자발성 세균성 복막염 환자에서 치료 경과에 따른 복수 Nitric Oxide (NO)의 변화

연세대학교　대학원
의학과
박 영 수

자발성 세균성 복막염 환자에서 치료 경과에 따른 복수 Nitric Oxide (NO)의 변화

지도교수 전 재 윤

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의학과

박 영 수

박영수의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기 까지 깊은 애정과 인내로 지도해 주신 전재윤 교수님께 깊은 감사를 드리고, 바쁘신 중에도 조언을 아끼지 않으신 송시영 교수님과 김혜영 교수님에게도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 논문이 완성되기 까지 실험에 큰 도움을 준 홍시내 연구원과 여러 후배들에게도 감사를 드리고 제 곁에서 늘 힘이 되어준 사랑하는 아내와 딸 지윤이에게 고마움을 전합니다.

저 자 씀

차례

그림 차례

표 차례

국문요약

자발성 세균성 복막염 환자에서 치료 경과에 따른 복수 Nitric Oxide (NO)의 변화

Nitric Oxide는 혈관 확장에 작용하는 중요한 매개 물질로 알려져 왔다. 또한 NO는 혈관 확장과 같은 작용이외에도 인체에서 다양한 기능이 있는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 자세한 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다.

간경변증 환자에서는 일반적으로 NO가 증가하는 것으로 알려져 있고 증가된 NO는 내장 및 전신의 혈관 확장을 유발하여 전신 순환의 장애를 초래하고 신기능을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 자발성 세균성 복막염은 복수를 동반한 간경변증 환자에서 흔히 발생하는 치명적인 합병증으로 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 NO가 증가해 있다고 알려져 있다. 그러나 복수를 동반한 간경변증 환자의 복수와 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 NO의 기능과 변화에 대한 구체적인 결론은 아직 없다.

따라서 본 연구는 자발성 세균성 복막염 환자의 복수를 치료기간 동안 일정한 간격으로 채취하여 NO의 변화를 살펴보고 자발성 세균성 복막염이 없는 간경변증 환자의 무균성 복수와 비교하여 NO의 임상적 의의를 살펴보고 동시에 혈액내의 NO와

비교하여 NO의 전신적인 역할과 임상적 의미를 살펴보고자 하였다.

2000년 11월부터 2002년 12월까지 연세대학교 의과대학 신촌 세브란스 병원에 입원한 간경변증 환자 중에서 복수 천자가 가능한 84명의 환자를 대상으로 하였다. 간경변증은 임상 증상과 초음파 및 복부 컴퓨터 단층 촬영 등의 영상 자료를 이용하여 진단하였다. 환자의 복수와 혈액을 일정한 간격으로 채취하여 백혈구수와 총단백, 알부민 및 NO [NOx = nitrite(NO_2) + nitrate(NO_3)] 를 측정하고 혈액에서는 혈청 화학 검사와 말초 혈액 검사를 시행하였고 복수에서는 세균 배양을 시행하였다.

환자의 평균 연령은 53.5±9.7 세이고 간경변증의 원인은 B형 간염이 68 명, C형 간염이 4명, 알코올성 간염이 5 명, 기타 원인이 분명하지 않은 경우가 7 명이었다. 이중 Child-Pugh Class A는 1 명, B는 28 명, C는 54 명이었다.

복수에서 측정한 NO는 자발성 세균성 복막염군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 복막염군(mean, 82.6 μmole/L ± 14.4)이 대조군(mean, 54.6 μmole/L ± 13.0)보다 다소 높았다. 자발성 세균성 복막염 환자군 36명 중 항생제 치료 7일 후에 복수내에 백혈구가 250개 이하로 감소된 군(n=26)과 항생제에 반응하지 않아 치료 후에도

복수내에 백혈구가 250개 이상인 양 군(n=12) 사이에 입원 당시의 복수 NO 값을 비교해 보면 항생제 치료에 반응한 군에서 통계적으로 유의하게 NO의 값이 높았다(p-value=0.044). 전체 대상 환자 중 10명에서 치료 기간 동안 혈액과 복수를 동시에 채취하여 NO를 측정할 수 있었는데 혈액과 복수 각각에서 치료 기간에 따라 통계적으로 의미 있는 NO 값의 변화는 관찰되지 않았지만 치료 전 복수와 혈액의 NO 값은 상관관계를 보였다. 치료 성적에 영향을 미치는 인자들을 검증하기 위해 간기능, 간암, 입원 당시의 복수 NO의 값을 포함하여 다변량 분석을 시행하였는데 NO가 80 μmole/L 이상인 군에서 통계적으로 유의하게 항생제 치료에 반응을 하는 것으로 나타났다.

결론적으로 자발성 세균성 복막염 환자에서 치료 전 복수 NO 값이 높은 군에서 항생제 치료에 양호한 반응을 보였고 혈액 NO가 복수 NO를 반영한다고 할 수 있다.

핵심되는 말 : 간경변증, 자발성 세균성 복막염, 복수, Nitric Oxide

자발성 세균성 복막염환자에서 치료 경과에 따른 복수 Nitric Oxide (NO)의 변화

<지도교수 전재윤 >

연세대학교 대학원 의학과

박 영 수

I. 서 론

Nitric Oxide(이하 NO)는 1979년대 말에 Furchgott 등[1] 이 발견한 이래로 혈관의 확장에 작용하는 중요한 매개 물질로 알려져 왔다. 또한 NO는 혈관 확장과 같은 작용이외에도 인체에서 다양한 기능이 있는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 자세한 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다.

