생명과학회지
Korean J. Life Science, 9(2), 201~206, 1999

신생아의 혈청내 Nitric Oxide와 Erythropoietin의 생성

정현기† · 김광혁*

고신대학교 의학부 소아과학교실
*고신대학교 의학부 미생물학교실

Production of Nitric Oxide and Erythropoietin in Serum of Newborn

Hyun-Kee Chung† and Kwang-Hyuk Kim*

Department of Pediatrics, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea
**Department of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

Abstract

Nitric oxide(NO) is a potent and selective pulmonary artery vasodilator. Erythropoietin(EPO) is produced in the kidney in response to reduced oxygen availability. In this study, blood samples were collected for determination of NO and EPO concentrations in 18 normal newborns and 16 newborns with respiratory distress syndrome(RDS). Serum was measured by Ding's method for NO concentration and by enzyme-linked immunosorbant assay for EPO concentration. Nitrite ion concentration in serum was 14.9±3.2 μM in normal control group and 12.8±3.3 μM in RDS group. EPO concentration in serum was 16.2±3.4 mU/ml in normal control group and 21.2±5.4 mU/ml in RDS group. These results show the decrease of NO and increase of EPO in RDS newborn patients in comparison with normal newborns. Such imbalances may contribute to the development of several clinical symptoms.

Key words – Repiratory distress syndrome, Nitric oxide, Erythropoietin

서 론

Nitric oxide(NO)는 사이토카인이나 미생물의 영향을 받아 대식세포, 호중구, 혈관내피세포, 활막표층세포, 활막섬유아세포, 연골세포 등에서 생성되는 반응질소중간체(reactive nitrogen intermediates, RNI)로서 nitric oxide synthase(NOS)가 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다[8,15,30]. 생성된 NO는 생체내에서 혈관이완물질, 신경전달물질, 면역기능조절물질로서 작용할 뿐만 아니라 패혈증이나 염증반응에 관련하게 된다. 즉, 면역염증반응을 통한 항미생물작용 혹은 항암작용을 일으키는 것으로 알려져 있으며 이러한 독작용은 미토콘드리아 기능 억제, FeS함유 효소기능 저하, DNA손상 등의 작용에 의하여 나타나기 때문에 과량의 NO생성시 정상조직에 손상을 주게 된다. 내피세포나 혈관 연조직세포들은 감염과정에서 내독소(endotoxin), tumor necrosis factor-α (TNF-

† Corresponding author

α) 혹은 interferon-γ (IFN-γ) 등에 반응하여 NO를 생성할 수 있다[2,7,18,19,24,32,34]. NO의 방출은 현재 패혈성 환자에서 저혈압과 쇽의 주요인자로 생각되고 있다[3,25]. 사이토카인에 의해서 활성화된 순환성 대식세포 또한 NO를 생성함으로서 세포독성에 관련을 갖고 있다[5,14,16, 20,31]. 호중구 또한 NO를 생성한다는 것은 쥐의 백혈구 실험들에서 보고되고 있다[27]. Nitric oxide (NO)는 면역능과 혈관확장을 조절하는 주요 messenger분자로서 또는 뇌와 말초신경계에서 neurotransmitter로서 작용한다. NO는 대식세포능의 한가지 mediator임이 동물생리에서 인식되고 있고 대식세포에서 NO생성이 중단되었을 때 이 세포의 항종양성 및 항균성을 잃어버림으로서 NO가 대식세포능의 결정적 인자임을 알 수 있다. Endothelial-derived relaxing factor는 바로 nitric oxide인 것으로 밝혀졌으며 NO는 guanylyl cyclase를 활성화하여 cGMP를 생성시키며 이들에 의하여 근육이완에 관계하는 cGMP- dependent protein kinase를 자극시킨다[25].

Erythropoietin(EPO)은 내분비호르몬의 기능을 갖는 당단백 성장인자이다. EPO는 저하된 산소 이용도에 영향을 받아 신장에서 생성된다. 생성된 이들 물질은 혈류를 따라 순환하면서 적색골수내의 세포들에 작용하여 적혈구 생성율을 조절한다. EPO는 30,400의 분자량을 나타내고 있으며 사람과 설치류 사이에 80 % 상동성을 보이고 있다. 정상적인 조건하에서 EPO생성은 산소의 공급과 소비에 관련된 몇가지 생리적 파라미터에 의해서 영향을 받는다. 순환중의 EPO 수준은 정상적인 적혈구용적이 유지될 수 있도록 적혈구생성을 조절한다. EPO는 급성혈액결손이나 정상신장기능을 가진 빈혈증에서 증가를 보이고 있으며 반대로 진행성신장질환을 나타내는 빈혈증에서 감소를 보인다. 따라서 EPO의 양적 수치는 적혈구 량의 비정상적인 증가를 보이는 질환인 적혈구증다증이나 빈혈증을 분별해 내는데에 이용될 수 있다[6,17,29,33].

