

흰쥐의 적출대동맥에서 Aprotinin이 내피의존에 의한 혈관장력에 미치는 영향

충남대학교 의과대학 마취통증의학교실

김윤희 · 손수창 · 윤석화 · 신용섭 · 이정은 · 윤희석 · 박성준 · 고영권

Abstract

Effect of Aprotinin on Contractile Response of Isolated Rat Aortic Rings

Yoon Hee Kim, M.D., Soo Chang Son, M.D., Seok Hwa Yoon, M.D., Yong Sub Shin, M.D., Jung Un Lee, M.D., Hee Seck Yoon, M.D., Seong Jun Park, M.D., and Young Kwon Ko, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: It has been reported that aprotinin reduced NO production in vivo in the airways of patients undergoing cardiopulmonary bypass and decreased cytokine-induced NOS II expression in a dose-dependent manner in vitro in cultures of a murine epithelial cell line. Although the inhibitory effect of aprotinin on the release of inducible NO has been reported by several investigators, the number of reports demonstrating its effect on the production of endothelial NO is rather limited. The goal of this study was therefore to investigate the effects of aprotinin on the contractile response and release of endothelial NO in isolated rat aortic rings.

Methods: Endothelium-intact and endothelium-denuded thoracic aortic rings from SD rats were suspended in an organ chamber. Isolated aortic rings were precontracted with phenylephrine (10^{-8} M– 10^{-4} M) cumulatively and 10 minute before the precontracted phenylephrine treatment, aprotinin (125 KIU/ml) was added. The effect of L-NAME and L-arginine were evaluated by applying L-NAME and L-arginine after added aprotinin and before precontracted phenylephrine.

Results: Aprotinin (125 KIU/ml) relaxed rat thoracic aortic rings in an endothelium independent manner. The L-NAME and L-arginine treatment did not affect the aprotinin-induced relaxation.

Conclusions: Aprotinin was shown to have a vasodilatory effect on rat thoracic aortic rings. The vasodilatation effect of aprotinin was not related to the increased production of endothelial NO.

Key Words: Rat; NO; cardiopulmonary bypass; vasodilatation; aprotinin.

책임저자 : 김윤희, 대전시 중구 대사동 640
충남대학교 의과대학 마취통증의학교실
우편번호: 310-721
Tel: 042-220-7840, Fax: 042-220-7968
E-mail: yhkim@cnuh.co.kr

본 논문은 2002년도 충남대학교병원 공모과제 연구비의 보조를 받았음.

서 론

Aprotinin은 혈장과 다양한 조직의 polypeptide 단백질 분해효소억제제로서, 58개의 아미노산으로 이루어진 단 사슬 polypeptide이며 분자량 6,512 daltons의 작은 구 단백질이다.¹⁾ 기본적으로 응고 cascade에 작용하여 응고

기능을 항진시키고 혈소판 기능의 보전에도 관여하여 술 후 출혈량을 감소시키고 수혈량을 줄이는 효과가 있다.²⁾ 또한 개심술환자에서 고용량을 사용할 때 출혈의 감소 효과뿐만 아니라 체외순환으로 초래되는 전신염 증성반응을 줄이는 효과가 보고되고 있다.^{3,4)} 체외순환은 염증성 매개물질인 cytokine의 유리를 증가시키고 증가된 cytokine은 nitric oxide synthase II (NOS II)의 유도를 촉진하며 이렇게 생성된 고농도의 inducible nitric oxide (inducible NO)는 체외순환자체와 연관된 장기의 손상과 연관이 깊은 것으로 되어있다.⁵⁻¹⁰⁾ Gray 등의^{11,12)} 연구에 의하면 aprotinin이 체외순환동안 기도의 inducible NO의 생성을 감소시키고 murine epithelial cell line의 배양에서 NOS II의 유도를 감소시켰다고 보고하는 등 여러 연구자들이 aprotinin이 inducible NO의 생성을 억제하였다고 보고한 반면¹³⁾ endothelial NO의 생성에 aprotinin이 미치는 영향에 대해서는 거의 연구가 되어 있지 않다.

