

Monocrotaline으로 유발한 백서 폐동맥 고혈압에서 Endothelin 수용체 차단제 투여의 효과

포천중문의과대학 소아청소년과, 병리과*, 이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실[†], 소아과학교실[‡]

임경아 · 심정연* · 조상호* · 김관창[†] · 한재진[†] · 홍영미[‡]

= Abstract =

Effect of endothelin receptor blockade on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats

Kyoung Ah Lim, M.D. Jung Yun Shim, M.D., Sang Ho Cho, M.D., Kwan Chang Kim, M.D.,
Jae Jin Han, M.D. and Young Mi Hong, M.D.

Department of Pediatrics, Department of Pathology*, College of Medicine, Pochon CHA University,
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery[†], Department of Pediatrics[‡], School of Medicine,
Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose : To examine the effect of bosentan, a dual endothelin receptor (ER) antagonist, on the development of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension in rats by especially focusing on the pulmonary vascular morphology changes.

Methods : Sprague-Dawley rats were treated as follows: controls received a subcutaneous saline injection, MCT-treated rats received a subcutaneous MCT injection, and bosentan-treated rats received a MCT injection followed by treatment with bosentan (20 mg/kg/day). To assess the effects of ER blockade on the time course, the animals were exsanguinated, and their hearts and lungs were dissected after 7, 14, or 28 days.

Results : The mean body weights of the MCT- and bosentan-treated rats were significantly lower than that of the control rats on days 7, 14, and 28. Bosentan administration significantly inhibited the progression of right ventricular hypertrophy on day 28 (right ventricle/[left ventricle+septum]: 0.71 ± 0.10 in MCT-treated rats vs. 0.49 ± 0.09 in bosentan-treated rats; $P < 0.05$). Quantitative analysis of peripheral pulmonary arteries revealed that the increase in medial wall thickness after MCT injection was significantly attenuated in the bosentan-treated rats on day 28 ($49.96 \pm 10.06\%$ in MCT-treated rats vs. $47.09 \pm 10.48\%$ in bosentan-treated rats; $P < 0.05$). In addition, the increase in the number of intra-acinar muscular arteries after MCT injection was reduced by bosentan on days 14 and 28.

Conclusion : Bosentan administration in intermediate doses exerts inhibitory effects on lung vascular hypertrophy and right ventricular hypertrophy during the development of MCT-induced pulmonary hypertension in rats.

(Korean J Pediatr 2009;52:689-695)

Key Words : Endothelin receptor antagonist, Monocrotaline, Pulmonary hypertension

서 론

폐동맥 고혈압은 특발성으로 발생하거나 혹은 만성 폐쇄성 폐질환, 선천성 심장병, 호흡곤란 증후군, 만성 저산소증 등 여러 원인에

의해 이차적으로 발생하기도 한다. 폐동맥 고혈압은 증가된 폐혈관 긴장도(tone), 혈관 반응, 폐 평활근 세포의 증식이 특징적인 병태생리이며, 이차적으로 폐혈관 저항을 증가시켜 우심실 비대를 초래한다. 폐동맥 고혈압의 병리학적 소견으로는 혈관 내피세포와 섬유모세포, 및 평활근 세포의 비대와 증식으로 인한 혈관 벽의 비후, 세포외 기질의 축적을 들 수 있다¹⁾. 이에 대한 기전으로 기계적인 장력과 전단 응력 뿐 만 아니라 혈관 내피 세포에서 분비되는 여러 가지 성장 인자 및 혈관 활성화 매개물과의 관련성에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다²⁻⁶⁾. 즉, 지난 수년간 폐고혈압증에 관한 병태생리학적인 많은 이해가 이루어졌으며 특히 세포내 전달 기제들이 밝혀지면서, 질병 발생에 중요한 역할을 한다고 믿어지는 특이 경로를 차단하는 약제들이 개발되고 있다⁷⁻¹²⁾.

