여 chuck에 붙인 후 동결 절편기에서 10um 두께로 잘라 젤라틴 코팅된 슬라이드에 부착시킨 후 상온에서 1시간 건조한 다음 고정액 4% paraformaldehyde(0.1M, pH 7.4)로 하루동안 고정시키고 20% sucrose (0.05M, pH 7.4)로 48시간동안 연속적으로 고정하였다. eNOS의 면역조직화학염색은 avidin-biotin- peroxidase detection system(Vector Labs, Burlingame, CA, USA)을 이용하였다.[15] 표본을 0.05M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에서 세척한 후 1% H_2O_2를 떨어뜨려 내재된 peroxidase의 활성을 억제하고 PBS로 세척하였다. goat 혈청(RBI, MA, USA)에 10분간 접촉시켜 항체들의 비특이적 결합을 억제시킨 후 각각의 표본 slide에 1: 50으로 희석한 eNOS (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) 일차 항체를 떨어뜨린 후 실온에서 2시간 동안 처리하였다. 표본을 PBS용액에서 충분히 세척한 후 각 항체와의 결합이 강력하게 작용할 수 있

도록 하기 위하여 goat biotinylated anti-rabbit antibody를 상온에서 1시간 30분씩 처리하고 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)(Vector Labs, Burlingame, CA, USA)로 1시간 처리하여 diaminobezidine (DAB)으로 발색 시켰다. 염색을 마친 표본은 탈수과정을 거쳐 cover glass로 봉입 하였다. 음성 대조군은 일차항체를 대신해서 nonimmune mouse serum IgG로 처리하였다.

4. 영상분석(Image Analysis) 및 통계

면역 조직화학염색을 시행한 폐 조직 slide를 200배 하의 광학 현미경에서 관찰하여 폐조직에서 직경이 50~60 um의 혈관을 선택하여 elastic lamina와 평활근 존재 여부를 확인하였다. 직경이 50um 이하인 경우 평활근 존재 여부를 확인하여 정맥과 구분하는 것이 불가능하므로 이 정도 크기의 동맥 혈관만을 선택하였다. 폐 조직 slide를 광학 현미경 대물대 위에 올려놓고 염색되지 않은 slide 부분(blank)과 염색된 조직의 부분을 가장 잘 식별할 수 있는 적절한 광원(light source)의 밝기를 정하여 일정하게 고정하였다. 현미경에 연결된 CCD camera(삼성, 서울, 한국)로 상을 얻어 컴퓨터 스크린에 나타내고 영상 분석을 위하여 (Multiscan, USA)를 이용하였다. 하얗게 염색된 세포를 0으로, 검게 염색된 세포를 256으로 판정하여 gray scale을 지정하고 일단 setting이 정해지면 실험하는 끝까지 같은 조건하에서 영상 분석을 시행하였다. 그렇게 함으로써 모든 조건이 고정되어 염색정도(staining intensity)만이 gray scale에 반영되도록 하였다. 컴퓨터 스크린에 나타난 상에서 염색되지 않은 부위(blank)의 gray scale에 의한 오차를 제거하기 위하여 관찰하고자 하는 부위를 pen-mouse로 지정하고 염색되지 않은 배경 부위(blank)의 gray value를 제하여 eNOS 항체로 염색된 적절한 크기의 폐혈관에서의 gray scale이 측정되었다.

영상분석기 이용 시 현미경 200배 하의 배율에서 한 pixel은 한 변의 크기가 0.68143um인 정사각형으로 1mm^2 당 200백만 개의 pixel이 포함되는 해상도로 측정되었고 일정하게 지정한 부위에 포함되는 모든 pixel의 수로 pixel gray value 간의 합을 나눈 것을 integrated optical density(IOD)로 나타내었다. 이렇게 얻어진 IOD를 지정된 부위의 염색

정도를 나타내는 상대적인 값으로 선택하였다.

$$\text{IOD} = \frac{\text{sum of pixel gray level values}}{\text{number of pixels}}$$

각 조직 당 적어도 5 field를 관찰하였고 결과는 one way ANOVA와 student's t-test를 이용하여 각 군을 비교하였다.

