대한산부회지 제44권 제7호 2001
Vol. 44 No. 7 July 2001

조산의 예측에 있어 산모의 질 분비물내 Nitrate와 Nitrite 측정의 유용성

연세대학교 의과대학 산부인과학교실
김영한 · 조재성 · 이창희 · 박용원

=ABSTRACT=

Usefulness of total nitrate and nitrite in vaginal secretions as a predictor of premature delivery

Young Han Kim, M.D., Jae Sung Cho, M.D., Chang Hee Lee, M.D., Yong Won Park, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Objective : This study is directed to determine whether the concentrations of nitrate and nitrite, metabolites of nitric oxide, in vaginal secretions could be used to predict a premature delivery.

Method : A total of 60 pregnant women from March, 2000 to February, 2001 received continuous prenatal care and underwent delivery in our hospital was enrolled in the study. Gestational age was ranged between 20 and 37 weeks. Those patients were divided into four groups according to clinical parameters such as preterm labor, premature rupture of membranes and premature delivery. Specimens were obtained by thorough washing of vagina with 5 mL sterile physiologic sodium chloride solution for determination of nitric oxide metabolites. The total nitrate and nitrite concentration was determined by treatment with nitrate reductase followed by the Griess reaction.

Results : Subjects were divide into four groups (group I, no preterm labor and term delivery 〔n=19〕; group II, preterm labor and term delivery 〔n=12〕; group III, preterm labor and consequent premature delivery 〔n=6〕; Group IV, preterm labor with premature rupture of membranes and consequent premature delivery 〔n=23〕). Total nitrate and nitrite concentrations in group II-IV (62.2±50.3 μmol/L in group II, 113.3±77.0 μmol/L in group III, 101.9±72.4 μmol/L in group IV) were significantly higher than the concentration in Group I (9.4±11.9 μmol/L). From the receiver operating characteristic curve in the prediction of premature delivery, we set 27.6 μmol/L as a cut-off value in this study. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were 71.9%, 78.6%, 79.3%, and 71.0%, respectively.

Conclusion : Patients with premature delivery do have increased nitric oxide metabolites in vaginal secretions. These results suggest that nitric oxide may be involved in the initiation of cervical ripening and used as a predictor of premature delivery.

Key Words : Nitric oxide, Nitrate, Nitrite, Premature delivery

일반적으로 조기 진통과 이에 따른 조기 분만은 산과 분야에 있어서 중요한 문제 중의 하나로 신생아의 유병률과 사망률에 많은 영향을 끼친다. 조기 진통은 현재까지 다인자적인 원인이 그 이유로 그 중 감염이 중요한 원인으로 제시되어지고 있으나 아직까지 정확한 이유는 거의 모르는 실정이며 따라서 특별한 이유없이 발생하는 특발성 조기 진통 또한 흔한 진단이 되고 있다. 그간 많은 연구에도 불구하고 조기 진통과 조기 분만의 예측과 치료에 유용한 방법은 현재까지 알려져 있지 않다. 최근에 수많은 생물학적 과정의 매개인자 (mediator)로

접수일 : 2001. 5. 16.
주관책임자 : 박용원
*본 연구는 2000년 연세대학교 의과대학 강사연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.
*본 연제는 2001년 대한산부인과 춘계학술대회에서 구연되었음.

알려진 nitric oxide (NO)가 자궁, 태반, 자궁 경부에 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되고 있다.[1,2] NO는 L-arginine의 기질로부터 nitric oxide synthase (NOS)라는 효소의 작용으로 L-citrulline과 함께 그 부산물로 얻어진다. 이후 NO는 곧바로 nitrite와 nitrate로 전환되거나 peroxynitrite를 형성한다.[3]