신생아 호흡곤란증후군(Respiratory distress syndrome, RDS)은 폐의 발달 미숙으로 인하여 제 II 형 폐포에서 폐의 지속적인 팽창을 유지시켜 주는 물질인 폐표면 활성제(pulmonary surfactant)의 부족으로 무기폐를 초래하는 대표적인 진행성 호흡부전의 하나이다. 신생아의 폐고혈압 지속증(Persistent Pulmonary Hypertension of Newborn, PPHN)은 대개 만삭이나 과숙아에서 일어나며 출생시 질식, 태변흡입증후군, B군 연쇄상구균 폐혈증, 저혈당, 적혈구과다증 등에 의해서 2차적으로 오기도 하나 미숙아에서 흔히 보는 신생아 호흡곤란증후군도 원인이 된다[10,12, 13,22]. 본 연구에서는 정상 및 호흡곤란 신생아의 혈청내에 존재하는 endothelial-derived relaxing factor인 NO생성을 관찰하고 erythropoetin의 생성을 봄으로서 정상 신생아에서의 NO 및 erythropoetin생성능의 정상치를 설정함과 아울러 호흡곤란 신생아에서의 NO 및 erythropoetin 생성능과 호흡곤란 관련성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 검사시료의 준비

고신의료원의 소아과에 내원한 호흡곤란 신생아환자 16명과 정상신생아 18명으로 부터 혈액 5 ml 씩을 채취하여 응고시킨후 원침을 통한 혈청분리를 시행하였다. 분리된 혈청은 deep freezer에 보관하여 다음 시험을 준비하였다.

2. Nitrite ion 정량분석

Nitric oxide의 측정은 nirite ion 측정법인 Ding 등의 microplate검사법에 준하여 시행하였다. 즉 deep freezer에 보관된 혈청을 실온에서 해빙하여 각 각으로 부터 0.1 ml 씩의 시료를 96 wells microplate (Costar, U.S.A.) 로 옮긴 다음 Griess 시약 [1 % sulfanilamide (Sigma) / 0.1 % naphthylethylene diamine dihydrochloride (Sigma) / 2.5 % phosphoric acid (Junsei)] 0.1 ml 씩을 작용시킨 후 실온에서 10분 동안 방치하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, U.S.A.) 를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (Hayashi) 로 작성하였다.

3. Erythropoietin 정량분석

Erythropoietin의 측정은 PREDICTA® Human Erythropoietin ELISA kit (Genzyme, Cambridge, U.S.A.) 을 이용하였다. 간략하면 미리 erythropoietin에 대한 모노클론 항체가 부착된 96 wells microplate 의 각 well에 희석액 100 $\mu\ell$ 씩 을 적하한 다음 시료를 25 $\mu\ell$ 씩을 가하여 혼합한 후 37 ℃ 배양기에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 biotinylated 항체 액 100 $\mu\ell$ 씩

을 적하하여 다시 37 ℃ 배양기에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 streptavidin 액 100 ㎕ 씩을 적하하여 다시 37 ℃ 배양기에서 15분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine 기질액 100 ㎕ 씩 을 적하하여 다시 실온에서 10 분동안 방치하였다. 여기에 stop 액 100 ㎕ 씩 을 가하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, U.S.A.) 를 이용하여 450 nm 에서 측정하였다. standard curve 작성을 위한 시험도 동시에 시행하였다.

4. 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 이하일 때 의의 있는 차로 간주하였다.

결과 및 고찰

출생후 분만아가 호흡을 시작하면 폐동맥압과 폐혈관 저항은 급격히 감소하고 폐혈류량은 증가하나, 이러한 태아기에서 신생아기로 이행하는 순환의 변화기전은 정확히 알려져 있지 않다. 보고에 의하면 NO는 혈관 내피상포로부터 L-일지닌에서 내부적으로 합성되어, 태아나 신생아의 휴식시 폐혈관 긴장도를 유지하는 중요한 매개물질로 알려져 있으며, 이행기 동안 분비된 NO 의 역할은 아직 확실히 모르고 있다[4,9,26].