III. 결과

각 실험군 간의 시간에 따른 가사의 정도를 pH, pO_2를 측정하여 비교하였고 각 실험군 간의 eNOS 발현 정도를 비교하였다. 실험군은 출생 후 호흡개시 직전 폐를 적출한 군(0 min group), 10분간 가사를 유발한 군(10 min group), 20분간 가사를 유발한 군(20 min group), 출생 후 정상 산소 농도로 호흡한 군(living group)으로 나누어 우심실의 혈액을 채취하여 pH와 pO_2를 측정하였다. pH는 가사가 진행될수록 낮아졌으며 산소 분압도 가사가 진행될수록 낮아졌다.($p<0.05$)

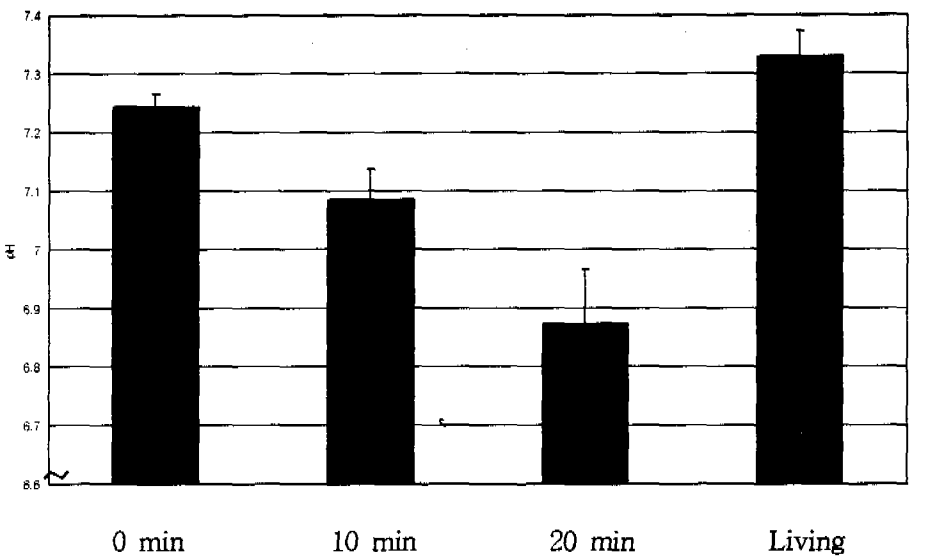

Figure 1. Results of pH in various conditions of asphyxia; 0 min group(n=3), 10 min group(n=3), 20 min group(n=3), and living group(n=3). Values are means ± SE. Kruskal Wallis test, $p<0.05$

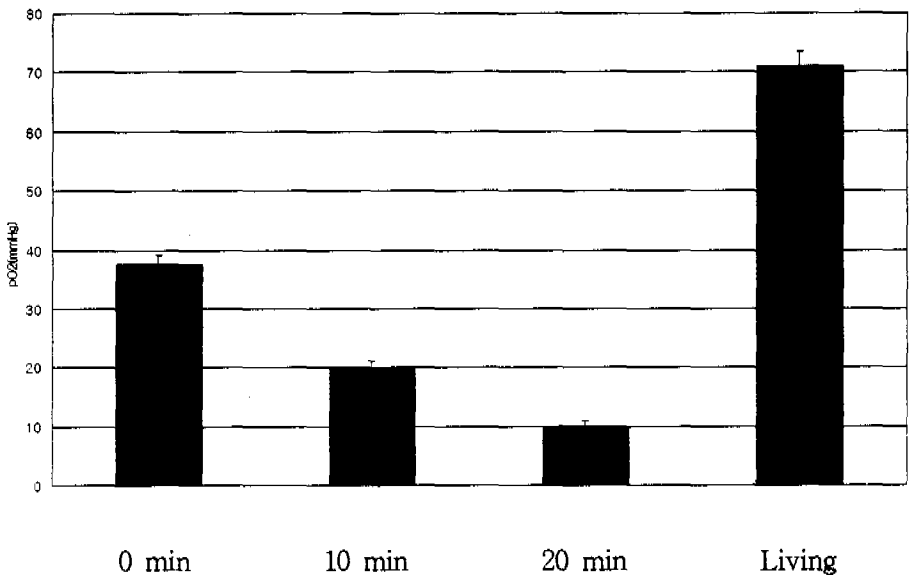

Figure 2. Results of pO_2 in various conditions of asphyxia; 0 min group(n=3), 10 min group(n=3), 20 min group(n=3), and living group(n=3). Values are means ± SE. Kruskal Wallis test, $p<0.05$