현재까지 NO의 기능은 불분명하지만 크게 세 가지로 요약할 수 있다.[2] 첫째는 조절기능으로 심장 수축, 혈관확장, 세포유착, 혈관침투 등에 관여하며, 둘째는 보호 기능으로 항산화 기

능, 백혈구 유착을 억제하는 기능 등이 있다. 그 외에 여러 효소의 작용을 억제하고 DNA의 손상을 유발하며 방사선 및 독성 물질 등에 대한 세포의 감수성을 증가시켜 세포 손상에 관여한다.

NO의 합성에 관여하는 Nitric oxide synthase(NOS)는 세 가지의 이형태가 존재하는데 neuronal NOS(nNOS)은 뇌조직에 존재하고, endothelial NOS(eNOS)는 혈관 내피 세포에 주로 존재하고 , inducible NOS(iNOS)는 평상시에는 거의 검출되지 않다가 내독소에 의해 대식 세포가 활성화되면 증가하여 NO를 합성하게 된다.[3,4] NOS에 의해서 L-arginine이 citrulline으로 전환하는 과정에서 발생하는 NO는 수용성의 무색의 기체로 매우 불안정한 분자구조를 갖는다(그림 1). NO는 대기중에서 반감기가 약 3-4초에 불과하여 수 초 내에 산소와 반응하여 Nitrite (NO_2) 또는 Nitrate (NO_3)로 전환된 후 소멸된다. 그러나 체액에서는 NO_2 또는 NO_3로 산화하여 수 시간동안 안정적인 구조를 유지하게 된다.[5.6]

이전의 보고[7,8]에 따르면 간경변증 환자에서는 일반적으로 NO가 증가하는 것으로 알려져 있고 증가된 NO는 내장 및 전신의 혈관 확장을 유발하여 전신 순환의 장애를 초래하고 신기능을 저하시키는 것으로 알려지고 있다. 그러나 간경변증 환자에서 NO는 혈관확장 작용 이외에 ATP와 DNA의 합성과 세포 호

흡 주기를 억제하므로 세균의 증식을 억제하거나 살균 작용이 있어 자발성 세균성 복막염 환자에서 숙주 보호 기능이 있다는 보고도 있었다.[5,9,10] Morales-Ruiz 등[11]에 의하면 복수 발생이 유도되는 간경변증 모델의 쥐에서 복강내 대식 세포가 출현하고 출현한 대식 세포에서 iNOS가 증가한 것을 보고하였다. 이러한 현상은 정상적인 대조군 쥐에서는 거의 관찰되지 않으며 간경변증 모델의 쥐에서 NO의 합성을 억제하였을 때 세균 감염이 발생하는 것을 관찰하고 NO에 항균 효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나 NO에 항균 작용이 있는데 대한 명확한 기전은 밝혀지지 않았고 사람에서도 동일한 작용이 있다는 보고도 없다.

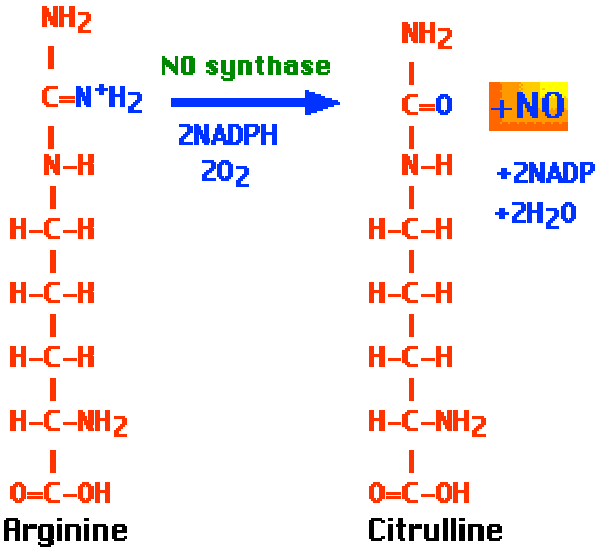

그림 1. NO의 발생 과정

자발성 세균성 복막염은 복수를 동반한 간경변증 환자에서 흔히 발생하는 치명적인 합병증이다.[12] 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 경우 복수에서 TNF-α , IL-6 등과 같은 사이토카인들이 증가되어 있고[13] 이와 같은 여러 종류의 증가된 사이토카인들은 iNOS에 의한 NO의 합성을 증가시킨다.[14,15] 이와 같은 결과들을 종합해 보면 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 NO가 증가해 있을 것이라고 추정 할 수 있다. Such 등[16]은 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 자발성 세균성 복막염이 없는 환자의 무균성 복수보다 NO가 유의하게 높은 것으로 보고하였다. 또한 Bories 등[17]은 치료되지 않고 지속되는 자발성 세균성 복막염 환자에서 복수 NO가 증가한 것을 관찰하였다. 그러나 Garcia-Tsao 등[18]의 보고에 따르면 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수와 간경증만 있는 환자의 복수에서 NO값에 유의한 차이가 없었지만 중한 경로를 밟는 환자의 경우에서 경한 환자에 비해 복수 NO가 증가해 있는 소견을 보였다.[18] 반면 또 다른 실험 결과들은 NO가 자발성 세균성 복막염의 병태 생리에서 숙주 보호 기능이 있는 것으로 보고하였다.[19]

이와 같이 현재까지 복수를 동반한 간경변증 환자의 복

수와 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 NO의 기능과 변화에 대한 구체적인 결론은 아직 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 자발성 세균성 복막염 환자의 복수를 치료기간 동안 일정한 간격으로 채취하여 NO의 변화를 살펴보고 자발성 세균성 복막염이 없는 간경변증 환자의 무균성 복수와 비교하여 NO의 임상적 의의를 살펴보고 동시에 혈액내의 NO와 비교하여 NO의 전신적인 역할과 임상적 의미를 살펴보고자 하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 연구대상

