

## Peroxide와 자간전증 환자의 혈청 관류에 따른 제대정맥의 prostaglandin 생성의 변화

울산대학교 의과대학 산부인과학 교실  
김 암·이필량·한지수·이인식·목정은

### =Abstract=

### Effects of peroxides and preeclamptic sera on prostaglandin release by perfused human umbilical cord vein

Ahm Kim, M.D., Pyl-Ryang Lee, M.D., Ji-Soo Han, M.D.,  
In-Sik Lee, M.D., Jung-Eun Mok, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan  
Asan Medical Center, Seoul, Korea

### Objective

This study was performed to evaluate the prostaglandin secretion rates in human umbilical vein with preeclamptic sera and peroxide perfusion.

### Study design

Isolated human umbilical cords(n=10) were perfused for 30-minute intervals with cord buffer, 15% normal pregnant sera and preeclamptic patient sera, 100 mol/L t-butyl hydroperoxide alone, and after perfusion with low-dose aspirin( $5 \times 10^{-5}$  mol/L). Cord buffer gassed with 95% oxygen and 5% carbon dioxide and warmed to 37°C was used for the perfusion buffer. Effluent flow rates were measured during each experimental treatment. Effluent samples were measured for 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> and thromboxane B<sub>2</sub> by enzyme immunoassays.

### Results

The concentrations of 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> in preeclamptic sera were significantly

\*본 연구는 아산생명과학 연구소 연구비 지원으로 이루어졌음.

\*본 논제는 제77차 춘계 산부인과 학술대회에서 구연되었음.

higher than those in normal pregnant sera. ( $989.3849 \pm 1602.927$  vs.  $1.3116 \pm 1.22085$  ng/ml, mean  $\pm$  SD,  $p < 0.01$ ). However, the concentrations of thromboxane B<sub>2</sub> were not different between normal pregnant sera and preeclamptic sera. The secretion rate of 6-keto-prostaglandin F<sub>1</sub>*a* in human umbilical endothelial cells was not significantly different ( $p = 0.77$ ) between two groups. Comparing to normal pregnant sera, the secretion rate of thromboxane B<sub>2</sub> was significantly increased ( $p < 0.01$ ) after preeclamptic sera perfusion. The secretion rate of 6-keto-prostaglandin F<sub>1</sub> was significantly increased ( $p < 0.01$ ) following peroxide perfusion and that was significantly decreased by aspirin. The secretion rate of thromboxane B<sub>2</sub> was not significantly different between preeclamptic sera and peroxide alone or subsequent perfusion with aspirin.

### Conclusions

(1) Preeclamptic sera stimulate thromboxane production rather than prostacyclin production by endothelial cells of human umbilical vein in vitro. (2) Peroxide stimulates the secretion of both prostacyclin and thromboxane, and low dose aspirin mitigates hydroperoxide-induced prostacyclin secretion. We confirmed that thromboxane secretion is stimulated by preeclamptic sera and the role of peroxide in prostaglandin secretion. We established the perfusion system using human umbilical vein through this study. This perfusion system may be useful to understand the pathophysiology of preeclampsia.

Key Words : Preeclampsia, Umbilical vein, Secretion rate, Prostaglandin

## I. 서 론

임부의 7~10%에서 발생되는 자간전증은 모성, 태아 및 신생아 사망과 합병증의 주된 원인이 되고 있으나 아직까지도 그 발병기전 및 원인이 명확하게 밝혀져 있지 않다. 자간전증시 혈관 수축제에 대한 혈관의 민감도의 증가<sup>1)</sup> 및 일련의 응고반응의 증가 등의<sup>2)</sup> 병태생리가 관찰된다. 최근 들어 많은 연구자들에 의해 여러 가지 생리학적 기능을 가진 혈관내피세포의 손상이 자간전증의 다양한 증상을 설명할 수 있는 근본적인 병태생리로서 주목을 받고 있다<sup>3~7)</sup>. 즉 자간전증 환자에서는 임신 16주에서 22주 사이에 일어나는 trophoblast에 의한 이차적 침윤이 발생하지 않아 placental perfusion이 감소하게 되고 이로 인하여 태반에서 혈관내피세포에 손상을 야기하는 물질이 분비되어 혈관내피세포를 손상시키고 이에 따라 혈관내피세포에 의해 유지되던 혈관내 oncotic pressure의 감소, 혈관내피세포의 여러가지 분