NOS activity는 면역 조직 염색된 조직을 영상 분석기로 판정하여 염색정도(intensity)로 점수화 하였다.(Fig.3) 출생 후 호흡개시 직전 폐를 적출한 군 (0 min)과 출생 후 정상 산소농도로 호흡한 군 (living)의 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 각각 평균 149.85±1.12와 152.11±0.92로 출생 후 시간이 경과함에 따라 증가하였으나 통계학적 의의는 없었다.(p=0.87)

0 min 대조군에서 폐 조직의 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 149.85±1.12였고 10분 가사군은 142.46±0.77로 가사가 발생한 후 감소하였다. ($p<0.05$) 10분 가사군과 비교할 때 20분 가사군의 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 145.85±0.98로 다시 증가하였다. ($p<0.05$)

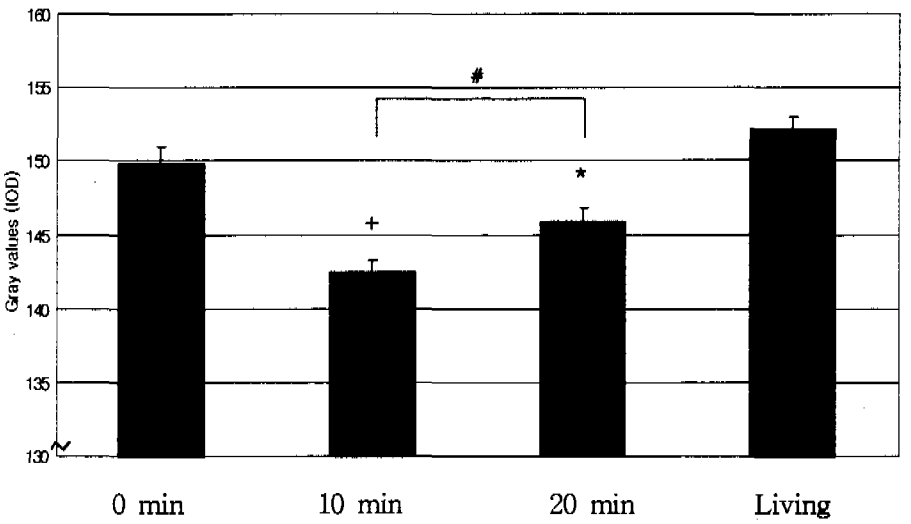

Figure 3. Results of eNOS staining intensity in arteries (50-60um diameter) from 0min group, 10min group, 20min group, living group. Values are means ± SE.
Gray scale : 0; white, 256; black
+: $p<0.05$ vs 0min.
*: $p<0.05$ vs 10min.
#: $p<0.05$ 10min vs 20min