가. 연구 대상 기준

2000년 11월부터 2002년 12월까지 연세대학교 의과대학 신촌 세브란스 병원에 입원한 간경변증 환자 중에서 복수 천자가 가능한 84명의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 53.5±9.7 세였고 간경변증의 원인은 B형 간염이 68 명, C형 간염이 4명, 알코올성 간염이 5 명, 기타 원인이 분명하지 않은 경우가 7 명이었다. 이중 Child-Pugh Class A는 1 명, B는 28 명, C는 54 명이었다. 간경변증은 임상 증상과 초음파 및 복부 컴퓨터 단층 촬영 등의 영상 자료를 이용하여 진단하였다. 환자의 복수와 혈액을 채취하여 백혈구수와 총단백, 알부민 및 NOx [NOx = nitrite (NO_2)+nitrate(NO_3)를 측정하고 혈액에서는 혈청 화학 검사와 말초 혈액 검사를 시행하였고 복수에서는 세균 배양을 시행하였다.

나. 자발성 세균성 복막염의 진단 및 치료

자발성 세균성 복막염의 진단은 발열, 복통 및 동

통 등의 임상 증상을 동반하며 복수 천자 시에 복수 내 다형핵 백혈구가 250/㎣ 이상이거나 복수 배양 검사로 세균이 동정되는 경우로 하였다. 자발성 세균성 복막염의 치료는 cefotaxime 2.0g을 12시간 마다 7일 동안 정주하는 것을 원칙으로 하였다.[20,21] 완치 판단의 기준은 치료를 시작하고 7일 후에 다시 복수를 천자하여 복수 내 다형 핵구가 250/㎣ 이하로 감소되고 증상이 소실되는 경우로 정의하였고, 복수 천자가 불가능한 경우에는 발열 및 복통 등의 증상이 소실되는 경우로 하였다.

2. 연구 방법

가. 복수의 채취 및 보관

복수는 환자가 내원하여 항생제로 치료하기 직전(Day 0), 항생제로 치료한 2일 후(Day 2) 그리고 치료 후 7일째(Day 7)에 각각 10ml의 복수와 동량의 혈액을 채취하여 원심 분리기(25,000 rpm, 10분)를 이용하여 상층액을 분리하여 - 70 °C의 냉동고에 보관하였다.

나. Nitric Oxide의 분석 및 측정

NO의 분석은 상용화된 Kit (Nitrate/Nitrite

Colorimetric Assay Kit, Cayman chemical®)를 사용하여 Griess Reagent [(1% sufanilic acid + 5% H3PO4) + (0.1% naphthyl ethylene diamine dihydrochloride +Distilled water)] 를 이용한 방법으로 측정하였다. 냉동고에 보관된 복수견본을 해동시킨 후에 nitrate reductase를 이용하여 nitrate를 nitrite로 환원시킨 후 540 nm의 파장을 가진 분광광도계를 이용하여 NOx [NOx=nitrite(NO_2)+nitrate(NO_3)]를 측정하였다.

다. 분석 내용

(1) 대상 환자를 복막염군과 무균성 복수군으로 나누어 대상환자의 임상적 특성을 비교하였다.

(2) 복막염군(n=38명)과 무균성 복수군(n=46명)의 치료 직전의 복수 NO 값을 비교하였다.

(3) 복막염군에서 치료 경과에 따른 복수 NO 값의 변화를 살펴보았다(n=24명).

(4) 복막염군에서 항생제 치료에 반응한 군(n=26명)과 반응하지 않은 군(n=12명) 사이의 특성을 비교하였다.

(5) 복막염군의 복수 NO 값과 복수내 백혈구수의 상

관 관계를 알아보았다.

(6) 복막염군의 복수 NO 값과 혈액 NO 값의 상관 관계를 알아보았다.

라. 통계

통계는 의학 SPSS 10.0을 사용하여 대상 환자의 연령, 혈액 및 복수의 백혈구치, NOx 값을 비교 분석하였고, 복막염군의 치료 시기에 따른 NO의 변화는 반복 측정 분산 분석법(repeated measured ANOVA) 및 Logistic regression 방법을 사용하였다. 각 표와 그림에 통계처리 방법을 명시하였고 p value가 0.05 이하인 경우에 통계학적인 유의성이 있는 것으로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징

본 연구에 포함된 환자는 모두 84명으로 남자가 53 명(63.1%),여자가 31 명(36.9%)이었고 평균 연령은 53.5 세(± 9.7세)였다(표 1). 간경변증의 원인은 B형 간염 바이러스에 의한 경우가 68명(81%)로 가장 많았고 그 다음으로 알코올(5명 6%)과 C형 간염 바이러스(4명, 4.8%)의 순이었다(표 1). 그 외에 원인을 알 수 없었던 경우가 모두 7명(8.3%)이었다. 대상 환자의 간기능을 살펴보면 Child-Pugh 분류에 따라 C 등급이 54명(64.3%)으로 가장 많았고 그 다음 B 등급(28명)과 A 등급(1명) 순으로 전반적으로 본 연구에 포함된 환자들은 간경변증이 진행된 경우였다. 전체 대상 환자 중 간암을 동반한 경우는 32명으로 약 38%에 해당하였다. 84명 중 자발성 세균성 복막염으로 입원한 환자는 전체의 45.2 %인 38명이었고 나머지 46명(54.8%)은 복수를 동반한 간경변증으로 입원하였으나 자발성 세균성 복막염은 없었다(표 1). 대조군과 복막염군의 임상 양상은 크게 차이가 없었으나 복막염군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 Child-Pugh C 등급에 속하는 환자가 많았다(p=0.044,표 1). 그 외 두 군간에 프로트롬빈 시간과 혈소판의 평균이 차이가 있었고 복수