따라서 저자들은 aprotinin이 적출된 흰쥐의 흉부대동맥의 수축반응에 미치는 영향을 알아보고 수축반응의 변화와 내피세포이완인자 즉 endothelial NO와의 관련성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

한국화학연구소에서 4주령되는 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 분양받아 본 실험실의 동물사육실에서 4-5주간 사육하여 체중이 230-250 g인 흰쥐를 실험대상으로 하였다. 가능한한 아드레날린 분비를 억제하기 위하여 두부타격법으로 일시 실신시킨 뒤 복부정중선을 따라 절개한 뒤 흉부대동맥을 적출하였다. 적출한 흉부대동맥을 즉시 온도가 20°C 정도로 유지되며 100% 산소가 통기되고 있는 Tris 완충 Tyrode 용액이 담긴 실험 접시에서 혈관주위의 지방 및 결체조직을 제거한 후 3-4 mm 길이의 대동맥고리절편을 만들었다. 한편 대동맥내피세포 제거를 위하여서는 가는 핀모양의 stainless wire를 이용하여 혈관내경을 5-6회 정도 부드럽게 문질렀다. 이 환형 절편 고리를 50 ml 용량의 Tris 완충 Tyrode 용액수조에 수직으로 현수하였다. 수조의 용액은 100% 산소를 계속 통기시키면서 온도는 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH는 7.35 ± 0.05 가 되도록 유지하였다. Tris 완충 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 158 mM/L, KCl 4 mM/L, CaCl_2 2 mM/L, MgCl_2 1 mM/L, Tris 6 mM/L, Glucose

6 mM/L로 구성하였다. 수직으로 수조에 현수한 절편의 아래쪽은 수조의 핀에 고정시키고 위쪽은 생리적 기록계에 장력측정변환기(Hugo Sachs, Germany)로 등척성 수축(isometric contraction)곡선을 기록할 수 있도록 장치하였다. 흉부대동맥의 각 절편의 기저장력은 2 g이 되도록 조절하였다. 실험을 시작하기 전에 모든 절편은 상기한 실험조건에 적응하도록 수조 내에서 2시간동안 평형상태를 유지시켰으며 그동안 매 30분마다 완충액을 교환해 주었다.

혈관내피인자와의 관련성을 알아보기 위해 혈관내피가 제거되지 않은 혈관과 제거된 혈관으로 나누어 phenylephrine (10^{-8} M - 10^{-4} M)을 단계적으로 가하여 이에 대한 누적용량-수축반응곡선을 관찰한 후 aprotinin 125 KIU를 투여하고 10분 후에 다시 phenylephrine 누적용량-수축반응곡선을 얻어 aprotinin 투여 전과 비교하였다. 이때 절편의 혈관내피의 존재유무를 확인하기 위해 phenylephrine (10^{-5} M)로 수축시킨 후에 acetylcholine (10^{-6} M)을 투여하여 최대수축력의 80% 이상 유지하는 것을 내피가 제거된 혈관으로 간주하였다. 또한 내피세포가 존재한 혈관에 내피세포이완인자로 여겨지는 NO의 합성효소억제제인 L-NAME (N-nitro-L-arginine methylester) (3×10^{-4} M)과 L-arginine (3×10^{-4} M)을 aprotinin 투여 20분 전에 투여하고 aprotinin 투여 후에 얻은 phenylephrine 누적용량수축반응곡선을 비교 관찰하였다. 시약 중 L-NAME, L-arginine, phenylephrine은 Sigma (USA)제품을 사용하였다. 그 외의 모든 약품은 일급시약을 사용하였으며 aprotinin은 일동제약(한국)에서 공급받았다.

모든 결과는 phenylephrine 누적-용량반응곡선에서 phenylephrine (10^{-5} M)에 대한 수축치를 100으로 하여 이완정도를 백분율로 나타냈다. Aprotinin에 의한 누적적 반응곡선은 Sigma Plot Program을 이용하여 얻었으며 측정된 모든 값은 평균치 \pm 표준편차로 나타냈고 각 군 간의 비교는 unpaired t-test로 각 군내에서 약물처치에 의한 비교는 paired t test를 이용하여 비교하였고 P값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

Aprotinin이 혈관수축반응에 미치는 영향

Phenylephrine (10^{-8} M - 10^{-4} M)을 단계적으로 가하

여 이에 대한 누적용량-수축반응을 관찰한 후 aprotinin (125 KIU/ml)을 투여하고 10분 후에 다시 phenylephrine 누적용량-수축반응 곡선을 얻어 aprotinin 투여 전과 비교하였는데 10^{-8} M과 3×10^{-7} M을 제외한 모든 농도에서 유의하게 혈관 수축반응이 감소되었다 ($P < 0.05$). 10^{-4} M에서 최대 수축치가 40% 감소하였다(Fig. 1).