Received : 9 October 2008, Revised : 10 November 2008

Accepted : 5 December 2008

Address for correspondence : Young Mi Hong, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Ewha Womans University Mok-Dong Hospital, 911-1 Mok6-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-710, Korea

Tel : +82-2-2650-2841, Fax : +82-2-2653-3718

E-mail : hongym@chollian.net

This work was supported by the research fund from Il-dong Pharmaceutical Company (2007) by the Korean Pediatric Society, Seoul, Korea

이 중 혈관 내피 세포로부터 생성, 분비되는 endothelin-1 (ET-1)은 강력하고, 오래 지속되는 혈관 수축을 일으키는 펩타이드로서¹³⁾, ET-1 생성과 폐혈관 변화와의 관련성이 제시되었다¹⁴⁻¹⁶⁾. 혈청 ET-1은 대식세포, 비만세포, 다형핵 백혈구에서도 생성, 분비되며, 특히 angiotensin II에 의해 세포에서의 분비가 자극되어 이는 다시 심실의 비대와 섬유화를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. ET-1의 세포 작용 기전을 조절하는 약물로서 개발된 것이 endothelin 수용체에 대해 경쟁적으로 작용하여 ET-1의 결합을 차단하는 수용체 차단제이다. 이 중 bosentan은 수용체 A와 수용체 B에 모두 작용하는 이중 수용체 차단제(dual receptor blocker)로서 투여 용량에 비례하게 혈장 ET-1 농도를 증가시키며 ET-1에 관련된 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는 alkaloid계 toxin인 monocrotaline에 의해 유발된 백서의 폐동맥 고혈압 모델에서 bosentan을 지속적으로 투여하였을 때 일어나는 초기 혈관 변화들을 관찰함으로써 폐동맥 고혈압 발생의 기전을 이해하고 치료에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 실험군

병원균이 없는 체중 200-250 g의 자성 성숙 Sprague-Dawley 백서를 대조군, monocrotaline군 및 bosentan군으로 나누었다. 대조군에는 3.0 mL/kg의 생리식염수를 배부에 피하 주사하고 실험 기간 동안 일반적인 동물 사료와 물을 공급하여 12시간 낮밤이 조절되는 사육실에서 관찰하였다. Monocrotaline군에는 동량의 monocrotaline 수용액 60 mg/kg를 배부에 1회 피하 주사하였다. Monocrotaline 수용액은 monocrotaline 분말(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)을 적은 양의 1N 염산 용액(HCL)에 녹인 후 멸균 증류수로 희석하고 수산화나트륨(NaOH)를 첨가하여 pH 7.35로 맞추고 최종적으로 20 mg/mL의 농도가 되도록 희석하였다. 정해진 실험 기간 동안 대조군과 동일한 조건 하에서 사육하며 관찰하였다. Bosentan군은 monocrotaline군과 동일한 용량의 monocrotaline을 1회 피하 주사한 후 실험 기간 동안 bosentan (Tracleer[®], Actelion Pharm., South San Francisco, CA, USA) 20 mg·kg⁻¹·day⁻¹을 1 mL의 멸균 증류수에 녹여 12시간 간격으로 나누어 위관 영양법으로 투여하였다. 실험 7일, 14일, 28일 제 각 실험 군에서 무작위로 6마리씩 선택하여 아래와 같은 방법으로 동물을 희생시켜 실험하였다.

2. 연구 방법

1) 기관의 무게 측정

실험동물의 체중을 측정하고 에테르를 이용하여 마취시킨 후 즉시 흉벽을 절개하였다. 심장과 대혈관의 기시부를 노출시킨 후 하대정맥으로부터 혈액을 채취하고 심장과 폐를 동시에 적출하였

다. 작은 가위를 이용하여 심장을 절개하여 우심실을 좌심실 및 심실벽으로부터 분리하고 우심실의 무게와 좌심실 및 심실벽의 무게를 각각 측정하여 우심실/(좌심실+심실벽) 무게의 비를 구하였다. 주기관지를 포함한 양측 폐의 무게를 측정 후 조직 검사를 위해 10% 포르말린 액에 담그고 1 cc 주사기를 이용하여 양측 기관지를 통해 포르말린 액을 서서히 주입하여 폐포를 확장시킨 후 고정하였다.

