

단순 작업성 심관류 모델에서의 신생돈 심장의 보존 후 백혈구- 제거 혈액을 이용한 재관류가 심근 VCAM-1 발현 및 심기능에 미치는 영향

이 정 렬* · 석 철 준** · 서 정 욱** · 한 재 진***

Effect of reperfusion with leukocyte-depleted blood on the expression of myocardial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and myocardial function in isolated working heart perfusion model

Jeong Ryul Lee, M.D.*, Chul Jun Suk, B.S.**, Jeong Wook Seo, M.D.**
Jae Jin Han, M.D.***

Background: Adhesion of leukocytes to myocardium or vascular endothelium has been known as an important initial step in the ischemia-reperfusion injury which may affect the cardiac function. Therefore, leukocyte-depleted reperfusion may inhibit ischemia-reperfusion induced functional and ultrastructural deterioration. In this study, we quantified the time-dependent expression of the vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) on piglet myocardium and demonstrated its relation to functional recovery using isolated piglet working heart perfusion model. **Material and Method:** Neonatal(1 to 3 day old) piglet heart was harvested with 4 °C University of Wisconsin solution(UWS) and preserved in the same solution for 12 hours. Ex vivo model of an isolated working neonatal piglet heart perfusion consisting of membrane oxygenator and roller-pump was used(Fig. 1). Hearts were grouped into leukocyte-non-depleted(group A, n=8) and leukocyte-depleted group(group B, n=8). In group B, hearts were reperfused with leukocyte-depleted blood using a leukocyte filter (Sepacell R, Asahi Medical, Japan). Segments of right atrium were taken before and after 1, 2, 3, and 4 hours of reperfusion for the evaluation of expression of VCAM-1. The intensity of immunohistochemical staining of the VCAM-1 on the myocardium were graded semiquantitatively(0 to 4). For the evaluation of myocardial functions stroke work indices were calculated as well at the same time-points. **Result:** Mean expressions of VCAM-1 on

*서울대학교 어린이병원 흉부외과, 서울대학교의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교의학연구원 심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Childrens Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Medical Research Center, Heart Research Institute.

**서울대학교병원 병리과, 서울대학교 의과대학 병리학 교실, 서울대학교 의학연구원 심장연구소

Department of Pathology, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Medical Research Center, Heart Research Institute

***이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ewha Womans University, College of Medicine

†본 논문은 1997년도 학술진흥재단의 자유공모과제연구비 지원에 의하여 연구되었음.

논문접수일 : 99년 12월 27일 심사통과일 : 2000년 3월 13일

책임저자 : 이정렬(110-744) 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 어린이병원 흉부외과. (Tel) 02-760-2877, (Fax) 02-765-7117

E-mail : jrl@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다

the myocardium at 0, 1, 2, 3, and 4 hours of reperfusion were 0.63, 1.44, 1.64, 2.65, and 3.34 in group A, while 0.56, 1.40, 1.50, 1.88 and 2.14 in group B(Fig. 3). Mean stroke work indices at 0.5, 1, 2, 3, and 4 hours after reperfusion were 1.35×10^4 , 1.32×10^4 , 1.14×10^4 , 0.81×10^4 , and 0.68×10^4 erg/gm in group A, while 1.40×10^4 , 1.43×10^4 , 1.34×10^4 , 1.28×10^4 , and 1.12×10^4 erg/gm in group B(Fig. 4). **Conclusion:** In this study, we demonstrated that leukocyte-depletion attenuated the expression of VCAM-1 during reperfusion and the time-dependent functional deterioration of the myocardium was well correlated with the degree of VCAM-1 expression.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:213-20)

Key words : 1. Reperfusion injury
2 Myocardial reperfusion injury
3. Leukocyte
4, Adhesion molecules

서 론

심장이식술 후 허혈-재관류 손상에 있어서 백혈구의 혈관 내피 세포 부착은 매우 중요한 초기 과정이다. 허혈 상태의 심장을 재관류시키면 혈관내 백혈구는 혈관 내피 세포에 의해 활성화되고 그 결과 혈관 내피 세포 혹은 심근에서의 결합기인 부착물질들의 발현이 증가한다. 따라서 백혈구 제거 혈액을 이용하여 재관류하면 부착 물질(adhesion molecule) 발현의 감소로 염증반응을 경감시키고 이것이 허혈-재관류 손상을 줄이는 항염증반응(antiinflammatory)으로 유용한 심근보호법이 될 수 있다는 사실에 대한 반증이 될 것이 분명하다. 이러한 가정은, 동물 실험에서 백혈구-제거 재관류가 심기능 회복이나 심장의 미세 구조 유지에 도움이 된다는 사실로 입증된 바 있다. 그러나 대부분의 연구가 단순히 관상동맥을 절찰하거나 지지 동물(supporter animal)을 사용한 재관류 모델에서 관찰한 연구들이었으며, 재관류 4시간 이내의 비교적 초기 혈관부착물질의 발현의 시간 경과에 따른 변화 양상을 증명한 연구는 없었다^{1,2)}. 이에 저자 등은 본 연구에서 신생돈 심근을 이용하여, 백혈구 제거 여과기에 통과시켜 미리 재관류혈 중의 백혈구를 제거함으로써 단순 작업성 순환 회로내 백혈구 수치를 5%미만으로 유지하면서 시간 경과에 따른 심근 내 VCAM-1의 발현 양상을 관찰하여 이를 백혈구-비제거 재관류군과 비교하고 이러한 부착물질 발현 정도와 심기능 회복에 상관 관계가 존재하는지를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

실험동물

생후 1~3일된 신생돈(Yorkshire)을 사용하였으며, 백혈구-제거 여부에 따른 혈관세포 부착물질의 발현을 비교하기 위

하여 실험군을 나누었다. 백혈구-비제거군이 8마리였고, 막성 필터(Sepacell R, Asahi Medical, Japan)를 이용 백혈구 제거 혈액으로 재관류를 시행한 백혈구-제거군이 8마리였다.