혈관내피세포가 aprotinin의 혈관이완반응에 미치는 영향

혈관내피세포가 제거된 혈관에 Phenylephrine (10^{-8} M - 10^{-4} M)을 단계적으로 가하여 이에 대한 누적용량-수축반응을 관찰한 후 aprotinin (125 KIU/ml)를 투여하고 10분 후에 다시 phenylephrine 누적용량-수축반응 곡선을 얻어 aprotinin 투여 전과 비교하였는데 10^{-8} M과 3×10^{-7} M을 제외한 모든 농도에서 유의하게 혈관 수축반응이 감소되었고($P < 0.05$) 10^{-4} M에서 최대 수축치가 54% 감소함을 보였다(Fig. 2).

혈관내피세포가 건재한 혈관과 제거된 혈관에서 aprotinin이 혈관수축반응에 미치는 영향 비교

혈관내피세포가 건재한 혈관과 내피세포가 제거된 혈관에 Phenylephrine (10^{-8} M - 10^{-4} M)을 단계적으로 가하여 이에 대한 누적용량-수축반응을 관찰한 후

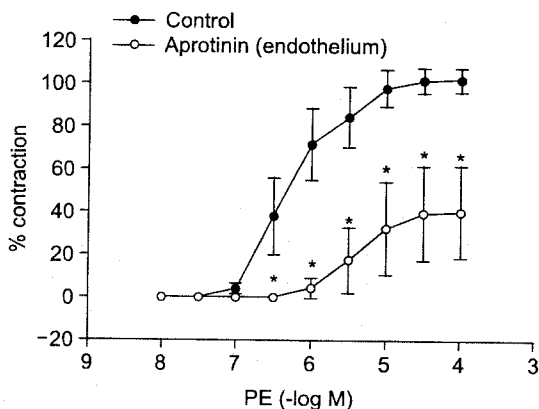


Fig. 1. Cumulative dose-response curve for phenylephrine in rat aortic rings with endothelium after aprotinin (125 KIU/ml) administration. Results are presented as mean \pm SD of five to six different animals. *: $P < 0.05$ vs with control.

aprotinin (125 KIU/ml)를 투여하고 10분 후에 얻은 phenylephrine 누적용량-수축반응 곡선을 얻어 aprotinin 투여전과 비교했을 때 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

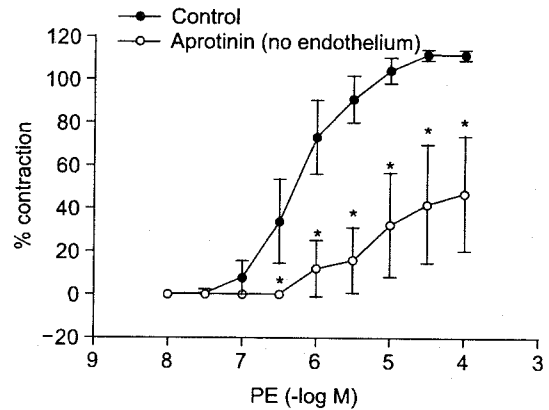


Fig. 2. Cumulative dose-response curve for phenylephrine in rat aortic rings without endothelium after aprotinin (125 KIU/ml) administration. Results are presented as mean \pm SD of five to six different animals. *: $P < 0.05$ vs with control.