2) 형태계측학적 측정

포르말린 액에 밤새 고정된 양측 폐의 하엽과 상엽에서 5 mm 간격으로 횡단면으로 폐를 절단하여 블록을 만들었다. 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매 과정을 거쳐 3 μm의 연속 절편을 만든 후 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. 각 실험군의 염색 표본에서 종말 세기관지, 호흡성 세기관지와 동행하는 근육성 폐세동맥의 외경(양측 외탄력관 사이의 거리) 및 중막의 두께(내탄력관과 외탄력관 사이의 거리)를 image-Pro plus 6.0 program을 이용하여 측정하고 중막 비후율(중막의 두께/외경×100, %)을 구하였다(Fig. 1). 한 표본 슬라이드에서 혈관 외경 25-100 μm 인 혈관 30개씩을 선택하여 측정하고 평균을 구하였다. 또한 호흡성 세기관지로부터 폐의 말단 부분까지를 관찰하여 한 시야에서 발견되는 근육성 폐세동맥의 숫자를 기록하였다(Fig. 2). 즉, 호흡성 세기관지 이하의 폐포판, 및 폐포에 동반된 폐세동맥 중 근육성 폐세동맥의 숫자를 200배율 시야에서 세어 기록하였다. 한 개체 당 20개의 다른 시야를 확보하여 각 시야에서 관찰되는 근육성 폐세동맥의 숫자를 기록하고 평균값을 구하였다.

3) 사망률

실험 기간 동안 동물들은 12시간 낮밤이 조절되는 사육실에서 관찰하였으며 일반적인 동물사료를 제공하였고 물은 스스로 섭취할 수 있도록 충분한 양을 공급하였다. 각 군 별로 나누어 cage에서 사육하였고 실험 기간 중에 사망한 개체의 생존일수를 기준으로

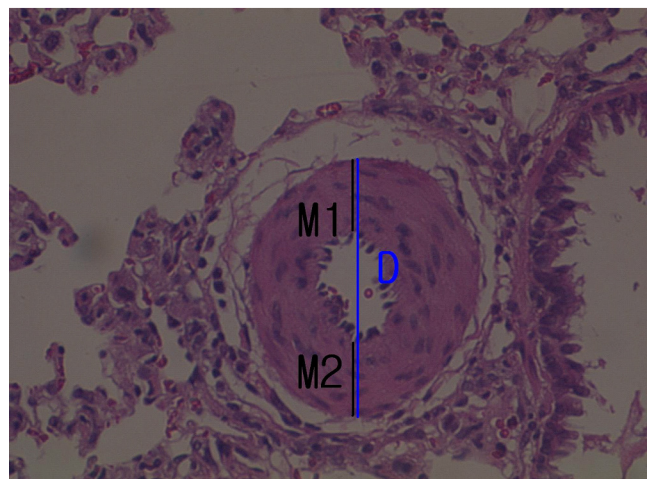


Fig. 1. Image analyzer represents the external diameter (D) and medial wall thickness on either side (M1 and M2) of a pulmonary arteriole. The medial wall thickness was expressed as follows: % wall thickness=(M1+M2)/D×100.

로 사망률을 구하였다.

4) 통계학적 분석

통계 프로그램은 SPSS for Windows (version 10.0, SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였고 각 군 간의 결과 비교는 Mann-Whitney U test로 분석하여 *P* value 0.05 미만을 통계적으로 의미 있는 결과로 해석하였다.

결 과

1. 기관별 무게

초기 체중은 각 실험 군 간에 유의한 차이가 없었으나 실험 7일부터 28일까지 monocrotaline군과 bosentan군의 평균 체중은 대조군에 비해 유의하게 작았다. 실험 28일째 monocrotaline군의 평

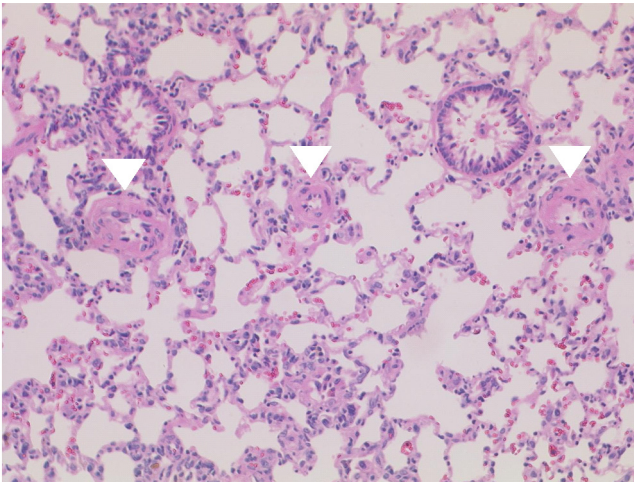


Fig. 2. The number of muscular intra-acinar arteries per peripheral field was counted. Each arrowhead indicates a section of a muscular intra-acinar arteriole (H&E stain, ×200 magnification).