비물에 의해 유지되던 혈액응고 반응의 항상성의 파괴 및 혈관내피세포에 의해 분비되는 여러 가지 vasoactive substance 간의 불균형이 초래하게 되어 자간전증에서 관찰되는 다양한 spectrum의 증상이 발생하는 것으로 생각된다<sup>8)</sup>. 혈관내피세포의 손상은 강력한 혈관 확장제인 prostacyclin 및 EDRF 등의 감소 및 강력한 혈관 수축제인 endothelin을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

자간전증환자의 태반에서 lipid peroxide와 thromboxane의 생성이 비정상적으로 증가되어 있으며<sup>8, 9)</sup> 증가된 lipid peroxide에 의해 cyclooxygenase가 자극되어 강력한 혈관 수축제인 thromboxane의 생성이 증가되어 혈관 수축이 유발된다<sup>10)</sup>. 그러나 자간전증환자의 혈청으로 혈관내피세포를 배양하였을 때 혈관이완물질인 prostacyclin의 생성이 증가되는 점으로 보아, 자간전증환자의 혈청에는 prostacyclin의 homeostatic mechanism에 작용하는 어떠한 물질이 포함되어 있어서 혈관내피세포를 자극하여 prosta-

cyclin의 생성을 촉진시키는 것으로 생각된다<sup>11)</sup>. 이에 저자들은 자간전증 환자의 혈청을 제대정맥에 관류시켜 프로스타글란딘 생성의 변화 및 peroxide와 그 외 각종 외부조건의 변화에 따른 제대정맥 혈관내피세포에서의 프로스타글란딘 생성의 변화를 관찰하여 자간전증의 병태생리를 연구하였다.

## II. 연구방법 및 재료

### 1) 재료선정

대상군은 1994년 11월부터 1995년 9월까지 서울 중앙병원 산부인과에 자간전증 치료를 위해 입원한 임부종 항고혈압제 및 항경련제 등 치료약제가 투여되기 전에 혈액채취가 가능하였던 10명과 대조군으로 조기파수, 제왕절개수술이나 유도분만을 위해 입원한 정상 임부중에서 산모의 나이, 산과력, 재태연령이 비슷한 10명에서 혈액을 각각 10ml씩 채취하여 원심분리로 혈청을 분리해 실험시까지 -70°C에서 보관하였다. 6시간 간격을 두고 2회 측정한 혈압(수축기/이완기)이 140/90mmHg이상이며, 6시간 간격을 두고 2회 측정한 소변에서 단백질이 1+(100mg/dl)이상 검출되었을 경우 자간전증으로 정의하였다.

### 2) 연구방법

#### (1) 제대수집

정상 단태아 임부의 만삭 제왕절개술 중 제대에 힘을 가하지 않고 태반을 박리한 후 제대의 중간부위를 무균적으로 20~25cm 가량 잘라서 약 200ml정도의 cord buffer(sodium chloride 125 mmol/L, potassium chloride 4.5 mmol/L, disodium acid phosphate 0.2 mmol/L, monosodium acid phosphate 0.7 mmol/L, calcium chloride 2.5 mmol/L, magnesium sulfate 1.0 mmol/L, glucose 4.4 mmol/L(80 mg/dL), sodium bicarbonate 25 mmol/L, heparin 2 U/ml)에 담근다. 이때 제대의 태반측을 kelly clamp로 잡아 표시한다.