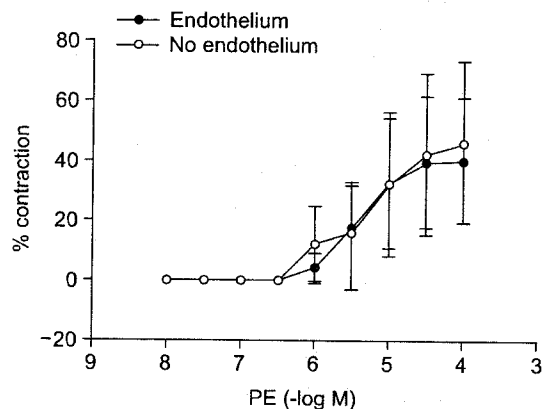


Fig. 3. Cumulative dose-response curve for phenylephrine in rat aortic rings with or without endothelium after aprotinin (125 KIU/ml) administration. Results are presented as mean \pm SD of five to six different animals.

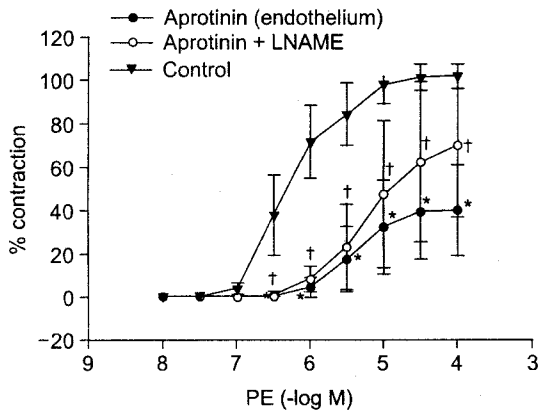


Fig. 4. Effect of L-NAME (3×10^{-4} M) in rat aortic rings on contractile responses for phenylephrine after aprotinin (125 KIU/ml) administration. Results are presented as mean \pm SD of five to six different animals. *: $P < 0.05$ vs with control, †: $P < 0.05$ vs with control, L-NAME: N-nitro-L-arginine methylester.

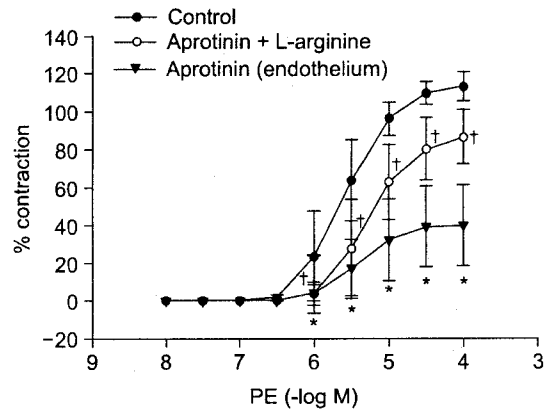


Fig. 5. Effect of L-arginine (3×10^{-4} M) in rat aortic rings on contractile responses for phenylephrine after aprotinin (125 KIU/ml) administration. Results are presented as mean \pm SD of five to six different animals. *: $P < 0.05$ vs with control, †: $P < 0.05$ vs with control.

L-NAME이 aprotinin의 혈관이완반응에 미치는 영향

내피세포가 존재한 혈관에서 aprotinin 투여 시의 phenylephrine의 수축력 감소에 대한 NOS억제제인 L-NAME (3×10^{-4} M)의 영향을 본 결과 L-NAME 투여 후 aprotinin의 이완반응은 감소하였으나 L-NAME 전처치하지 않고 aprotinin만을 투여한 군과는 유의한 차이가 없었으며 대조군과 비교해서 여전히 통계적으로 유의한 이완반응을 보였다(Fig. 4).

L-arginine이 aprotinin의 혈관이완반응에 미치는 영향

NO의 합성매개체인 L-arginine (3×10^{-4} M)을 전처치하여 NO의 과형성상태에서 aprotinin이 phenylephrine의 수축반응에 미치는 영향을 본 결과 L-arginine을 전처치한 후에도 통계적으로 유의하게 aprotinin은 혈관이완 반응을 보였다. 오히려 L-arginine의 전처치는 aprotinin의 혈관이완반응을 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 5).