Table 1. Changes in Body Weight, Right Ventricle/ (Left Ventricle+Septum) Ratio, and Lung/Body Weight Ratio at Different Times in Each Experimental Group

Day		Number of animals	Body weight (g)	RV/ (LV+septum) (%)	Lung weight/Body weight (%)
7	Control rats	6	298.0±12.2	0.34±0.05	0.42±0.04
	MCT rats	6	255.9±9.1 [†]	0.30±0.04	0.64±0.17
	Bosentan rats	6	253.2±6.9 [†]	0.29±0.03	0.62±0.08
14	Control rats	6	372.9±33.1	0.24±0.06	0.39±0.03
	MCT rats	6	294.1±34.0 [†]	0.47±0.07 [†]	0.81±0.48*
	Bosentan rats	6	299.3±23.5 [†]	0.36±0.08*	0.73±0.08 [†]
28	Control rats	6	426.8±37.0	0.32±0.06	0.35±0.03
	MCT rats	4	307.5±34.7*	0.71±0.10*	0.82±0.20*
	Bosentan rats	6	328.0±27.6 [†]	0.49±0.09 [†]	0.71±0.10 [†]

Abbreviation: MCT, monocrotaline

**P*<0.05 vs the corresponding value in control rats

[†]*P*<0.01 vs the corresponding value in control rats

균 체중은 대조군에 비해 28% 적었으며 bosentan군은 대조군에 비해 23% 적었다(Table 1).

우심실/(좌심실+심실벽) 무게 비로 나타난 우심실 비대 지표는 실험 7일째 세 군 간에 차이가 없었으나, 14일과 28일에는 monocrotaline군과 bosentan군의 우심실 비대 지표가 대조군에 비해 의미 있게 높았다. Bosentan을 지속적으로 투여한 군에서는 실험 28일째 우심실 비대 지표가 0.49±0.09 mg/g로, monocrotaline군의 0.71±0.10 mg/g에 비해 뚜렷하게 낮았다(*P*<0.05) (Table 1). 폐/체중 비는 실험 7일에 세 군 간에 유의성이 없었다. 14일과 28일에는 대조군에 비해 monocrotaline 군과 bosentan군의 폐/체중 비가 증가되어 있었다(*P*<0.05)(Table 1).

2. 폐혈관의 형태학적 계측

1) 폐동맥 중막 비후율

세기관지나 폐포 등의 기본적인 폐 골격 모양은 각 군 사이에 뚜렷한 차이가 없었으나 폐동맥 중막 비후 소견은 실험 7일째부터 대조군에 비해 monocrotaline군과 bosentan군에서 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3). 폐세동맥의 중막 비후율은 실험 28일째 bosentan 투여군에서 monocrotaline군에 비해 유의하게 낮았다(Table 2).

2) 근육성 폐세동맥의 수

호흡성 세기관지부터 폐의 말단 부분까지 주행하는 근육성 폐세동맥의 숫자는 대조군에 비해 monocrotaline군과 bosentan군에서 더 많이 관찰되는 경향을 보여 주었다. 또한 호흡성 세기관지 이하의 폐포관 및 폐포에 동반된 근육성 폐세동맥의 숫자가 bosentan을 지속적으로 투여한 군에서는 14일과 28일째 monocrotaline군에 비해 유의하게 적은 것으로 나타났다(*P*<0.05) (Table 3).

3. 사망률

실험 28일까지 동물을 관찰한 결과 대조군과 bosentan 투여군의 개체는 모두 생존한 반면 monocrotaline군에서는 실험 25일과 27일에 각각 1마리씩 사망하여 33%의 사망률을 보였다(Fig. 4).