최근 prostaglandin (PG) E_2 제제와 비교할 만한 NO donor의 자궁 경부 숙화 (ripening) 효과가 알려져 있고,[4] 융모양막염 (chorioamnionitis)이 있는 산모의 양수내에서 lipopolysaccharide (LPS)의 농도가 증가되어 있으며 이러한 산모에서 NO의 안정된 부산물 (metabolite)인 nitrate와 nitrite가 혈청 (serum)내 증가되어 있다는 사실이 보고되었다.[5] 따라서 자궁 경부 숙화에 관련이 있는 것으로 알려져 있는 NO의 부산물인 nitrite와 nitrate를 질 분비물 내에서 측정하고 이를 조기 진통과 관련이 있는 여러 인자와의 비교를 통하여 조산의 위험성을 예측하고자 하며 그 유용성을 확립하여 임상에 적용하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2000년 3월부터 2001년 2월까지 1년간 연세대학교 의과대학 부속 신촌 세브란스 병원에서 정기적인 산전 진찰과 분만이 가능하였던 총 60명의 산모를 대상으로 하였다. 임신과 관련된 질병이나 약물 복용의 기왕력이 있는 산모는 대상군에서 제외하였고, 외래 또는 입원하여 분만실에서 검체를 얻을 때의 산모의 재태 연령이 20주 이전이거나 37주를 지난 경우는 제외하였다. 조기 진통 유무, 조기 양막 파수 유무, 조기 분만 유무에 따라 대조군과 실험군으로 나누었다. 조기 진통이나 조기 양막 파수가 없고 만삭에 분만이 이루어졌던 군을 대조군 (group I, n=19)으로, 조기 진통만 있고 만삭에 분만이 이루어졌던 군 (group II, n=12), 조기 진통만 있고 조기 분만이 이루어졌던 군 (group III, n=6), 조기 진통과 조기 양막 파수가 모두 있고 조기 분만이 이루어졌던 군 (group IV, n=23)을 실험군으로 나누어 결과를 분석하였다. 조기 진통은 자궁 경부의 개대 (dilatation)나 소실 (effacement) 등의 변화를 동반하는 규칙적인 자궁 수축이 있을 때로 정의하였고, 조기 양막 파수의 진단은 질 후원개 (posterior fornix)에서 양수의 pooling 소견이 관찰되거나 nitrazine 검사상 양성 또는 fern 검사상 양성일 때로 하였다.

2. 검체 분석

1) 검체 수집

무균 처리된 생리 식염수 5 cc로 산모의 질내를 세척하여 검체를 얻어 15분 동안 10,000 g로 원심분리하여 분만 후 분석될 때까지 상층액 (supernatant)을 -70°C에서 냉동 보관하였다.

2) 검체 준비

검체의 분석은 NO assay kit (R&D system, USA)를 이용하였다. 검체를 상온에서 녹인 후 10,000 g로 원심분리하여 상층액 (supernatant)을 얻은 후 reaction buffer로 최소한 2배 희석하였다. 이렇게 얻어진 검체에서 100 μL를 취하여 reaction buffer 100 μL와 다시 혼합한 후 10,000 molecular weight filter로 단백질을 제거하였다. Sodium nitrite 용액을 사용하여 nitrite와 nitrate의 표준 curve를 구하였다.

3) 내인성 (endogenous) nitrite 분석

Blank well에 200 μL의 reaction buffer, zero standard well에 50 μL의 reaction buffer, 나머지 well에 nitrite standard와 검체를 각각 50 μL를 준비한 후 모든 well에 50 μL의 reaction buffer를 첨가하고, 다시 blank well을 제외한 나머지 well에 각각 50 μL의 Griess reagent I과 Griess reagent II를 순차적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 10분 동안 상온에서 방치하였다. 모든 검체의 반응은 96-well microplate에서 진행되었고 microplate reader를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를 구하였다.

4) Nitrate reduction 분석

Blank well에 200 μL의 reaction buffer, zero standard well에 50 μL의 reaction buffer, 나머지 well에 nitrate standard와 검체를 각각 50 μL를 준비한 후 모든 well에 25 μL의 NADH용액을 첨가하였다. 다시 모든 well에 25 μL의 nitrate reductase를 첨가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 30분 동안 incubation하였다. 이후 blank well을 제외한 나머지 well에 각각 50 μL의 Griess reagent I과 Griess reagent II를 순차적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 10분 동안 상온에서 방치하였다. 상기 방법과 마찬가지로 총 nitrite의 농도를 구하고 내인성 nitrate의 농도를 감하여 nitrate의 농도를 구하였다.

3. 통계 분석

SPSS 9.0 통계 프로그램을 이용하여, 각 군의 특성과 nitrate와 nitrite 농도의 비교는 one way analysis of variance (ANOVA), 임상 인자 (clinical parameter) 유무에 따른 비교는 student's t-test를 실시하였으며 p값이 0.05 미만일 때를 유의하다고 판정하였다. Receiver operating curve를 이용하여 조기 분만에 따른 nitrate와 nitrite의 임계치 (cut-off value)를 구하여 그 효과를 알아보았다.