Abman등[1]은 NO합성을 단기간 억제하여 출생시 폐혈류량이 정상적으로 증가되는 것이 약화됨을 관찰하고 NO가 출생시 폐혈관 저항의 감소에 중요한 역할을 함을 시사하였으며, 최근에는 소량의 NW-nitro-L- arginine 사용으로 기본 폐동맥압이나 폐혈관 저항의 증가없이 출생시 폐동맥압의 감소는 완전히 차단되고 폐혈관 저항의 감소는 약화되었음을 보고하고 있는데[11], 이들은 모두 출생시 폐순환의 이행에 있어서 NO가 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 것이라고 하겠다. 내피세포유래의 nitric oxide(NO)는 강력한 혈관 이완물질로 작용하기 때문에 내피세포에서 NO생성계가 손상을 입었을 때 폐고혈압과 같은 질병이 발생하는 것으로 생각되고 있다[21]. 호흡기질환의 치료에 NO를 흡입시킴으로서 NO를 폐혈관확장제로 이용하기도 한다[11]. NO흡입은 신생아의 여러 질병을 치료하는 데에 새로운 유망 치료법이 되고 있다. 이 치료법은 호흡을 하고 있는 데도 저산소증을 나타내는 미숙신생아나 이산화탄소 배출에 손상을 받은 신생아에 유익할 것이며 선천성심장질환을 나타내는 신생아의 경우 폐고혈압과 관련을 갖고 있다면 NO이용이 유리할 것으로 보고되고 있다[28]. 특히 NO는 신생아의 지속성폐고혈압의 치료에 특효가 있는 것으로 입증되고 있다. NO흡입요법은 성인호흡곤란 증후군뿐만 아니라 원발성폐고혈압증과 만성장애성폐질환의 치료에도 이용되고 있다. 흡입을 통하여 취해진 NO는 전신적 순환에는 효과를 나타내지 않고 선택적으로 폐혈관확장제로서 작용한다. NO치료는 폐고혈압지속이나 저산소 호흡장애를 나타내는 신생아들에서 산소공급의 원활을 나타냈다고 보고되고 있다[23]. erythropoietin (EPO)은 저하된 산소 이용도에 영향을 받아 신장에서 생성된 다음 이들 물질은 혈류를 따라 순환하면서 적색골수내의 세포들에 작용하여 적혈구 생성율을 조절한다. 본 연구에서는 정상 및 호흡곤란증후군 신생아로부터 혈액을 취하여 혈청내에 NO와 EPO량을 측정함으로서 정상 및 호흡곤란 신생아의 NO생성능을 비교하고 호흡곤란증후군 신생아의 저산소증에 의한 EPO생성의 변화를 관찰하였다.

정상신생아의 혈청내 nitrite ion은 14.9±3.2 μM을 나타냈고 호흡곤란신생아군에서는 12.8±3.3 μM을 나타냄으로서 정상 대조군보다 호흡곤란군이 NO생성량이 낮음을 볼 수 있었으며 대조군에서는 측정치들의 상당수가 Figure의 상부에 위치함에 비하여 호흡곤란군에서는 하부에 존재함으로 봐서 호흡곤란군에서 NO생성이 저하되 있는 것만은 분명하다. 그러나 통계학적 유의성은 나타내지 않았다(Fig. 1, Table 1). 따라서 앞으로 시료수의 폭을 더 넓혀 실험을 시행한다면 더욱 확실한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

정상신생아의 혈청내 EPO는 16.2±3.4 mU/ml을 나타냈고 호흡곤란신생아군에서는 21.2±5.4 mU/ml을 나타냄으로서 정상 대조군보다 호흡곤란군이 EPO생성량이 많음을 알 수 있었으며 통계학적으로 매우 유의한 차이를 나타냄으로서 호흡곤란군에서 EPO생성이 촉진되어 있다(Fig. 2, Table 1). 따라서 EPO생성의 증가에 의한 적혈구증다증의 출현가능성도 배제할 수가 없다하겠다.

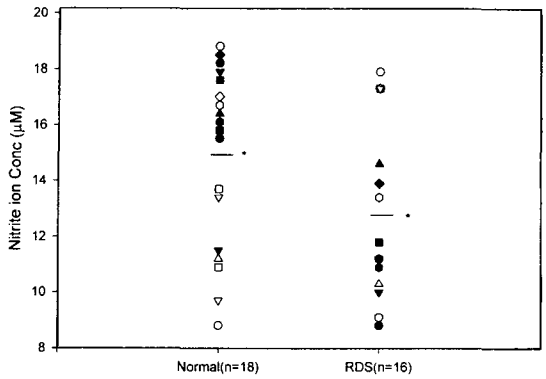

Fig. 1. Nitric oxide levels in blood of normal newborns and newborns with respiratory distress syndrome(RDS).
*points to means each.