내 백혈구 수치의 평균이 달랐으나 그 외에는 양 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

표1. 대상 환자의 특징

	Control(n=46)	SBP(n=38)	*P*
Mean age(yr)	**53.7**	53.2	NS
Sex(M/F)	31/15	22/16	NS
Child (AorB/C)	21/24	22/16	0.044
Etiology(B*/C†/alcohol/others)	34/4/4/4	34/0/1/3	NS
Albumin(g/dL)	2.64	2.51	NS
T. Bilirubin(mg/dL)	6.35	8.73	NS
P-Time(%)	57.6	45.7	0.002
Plt(/㎕)	108,000	73,000	0.010
HCC(+/-)	19/27	13/25	NS
Ascites WBC(/㎣)	160	5103	0.000

NS: Stastically non-significant, *: Hepatitis B, †: Hepatitis C

2. 자발성 세균성 복막염군과 무균성 복수군의 복수 NO 값의 비교

복수에서 측정한 NOx는 자발성 세균성 복막염군과 무균성 복수군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 복막염군(mean, 82.6 μmole/L ± 14.4)이 무균성 복수군(mean, 54.6 μmole/L ± 13.0)보다 다소 높았다(그림 2, p-

value=0.157).

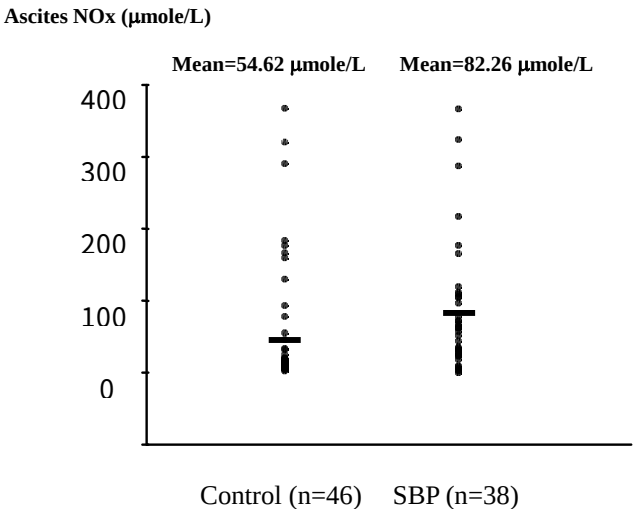

그림 2. 복막염군과 대조군의 입원 당시 NOx 값의 비교(independent T-test, p=0.157)

3. 치료 반응에 따른 자발성 세균성 복막염군의 복수 NO 값의 변화

자발성 세균성 복막염 환자군 36명 중 항생제 치료 7일 후에 복수 내에 백혈구가 250개 이하로 감소된 군(n=26)과 항생제에 반응하지 않아 치료 후에도 복수 내에 백혈구가 250개 이상인 양 군(n=12) 사이에 입원 당시의 복수 NOx를 비교해보면 치료에 반응한 군에서 통계적으로 유의하게 NOx의 값이 높았다(그림 3, 101.86 vs 40.03 μmole/L, p-

value=0.044).

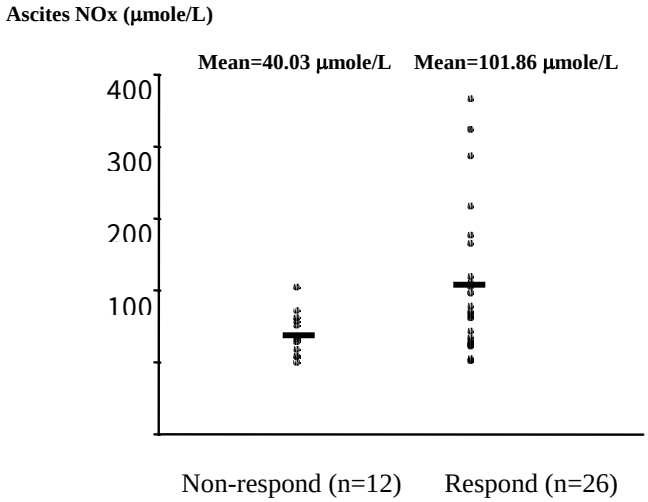

그림 3. 항생제에 반응한 군과 반응하지 않은 군의 입원 당시 복수 NO 값의 비교 (independent T-test, p=0.044)

4. 자발성 세균성 복막염 환자군의 치료 경과에 따른 복수 NO 값의 변화

자발성 세균성 복막염 환자 36명 중 24명에서 치료 기간에 따라 복수를 연속적으로 채취할 수 있었다. 치료 시기에 따른 복수 NOx의 값은 각각 치료 직전(Day0)이 88.4

μmole/L, 치료 2일 후(Day2)가 82.7μmole/L , 치료 7일 후(Day7)가 73.2 μmole/L로 치료 경과에 따라 NOx의 값이 다소 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(그림 4와 5, p-value=0.671). 그러나 복수를 연속적으로 채취할 수 있었던 24명을 치료반응에 따라 나누어 보았을 때 치료에 반응한 군(n=18)이 치료에 반응하지 않은 군(n=6)보다 치료 종료 시(Day 7)에 NOx의 값이 통계적으로 유의하게 높았으나(그림 6. mean, 93.55 vs 24.52 μmole/L, p-value=0.040) 치료 경과에 따른 양 군간의 차이는 없었다.