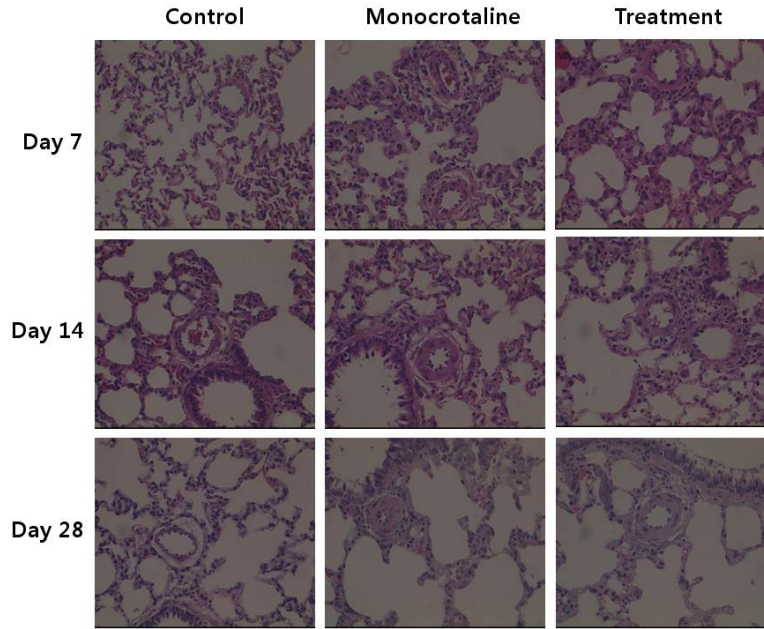


Fig. 3. Hematoxylineosin (H & E) staining of the lung tissues. Muscular layers of pulmonary arterioles were thickened in the monocrotaline-treated rats compared with the bosentan-treated rats on days 7, 14, and 28 ($\times 400$ magnification).

Table 2. Changes in Wall Thickness of Peripheral Pulmonary Arteries (%) at Different Times in Each Experimental Group

Day	Control rats	MCT rats	Bosentan rats
7	31.96 \pm 8.36	41.16 \pm 8.97*	38.52 \pm 12.09*
14	34.88 \pm 8.98	47.92 \pm 11.55*	49.33 \pm 11.55*
28	31.99 \pm 10.25	49.96 \pm 10.06*	47.09 \pm 10.48* [†]

Abbreviation : MCT, monocrotaline

* $P < 0.05$ vs the corresponding value in control rats

[†] $P < 0.05$ vs the corresponding value in MCT rats

Table 3. Number of Muscular Intra-acinar Arteries at Different Times in Each Experimental Group

Day	Contol rats	MCT rats	Bosentan rats
7	5.6 \pm 1.1	8.2 \pm 1.7*	8.8 \pm 1.9*
14	5.2 \pm 1.7	8.2 \pm 2.2*	5.4 \pm 1.6 [†]
28	3.9 \pm 1.3	8.3 \pm 2.2*	6.1 \pm 1.9* [†]

Abbreviation : MCT, monocrotaline

* $P < 0.05$ vs the corresponding value in control rats.

[†] $P < 0.05$ vs the orresponding value in MCT rats.

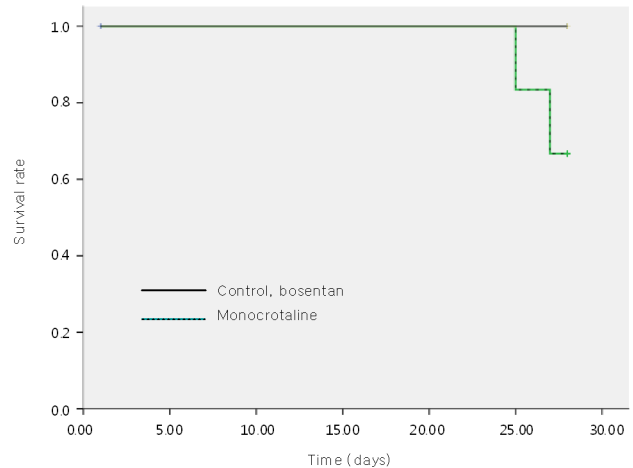


Fig. 4. Survival rates of the different experimental groups.

결 과

Monocrotalin은 pyrrole alkaloid 계 독소로 일회 주사로 일관되게 폐동맥 고혈압을 일으키는 물질이다. 그 기전으로는 투여 후 초기 1주일의 급성기 동안 형태학적인 또한 기능적인 내피 세포 손상의 증거들이 발견되었으며 이후에는 염증성 변화가 후속되어 점차적인 폐동맥 고혈압에 이르게 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. Miyauchi 등¹⁹⁾은 이미 monocrotaline 유발성 폐동맥 고혈압에서