실험방법

심장적출: 생후 3일 이내(체중 2~3 kg)의 신생돈에 케타민(100 mg/kg)을 근주하여 마취를 유도하고 수술대로 옮긴 후 사지를 결박하여 앙와위(supine position)를 만들고, 전경부에 2% 리도케인(lidocaine)을 피하 주사하여 국소 마취 시킨 후 기관절개술을 시행하였다. 기도내 도관은 내경 4 Fr. 크기를 사용하였으며 인공호흡기(Servo 900, USA)와 연결하여 100% 흡기산소로 1회 흡기량 60 cc, 분당 20~30회의 인공호흡을 시작하였다. 정중흉골절개로 개흉한 후 흡선과 전방 심낭을 충분히 제거하여 심장과 연결되어 있는 대혈관들이 충분히 노출되도록 하였다. 심장을 우측으로 견인하면서 좌측에 있는 반기정맥(hemiazygos vein)과 좌측 무명동맥(innominate artery)을 0-흑색명주사(black silk)로 절찰하였다. 0-흑색명주사를 이용하여 하행대동맥(descending aorta), 우측 무명동맥, 상공정맥(superior caval vein), 하공정맥(inferior caval vein), 주폐동맥(main pulmonary artery)에 혈관고(vessel loop)를 걸어두었다. 헤파린(heparin)과 항생제(cefpiramide)를 각각 300 Unit/kg, 50 mg/kg 용량으로 주폐동맥을 통하여 주사하였다. 우측 무명동맥에 특별히 고안된 12 gauge 도관을 이용하여 삽관한 후 동맥압을 감시하였다. 상공정맥과 하공정맥을 절찰하고 폐정맥과 주폐동맥에 소절개를 가하여 좌우 양심실 감압조치를 동시에 시행한 후 하행대동맥을 혈관 감자(clamp)로 차단하였다. 가루얼음(ice slush)을 이용하여 심장 외부 국소 급속 냉각을 동시에 유도하면서 우측 무명동맥 도관을 통해 4℃의 위스콘신대학용액을 평균 관류압 60 mmHg로 2분간 주입하여 심정지를 유도하고 주입량을 기록해 두었다. 하행대동맥, 좌측반기정맥, 무명동맥, 상공정맥,

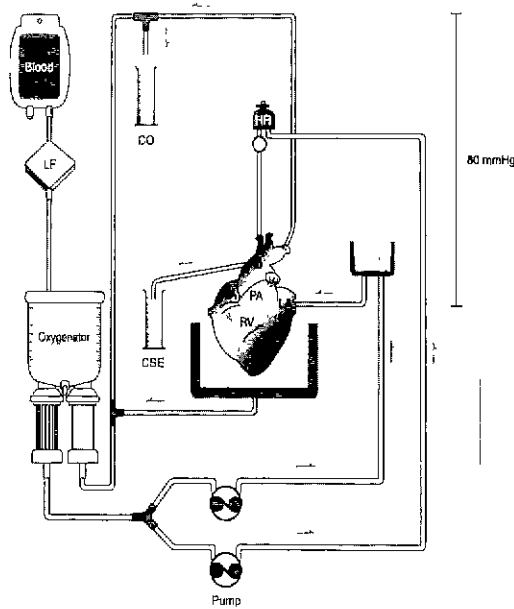


Fig. 1. Diagram of the Isolated Working Heart Perfusion Circuit Donor blood with (LD group) or without (control group) passing through a leukocyte filter, is pumped to either the aortic root or a reservoir that supplies the left atrium. Afterload is set to 80 mmHg by the height of the aortic column. Cardiac output is measured by timed collections of the coronary sinus effluent and overflow from the aortic column. LF: leukocyte filter, CO: cardiac output, CSE: coronary sinus effluent, HR: heated reservoir, Ao: aorta, PA: pulmonary artery, RA: right atrium, LA: left atrium, RV: right ventricle, LV: left ventricle.

하공정맥, 주폐동맥을 차례대로 결찰부위보다 원위부에서 절제한 후, 좌심방 끝동(cuff)을 최대한 많이 남기면서 적출을 완료하였다. 이때 우측 무명동맥 도관은 그대로 남겨두었다.

심근 보호액 및 심장 보관: 심정지액으로는 심근보호능 및 혈관 부착 물질의 발현에 영향이 비교적 적은 것으로 인정된 섭씨 4℃의 위스콘신대학용액을 사용하였고, 특별히 제작된 용기를 이용하여 동일 온도, 동일액에 침적시켜 12시간 동안 냉장 보관하였다.