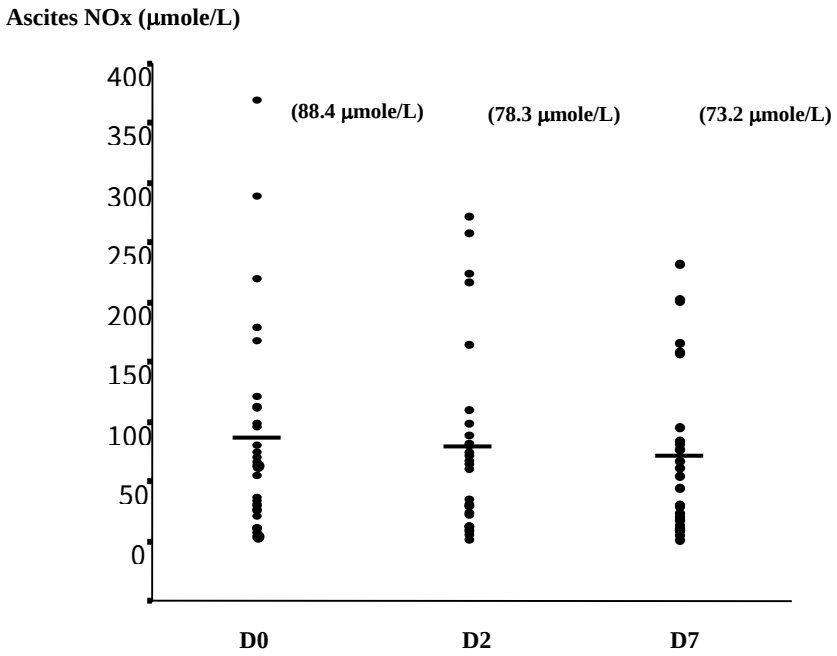

그림 4. 자발성 세균성 복막염 환자의 치료 경과에 따른 평

균 NOx 값의 변화(repeated measured ANOVA, p=0.671)

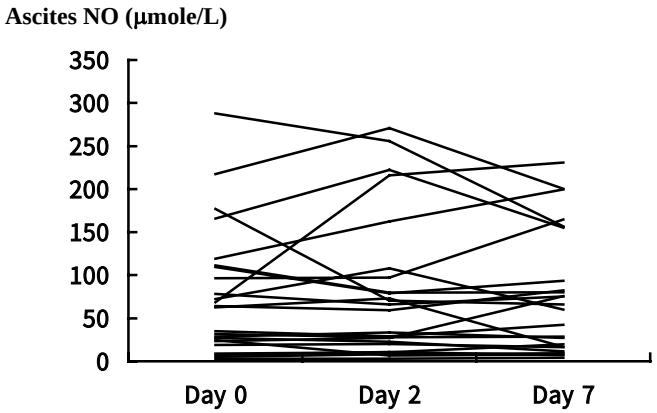

그림 5. 자발성 세균성 환자의 치료경과에 따른 복수 NO 값의 변화

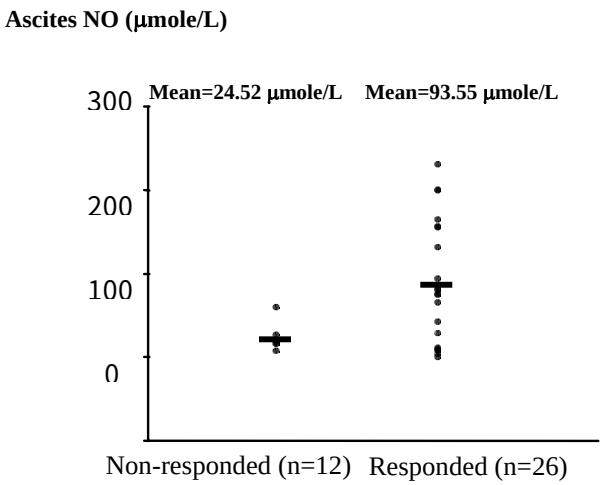

그림 6. 항생제에 반응한 군과 반응하지 않은 군의 치료 종료시 복수 NO 값의 비교 (Mann-Whitney U-test, p=0.04)

5. 복수 NO 값과 혈액 NO 값의 비교

전체 대상 환자 중 17명에서 치료 직전 혈액과 복수를 동시에 채취하여 NOx를 측정할 수 있었는데 혈액과 복수 각각에서 치료 기간에 따른 통계적으로 의미 있는 NOx의 변화는 관찰되지 않았지만 치료 전 복수와 혈액의 NOx 값은 상관관계를 보였다(그림 7, r^2=0.86, p-value=0.001).