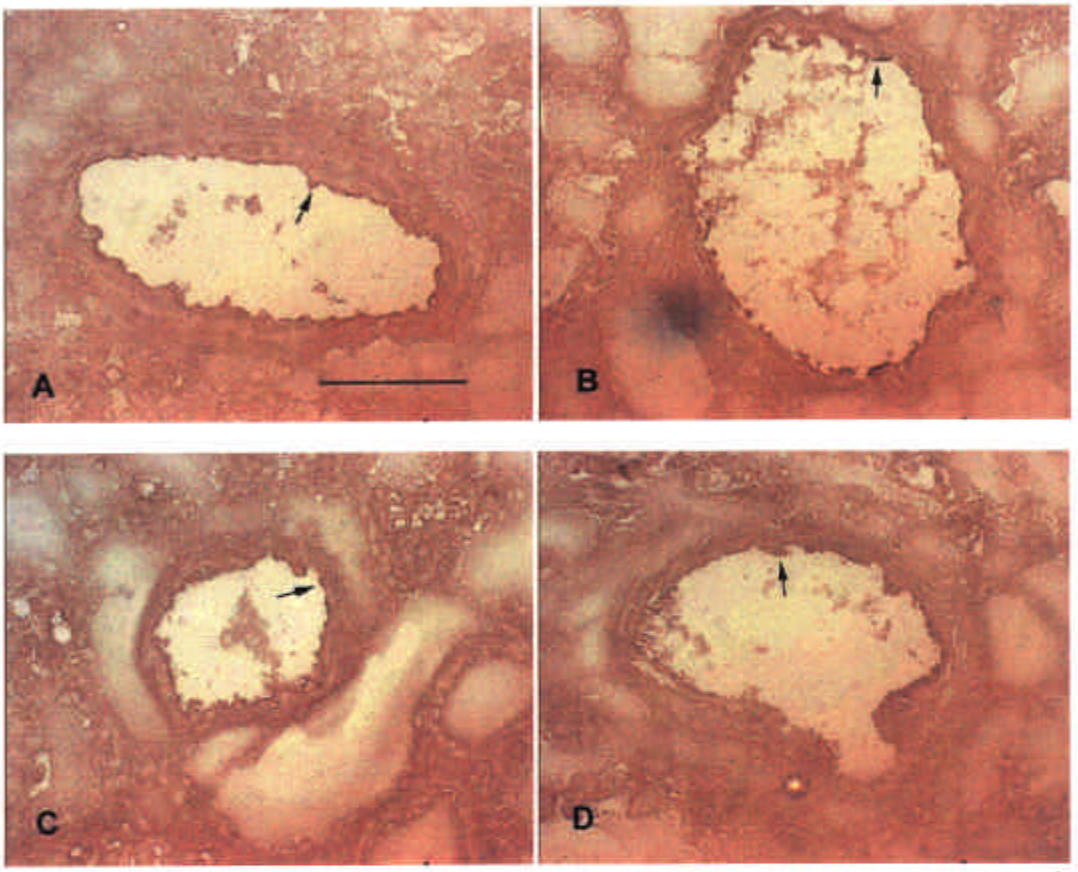

Fig 4. Immunohistochemistry with eNOS antibody. There were enhanced densities on endothelial layer.(arrows) A: eNOS staining in pulmonary arteries from 0 min group. B: eNOS staining in pulmonary arteries from 10 min group. C: eNOS staining in pulmonary arteries from 20 min group. D: eNOS staining in pulmonary arteries from living group. original magnification, ×200. Bar = 100um

IV. 고찰

1980년대 중반까지 NO는 단순히 대기 오염 물질로만 인식되었으나 1984년에서 1987년 사이 신체 내의 대식 세포, 신경 세포, 혈관의 내피 세포 등에서 발견되었다. 이후 최근까지의 연구에 의하면 NO는 체내의 모든 기관에 존재하며 생리적으로 여러 과정에 관여한다. NO는 신경 전달 과정에서 기억, 학습 과정, 심혈관계에서 혈관 확장 및 혈소판 응집과 활성화의 억제, 폐에서 기관지 확장, 환기-관류의 유지, 소화기에서 장운동에 관련이 있다고 알려져 있으며 NO와 관련된 병태 생리로 파킨슨씨 병, 고혈압, 임신성 고혈압, 선천성 심장병을 동반한 폐 고혈압, 신생아에서 지속적 폐 고혈압, 천식, 괴사성 장염, 당뇨 등이 규명되었다.[1]

NO는 반감기가 매우 짧은 물질로서 혈관의 내피 세포에서 생성된 후 평활근 세포로 확산되어 작용을 일으키고 곧 혈류로 유입되어 혈관에 대한 작용이 없는 대사산물로 바뀌게 되므로 NO 자체를 측정하여 정량하는 것은 매우 어렵다. NO 생산을 반영하는 여러 간접적인 방법으로 NO의 전구 물질인 L-arginine을 측정하거나 생산 효소인 NOS를 측정하거나 대사산물인 cGMP 양 혹은 nitrite(NO^{2-}), nitrate(NO^{3-})를 정량하는 방법으로 NO 생산을 유추하여 실험하고 있다. 최근에는 NOS에 대한 RT-PCR 등을 이용하여 유전자 단계의 규명도 이루어지고 있으며 electron paramagnetic resonance를 이용하여 NO를 직접 정량하는 방법도 소개되고 있다.[16] 본 실험에서는 NOS 효소의 발현 정도를 면역 조직 화학 염색을 통하여 측정하여 NO 생산을 규명하고자 하였다.