재관류: 관류혈을 얻기 위하여는 지지동물로 야기될 수 있는 혈관 부착 물질 발현에 대한 교란변수를 제거하기 위하여 지지동물 대신에 막성산화기(Microsafe, Polystan, USA)를 이용한 단순 작업성 심관류 모델을 이용하였다. 본 모델을 이용함으로써 산화기로부터 공급되는 혈액을 롤러 펌프(Cobe Heart-Lung machine, Cobe, USA)를 이용하여 일단 좌심방 부하를 조절할 수 있는 용기에 모아 높낮이를 조절하여 좌심방 전부하를 자유자제로 조절가능하도록 하였다. 하행대 동맥에 삽관한 도관은 긴 심폐우회술용 플라스틱 도관으로 연결함으로써 높낮이를 조절하여 좌심실 후부하를 일정 수

준으로 유지할 수 있었다(Fig. 1). 본 연구에서는 혈액학의 측정이 주관심사가 아니었으므로 대표적인 혈액학 변수를 한 가지로 지정하기 위해 좌심방압을 6 mmHg, 대동맥후부하를 평균 80 mmHg로 고정하여 유지하였다. 산화기 충전액으로는 같은 종의 성돈(Yorkshire, 체중 50 kg 이상)에서 채취한 혈액을 양군에 모두 생리식염수를 혼합하여 심장수술에서 흔히 사용되는 적혈구 분획치인 25~30%, 혈색소치 8~10 mg/dl, 산소분압을 150 mmHg 이상으로 맞추고 포도당과 포타슘을 정상치로 유지하고 칼슘은 저칼슘치(0.1~0.5 mmol/L)로 유지하였다. 재관류혈의 백혈구 제거를 위해서는 백혈구 여과기(Sepacell, Asahi Medical, Japan)를 사용하였다. 심근조직 채취와 보존: 재관류 직전과 재관류 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 때에 우심방 심근을 채취하였으며 냉온 이소펜탄(isopentane)에 담근 후 액화질소에 침적시켜 급속 냉각시킨 다음 -70℃에 보관하였다. **백혈구 여과기 효율 검증:** 백혈구 여과기의 효율을 검증하기 위하여 여과하기 전, 후의 백혈구 수를 측정하였다. **면역조직화학검사:** 심근세포와 관상동맥 내에서의 VCAM-1의 발현 정도를 알아보기 위해 각각 시간대에서 적출한 심장 조직 편을 OCT(Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN, USA)에 담가서 급속 냉동하여 4µg 두께로 3-aminopropyl-triethoxysilane(Sigma, USA)으로 표면 처리된 슬라이드에 올려놓은 다음 공기 중에 건조시킨 뒤 섭씨 -20℃의 아세톤(aceton)에 5분간 고정하였다. 각 슬라이드는 PBS(Phosphate buffered saline, pH7.2)에 5분 동안 3회 수세를 하였다. 비특이적인 항원-항체 반응(non-specific reaction)을 억제하기 위해 0.15% 정상 마 혈청(horse serum)으로 실온에서 30분간 반응시켰다. 조직 절편을 희석된 일차 항체(VCAM-1; purified mouse anti-human CD106 monoclonal antibody, R&D Systems Inc., USA, diluted 1:50 in blocking serum)와 절편이 건조되지 않도록 상온의 습실(humidified chamber)에서 2시간 동안 반응시켰다. 비특이적인 배경 염색을 줄이기 위해 0.1% Triton X-100에 3분 정도 담그고 PBS에 3회 수세하였다. 조직 표본을 FITC(Fluorescein isothiocyanate)로 표지(labeling)된 이차 항체(VCAM-1; FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, DAKO, Denmark, diluted 1: 50 in blocking serum)로 상온의 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 0.05% tween 20/PBS로 수세한 후 각 슬라이드를 propodium iodide/ antifade(Oncor, USA)로 대조염색(counterstain)을 실시하여 형광 봉입제(fluorescent mounting media, DAKO, Denmark)로 포매 하였다. 각 조직 절편에 대해 2인이 형광현미경(AHBT3, VANOX, Olympus, Japan)을 이용하여 눈가림법으로 조직에서의 발현 정도를 0-4 등급(Grading scale)의 척도로 반정량적인 방법으로 등급화하였다(grade 0: negative for immunofluorescence, grade 1: trivial positive, grade 2: mild positive, grade 3: moderate

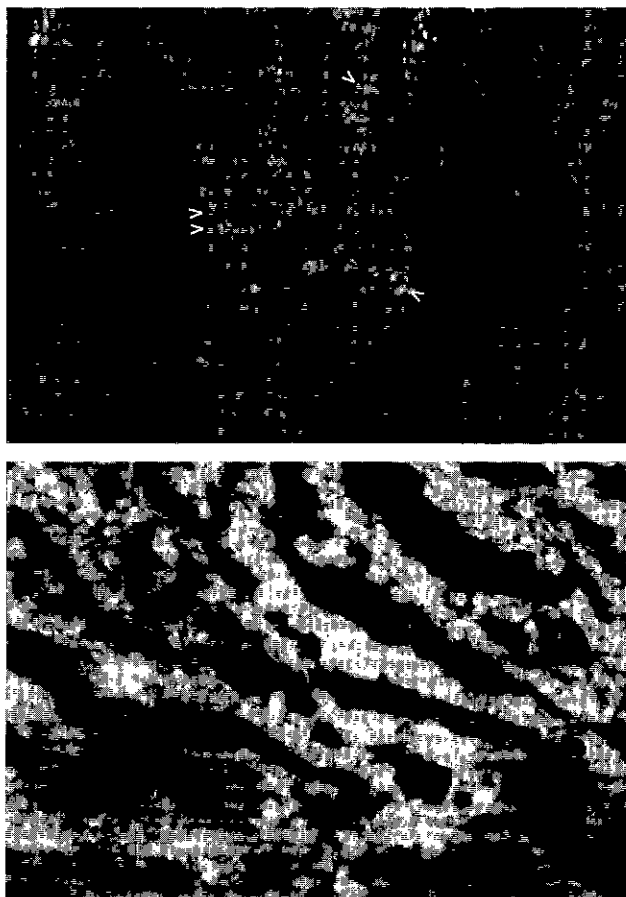


Fig. 2. Immunofluorescent micrograph of the myocardium using antibody against VCAM-1. A, Trace (+) immunoreaction (arrowheads) of the myocardium B, Moderate (+++) immunoreaction shows fluorescence at the myocardium.

positive, grade 4 : strong positive).