순환 혈액 내 ET-1 농도가 증가됨을 관찰함으로써 ET-1이 발병 기전에 관여할 것으로 보고하였다. 또한 BQ-123이라는 ETA 수용체 차단제를 사용하였을 때 폐동맥 고혈압과 폐동맥의 중막 비후가 완화됨을 통해 ET가 발병 기전에 관여함을 반증하였다. 1997년 Stephane 등²⁰도 LU-135252라는 ETA 수용체 차단제를 사용하여 쥐에서 monocrotaline 유발성 폐고혈압이 완화되고 우심실 비대와 혈관 내피 세포 기능이 회복됨을 증명하였다. 현재까지 알려진 ET 수용체는 혈관 수축과 평활근 세포의 증식을 매개하는 ETA 수용체와 nitric oxide와 prostacycline 분비를 통해 혈관 이완을 매개하는 ETB1 수용체, 그리고 혈관 수축에 관련된 ETB2 수용체로 나뉜다²¹. 그러므로 ETA 수용체 차단제를 단독으로 사용하였을 때에는 ETA 수용체를 통한 혈관 수축은 억제되지만, ETB 수용체에 결합하는 ET에 의한 효과도 함께 나타날 수 있으므로 두 가지 수용체를 동시에 차단하는 이중 수용체 차단제를 사용하는 것이 ET-1의 영향을 알아보는 데 더 적합한 방법이라고 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 monocrotaline에 의해 유도된 백서의 폐동맥 고혈압증에서 ET-1 수용체에 대한 비특이적 차단제인 bosentan을 지속적으로 투여하였을 때 폐혈관의 재형성, 우심실 비대, 그리고 생존율에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

본 실험에서 monocrotaline 투여 직후부터 bosentan (20 mg · kg⁻¹ · day⁻¹)을 실험 기간 동안 지속적으로 투여한 군에서는 4주째 우심실 비대가 대조군에 비해 적었으며 폐혈관 중막 비후도 완화된 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들이 monocrotaline을 이용하여 rat에서 시행한 연구 결과와 일치되는 소견이었다^{22, 23}. Hill 등²²은 bosentan (200 mg · kg⁻¹ · day⁻¹)를 3주간 투여한 결과 우심실 대 좌심실 및 심실벽의 무게비나 우심실 압력에 있어서 대조군과 유의한 차이가 있었다고 보고하였는데 bosentan 100 mg · kg⁻¹ · day⁻¹를 투여한 군에서는 이와 같은 항고혈압 효과를 확인할 수 없다고 하였다. 단, 이들이 사용한 monocrotaline 양은 105 mg/kg로 다른 연구자들에 비해 많았다^{8, 19, 20, 23, 24}. Clozel 등²³도 monocrotaline 모델에서 bosentan 투여의 효과를 입증하였는데 4주째 평균 폐동맥 압력과 우심실 대 체중 비를 비교하였다. 이들은 예비 실험을 통해 bosentan의 용량-반응 곡선에서 안정수준에 이르는 최고 용량인 300 mg · kg⁻¹ · day⁻¹를 선택하였다고 하였다. 이와 같이 지금까지 이루어진 대부분의 연구에서는 200-300 mg · kg⁻¹ · day⁻¹로 상대적으로 높은 용량의 bosentan을 사용한 반면^{22, 23}, 본 연구에서는 중간 용량의 bosentan을 투여하여 의미 있는 억제효과를 얻을 수 있었다는 점이 구별되는 점이라고 할 수 있겠다. 단, 본 연구에서 제시하지 못한 폐동맥 압력과의 상관성을 알아보기 위해 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

폐동맥 고혈압에서 폐혈관의 조직학적 변화는 여러 가지 형태 분석학적 검사(morphometric analysis)로 확인할 수 있는데 본 연구에서는 첫째로 혈관 외경 25-100 μm 사이의 폐동맥에서 중막 비후를 측정하여 비교하였다. 이와 같은 분석 방법은 많은 선행

연구에서도 혈관의 크기에 상관없이 동일하게 사용되었다^{3, 11, 19, 20, 22, 24}. 폐고혈압이 지속될 때 폐동맥의 혈관재형성 과정이 진행되는데 이는 각각의 근육성 폐동맥에서 주로 평활근 세포의 비대에 의해 중막의 두께가 증가하는 소견이다¹. 연구자들에 따라 폐포성 혈관(alveolar wall arteries)의 근육화가 폐동맥 고혈압의 조직 소견이라고 생각하여 이를 정량화하려는 시도들이 있어왔다. Todd 등¹⁸은 monocrotaline 투여 후 폐포성 혈관 중 근육성 변화가 생긴 혈관의 백분율을 구하여 나타내었다. Shchermuly 등⁸은 40-50개 사이의 폐포성 혈관을 근육성, 부분 근육성, 그리고 비근육성 동맥으로 구분하여 점수화하였다. 본 연구에서는 직경 125 μm 이하의 호흡성 세기관지를 한 표본에서 두 개 이상 찾아 이를 잇는 가상의 3차원적 영역을 만들어 이 이하의 말단 범위 안에 속하는 근육성 폐동맥의 개수를 구하였다. 이와 같은 폐의 말단부에서는 정상적으로 근육성 폐동맥은 드물게 관찰되나, 본 연구에서는 폐동맥 고혈압의 혈관 병리에서 특징적인 소견인 근육 확장 소견이 말단부에서도 쉽게 관찰되었다. 이와 같은 혈관 변화는 4주간의 bosentan 투여에 의해 완화되는 결과를 보여 주었다. 또한 결과에서 언급하지는 않았으나 중증 폐동맥 고혈압에서 볼 수 있는 plexiform lesion이 monocrotaline군 개체에서 얻은 조직 슬라이드에서 유일하게 관찰되었다.