최근에는 임신 중 NO의 작용에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 태아에서 NO는 매우 중요한 역할을 하는데 Sladek 등[4]은 태반과 탯줄에서 NO 분비가 태아 태반 순환에서 낮은 혈관 저항을 유지하게 해주는 매우 중요한 기전이라고 하였다. 태아에서는 임신 초기에 비해 후기에 NO의 생산이 증가하며 특히 체 혈관의 내피 세포보다는 폐혈관의 내피세포의 NO 생산 능력이 더욱 증가하게 된다. 이런 현상은 칼슘-칼모듈린-매개기전(Calcium-calmodulin-mediated mechanism)으로 NOS의 activity가 증가하기 때문이며 이 효소와 관련된 조효소(cofactor)의 증가

등이 원인이다.[2,5]

Abman 등[6]은 정상 분만 과정에서 NO가 혈관의 긴장을 조절하는데 중요하게 기여한다는 것을 증명하였다. 본 연구에서도 출생 후 호흡 개시 직전 폐를 적출한 대조군과 24시간 이상 정상 산소 농도로 호흡한 생존군에서 염색정도로 나타낸 NOS의 양을 비교해 보면 증가하고 있는 것으로 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다. 이런 결과는 대조군이 거의 정상 출산이 임박한 (제태 기간 21일) 만삭의 쥐들이었으며 정상 산소 농도로 호흡한 군의 연령이 생후 만 1일 정도였으므로 큰 차이가 없었던 것으로 보인다.

본 연구에서 대조군은 출생 후 호흡개시 직전에 폐를 노출한 군, 가사군은 10분, 20분간 가사를 유발한 군, 생존군은 24시간 이상 정상 호흡을 한 군으로 나누어 실험하였다. 대조군에 비해 가사군에서 pH가 의미 있게 낮게 나타났고 산소의 분압도 의미 있게 낮게 나타나 가사 유발의 시간은 충분했던 것으로 보이며 NO의 생산량에 변화가 일어나는 시간으로도 충분했을 것으로 사료된다. 급성 저산소증 상태를 유발하여 NO의 생산량을 정량 하였던 기존의 연구들을 보면 2분에서 7분까지의 저산소 상태를 인위적으로 유발하여 실험하였다.[9-10]

저산소증과 NO 생산에 대해서는 상반되는 견해들이 제시되었다. Rodman 등[9]은 쥐의 폐혈관을 분리하여 저 산소 상태에서 cGMP 농도가 정상 산소상태의 농도보다 의미 있게 낮은 것을 발견하고 생체 내에서 저산소성 폐혈관 수축 현상은 NO 생산의 감소에서 기인한다고 주장하였다. 또한 저산소증이 만성적으로 지속되는 경우 혈관 내피 세포에서 NO 생산이 감소되고 폐 고혈압이 유발된다는 보고가 있다.[11] 그러나 반대로 저산소증에 의한 혈관 수축 시 NO의 양이 증가되어 혈관수축에 의한 저항이 증가하는 것을 보상한다는 보고도 있다.[10,12-13, 16-17] 저산소증이 일어나면 혈관의 내피세포는 혈관 수축 작용이 있는 endothelin-I을 분비하여 혈관의 평활근 세포(smooth muscle cell)의 증식과 수축력을 증가시키고, 동시에 NO를 분비하여 혈관을 확장시켜 적절한 혈관 수축과 이완을 조절한다. 저산소증이 있을 때 폐의 내피세포는 초기에 NO 생산을 늘려 폐혈관 저항이 증가하는 것을 방지하며 만일 NOS를 억제하게 되면 NO가 생산되지 않아 폐 고혈압이 더 심화된다.[18] 본 실험 결과에서는 주산기 가사가 진행되어 저산소증 상태를 초래하자

백서의 폐에서 NOS의 발현이 감소하였다. 그러나 주산기 가사가 진행됨에 따라 NOS 발현은 점차 증가하였고 폐 저항 증가를 보상하려는 생리적인 반응이 일어난 것으로 생각된다.