동물관리

실험동물들은 The National Society for Medical Research에 의해 공식화된 Principles of Laboratory Animal Care"와 the National Institute of Health에 의해 발간된 Guide for the care and use of Laboratory Animals"(NIH publication No. 85-32, revised. 1985)에 따라 관리하였다.

통계 처리

연속 변수들은 평균±표준편차로 표시하였으며 두 군간의 변수들의 비교는 unpaired Student t-test를 사용하였고 백혈구-제거군에서의 백혈구 제거 전후의 비교는 paired Student t-test를 사용하였으며 P 값 0.05이하를 유의수준으로 판정하였다.

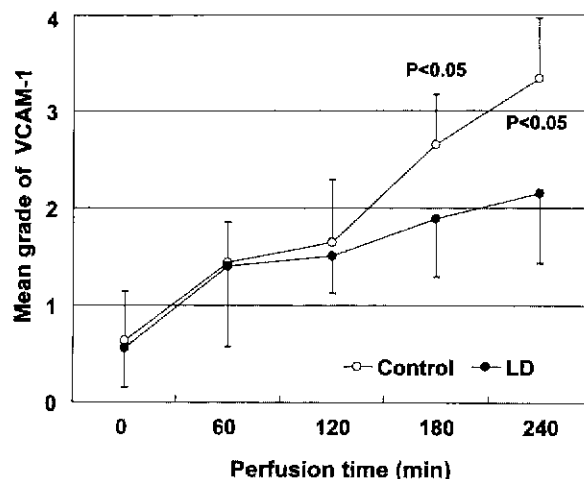


Fig. 3. The mean grades of tissue VCAM-1 expression in the myocardium, were significantly higher in the control group than the leukocyte-depleted (LD) group at 3 hours (p<0.05) and 4 hours (p<0.05) after the onset of cardiac reperfusion

결 과

두 군간의 재관류전의 적혈구 분획과 혈색소치, 산도, 산소와 이산화탄소 분압 및 탄산기의 차이는 없었다(p>0.05). 백혈구-비제거군의 백혈구수는 재관류전 5.5±3.2×10³/mm³으로 백혈구-제거군의 0.5±0.6×10³/mm³에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다(p<0.01). 백혈구 여과기의 백혈구 제거효율은 91%였다. 4 시간의 재관류후 적혈구분획은 백혈구-비제거군이 16±4.1%, 백혈구-제거군이 19.0±6.8%로 두 군간의 통계학적 차이는 없었다(p> 0.05). 4 시간의 재관류 후 혈액에서의 백혈구 수는 백혈구-비제거군의 경우 1.8±0.9×10³/mm³로 감소되어 있었으며(p <0.05), 백혈구-제거군에서는 0.5±0.6×10³/mm³로 재관류 전의 수치와 차이가 없었다. 심근의 기능과 밀접한 관계가 있는 심근의 수분함량을 측정하기 위하여 심장을 1주일간 건조시킨 후 젖은 상태의 무게와의 차이를 젖은 상태의 무게로 나눈 백분율로 나타내었을 때 백혈구 비제거군과 제거군이 각각 82.0±2.8%와 81.50±4.5%로 백혈구-제거군에서 약간 적었으나 통계적 차이는 없었다(p>0.05). 심근에서의 VCAM-1의 평균 발현은 시간 경과에 따라 백혈구-비제거군에서는 각각 0.63 0.52, 1.44 0.42, 1.64 0.64, 2.65 0.52, 3.34 0.62 였으며 (n=8), 백혈구-제거군에서는 시간별로 0.56 0.42, 1.40 0.83, 1.50 0.38, 1.88 0.58, 2.14 0.70으로 (n=8) 백혈구제거-재관류군에서의 VCAM-1 발현이 재관류 3시간 이후부터 통계적으로 유의하게 적은 것이 관찰 되었다(p<0.05)(Fig. 2, 3). 심박출지수는 백혈구-비

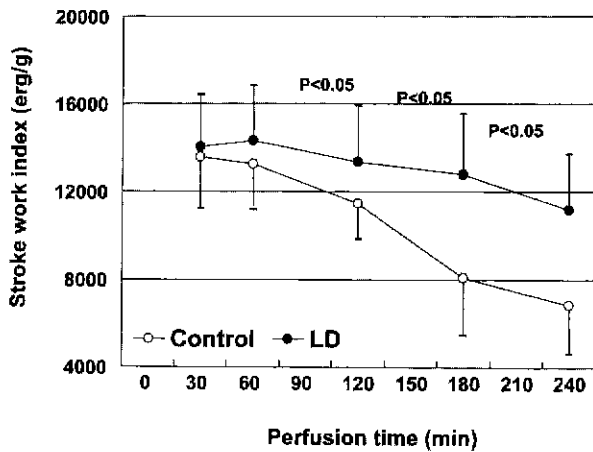


Fig. 4. The mean stroke work indices were significantly greater in the leukocyte-depleted (LD) group than control group at 2, 3, and 4 hours after the onset of reperfusion ($p<0.05$, $p<0.05$, $P<0.05$, respectively).