#### (2) 관류실험

37°C의 항온부스내에서 chamber속 buffer에 제대를 담그고, 제대의 kelly clamp로 표시된 부위는 가

위로 잘라낸 후 태반쪽 제대정맥에 도관(catheter)을 삽입하여 cord clamp로 고정시킨다. 이 도관을 통해 cord buffer 100 ml를 흘려 보내어 혈관내의 혈액과 혈관을 제거하고 태아쪽 제대정맥에도 마찬가지 방법으로 도관을 삽입한다. 태반쪽 도관은 관류 펌프(perfusion pump)를 통과해 나오는 관과 연결하고 태아쪽 도관은 검체를 모을 수 있도록 연결된 chamber의 관(tube)에 연결한다. 관류액으로는 cord buffer, 15%의 정상 및 자간전증환자의 혈청, t-butyl hydroperoxide, aspirin을 사용하였다. t-butyl hydroperoxide(Sigma, St. Louis)의 농도는 자간전증환자의 태반조직 농도와 비슷한 100 mol/L을 사용한다. Aspirin(Sigma, St. Louis)은 100 mg을 모체에 경구 투여한 후 제대 순환 속에서 측정되는 농도인  $5 \times 10^{-5}$  mol/L을 사용하였다. 펌프를 켜고 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 혼합가스를 공급하면서 다음과 같은 순서대로 용액을 15 ml씩 0.5 ml/min의 속도로 30분씩 관류시켰다(fig. 1). Cord buffer-15% 정상 임부 혈청-cord buffer-15 % 임신성 고혈압 환자의 혈청-cord buffer-t-butyl hydroperoxide-cord buffer-aspirin-t-butyl hydroperoxide를 관류시키면서, 처음 관류한 cord buffer, 정상 임부 혈청, 자간전증환자의 혈청, t-butyl hydroperoxide, aspirin 먼저 관류시킨 후 관류한 t-butyl hydroperoxide가 관류 5분 후부터 나오는 용액 9 ml를 eppendorf tube(1.5 ml) 6개에 나누어 모았다. 관류하기 전 cord buffer와 15%의 정상 및 자간전증 환자의 혈청은 3 ml를 eppendorf tube 2개에 모아 이를 검체를 -70°C에 보관하였다.

#### (3) 제대정맥 내피세포의 생육성(viability) 판정

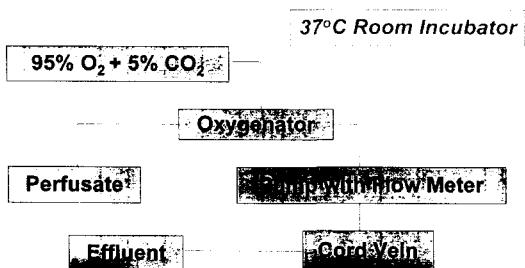


Fig. 1. Schematic Representation of the Perfusion System

Table 1. Concentrations(ng/ml) of prostaglandin metabolites.

	Normal	Preeclamptic	Significance
6-keto prostaglandin F <sub>1α</sub> (mean ± 1S.D.)	1.3116 ± 1.2285	989.3849 ± 1602.9270	p<0.01
Thromboxane B <sub>2</sub> (mean ± 1S.D.)	92.7480 ± 155.2817	175.7946 ± 369.1932	p=0.52

S.D. ; standard deviation

관류가 끝난 후 Jaffe<sup>12)</sup>의 방법을 사용하여 얻은 제대정맥 내피세포 부유액 100μl에 trypan blue 200μl을 섞어 실온에서 5분간 두었다가 hemocytometer로 trypan blue에 착색이 되지 않은 세포를 세어 판정하는 방법인 trypan blue exclusion 방법으로 생육성을 평가하였다.