저산소증이 있을 때 NO의 생산을 억제하면 저산소증 후에 오는 뇌 손상을 줄일 수 있다는 보고가 있다.[19-20] 저산소증에 노출되면 각종 아미노산이 생화학적 cascade를 일으켜 효소(protease, lipase, protein kinase)등이 활성화되고 자유기(free radical)가 생성되며 사립체(mitochondria) 내에서 oxidative phosphorylation이 잘 일어나지 않아 결국 신경세포의 사망을 초래하게 된다.[21] Kader 등은 쥐에서 국소적인 대뇌 피질의 허혈을 유발하여 NO 생산이 급격히 증가하는 것을 발견하고 허혈 후 수분 내에 NO의 증가 후 glutamate 분비 증가가 신경 손상의 주요기전이라 하였다.[22] 이런 과정에서 특히 N-methyl-D-aspartate는 NO 합성을 자극하고 NO가 glutamate neurotoxicity를 유발하기 때문에 NOS를 억제하게되면 뇌 손상을 줄일 수 있다고 보고되고 있다.[19-20] 그러나 NOS를 억제하면 폐혈관 저항이 증가되고 특히 태아에서 신생아로 이행되는 주산기 과정의 정상 생리 현상을 저해할 우려가 있으며 저산소증이 있을 경우 태아 폐 고혈압 지속증을 유발할 위험이 상당히 크다. 그러므로 NO 생산과 주산기 가사 때의 생리적 반응이 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각되며 NO 생산 증가와 감소에 따른 영향도 평가되어야 할 것이다.

이후 좀더 방대한 실험 개체를 이용한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며 NOS activity 측정을 통한 NO 생산량을 비교하는 이외에도 PCR 등을 이용한 유전자 단계에서의 연구도 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

저자는 주산기 가사에 의한 저산소증이 진행되는 시간에 따라 폐혈관 내피세포의 NO 생성 변화를 측정하기 위하여 신생 백서를 대조군 10분, 20분 가사군, 생존군으로 나누어 pH, pO_2를 측정하고 개흉하여 폐 조직을 얻은 후 면역 조직화학 염색하여 염색정도로 나타낸 eNOS의 양을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 만삭의 어미 쥐에서 제왕 절개로 출산된 신생 백서를 자궁 채로 적출한 후 온수에 담가 주산기 가사를 유도하였다. 10분, 20분 가사군에서 대조군에 비하여 pH와 pO_2가 의미 있는 감소를 보였다.
2. 신생 백서의 폐 조직을 eNOS양을 측정하기 위하여 면역 조직 화학 염색 후 염색정도를 측정하여 10분, 20분 가사군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 의미 있는 감소를 보였다.
3. 대조군에 비하여 생존군에서 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다.
4. 10분 가사군과 20분 가사군의 폐 조직에서 염색정도로 나타낸 eNOS의 양은 의미있는 증가를 보였다.

이상의 실험 결과들로부터 주산기 가사가 진행되면 폐에서 초기에 eNOS의 발현이 감소하며 이것이 저산소성 폐 고혈압의 중요한 병태 생리인 것을 알 수 있었다. 그러나 주산기 가사가 진행됨에 따라 eNOS 발현은 점차 증가하며 폐 고혈압 증가 및 폐 저항 증가를 보상하려는 생리적 반응을 확인하였다.

참고 문헌

1. Nelin LD, Hoffman GM. The use of inhaled nitric oxide in a wide variety of clinical problems. Pediatric Clinics of North America 1998;45(3):531-49.
2. Shaul PW, Farrar MA, Magness RR. Pulmonary endothelial nitric oxide production is developmentally regulated in the fetus and newborn. Am. J. Physiol. 1993;265(Heart Circ. Physiol. 34):H1056-H1063.
3. Yang D, Lang U, Greenberg SG, Myatt L, Clark KE. Elevation of nitrate levels in pregnant ewes and their fetuses. Am. J. Obstet Gynecol 1996;174:573-7.
4. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. Am. J. Physiol. 1997;272:R441-63.
5. Forstermann U, Schmidt HH, Pollack js, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane N, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. Biochem Pharmacol 1991;42:1849-57.
6. Abman SH, Chatfield BA, Hall SL, McMurtry IF. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. Am. J. Physiol. 1990;259(Heart Cir. Physiol. 28):H1921-7.
7. Warren JB, Maltby NH, MacCormack D, Barnes PJ. Pulmonary endothelium-derived relaxing factor is impaired in hypoxia. Clin. Sci. 1989;77:671-6.
8. Faller DV, Endothelial cell responses to hypoxic stress. Clin. Exp. Pharma. Physiol. 1999;26:74-84.
9. Rodman DM, Yamaguchi T, Hasunuma K, O'brien RF, McMurtry IF. Effects of hypoxia on endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary

artery. Am. J. Physiol. 1990;258(Lung cell. Mol. Physiol.2):L207-L214.