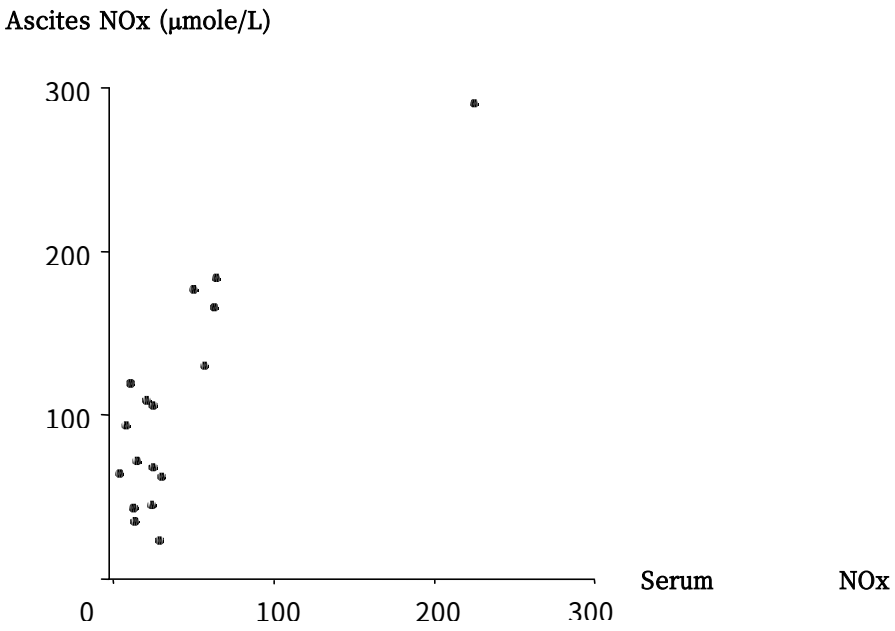

그림 7. 치료 전 복수 NOx 값과 혈액 NOx 값의 상관 관계

(Pearson correlation, r^2=0.86, p-value=0.001)

17명 중 10명에서 연속적으로 복수와 혈액의 채취가 가능하였으나 치료 경과에 따른 변화는 관찰할 수 없었다. 혈액과 복수의 NOx 비를 구하여 치료기간에 따른 변화와 평균을 살펴 보았으나 통계적 유의성은 없었다.

6. 복수 NO 값과 복수내 백혈구수의 상관관계

NO가 복수내 대식 세포에서 주로 생성되기 때문에 복수 백혈구수와 NOx의 상관 관계를 살펴 보았으나 통계적 유의성은 없었다(p-value=1.0).

7. 복수 NO 값과 치료성적의 관계

치료 성적에 영향을 미치는 인자들을 검증하기 위해 간기능, 간암 및 입원 당시의 복수 NOx의 값을 포함하여 다변량 분석을 시행하였는데 NOx가 80 μmole/L 이상인 군에서 통계적으로 유의하게 항생제 치료에 반응을 하는 것으로 나타났다(p-vlaue=0.05). 즉 입원 당시 복수에서 측정한 NOx 값이 높은 경우(80 μmole/L 이상)에 치료에 양호한 반응을 보였다.

표 2. 치료 성적에 영향을 미치는 인자

	치료

인자	치료		p-value
Child (A/B/C)	0/13/7	0/32/1	0.340
Cause (B/C/Alc/Other)	10/0/1/1	24/0/0/2	0.590
HCC(유/무)	5/7	8/18	0.566
Ascites NOx (≤ 80μmole/L /80μmole/L <)	11/1	15/11	0.050

Ⅳ. 고 찰

Nitric oxide는 nitric oxide synthase에 의해 L-arginine이 citrulline으로 전환되는 과정에서 발생되는 무색의 수용성 기체이다. 현재까지 보고된 바로는 NO는 주로 혈관 이완에 작용하지만 그 외에도 세포유착이나 항산화 기능, 백혈구 유착 억제, 면역 작용 및 항균 작용을 갖는 것으로 알려져 있다.[2,5,10]

간경변증 환자에서 NO 값은 정상인보다 증가된 소견을 보여주는데[7] Such 등[16]은 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자의 복수에서 NO가 복막염이 없는 무균성 복수의 NO보다 유의하게 높은 것으로 보고하였고 Bories 등[17]도 치료되지 않고 지속되는 자발성 세균성 복막염 환자에서 복수 NO가 증가하였다고 보고하였다. 이와 같이 증가된 NO의 기능에 대해서는 뚜렷하게 알려진 바가 없지만 Siber 등[8]은 간경변증 환자에서 증가된 NO가 내장 및 전신의 혈관 확장을 유발하여 전신 순환의 장애를 초래하고 신기능의 저하를 초래한다고 보고하였다. 또한 증가된 NO는 간세포의 세포사멸 (apoptosis) 과정에 개입하여 간세포 손상에 관련하는 것으로 알려져 있다.[22] 그 밖에 간질환 환자에서 NO는 전신 순환의 장애를 초래하여 복수의 형성에도 관여하는 것으로도 알려져 있다.[23]

그러나 NO가 간경변증 환자에서 위와 같이 해로운 작용

만 하는 것은 아니다. 자발성 세균성 복막염 환자에서 NO는 ATP와 DNA의 합성과 세포 호흡 주기를 억제하여 세균의 증식을 억제하거나 살균 작용이 있어 자발성 세균성 복막염 환자에서 숙주 보호 기능이 있다는 연구 보고도 있다.[5,9,10] Jimenez 등[24]은 과거에 자발성 세균성 복막염으로 치료 받은 적이 있거나 현재 자발성 세균성 복막염으로 치료 받고 있는 환자의 복수에서 분리한 대식 세포에서 NO 생성 활성도가 증가해 있는 것을 발견하였고 이러한 환자들에서 복수 NOx의 농도가 복막염이 없는 환자보다 증가해 있는 것으로 보고하였다. 또한 Ruiz 등[11]은 간경변 모델 쥐에서 NO를 생성하는 대식 세포의 iNOS를 억제하였을 때 세균 감염이 유발된다고 보고하며 간경변 모델 쥐에서 대식 세포의 iNOS를 유도하면 세균성 복막염을 예방할 수 있다고 주장하였다. 이는 곧 iNOS에 의해 합성되는 NO가 세균 감염에 대한 숙주 보호 효과가 있는 것을 의미한다. 그러나 이러한 결과가 사람에게도 동일하게 일어난다는 보고는 아직 없다.