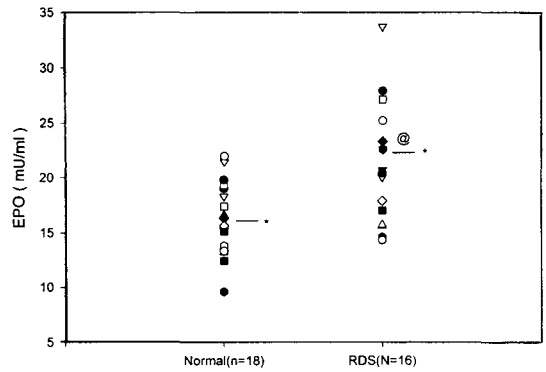

Fig. 2. Erythropoietin(EPO) levels in blood of normal newborns with respiratory distress syndrome (RDS).
*points to means each.
@: significantly different from the normal with P<0.001.

Table 1. Nitric oxide and erythropoietin(EPO) levels in blood of normal newborns and newborns with respiratory distress syndrome(RDS)

Group	Nitrite ion (μM)	EPO (mU/ml)
Normal(n=18)	14.9±3.2	16.2±3.4
RDS(n=16)	12.8±3.3	21.2±5.4*

*significantly different from the normal with P<0.001.

요 약

본 연구는 정상 및 호흡곤란 신생아의 혈청내에 존재하는 nitrio oxide(NO)의 생성을 관찰하고 erythropoietin (EPO)의 생성을 보기 위하여 정상 신생아 18명과 호흡곤란 신생아 16명으로부터 혈액을 채취하여 혈청내에서의 NO 및 EPO 생성량을 enzyme-linked immunosorbant assay법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상신생아의 혈청내 nitrite ion은 14.9±3.2 μM을 나타냈고 호흡곤란신생아군에서는 12.8±3.3 μM을 나타냄으로서 정상 대조군보다 호흡곤란군이 NO생성량이 낮음을 알 수 있었다.

2. 정상신생아의 혈청내 EPO는 16.2±3.4 mU/ml을 나타냈고 호흡곤란신생아군에서는 21.2±5.4 mU/ml을 나타냄으로서 정상 대조군보다 호흡곤란군이 EPO생성량이 많음을 알 수 있었으며 통계학적으로 매우 유의한 차이를 나타냈다.

이상의 결과에서 호흡곤란증후군에서는 정상대조군에 비하여 NO생성이 대체적으로 저하되어 있음을 알 수 있었고 반대로 EPO의 생성은 증가되어 나타남으로서 EPO 상승에 따른 임상증상도 발현될 가능성이 있다하겠다.

감사의 글

본 논문은 1997년 고신대학교 의학부 기초임상공동연구비의 지원에 의해 이루어 졌으며 이를 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Abman, S. H., B. A. Chatfield, S. L. Hall and I. F. McMurtry. 1990. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *Am J Physiol.* **259**, 1912-1927.
2. Adams, L. B., S. G. Franzblau, Z. Vavrin, J. B. Hibbs and J. L. Krahenbuhl. 1991. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol.* **147**, 1642-1646.
3. Bredt, D. S. and S. H. Snyder. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**, 682-685.