제거군의 경우 시간에 따라 각각 $1.35 \pm 0.24 \times 10^4$, $1.32 \pm 0.20 \times 10^4$, $1.14 \pm 0.16 \times 10^4$, $0.81 \pm 0.26 \times 10^4$, $0.68 \pm 0.22 \times 10^4$ erg/gm 이었고($n=8$), 백혈구-제거군에서는 각각 $1.40 \pm 0.24 \times 10^4$, $1.43 \pm 0.25 \times 10^4$, $1.34 \pm 0.26 \times 10^4$, $1.28 \pm 0.27 \times 10^4$, $1.12 \pm 0.25 \times 10^4$ erg/gm 으로($n=8$) 재관류 2시간, 3시간, 4시간 때에 백혈구-제거 재관류군에서 심기능 보존이 의미있게 양호하였다 ($p<0.05$)(Fig. 4).

고 찰

본 연구는 심장 이식시 공여심장에 유발되는 허혈-재관류 손상이 일련의 급성 염증반응과 유사하게 백혈구와 혈관 내피 세포 상호작용에 의하여 유발됨을 혈관부착물질의 일종인 VCAM-1의 발현 정도로써 확인하고, 이러한 허혈-재관류 손상의 주된 요인으로 작용될 수 있는 백혈구를 재관류혈로부터 제거함으로써 부착 물질 발현을 감소시켜서 심기능 회복에도 도움이 될 수 있는지 입증하기 위해서 시행하였다. 심장 이식시 공여 심장의 심근을 안전하게 보존한다는 것은 이식 직후 혹은 이식 후 장기간 양호한 심기능을 유지하기 위해 매우 중요하다. 이러한 심기능 보존과 관련하여 공여 심장의 적출과 보관, 이식, 이식후의 수혜 개체 사이의 허혈 및 재관류에 의한 손상은 이식 심장의 초기 및 장기 성적에 큰 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 실제로 심장이식은 안전한 허혈 시간에 제한이 있기 때문에 장시간의 허혈 이후 재관류시 초기 이식 장기의 기능 부전이 흔히 발생하여 안전한 공여 심장의 보존 시간에는 한계가 있다. 만약 연장된 허혈 시간에도 불구하고 조직 보존능이 향상될 수만 있다면

공여 장기 부족 현상을 완화시킬 수 있음은 물론, 심장이식 전 HLA(human leukocyte antigen) 적합 검사를 시행할 시간을 벌 수 있으므로 면역적합성(immunocompatibility)을 개선하여 향후 공여 심장 장기 생존율을 증가시킬 수도 있다. 비록 최근에 냉각 심보존에 의한 장시간의 허혈 손상을 부분적으로 줄이는데에는 성공했지만, 초기 재관류 손상에 의한 술 후 공여 심장 기능 부전은 여전히 완전히 극복되지 못하고 있다. 본 연구에서는 국내의 지역적인 여건을 고려하여 신생돈에서의 단순 작업성 심관류 모델을 이용하여 12시간의 냉각 허혈-보존 후 4시간의 재관류를 시도하였으며, 이때 심정지액 및 보존액으로는 보존능이 우수한 것으로 알려진 위스콘신대하용액을 이용하였다^{2,3}. 단순 작업성 심관류 모델을 사용함으로써 기타 다른 장기 또는 수혜장기의 영향을 배제한 상태에서 심장 보존과 관련된 변수만을 직접 관찰할 수 있었고 그런 점에서 본 동물 모델이 심장 보존 효과만을 분리 관찰할 수 있는 적합한 모델이라고 생각되었다.

허혈 이후 심근의 재관류 손상의 주된 원인으로 백혈구가 관련되었다는 많은 보고가 있으며, 특히 허혈-재관류 손상과 관련하여 호중구(neutrophil) 등 면역세포에 의해 유발되는 염증반응에 대해서는 많은 연구가 진행되었다^{2,4}. 심장 이식 후의 허혈-재관류 손상에 있어서 백혈구와 혈관내피세포는 매우 중요한 역할을 담당한다^{5,6}. 특히 이식될 조직의 적출, 보관, 이식시 허혈과 연관된 생리조직학적인 변화에 의한 조직의 기능부전(dysfunction)과 허혈 손상에 따른 백혈구 등 염증세포의 동원(recruitment)과 침투(infiltration)는 손상의 중요한 과정이다. 순환하는 백혈구와 활성화된 혈관내피세포의 상호작용에서 백혈구의 혈관 내피 세포로의 부착은 허혈-재관류 손상 기전의 초기 과정으로 백혈구의 세포내로 침투를 위해 반드시 필요하다. 이 과정에서 혈관내막에서의 부착물질(adhesion molecule)들의 발현 수준이 상향조절(up-regulation)되거나 활성화되어지고 부착물질의 활성화로 유도된 일련의 면역반응 또는 염증반응은 장기가 이식된 후에도 계속되는 장기손상의 원인 기전이 될 수 있어 장기의 장기 생존성 유지에도 영향을 미치게 된다. 백혈구에 의한 심근 손상 기전은 완벽하게 밝혀진 것은 아니나 복잡한 염증반응 사슬과 이에 관련된 기능성 단백질의 역할에 기인하는 것으로 설명된다. 혈관 손상 동안에 방출되어진 ATP가 호중구와 혈관 내피 세포의 상호작용을 한층 가속화하며 이로 인해 호중구로 유도되어진 손상이 이루어진다. 또한 호중구와 혈관 내피 세포사이에서 혈소판활성인자는 ATP 또는 UTP 에 의해서 유도된 호중구의 부착을 매개한다. 허혈 조직의 재관류는 급성염증반응과 유사한 일련의 반응과 관련되어 있으며 혈소판활성인자(platelet activating factor), 류코트리엔 B4 (leukotriene B4) 등의 매개인자의 축적으로 인하여 허혈-재관

류에 의해 유도된 모세혈관직후 소정맥(postcapillary venule)에 백혈구 단순부착(rolling), 결합(adherence) 및 이주(emigration)가 더욱 증가된다. 또한 순환하는 백혈구와 혈관의 내피 세포사이의 부착의 상호작용은 활성화된 호중구, 혈관내피세포 표면에서 발현된 당단백질(glycoproteins)인 부착물질, 반응성 산소 대사물질(reactive oxygen metabolites), 호중구에 의해 생산되어진 소립자 관련 단백질(granule-associated proteins), 미세순환(microcirculation) 내에서 발생하는 유체역학적 힘(hydrodynamic forces)등에 의해 조절된다.