Jimenez 등[24]이 과거에 복막염으로 치료하고 회복된 환자에서 현재 복막염으로 치료 받고 있는 환자보다 복수 NO가 더 높다고 보고하였으나 이 연구의 대상 환자는 동일한 환자가 아니고 서로 다른 환자라는 문제점을 갖고 있다. 그리고 Garcia-Tsao 등[18]에 따르며 자발성 세균성 복막염 환자와 일반

적인 간경변 환자의 무균성 복수에서 측정한 NO 값이 차이가 없었고 치료 경과에 따른 변화가 없었다. 그러나 위중한 경과를 갖는 환자에서 NO의 값이 비교적 경한 경로를 갖는 환자의 NO 보다 높아서 간기능이 불량한 환자의 예후를 예측하는 경우에 복수 NO를 지표로 사용할 수 있다고 주장하였다.

위와 같이 자발성 세균성 복막염 환자에서도 어떤 경우는 복수 NO가 증가되어 있고 어떤 경우는 증가되어 있지 않다. 어떤 이유로 이와 같은 차이가 발생하는지 뚜렷하지 않지만 일반적으로 대식 세포에서 iNOS의 발현과 점화(priming)가 다르기 때문인 것으로 생각하고 있다.[16]

현재까지 자발성 세균성 복막염 환자에서 NO의 역할에 대한 분명하고도 구체적인 연구 결과는 없다. 본 연구는 자발성 세균성 복막염 환자 38명과 단순 복수만 동반한 간경변증 환자 46명을 대상으로 하여 복수를 채취하였다. 특히 자발성 세균성 복막염 환자군 중 24명에서 치료 경과에 따라 연속적으로 복수를 채취하여 복수 NO 값의 변화를 살펴보고 이중 혈액 채취가 가능하였던 10명에서 혈액과 복수 NO의 값을 측정하여 NO의 변화와 복막염의 진행을 살펴보았다. 자발성 세균성 복막염군에서 대조군보다 복수 NO가 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 연속적으로 복수를 채취할 수 있었던 24명의 환자에서

도 복수 NO의 변화를 살펴 보았으나 통계적으로 유의한 변화는 없었다. 그러나 자발성 세균성 복막염 환자 중에서 7일 째에 cefotaxime에 반응한 군(26명)이 반응하지 않은 군(12명)보다 입원 당시 복수 NO의 값이 증가해 있었다. 그러나 연속적으로 복수 채취가 가능했던 24명에서는 치료 전 NO의 값이 항생제에 반응한 군에서 다소 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다(p-value=0.072). 치료 7일째에는 치료에 반응한 군에서 통계적으로 유의하게 NO가 높아 NO가 복막염 치료에도 관여한다는 기존의 주장과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 NO의 항균 효과를 검증하기 위해서는 복수 대식 세포를 분리 배양하여 iNOS의 발현을 확인하는 과정이 필요할 것으로 생각한다.

과거의 연구들은 복막염 환자에서 연속적으로 복수를 채취하여 NO를 확인하지 못하였으나 본 연구는 연속적으로 복수를 채취하여 지속적으로 NO가 증가한 경우에 복막염이 잘 치료된다는 결과를 보임으로 이전의 연구에 비해 보다 구체적으로 NO의 기능을 살펴보았다고 할 수 있다. 또한 복막염을 치료함에 따라 복수 NO가 증가하지는 않았지만 치료 전에 복수 NO가 증가한 경우에 치료에 양호한 반응을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 혈액과 복수 모두에서 NO를 측정할 수 있었던 10명의 환자를 대상으로 하여 살펴보았을 때 의미 있는 NO의 변화는 없었

지만 치료 전 복수와 혈액의 NO 값이 상관관계가 있는 것으로 보였는데(r^2=0.86, P-value=0.001) 이는 이전의 Garcia-Tsao 등[14]의 결과와 유사한 수치로 혈액 NO가 복수 NO 값을 반영한다고 볼 수 있고 본 연구에서 사용한 NO 측정 방법이 타당하고 신빙성이 있다는 것을 의미한다. 그러나 복막염 환자군에서 NO의 값이 기존의 연구와 달리 대조군과 차이가 없는 이유는 NO를 측정하는 방법과 대상 환자가 다르기 때문인 것으로 생각한다.

본 연구에서는 복막염 환자에서 NO 값의 변화가 심하여 오차를 줄이기 위해서 복수와 혈액의 NO 비를 구하여 변화를 살펴 보았으나 의미 있는 변화는 없었다. 또한 복수 내의 백혈구 수와 NO 생성의 상관 관계를 조사하였으나 유의한 결과를 보이지 않았다. 이와 같은 결과를 보인 이유는 사람마다 복수 대식세포에서의 iNOS 발현 정도가 다르기 때문으로 생각한다.

이상을 요약해 보면 자발성 세균성 복막염 환자군과 단순 복수를 동반한 간경변증 환자의 복수 NO 값은 차이가 없었다. 치료기간에 따른 혈액과 복수에서의 NO의 변화도 없었다. 그러나 치료 전 복수 NO가 높은 경우에 항생제 치료에 비교적 반응을 잘하였고 이와 같은 경우는 치료가 끝난 7일째에도 지속적으로 NO가 상승해 있었다. 치료 전의 혈액과 복수의 NO는 상관 관계를 보여 혈액 NO가 복수 NO의 값을 반영한다고 볼 수

있다.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 자발성 세균성 복막염을 동반한 환자 군과 간경변증 환자 중 단순 복수를 동반한 대조군의 복수 NO를 비교하고 복막염군에서 치료 기간에 따른 복수 및 혈액에서의 NO 값의 변화를 살펴보고자 하였다. 단순 복수를 동반한 간경변증 환자 군에 비해 자발성 세균성 복막염 환자 군에서 복수 NO 값이 높지 않았지만 자발성 세균성 복막염 환자 중에서 항생제 치료에 양호한 반응을 보인 군에서 치료 직전 및 치료 종료 후 높은 NO 값을 보였다. 그리고 복막염 군에서 치료 전의 혈액 NO와 복수 NO의 값 사이에 상관 관계가 있어 혈액 NO가 복수 NO 값을 반영한다고 할 수 있다.