4. Castillo, L., T. DeRojas-Walker, Y. M. Yu, M. Sanchez, T. E. Chapman, D. Shannon, S. Tannenbaum, J. F. Burke and V. R. Young. 1995. Whole body arginine metabolism and nitric oxide synthesis in newborns with persistent pulmonary hypertension. *Peditr Res.* **38(1)**, 17-24.
5. Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* **175**, 1111-1122.
6. Christensen, R. D., K. W. Liechty, J. M. Koenig, K. R. Schibler and R. K. Ohls. 1991. Administration of erythropoietin to newborn rats results in diminished neutrophil production. *Blood.* **78(5)**, 1241-1246.
7. Cui, S., J. S. Reichner, R. B. Mateo and J. E. Albina. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 2462-2467.
8. Curran, RD, T. R. Billiar, D. J. Stuehr, K. Hofmann and R. L. Simmons. 1989. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. *J Exp Med.* **170**, 1769-1774.
9. Dinh-Xuan, A., T. W. Higenbottam, C. A. Clelland, J. Pepke-Zaba, G. Cremond, A. Y. Butt, S. R. Large, F. C. Wells and J. Wallwork. 1991. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *New Eng J Med.* **324**, 1539-47.
10. Drummond, W. H., G. J. Peckham and W. W. Fox. 1977. The clinical of the newborn with persistent pulmonary hypertension: Observation in 19 affected neonates. *Clin Pediatr* **16**, 335-341.
11. Finer, N. N. and K. J. Barrington. 1997. Nitric oxide in respiratory failure in the newborn infant. Semin Perinatol. **21**, 426-440.
12. Geggel, R. L. and L. Reid. 1984. The structural basis of PPHN. *Clin Pediatr* **11**, 525-549.
13. Goldstein, J. D., M. Rabinovitch and R. VanPraah. 1979. Unusual vascular anomalies causing persistent pulmonary hypertension in a newborn. *Am J Cardiol* **43**, 962-968.
14. Hibbs, Jr., J. B., R.R. Taintor and Z. Vavrin. 1987. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* **235**, 473-476.
15. Hibbs, J. B., Z. Vavrin and R. R. Taintor. 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.* **138**, 550-565.
16. Higuchi, M., N. Higashi, H. Taki H and T. Osawa. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages : Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol.* **144**, 1425-1431.
17. Hung, G. Y., M. J. Jeng, C. Y. Lin, W. J. Soong and B. Hwang. 1998. The relationship between serum and sliva erythropoietin concentrations in adults, full-term and premature infants. *Chung Hua Min Kuo Hsiao Erh Ko I Hsa Chih.* **39(6)**, 380-385.
18. Konur, A., S.W. Krause, M. Rehli, M. Kreutz and R. Andreesen. 1996. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide. *J Immunol.* **157**, 2109-2115.
19. Lane, T. E., B.A. Wu-Hsieh and D. H. Howard. 1994. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* **62**, 1940-1945.
20. Liew, F. Y., S. Millott, C. Parkinson, R. M. Palmer, S. and Moncada. 1990. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 4794-4797.
21. Marriott, H. and T. Higenbottam. 1997. The role of nitric oxide in respiratory disease. *Schweiz Med Wochenschr.* **127**, 709-714.
22. Mauskopf, J.A., M.E. Backhouse, D. Jones, D.E. Wold, M. C. Mammel, M. Mullett, R. Guthrie and W. Long. 1995. Synthetic surfactant for rescue treatment of respiratory distress syndrome in premature infants weighing from 700 to 1350 grams: Impact on hospital resource use and charges. *J Pediatr.* **126(1)**, 94-101.
23. Mercier, J. C., T. Lacaze, L. Storme, J. C. Roz, A. T. Dinh Xuan and M. Dehan. 1998. Disease-related response to inhaled nitric oxide in newborns with severe hypoxaemic respiratory failure. *Eur J Pediatr.* **157(9)**, 747-752.
24. Morin, A. M. and A. Stanboli. 1994. Nitric oxide synthase localization in cultured cerebrovascular endothelium during mitosis. *Exp Cell Res.* **211**, 183-188.
25. Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endotherium-derived relaxing factor.

Nature. **327**, 524-526.
26. Roberts, J. D. and P. W. Shaul. 1993. Advances in the treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Clin Nor Am*. **40(5)**, 983-1004.
27. Schmidt, H. H. H. W., R. Seifert and E. Bohme. 1989. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL 60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. *FEBS lett*. **244**, 357-360.
28. Skimming, J. W. 1998. Nitric oxide inhalation therapy for newborn infants. *Curr Probl Pediatr*. **28(8)**, 253-264.
29. Stoutenborough, K. A., J. M. Sutherland, H. A. Meineke and I. J. Light. 1969. Erythropoietin levels in cord blood of control infants and infants with respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr Scan*. **58(2)**, 121-4.
30. Stuehr, D. J. and M. A. Marletta. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis : Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82**, 7738-7742.
31. Tayeh, M. A. and M. A. Marletta. 1989. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *J Biol Chem*. **264**, 19654-19658.
32. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson and E. Balish. 1995. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect Immun*. **63**, 1142-1144.
33. Yamashita, H., J. Kukita, S. Ohga, H. Nakayama, K. Akazawa and K. Ueda. 1994. Serum erythropoietin levels in term and preterm infants during the first year of life. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. **16(3)**, 213-8.
34. Zhang, X., E. W. Alley, S. W. Russell and D. C. Morrison. 1994. Necessity and sufficiency of beta interferon for nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun*. **62**, 33-40.