심장수술과 관련하여는 심폐우회술, 허혈, 재관류, 고온, 심근조직의 외과적인 손상 등이 심근에서 싸이토카인들의 생성 및 활성화를 초래하고, 이를 매개로 모세혈관 누수현상(capillary leak), 혈관 장력(vasomotor tone)의 변동, 염증세포의 가세현상을 발생시켜 결국 심기능 저하까지 초래될 수 있다. 허혈 조직의 재관류로 인한 손상의 기전은 허혈손상을 받은 조직내의 혈관 세포 내막과 대식세포, 순환 면역세포간의 상호작용의 결과로 면역세포 들로부터 각종 싸이토카인들이 생성되고 백혈구가 조직주변으로 모여들어 염증반응이 초래되는 것으로 이해되고 있다. 이 과정 중에서 가장 중요한 역할을 담당하리라 예상되는 인자는 혈관 내피세포 표면에 존재하는 부착물질로, 장기 종류에 따라 여러 가지 싸이토카인에 의해 이 부착물질이 활성화되고 여기에 혈액내 순환하는 백혈구의 결합기와 부착물질이 결합하면서 백혈구를 혈관 내피 세포내에 부착하도록 한다. 이러한 허혈-재관류 이후 염증성 심근 손상을 매개하는 인자로서 부착물질들이 알려졌다. 특히 이런 일련의 부착분자의 발현은 저산소증(hypoxia)과 싸이토카인(cytokine)의 방출에 영향을 받는다. Kacimi 등⁷⁾은 저산소증(0% O₂ for 6hours)과 저산소증/재산화(hypoxia/reoxygenation)의 영향보다 IL-1 β 등에 의해 부착물질(ICAM-1, VCAM-1)의 mRNA와 단백질의 발현이 증가되며 이러한 부착물질의 발현에는 적어도 두 개 이상의 전사인자(NF- κ B, AP-1)가 요구되어진다고 하였다. 이러한 혈관 부착물질들 중 VCAM-1(CD106)은 여러 가지 염증의 진행 과정에 있는 혈관 내피 세포에서 유도되는 세포 부착 물질이며, 순환하는 단핵구나 림파구등의 표면에 존재하는 α 4 β 1 그리고 α 4 β 7 인테그린(integrin)인 VLA-4(very late antigen-4)에 대한 라이간드(ligand)로 알려져 있다⁸⁾. VCAM-1은 활성화된 혈관내피세포의 표면에서 발현하는 90~110 kDa의 당단백질로서 정상혈관세포에서는 발현되지 않지만 IL-1 β , IL-4, TNF α 그리고 IFN- γ 등의 염증반응의 매개인자인 싸이토카인(cytokine)에 의해 발현되어 진다. 본 연구에서는 심근세포 및 관상 동맥내에서의 혈관세포 부착물질의 발현이 재관류 3 시간까지는 차이가 없었으나 3 시간 이후부터는 백혈구 제거 재관류시 발현의 증가가 의미 있게 적은 것을 발견하였

다. 그러나 이후 시간이 경과함에 따라 백혈구제거-재관류군에서 부착물질 발현의 증가 정도가 의미 있게 적었는데 이는 재관류 후 VCAM-1의 출현이 되는데에는 적어도 4 시간 정도의 시간이 필요하다는 보고⁹⁾와 일치하는 관찰이라고 생각되었으며 또한 이 기간 동안에 부착물질의 발현은 물론 그로 인해서 일어날 수 있는 허혈 재관류손상과 심기능 저하 역시 백혈구제거-재관류군에서 의미 있게 적었다는 사실에서 심기능 저하와 부착물질 발현사이의 양성 상관 관계를 입증할 수 있었다.