#### (4) Thromboxane B<sub>2</sub>와 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> 측정

냉동 보관된 검체를 진공 원심분리(SpeedVac Concentrator, Savant Instruments, Farmingdale, N.Y.)로 수분은 모두 증발시키고 원래 검체부피의 1/10정도 되도록 3차 증류수를 넣어 희석하였다. 이렇게 처리한 검체에서 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub>와 thromboxane B<sub>2</sub>를 효소면역법(Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom [enzyme immunoassay])으로 측정하였다.

#### (5) 통계

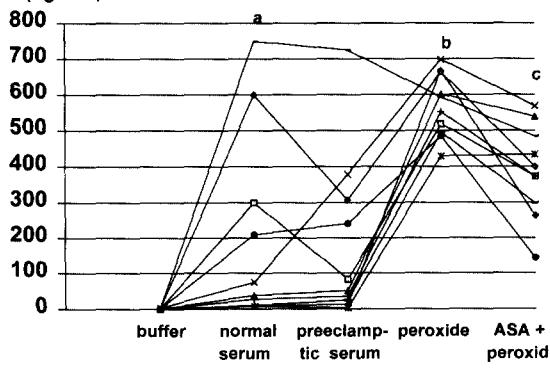
Wilcoxon rank sum test와 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 비교하였으며, p<0.01을 유의수준으로 정의하였다.

### III. 결 과

6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub>는 15%의 정상 임부 혈청 내에서 평균 1.3116 ng/ml의 농도로 측정되었으며, 15%의 자간전증 환자 혈청 내에서는 평균 989.3849 ng/ml의 농도로 측정되어 양군간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(p<0.01). Thromboxane B<sub>2</sub>는 15%의 정상 임부혈청 내에서 평균 92.7480 ng/ml의 농도로 측정되었으며, 15%의 자간전증 환자 혈청 내에서는 평균 175.7946 ng/ml의 농도로 측정되어 양군간에 유의한 차이는 관찰되지 않

았다(p=0.52)(Table 1).

제대정맥내로 각 용액을 관류시킨 후 측정된 프로스타글란딘의 대사물질인 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub>와 thromboxane B<sub>2</sub>의 농도를 이용하여 제대정맥내 피세포에서의 분비율(secretion rate)을 알아보았다. 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub>는 cord buffer를 처음 관류시킨 후에 비해 정상 임부혈청을 관류시켰을 때 유의한 분비율의 증가가 관찰되었다(p<0.01). 그러나 정상 임부혈청을 관류한 후와 자간전증환자의 혈청을 관류한 후의 분비율의 차이는 관찰되지 않았다(p=0.77). 자간전증환자의 혈청을 관류한 후에 비해 hydroperoxide를 관류한 후의 분비율증가는 유의하였으며(p<0.01), 아스파린을 먼저 관류하고 나서 hydroperoxide를 관류하였을 때 분비율은 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 2). Thromboxane B<sub>2</sub>의 분비율은 cord buffer를 관류한 후와 정상 임부혈청을 관류한 후에 유의한 변화는 관찰되지 않았으나(p=0.63), 정상 임부혈청을 관류한 후에 비해 자간전증환자의 혈청을 관류한 후의 분비율은 유의하게 증가되었다(p<0.01). 자간전증환자의 혈청을 관류한 후나 hydroperoxide를 관류한 후 thromboxane B<sub>2</sub>분비율의 차이는 관찰되지 않았으며(p=0.56), 아스파린



a, b, c : p&lt;0.01 by Wilcoxon signed rank test

Fig. 2. 6Keto-PGF1α secretion rate

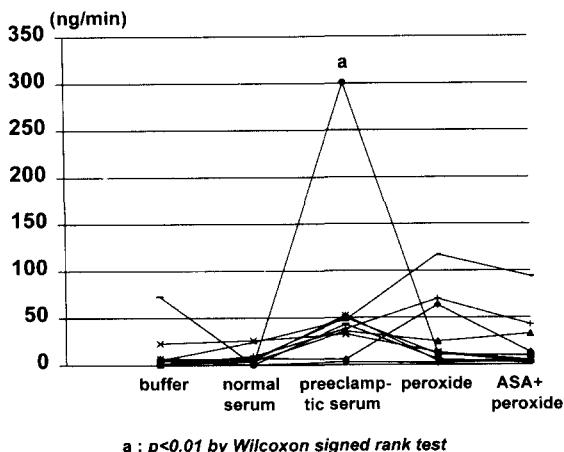


Fig. 3. Thromboxane B2 secretion rate

을 관류 후 hydroperoxide를 관류한 경우에도 분비율의 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p=0.06$ )(Fig. 3).