고 찰

Ulker 등은¹⁴⁾ aprotinin이 흰쥐에서 폐동맥 절편의 NO 매개에 의한 혈관 내피세포 이완작용을 감소시켰으며 이는 aprotinin이 inducible NOS만을 억제하는 것이 아니라 endothelial NOS (eNOS, NOS I)도 억제하여 NO의 생성을 방해한 결과라고 보고하였다. 그 후의 aprotinin과 eNOS와의 연관성 논문에서도 aprotinin은 비교적 고농도에서(250 KIU/ml) 쥐의 관상동맥의 bradykinin에 의한 혈관이완작용을 감소시켰으며 이러한 작용은 관상동맥혈관내피세포의 eNOS mRNA의 발현 억제에 의한 NO의 생성 감소에 기인한다고 하였다.¹⁵⁾ 또한 Venturini 등은¹⁶⁾ 흰쥐에서 aprotinin이 NOSI과 NOSII 모두를 억제하는 NOS의 경쟁적 억제제라고 보고하는 등, 제한적이지만 aprotinin이 inducible NOS mRNA의 발현만을 억제하는 것이 아니라 endothelial NOS의 발현도 억제한다는 몇몇 보고들이 있다. 내피세포에서 생성되는 NO는 혈소판의 기능, 혈관의 장력, 혈류 등을 유지하는데 중요한데 aprotinin의 이러한 NOS에 대한 억제는 관상동맥우회술 후 이식혈관의 수축현상을 조장하고 이는 혈전의 생성을 증가시켜 심장허혈의 위험성이 있을 수 있다고 보고하고 있다.¹⁷⁾ 또한 Havel 등은^{17,18)} 사람 제대정맥의 내피세포의 배양실험에서 aprotinin은

6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ 와 thromboxan B_2 의 비율을 변화시키고 von Willebrand factor의 생성을 증가시켜 혈전생성을 증가시켰으며 이러한 결과는 관상동맥우회술시 사용하는 aprotinin이 이식혈관의 혈전생성을 증가시켜 심근경색의 위험성을 높일 수 있다고 하였다. 이러한 연구결과들은 심장수술 시 출혈을 감소시키는 이점을 가진 aprotinin의 상반된 문제점들을 보여주고 있으며 관상동맥우회술시 aprotinin의 안전성에 대한 논란의 근거들이 되어지고 있다.

그러나 본 연구에서는 흰쥐의 흉부 대동맥 절편에서 aprotinin이 저농도(125 KIU/ml)와 고농도(250 KIU/ml) 모두에서 phenylephrine에 의한 흉부 대동맥 절편의 수축반응을 억제시켰으며 이는 Ulker 등과¹⁴⁾ Venturinin 등의¹⁶⁾ 연구와 상반되는 결과이다. 본 연구에서 사용된 aprotinin의 농도는 Ulker 등의¹⁴⁾ 연구에서 사용된 농도와 같은데 저농도 즉 125 KIU/ml는 임상에서 140 mg의 부하용량과 35 mg을 시간당 투여하는 저용량 투여방법 시에 보이는 혈중농도에 해당하고 250 KIU/ml는 280 mg의 부하용량과 70 mg을 시간당 투여하는 고농도 투여방법 시의 혈중농도에 해당한다.¹⁴⁾ 예비실험 시, 참고 문헌의 결과로 aprotinin이 phenylephrine에 의한 혈관수축반응을 증가시킬 것으로 예상되었으나 의외로 aprotinin의 저농도에서 뚜렷한 혈관이완 반응을 보였고 고농도(250 KIU/ml)에서는 phenylephrine 10^{-7} M에서도 80% 이상의 과도한 혈관이완 반응을 보여 본 실험에서는 저농도에서만 실험하였다. 본 연구에서 관찰된 aprotinin의 혈관이완 반응은 내피세포의 유무와 무관하였으며 또한 NOS의 억제제인 L-NAME의 전처리 후에도 대조군과 비교하여 유의한 이완반응을 보였다. 그리고 L-arginine을 전처리하여 NO의 과형성 상태에서도 이완반응의 큰 증가를 보이지 않았던 점으로 미루어 본 실험의 aprotinin에 의한 흰쥐의 흉부 대동맥 혈관 절편의 이완 반응은 endothelial NOS와 무관하다고 할 수 있다. 다른 연구자들의 보고와 본 연구 결과의 이러한 상반된 차이는 실험조건, 대상동물, 혈관종류, 혈관수축제의 종류 및 용량, 약제의 농도 등에 따른 차이라고 할 수밖에 없을 것으로 여겨진다. 결론적으로 본 연구에서 aprotinin은 흰쥐의 흉부대동맥 혈관을 이완시켰고 L-NAME 및 L-arginin의 처치는 aprotinin의 혈관이완반응에 큰 영향을 끼치지 않은 것으로 보아 내피세포에서 NO의 생성과 aprotinin의 혈관이완반응과는 연관성이 없는 것 같다. Aprotinin은 출혈량이 큰 수술인