결론적으로 자발성 세균성 복막염 환자에서 치료 전 복수 NO 값이 높은 경우에 항생제 치료에 양호한 반응을 보인다고 할 수 있으며 혈액 NO가 복수 NO를 반영한다고 할 수 있다. 그러나 위의 결과로 복수 NO가 항균 작용을 갖는지는 알 수 없고 NO의 항균 작용의 기전을 정확히 밝혀내기 위해서는 복막염 환자의 복수에서 대식 세포를 분리 배양하여 iNOS의 활성도와 NOx의 관계를 살펴보고 이에 대한 분자학적

수준에서의 연구가 향후 필요할 것으로 생각한다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.

2. Matthew BG, David J, David AW. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1999;276:G315-21.

3. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. J Vasc Res 1994;31:131-43.

4. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994;269:13725-8.

5. Moncada S, and Higgs A. Mechanism of Disease: The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. N Engl J Med 1993:329;2002-12.

6. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry 1988;27:8706-11.

7. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. Hepatology 1993;18:1139-43.

8. Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. Gastroenterology 1993;104:1750-4.

9. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell 1995;81(4):641-50.

10. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120:227-37.

11. Morales-Ruiz M, Jimenez W, Ros J, Sole M, Leivas A, Bosch-Marce M, Rivera F, Arroyo V, Rodes J. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: a host response against bacterial peritonitis. Gastroenterology 1997;112:2056-64.

12. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. Clin Infect Dis 1998;27:669-74.

13. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. Gastroenterology 1993;104:1492-7.

14. Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller

DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. J Exp Med 1992;176:261-4.

15. Spitzer JA. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. Hepatology 1994;19:217-28.

16. Such J, Frances R, Perez-Mateo M. Nitric oxide in patients with cirrhosis and bacterial infections. Metab Brain Dis 2002 Dec;17:303-9.

17. Bories PN, Campillo B, Azaou L, Scherman E. Long-lasting NO overproduction in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. Hepatology 1997;25:1328-33.

18. Garcia-Tsao G, Angulo P, Garcia JC, Groszmann RJ, Cadelina GW. The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial

peritonitis. Hepatology 1998;28:17-21.

19. Kim YM, Hong SJ, Billiar TR, Simmons RL. Counterprotective effect of erythrocytes in experimental bacterial peritonitis is due to scavenging of nitric oxide and reactive oxygen intermediates. Infect Immun 1996;64:3074-80.

20. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. J Hepatol 2000;32:142-53.

21. Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, Guarner C, Planas R, Sola R, Vargas V, et al. Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. Hepatology 1995;21:674-9.

22. Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Bouchier-Hayes D. Nitric oxide mediates hepatocyte injury. Am J Physiol

1998;275:G1117-26.

23. Cardenas A, Bataller R, Arroyo V. Mechanisms of ascites formation. Clin Liver Dis 2000;4:447-65.

24. Jimenez W, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Sole M, Colmenero J, Sort P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. Hepatology 1999;30:670-6.

Abstract

Changes of ascites nitric oxide according to the treatment course in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis

Young Soo Park

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Chae Yoon Chon)

Nitric oxide (NO) is a molecule involved in vascular dilatation and pathogen suppression. It also has immunologic and regulatory function. Cirrhosis is characterized by an increased risk for infections, including spontaneous bacterial peritonitis (SBP). The role of NO in SBP which develops in cirrhosis has not been clearly established.

The aim of this study was to investigate the role of NO in the treatment of SBP and its clinical usefulness. This study was designed to investigate the changes of ascites NO in the

course of treatment. NO is an extremely unstable molecule and is rapidly converted to in vivo to nitrite (NO_2) and nitrate (NO_3). Therefore nitric oxide metabolite (nitrites + nitrates [NOx]) was measured by chemoiluminescence in 84 ascites samples obtained from 84 cirrhotic patients. Among them 38 patients with SBP were treated with cefotaxime 2.0g, q12hr for 7 days. In 24 of SBP patients ascites was obtained consecutively before treatment (day 0), during treatment (day 2), and after treament (day 7). Ascites NO levels were not significantly different between patients with SBP (n=38; mean, 82.3 μM ± 14.4) and patients with sterile ascites (n=46; mean, 54.6 μM ± 13.0). And the change of ascites during treatment was not significant. In SBP patients ascites NOx from patients responded to antibiotics (n=26; mean 101.86 μM) was significantly higher compared with ascites from non-responded patients (n=12; mean, 40.03 μM) before treatment (p=0.044). A very significant direct correlation was found ascites and serum NOx levels before treatment (Pearson correlation, r^2=0.86, P-value=0.001). Among SBP patients with SBP, treatment response rate to antibiotics was

significant higher in those with NO levels ≥ 80 μM in multivariate analysis.In conclusion, ascites NO was not different between ascites from SBP patients and ascites from cirrhotic patients with sterile ascites. There was no change of ascites NOx in SBP patients during the course of treatment. Therefore ascites NO was not useful to determine the progress of SBP. However, ascites NO levels reflect serum NO levels, and patients with higher NO level before treatment may have better response to antibiotics.

Key words: Liver cirrhosis, spontaneous bacterial peritonitis, ascites, nitric oxide