Todd 등¹⁸은 생후 3일된 신생 쥐와 생후 8일된 미성숙 쥐와 8주된 성숙 쥐에서 각각 monocrotaline을 투여한 후 폐혈관 변화를 관찰하였는데 신생 쥐에서는 투여 2주 후에 우심실 비대나 폐혈관의 변화는 뚜렷하지 않은 반면 폐포 형성이 저하되어 있었다. 미성숙 쥐에서는 투여 2주 후에 근육성 혈관의 중막 비후와 주변부 혈관으로의 근육 확장이 관찰되었고 4주 후에는 동맥 크기가 성장함에 따라 중막 비후율이 오히려 감소한 반면, 성숙 쥐에서는 4주후까지 지속적으로 우심실 비대와 중막 비후가 진행되었다고 하였다. 이와 같이 폐고혈압 유발 실험에서는 실험 개체의 폐혈관 성숙도가 우선 고려되어야 할 것으로 생각한다. 또한 폐동맥 고혈압의 조직 병리 소견은 폐의 모든 부분에서 동일한 진행 정도를 나타내지 않는다는 점과 원인에 따른 조직학적 결과와의 상관관계가 아직까지 잘 정립되지 못했다는 점¹을 염두에 두고 시행되어야 할 것이다.

Clozel 등²³은 본 연구와 유사한 실험 모델에서 4주 후 사망률이 bosentan을 투여하지 않았을 때 53%, bosentan (300 mg · kg⁻¹ · day⁻¹)을 투여하였을 때 11%라고 보고하였다. 본 연구에서는 bosentan 투여 용량이 더욱 적었음에도 불구하고 4주까지 관찰한 결과 bosentan 투여군에서는 사망한 개체가 없었다. 이 두 실험에서 약물 투여 방법이 서로 달랐는데 음식물과 혼합하여 투여하는 방법보다 직접 gavage로 위까지 도달하도록 한 방법이 정확하였으리라 생각된다. 두 결과 모두 bosentan 투여로 중기 사망률을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 monocrotaline으로 유발한 폐동맥 고혈압 모델에서 비교적 적은 용량의 bosentan 투여로 중기 폐동맥 재형성과 우심실 비대가 억제되는 효과가 있었으며 사망률에서도 의미 있는

차이를 보여주었다.

요 약

목적 : 폐동맥 고혈압은 지속적인 폐혈관 저항의 증가로 우심실 부전에 이르게 되는 질병 상태를 일컫는다. 폐동맥 고혈압의 기전으로 폐혈관의 내피세포로부터 endothelin 분비가 증가되어 세포 증식 촉진, 세포 자멸 억제, 혈관 수축, 염증 반응을 통해 폐혈관의 재형성에 관여함이 제시되었다. Bosentan은 endothelin 수용체에 결합하여 효과를 차단시키는 약물로 개발되었다. 이에 monocrotaline으로 폐고혈압을 유발시킨 동물에서 non-selective endothelin receptor blocker인 bosentan을 투여하였을 때 폐동맥 고혈압 발생에 미치는 효과를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방법 : 체중 250 g 내외의 4주령 가랑 된 자성 Sprague-Dawley 백서를 대조군, monocrotaline군, bosentan군으로 나누었다. Monocrotaline군과 bosentan군에는 monocrotaline 수용액 60 mg/kg를 배부에 1회 피하 주사하고 대조군에는 동량의 생리 식염수를 주사하였다. Bosentan군에는 bosentan (20 mg · kg⁻¹ · day⁻¹)을 monocrotaline 투여 직후부터 매일 1일 2회 위관 영양법으로 투여하였다. 7일, 14일, 28일에 각각 동물을 희생시켜 심장의 무게를 우심실벽, 좌심실벽, 심실간벽으로 나누어 기관의 무게를 측정하고 조직 검사를 위해 양측 폐를 포르말린 수용액에 고정하였다.