관상동맥 우회술시 출혈량을 줄이고 수혈량을 감소시키는 데 큰 이점이 있으며 또한 심폐우회술시 inducible NOS 억제로 NO의 생성을 감소시켜 전신염증을 줄이고 술 후 각 기관의 기능을 회복시키는데 의미 있는 역할을 하는 약제인 만큼 관상동맥의 수축 혹은 이완작용, 혈전생성의 증가 등에 대한 실험적, 임상적인 연구가 충분히 시행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 심지연, 최인철, 최수경, 조인해, 고 흥: 토끼에서 내독소로 인한 급성 폐손상에 미치는 Aprotinin의 효과. 대한마취과학회지 2001; 41: 608-19.
2. Bidstrup BP, Royston D, Sapsford RN, Taylor KM: Reduction in blood use after cardiopulmonary bypass with high dose aprotinin (Trasylol). J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97: 364-72.
3. Royston D: High-dose aprotinin therapy: A review of the first five years' experience. J Cardiothorac Vasc Anesth 1992; 6: 76-100.
4. Westaby S: Aprotinin in perspective. Ann Thorac Surg 1993; 55: 1033-41.
5. Hill GE, Snider S, Galbraith TA: Glucocorticoid reduction of bronchial epithelial inflammation during cardiopulmonary bypass. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 1791-5.
6. Ruvolo G, Greco E, Speziale G: Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 1994; 57: 1055-6.
7. Delgado R, Rojas A, Glavia LA: Ca^{2+} -independent nitric oxide-synthase activity in human lung after cardiopulmonary bypass. Thorax 1995; 50: 403-4.
8. Alican I, Kubes P: A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. Am J Physiol 1996; 270: G225-37.
9. Mathies G, Sherman MP, Buckberg GD, Haybron DM, Young HH, Ignarro NJ: Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. Am J Physiol 1992; 262: H616-20.
10. Wendel HP, Heller W, Michel J: Lower cardiac troponin T levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass and receiving high-dose aprotinin therapy indicate reduction of perioperative myocardial damage. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109: 1164-72.
11. Hill GE, David RS, Richard AR: Aprotinin is associated with a decrease in nitric oxide production during cardiopulmonary bypass. Surgery 1997; 121:

- 449-55.
12. Hill GE, Richard AR: Aprotinin but not tranexamic acid inhibits cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Anesth Analg* 1997; 84: 1198-202.
 13. Svartholm E, Haglund U, Ljungberg J, Hender U: Influence of aprotinin, a protease inhibitor, a porcine E. Coli shock. *Acta Chir Scand* 1989; 177: 7-13.
 14. Ulker S, Mehtap G, Bayraktuktan U, Evinc A: Aprotinin impairs endothelium-dependent relaxation in rat aorta and inhibits nitric oxide release from rat coronary endothelial cells. *Cardiovascular research* 2001; 50: 589-96.
 15. Ulker S, Pascal P, Ulvi B: Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovascular research* 2002; 55: 830-7.
 16. Venturini G, Colasanti M, Ascenzi A: Aprotinin, the first competitive protein inhibitor of NOS activity. *Biochemical and biophysical research communication* 1998; 249: 263-5.
 17. Havel MP, Griesmacher G, Weigel: Aprotinin decreases release of 6-keto-prostaglandin F1a and increases release of thromboxan B2 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104: 654-8.
 18. Havel MP, Griesmacher G, Weigel: Aprotinin increase release of von Willebrand factor in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Surgery* 1992; 112: 573-7.
-