제거함으로써 차단할 수 있다는 사실로 설명하고 있다¹¹⁻¹³⁾. 본 연구에서는 백혈구 제거혈액을 이용하기 위하여 막성 필터를 이용해 재관류를 하였다. Bolling 등¹⁴⁾은 저산소증 심장의 갑작스러운 재산화시 활성화된 백혈구에 의해 생성된 산소유리기(oxygen-derived radicals)에 의해 심근의 손상이 유발되며 이러한 손상은 백혈구 제거 필터를 이용하여 방지할 수 있다고 하였다. 또한 백혈구-제거 혈액을 이용한 재관류가 심근의 전자현미경 구조면에서 전혈이나 혈성심정지액의 재관류에 비해 장점이 있다는 보고가 있었으며^{2,15)} 백혈구 제거 재관류시 초기 재관류 시기에 심근효소(CPK, CK-MB)의 방출이 감소한다는 보고도 있었다¹⁵⁾. Kawata 등¹¹⁾은 신생 양에서 2시간 허혈 후 1시간 재관류 시 백혈구 제거가 재관류후 장기의 기능면에서 장점이 있다고 보고하였으며, Breda 등¹³⁾은 지지동물을 이용한 단순 작업성 심관류 모형을 사용하여 12시간의 허혈후 4시간 재관류시 백혈구를 제거하면 심장의 기능적인 면에 장점이 있으며 전자현미경적으로 근섬유의 이상배열 및 분해가 감소하였고, 미토콘드리아의 부종이 감소하였으며, 핵내 염색소의 뭉침 현상과 간질의 부종도 감소하는 등 장점이 있음을 증명하였다. Zweier 등²¹⁾은 전자기공명기법을 이용하여 재관류 직후 수초 내에 심근에서의 산소유리기의 증가를 증명하여 재관류 손상에 산소유리기가 관여한다는 증거를 제시하였으며 산소유리기의 제거제(scavenger)를 사용하면 산소유리기에 의한 세포막 지질의 산화 대사물인 말론디알데하이드부산물의 방출이 억제됨을 보였다. 그 외에 여러 가지 산소유리기 제거제를 사용한 허혈-재관류 손상에서 산소유리기 영향에 대한 연구가 있었다^{16,17)}. Kukielka 등⁹⁾은 1시간동안 관상동맥을 차단한 후 24시간동안 재관류한 실험에서 세포간 부착물질-1(ICAM-1)의 mRNA는 재관류 1시간부터 나타났으며 심근에서의 세포간 부착물질의 발현은 6 시간 이후에 관찰되었다고 보고한 것에서 본 연구에서의 4시간 재관류는 짧은 시간이 아니었나 생각되었다. 본 연구에서 염증세포의 관여로 재관류 손상을 받더라도 1~4시간 정도의 일정 시간동안 부착물질 단백질이 합성되어 발현이 증가할 시간적 지연이 존재한다는 사실을 발견하였으며, 이는 허혈-재관류 손상이 혈관 부착 물질들의 활성

화에 직접적인 요인으로 작용하기보다 다른 유발 매개인자의 활성화에 의해 이루어진다고 생각된다. 또한 이러한 부착물질의 발현이 언제까지 지속되는지, 혈관내피세포의 기능부전이 가역적인 현상인지, 그 결과 부착물질의 발현 양상은 어떠한 형태를 갖는지 등에 관한 연구가 지속되어야 할 것이다. 왜냐하면 부착 물질 발현 억제 수단을 사용하더라도 이러한 시간에 따른 발현양상과 정도에 대한 지견이 있어야 가장 이상적인 타이밍과 용량을 선택할 수 있을 것이기 때문이다. 최근의 연구들은 백혈구와 혈관내피세포의 부착을 억제하기 위해 핵내 요소(NF- κ B)를 억제하거나¹⁸⁾, 혈관 부착 물질들(ICAM-1, VCAM-1, E-selectin)을 활성화시키는 세포활성물질들(cytokines)의 억제에 초점이 맞추어지고 있다^{19,20)}. 항혈청, 항암제, 기계적 필터등을 사용한 백혈구-제거 재관류가 심실세동이나 심근경색의 범위를 줄여준다는 사실이 보고된 바 있으며^{4,10)}, 이러한 효과는 백혈구 자체가 산소 유리기를 증가시키는 작용이 있어 세포막 지질 산화에 의한 세포막의 손상을 유발하거나, 단백분해효소(Protease)를 분비하거나, 여러 가지 세포 활성 물질들을 생성함으로써 세포막의 투과성을 증가시키는 기전들을 백혈구를 제거한다.

본 연구를 통해 12시간 허혈 후 4시간 재관류시 심근에서의 혈관세포 부착물질(VCAM-1)의 발현에서 백혈구 제거 재관류의 장점을 입증하였으며, 3시간이후 백혈구 제거시 혈관세포 부착물질의 발현의 증가폭이 감소하는 경향의 발견은 술후 심기능 저하의 시간 경과에 따른 경향을 예측할 수 있는 증거를 제시했다는 점에서 의미가 있다고 판단되었다. 또한 VCAM-1의 변화에 대한 지시자(marker)로서의 역할 가능성을 시사해 주었다는데 그 의의가 크다고 생각되었다. 막성 산화기와 톨러펄프를 사용하여 지지 동물로 인하여 야기될 수 있는 혈관 세포 부착물질의 발현에 대한 교란변수를 제거한 본 동물 실험 모델은 혈액학의 관찰 뿐만 아니라 허혈-재관류 손상의 백혈구와 혈관 내피 세포 사이의 상호작용에 대한 면역학적 측면에서의 관찰에도 유용함을 확인 할 수 있었다.

결 론

저자 등은 본 연구를 통해 신생돈 심장의 심근보호 및 보존액으로 위스콘신대학용액을 사용하여 12 시간의 허혈 보존 후 4 시간의 재관류시 백혈구제거-재관류가 재관류시 심근에서의 혈관세포부착물질-1(VCAM-1)의 발현을 감소시키는 것을 입증하였으며 시간 경과에 따른 심기능 저하 역시 VCAM-1 발현정도와 의미 있는 상관 관계가 있음을 증명하였다.