결과 : 7일, 14일, 28일째 평균 체중은 대조군에 비해 monocrotaline군과 bosentan군이 유의하게 적었다. 우심실/(좌심실+심실간벽)의 무게 비율은 28일째 monocrotaline군(0.71±0.10 mg/g)에 비해 bosentan군(0.49±0.09 mg/g)이 유의하게 적었다 (P<0.05). 폐세동맥의 조직형태학적 분석 결과 실험 28일째 monocrotaline투여에 의해 유발된 중막 비후 조건이 bosentan 투여에 의해 현저하게 저하된 것으로 나타났다(monocrotaline군 49.94±10.06 vs bosentan군 47.09±10.48, P<0.05). 또한 호흡성 세기관지 이하의 폐포에 분포하는 근육성 폐세동맥의 숫자도 monocrotaline 투여에 의해 증가되었으나 14, 28일째 bosentan군에서는 현저하게 적은 것으로 나타났다.

결론 : Monocrotaline으로 유도한 백서의 폐고혈압에서 bosentan을 투여하고 초기 경과를 관찰한 결과, 2주째부터 우심실 비대가 억제되었고 4주 이내 사망률도 낮아 endothelin receptor에 대한 길항 작용의 효과로 해석될 수 있겠다.

References

1) Tudor RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, Flores S. Pathology of pulmonary hypertension. Clin Chest Med 2007; 28:23-42.
 2) Dai ZK, Tan MS, Chai CY, Yeh JL, Chou SH, Chiu CC, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and

endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to heart failure in aorta-banded rats. Pediatr Pulmonol 2004;37:249-56.
 3) Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, et al. Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. Eur Respir J 2000;15:640-8.
 4) Chen L, He H, Fernandez Mondejar E, Freden F, Wiklund P, Alving K, et al. Endothelin-1 and nitric oxide synthase in short rebound reaction to short exposure to inhaled nitric oxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;281:H124-31.
 5) Park HK, Park SJ, Kim CS, Paek YW, Lee JU, Lee WJ. Enhanced gene expression of renin-angiotensin system, TGF-beta1, endothelin-1 and nitric oxide synthase in right-ventricular hypertrophy. Pharmacol Res 2001;43:265-73.
 6) Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen van P, Schott P, Brodde OE, et al. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. Circ Res 2003;93:230-7.
 7) Sastry BK. Pharmacologic treatment for pulmonary arterial hypertension. Curr Opin Cardiol 2006;21:561-8.
 8) Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:39-45.
 9) Lee SH, Channick RN. Endothelin antagonism in pulmonary arterial hypertension. Semin Respir Crit Care Med 2005;26:402-8.
 10) Morice AH, Mulrennan S, Clark A. Combination therapy with bosentan and phosphodiesterase-5 inhibitor in pulmonary arterial hypertension. Eur Respir J 2005;26:180-1.
 11) Dai ZK, Tan MS, Chai CY, Chou SH, Lin PC, Yeh JL, et al. Effects of sildenafil on pulmonary hypertension and levels of ET-1, eNOS, and cGMP in aorta-banded rats. Exp Biol Med (Maywood) 2006;231:942-7.
 12) Dupuis J. Endothelin-receptor antagonists in pulmonary hypertension. Lancet 2001;358:1113-4.
 13) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411-5.
 14) Janakidevi K, Fisher MA, Del Vecchio PJ, Tiruppathi C, Figue J, Malik AB. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Physiol 1992;263:C1295-301.
 15) Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. Cardiovasc Res 2004;61:227-37.
 16) Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation 2004;109:159-65.
 17) Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, van Marle SP, Peeters PA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. Clin Pharmacol Ther 1996;60:124-37.
 18) Todd L, Mullen M, Olley PM, Rabinovitch M. Pulmonary toxicity of monocrotaline differs at critical periods of lung

- development. *Pediatr Res* 1985;19:731-7.
- 19) Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73:887-97.
 - 20) Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-ylloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1312-8.
 - 21) Filep JG, Clozel M, Fournier A, Foldes-Filep E. Characterization of receptors mediating vascular responses to endothelin-1 in the conscious rat. *Br J Pharmacol* 1994;113:845-52.
 - 22) Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997;83:1209-15.
 - 23) Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C, Qiu C. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:967-73.
 - 24) Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, et al. A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:34-8.