#### IV. 고 칠

혈관의 긴장성을 조절하는 혈관내피세포의 기능이 상이 자간전증의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>[6], [13]-[15]</sup>. 자간전증시 혈관내피 세포에 의해 분비되는 혈관이완성 물질인 prostacyclin이 감소하며, 혈관수축성 물질인 thromboxane은 증가하게 되어<sup>[16]</sup>상대적으로 thromboxane/prostacyclin의 비율이 증가되어 혈관수축현상이 유발된다<sup>[9], [17]-[18]</sup>. 정상임부의 혈청과 자간전증 임부의 혈청을 제대 정맥에 관류한 후 제대정맥내피세포에서 생성된 prostacyclin농도는 정상 임부와 자간전증환자간에 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, thromboxane의 분비율은 정상 임신부에 비해 자간전증환자의 혈청을 관류하였을 때 더욱 증가하는 양상을 보여 자간전증 환자의 혈청 내에 혈관이완물질인 prostacyclin보다는 혈관수축물질인 thromboxane의 생성을 증가시키는 어떤 물질이 존재할 가능성을 시사하는 것으로 생각되며 이의 실체를 밝히는 것에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 정상 임부에서 보다 자간전증 임부의 혈청 내 prostacyclin의 농도가 유의하게 높게 관찰되었다. 이는 자간전증시 증가된 thromboxane에 의한 혈관수축에 대한 보상기전으로 인한 것으로 생각되나 대상군 수

가 적어 어떤 의미를 두기는 어려우며 많은 인원을 대상으로 추후 검증이 필요할 것으로 생각된다.

Peroxide 관류시 prostacyclin의 분비율은 자간전증 환자의 혈청을 관류한 경우 보다 증가하는 양상을 보였으나 thromboxane의 분비율은 유의한 차이가 없었다. 이는 peroxide가 자간전증환자의 혈청과 마찬가지로 혈관내피세포에 작용하여 thromboxane의 생성을 증가시키는 작용이 있는 것으로 생각된다. Peroxide 관류시 관찰되는 prostacyclin의 분비율 증가는 peroxide 자체에 의한 혈관내피의 자극에 의한 것인지 thromboxane의 증가에 대한 보상기전에 의해 prostacyclin의 분비율이 증가된 것인지는 확실하지는 않으나 peroxide에 의해 제대정맥내피세포에서의 thromboxane의 증가에 대한 homeostatic mechanism이 작용하였을 것으로 생각된다.

아스파린은 arachidonic acid가 프로스타글란딘으로 되는 과정인 cyclooxygenase에 작용하여 혈관이완성물질인 prostacyclin보다는 혈관수축성물질인 thromboxane의 생성을 더욱 방지하는 것으로 알려져 있다<sup>[19]</sup>. 본 연구에서 peroxide만을 관류한 후에 비해 아스파린을 관류하고 나서 peroxide를 관류한 경우, thromboxane의 생성율도 감소되었지만 prostacyclin의 분비율은 더욱 감소되었다. 이는 아스파린에 의해서 프로스타글란딘의 합성이 감소된 것으로 생각되지만 시간이 지남에 따라 제대의 프로스타글란딘생성능력이 점차 감소했을 가능성 및 peroxide에 의한 제대혈관내피 세포의 손상에 의해 상대적으로 prostacyclin의 생성이 더욱 감소하였을 가능성을 염두에 두어야 한다. 또한 프로스타글란딘의 생성에 영향을 줄 것으로 생각되는 perfusion pressure의 변화를 측정하지 못한 아쉬움이 있다. 그러나 본 연구가 갖는 중요한 의의는 혈관내피세포 배양에 의한 그 동안의 많은 연구에 비해 더욱 생체와 비슷한 조건으로 또 비교적 간단히 인간 제대정맥의 관류모델을 통해 국내에서는 최초로 혈관내피세포를 사용할 수 있었다는 것이라고 생각된다.