10. Fineman JR, Chang R, Soifer SJ. EDRF inhibition augments pulmonary hypertension in intact newborn lambs. Am. J. Physiol. 1992;262(Heart Circ. Physiol. 34):H1365-H1371.
11. Fike CD, Kaplowitz MR, Thomas CJ, Nelin LD. Chronic hypoxia decreased nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase in newborn pig lung. Am. J. Physiol. 1998;274(Lung cell. Mol. Physiol.18):L517-L526.
12. Su Y, Block ER. Acute hypoxia increases L-arginine content in cultured porcine pulmonary artery endothelial cells. J. Cell. Physiol. 1996;167(2):349-53.
13. Gess B, Schricker K, Pfeifer M, Kurtz A. Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats. Am. J. Physiol. 1997;273(Regulatory Integralive Comp. Physiol. 42):R905-10.
14. Brashers VL, Peach MJ, Rose CE. Augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rat lung by in vitro antagonists of endothelium-dependent relaxation. J. Clin. Invest. 1998;82;1495-1502.
15. 양인명, 최영길. 분자의학 연구기법. : 허영범, 면역조직화학법 제 1판. 서울: 고려 의학; 1999. p. 283-99.
16. Lubec B, Kozlov AV, Krapfenbauer K, Berger A, Hoeger H, Herrera-Marschitz M. Nitric oxide and nitric oxide synthase in the early phase of perinatal asphyxia of the rat. Neuroscience 1999;93:1017-23.
17. MacLean MR, McCulloch KM. Influence of applied tension and nitric oxide on responses to endothelins in rat pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia. Br. J Pharma 1998;123:991-9.
18. Beaufort AJ, Cardozo RH, Dorrepaal CA, Steendijk P, Velde ET, Bel FV. Nitric oxide inhibition after hypoxia-ischemia elevates pulmonary arterial pressure and increases oxygen need. Biol Neonate 1997;72:227-34.
19. Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide

synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. Pediatr Res 1993;35(1):10-4.

20. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pierce WJ. L-NAME reduces infarct volume in a filament model of transient middle cerebral artery occlusion in the rat pup. Pediatr Res 1995;38(5):652-6.
21. Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia relation to perinatal brain damage. Pediatr Res 1990;27:317-26.
22. Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1993;24:1709-16.

Abstract

The effects of perinatal asphyxia on the endothelial NO production in rats

Hee Suk Cho

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Baek Keun Lim)

Nitric oxide(NO) is a gas with a molecular weight of approximately 30, and is present in virtually every organ within the body. It's main function is to dilate pulmonary vessels and reduce pulmonary resistance. It also plays an important role in the reduction of pulmonary resistance after birth. However, the relationship between hypoxia during delivery and NO remains unclear and unclarified as seen in many studies which show contradictory. But most information comes from animal models reflecting stroke rather than hypoxia and only limited literature on NO in the perinatal period is available. So the information on NO' pathophysiology and biochemistry in adult models of ischemia cannot be extrapolated to perinatal asphyxia.

We therefore decided to study NOS activity to evaluate NO biosynthesis of rat models while graded asphyxia was induced intra-partum. Rat pups were divided into four groups; 10 min asphyxia, 20 min asphyxia, survived and control. Lungs were obtained from all groups, and stained immunohistochemically, then scored by eNOS staining intensity using an image analyzer.

The results were as follows

1. After inducing perinatal asphyxia in rat pups, a decreased of pH and pO_2 in the asphyxia groups was observed. (compared to the control)
2. eNOS activity showed a statistically significant decrease in the asphyxic groups compared with the control group.
3. After birth, eNOS activity was increased, but it was not significant statistically.
4. eNOS activity was greater in the group of 20 minutes asphyxia compared with the group of 10 minutes asphyxia.

From the results, it can be concluded that in rat pups, NO production decreases at initial asphyxia, but increases as asphyxia progresses.

Key words : Nitric oxide, Nitric oxide synthase, immunohistochemistry, perinatal asphyxia, hypoxia