참 고 문 헌

1. Breda MA, Drinkwater DC, Laks H, et al. *Prevention of reperfusion injury in the neonatal heart with leukocyte-depleted blood.* J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97:654-65
2. Stein DG, Permut LC, Drinkwater DC, et al. *Complete functional recovery after 24-hour heart preservation with University of Wisconsin solution and modified reperfusion.* Circulation 1991;84(suppl III) 316-23.
3. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, et al. *Expression of major histocompatibility antigens and vascular adhesion molecules on human cardiac allografts preserved in University of Wisconsin solution.* J Heart Lung Transplant 1993;12:1044-51.
4. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog.* Circulation 1983;67:1016-23.
5. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, et al. *Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs.* Heart Circ Physiol 1986;20:H314-22.
6. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, et al. *Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfusion in cat myocardium.* Circulation 1993;88:649-58.
7. Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS. *Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia.* Circ Res 1998;82 (5):576-86.
8. Springer TA. *Adhesion receptors of the immune system.* Nature 1990;346:425-34.
9. Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, et al. *Regulation of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium.* J Clin Invest 1993;92:1504-16.
10. Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, et al. *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: Effect of duration of occlusion.* Am Heart J 1986;112:682-90.
11. Kawata H, Sawatari K, Mayer JE Jr. *Evidence for the role of neutrophils in reperfusion injury after cold cardioplegic ischemia in neonatal lambs.* J Thorac Cardiovasc Surg 1992;103:908-18.
12. Lefer DJ, Shandelya SM, Serrano CV Jr., et al. *Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury.* Circulation 1993;88(part 1):1779-87.
13. Vaporciyan AA, Mulligan MS, Warren JS, Barton PA, Miyasaka M, Ward PA. *Up-regulation of lung vascular ICAM-1 in rats is complement dependent.* J Immunol 1995;155:1442-9.
14. Bolling KS, Halldorsson A, Allen BS, Rahman S, Wang T, Kronon M, Feinberg H. *Prevention of the hypoxic reoxygenation injury with the use of a leukocyte-depleting*

- filter. J Thorac Cardiovasc Surg 1997;113(6):1081-9.
15. Pearl JM, Drinkwater DC, Laks H, Capouya ER, Gates RN. *Leukocyte-depleted reperfusion of transplanted human hearts. a randomized double blind clinical trial.* J Heart Lung Transplant 1992;11:1082-92.
16. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. *Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation.* Surgery 1983;94:428-32.
17. Stewart JR, Blackwell WH, Crute SL, et al. *Inhibition of surgically induced ischemia/reperfusion injury by oxygen free radical scavengers.* J Thorac Cardiovasc Surg 1983;86:262-72.
18. Erl W, Weber C, Wardemann C, Weber PC. *alpha-Tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF-kappa B mobilization.* Am J Physiol 1997;273:H634-40 .
19. Wagener, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. *Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in vascular endothelial cells.* Proc Soc Exp Biol Med 1997;216:456-63
20. Boyle EM, Kovacich JC, Cauty TG, et al. *Inhibition of IL-8 blocks myocardial ischemia reperfusion injury.* J Thorac Cardiovasc Surg 1998;116:114-21.
21. Zweier JL, Rayburn BK, Flaherty JT, Weisfeldt ML. *Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium.* J Clin Invest 1987;80(6):1728-34.

=국문초록=

배경: 허혈-재관류 손상에서 백혈구가 심근 세포 또는 혈관 내피 세포에 부착하는 것은 매우 중요한 초기 과정이며 궁극적으로 심근 기능 회복이나 심장의 미세 구조 유지에도 영향을 준다. 본 연구에서는 신생돈 심장을 이용한 단순 작업성 심관류 모델을 이용하여 12시간 냉각 허혈 보존시킨 심장을 4시간 재관류 시켰을 때, 백혈구-제거 재관류가 심근에서의 혈관 세포 부착물질-1 (VCAM-1)의 발현과 심기능 회복에 미치는 영향을 비교 관찰하고자 하였다. **대상 및 방법:** 생후 3일 이내의 신생돈 심장을 4℃ 위스콘신 용액으로 심정지를 유도하여 적출한 후 동일한 용액에서 12 시간동안 허혈 상태로 보존하였다. 실험군을 백혈구-비제거 재관류군 (group A, n=8)과 백혈구-제거 재관류군 (group B, n=8)으로 이분하고, 단순작업성 심관류 모델을 이용하여, 보존된 심장을 재관류시켰다(Fig. 1). 관류후 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 췌에 우심이 부위의 심근 일부를 채취하여 면역조직화학법으로 VCAM-1의 발현 정도를 0-4 도의 등급으로 반정량적인 방법으로 군간 비교 평가하였다. 동시에 재관류 30분, 1, 2, 3, 4 시간 때의 심박출지수를 측정하여 심기능의 회복 정도를 비교하였다. **결과:** 심근에서의 VCAM-1의 평균 발현 정도는 시간 경과에 따라 백혈구-비제거 재관류군에서는 각각 0.63, 1.44, 1.64, 2.65, 3.34 였으며 백혈구-제거군에서는 시간별로 0.56, 1.40, 1.50, 1.88, 2.14로 백혈구-제거 재관류군에서의 VCAM-1 발현이 재관류 3 시간 이후부터 적은 것이 관찰되었다 ($p<0.05$) (Fig. 3). 평균 심박출지수는 백혈구-비제거군의 경우 시간에 따라 각각 1.35×10^4 , 1.32×10^4 , 1.14×10^4 , 0.81×10^4 , 0.68×10^4 erg/gm 이었고 백혈구-제거군에서는 각각 1.40×10^4 , 1.43×10^4 , 1.34×10^4 , 1.28×10^4 , and 1.12×10^4 erg/gm으로 재관류 2시간, 3시간, 4시간째에 백혈구-제거 재관류군에서 심기능 유지가 의미있게 양호하였다 ($p<0.05$)(Fig. 4). **결론:** 이상의 결과로 백혈구-제거 재관류가 심근에서의 VCAM-1의 발현을 감소시키는 것을 입증하였으며 시간 경과에 따른 심기능 저하 역시 VCAM-1 정도와 의미있는 양성 상관 관계가 있음을 증명하였다.

중심단어: 1. 백혈구제거 재관류
2. 혈관 세포 부착물질