#### V. 결 론

본 실험을 통하여 자간전증 환자의 혈청은 제대정맥 혈관내피세포에서의 thromboxane의 형성을 촉진하

며, peroxide는 thromboxane 및 prostacyclin의 분비를 증가시키며, 저 용량의 아스파린은 hydroperoxide에 의해 유발된 prostacyclin의 분비를 경감시키는 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구진은 본 연구를 통하여 인간 제대정맥을 이용한 관류모델을 확립할 수 있었다. 향후 인간 제대정맥 관류모델을 이용하여 각종 조건을 조절하여 지속적인 연구가 이루어 진다면 상이한 연구결과로 논란의 여지가 많은 임신성 고혈압의 원인 및 병태생리를 이해하는데 유용할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- Chesley LC. Vascular reactivity in normal and toxemic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1966 ; 99 : 871-881.
- Graeff H, von Hugo R, Schrock R. Recent aspects of hemostasis, hematology and hemorheology in preeclampsia-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1984 ; 17 : 91-102.
- Bussolino F, Benedetto C, Massobrio M, et al. Maternal vascular prostacyclin activity in pre-eclampsia. *Lancet* 1980 ; 2 : 702.
- Dadak C, Kefalides A, Dinzinger H, et al. Reduced umbilical artery prostacyclin formation in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1982 ; 144 : 792-795.
- Downing I, Shepherd GL, Lewis PJ. Kinetics of prostacyclin synthetase in umbilical artery microsomes from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Br J Clin Pharmacol* 1982 ; 13 : 195-198.
- Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, et al. Preeclampsia : An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989 ; 161 : 1200-1204.
- Todd ME. Hypertensive structural changes in blood vessels : Do endothelial cells hold the key? *Can J Physiol Pharmacol* 1991 ; 70 : 536-551.
- Walsh SW, Wang Y, Jesse R. Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 169 : 1007-1012.
- Walsh SW. Preeclampsia : An imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985 ; 152 : 335-340.
- Walsh SW, Parisi VM. The role of arachidonic acid metabolites in preeclampsia. *Semin Perinatol* 1986 ; 10 : 334-355.
- Branch DW, Dudley DJ, LaMarche S, et al. Sera from preeclamptic patients contain factors that stimulate prostacyclin production by human endothelial cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992 ; 45 : 191-195.
- Jaffe EA, Ralph L, Carl G, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973 ; 52 : 2745-2756.
- Weiner CP, Kwaan HC, Xu C, et al. Antithrombin III activity in women with hypertension during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1985 ; 65 : 301-306.
- Ferris TF. Pregnancy, preeclampsia, and the endothelial cell. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 1439-1440.
- McCarthy AL, Woofson RG, Raju SK, et al. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from woman with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 168 : 1323-1330.
- Friedman SA. Preeclampsia: A review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* 1988 ; 71 : 122-137.
- Rodgers JM. Pregnancy related hypertension. In: Creasy RK, Resnik R, eds. *Maternal-fetal medicine: principles and practice*. Philadelphia : WB Saunders, 1984.
- Walsh SW, Behr MJ, Allen NH. Placental prostacyclin production in normal and toxemic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1985 ; 151 : 110-115.

19. Walsh SW. Physiology of low-dose aspirin therapy for the prevention of preeclampsia. Seminars in Perinatol 1990 ; 14 : 152-170