

패혈증 제브라피쉬 모델에서의 염증반응과 벽전단응력 사이의 관계

최우락* · 김혜미** · 도준상* · 이상준*

Association of wall shear stress with inflammatory response in a sepsis zebrafish model

Woorak Choi*, Hyemi Kim**, Junsang Doh*, Sang Joon Lee*

Abstract : Activated leukocytes in sepsis patient commonly adhered to the microvessels where low wall shear stress (WSS) occurs. Many researchers have investigated relation between WSS and the accumulation of leukocyte using *in vitro* and *in vivo* models. However, the previous models had limitations in monitoring the leukocyte behavior in *in vivo* condition. In this study, WSS on blood vessels of a sepsis zebrafish model was measured using micro-PIV technique, and the distribution of the leukocytes was visualized by staining leukocytes. The leukocytes were mainly distributed in low WSS regions. The zebrafish would be useful model for understanding the relations between WSS and leukocyte behavior during sepsis.

1. 서 론

세균 감염으로 인한 전신성 염증반응인 패혈증 (sepsis)의 병리학적 진행 과정중 백혈구의 역할에 대한 연구들이 활발하게 진행되어왔다.⁽¹⁾ 세균에 의해 활성화된 백혈구는 각 조직과 장기들에 분포되어 있는 미세혈관 (microvessel) 벽에 쉽게 접촉하게 되며, 이는 혈관벽 손상과 혈전형성을 유도함으로써 원활한 관류를 방해하게 된다. 이러한 관류 이상은 패혈증에 의한 주요 사망원인인 다발성 장기부전 (multiple organ dysfunction syndrome)과 밀접하게 관련되어 있다.

최근에는 이러한 병리학적 과정의 시발점이 되는 백혈구의 접착이 벽전단응력 (wall shear stress)이 낮은 혈관들에서 집중적으로 발생한다는 내용의 연구들이 발표되면서 벽전단응력이 백혈구 거동에 미치는 영향에 대한 연구가 큰 관심을 받고 있다.⁽²⁾ 하지만 기존 연구들에서 사용되었던 혈관내피세포가 배양된 도관 (conduit)은 실제 혈관에서 일어나는 병리학적 과정

을 모방하는데 한계가 있었다. 또한 쥐나 토끼와 같은 기존 동물 모델들은 두껍고 불투명한 조직을 가지고 있기 때문에 혈관 내부의 병변이나 혈액유동을 실시간으로 관측하는데 한계가 있었다. 최근에는 제브라피쉬 (zebrafish) 수조에 패혈증을 일으키는 주요 세균인 박테리아성 지질다당류 (bacterial lipopolysaccharide)를 투여함으로써 제브라피쉬를 패혈증 연구에 활용한 사례들이 발표되고 있다.⁽³⁾ 제브라피쉬는 질병의 진행 속도가 빠르고, 생후 30일간 조직의 투명성을 유지하기 때문에, 질병의 진행 과정을 실시간으로 관측 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 제브라피쉬의 혈관 내에 작용하는 벽전단응력을 PIV 기법을 이용하여 측정하였고, 혈관 주변의 백혈구들을 염색함으로써 그 분포를 확인하였다. 또한 혈관들 중 일부를 아가로오스 겔(agarose gel)로 압박하여 주요혈관에 작용하는 벽전단응력의 크기를 변화시킴으로써 패혈증 제브라피쉬 모델 내에서의 백혈구 접착과 벽전단응력 크기의 상관관계를 분석하고자 하였다.

* 포항공과대학교 기계공학과

** 포항공과대학교 융합생명공학과

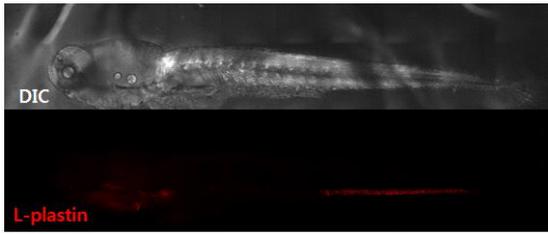


Fig. 1 Distribution of neutrophils and macrophages in sepsis zebrafish model

2. 실험 방법

혈관 내피세포에 GFP(green fluorescent protein)가 발현되어 있는 *tg[fli1a:EGFP]* 제브라피쉬의 부레 옆 주정맥(cardinal vein)에 세포 염색제 (L-Plastin antibody, anti-rabbit secondary antibody)을 주입함으로써 혈관주변의 백혈구 분포를 가시화 하였다 (Fig. 1). 또한 주요혈관에 작용하는 벽면전단응력의 크기를 변화시키기 위해 생체적합성이 높은 아가로오스 겔을 주요동맥과 정맥을 잇는 혈관(intersegmental vessel) 주변에 주입함으로써 혈액흐름의 일부를 일시적으로 차단하였다 (Fig. 2). 벽면전단응력 측정을 위하여 고속카메라를 이용해 연속된 혈액 유동 이미지를 얻었고, micro-PIV 기법을 적용하여 속도장 정보를 추출하였다. 이때 적혈구를 추적입자로 사용하였다.

3. 실험 결과

백혈구의 분포를 가시화한 결과 벽면전단응력이 가장 낮게 작용하는(약 0.1Pa) 꼬리 정맥(caudal vein)에 집중적으로 백혈구가 위치하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 또한 이러한 백혈구 분포가 벽면전단응력의 크기에 의한 것임을 확인하기 위하여 꼬리 정맥에 작용하는 벽면전단응력을 증가시키고자 하였다.

벽면전단응력을 변화시키기 위해 차단할 혈관의 위치는 각 혈관에 작용하는 저항 비를 이용하여 결정하였다. 혈관 차단 후 꼬리 정맥에 작용하는 혈류량과 벽면전단응력의 크기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

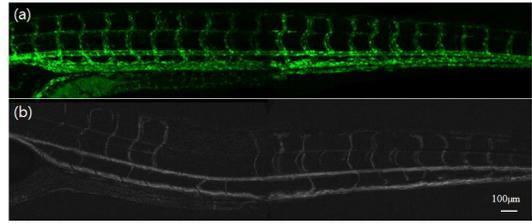


Fig. 2 (a) Vasculature of developing zebrafish and (b) Max intensity map of blood flow images to visualize blocked blood flow in intersegmental vessels.

4. 결론

인체에서 벽면전단응력이 낮은 혈관에 백혈구의 분포가 집중되는 현상이 제브라피쉬 모델에서도 재현됨을 확인하였다. 또한 일부 혈관의 차단을 통해 주요 혈관 벽에 작용하는 벽면전단응력의 크기를 변화시킴으로써, 꼬리정맥에 집중되는 백혈구 분포가 낮은 벽면전단응력에 의한 것임을 확인하고자 하였다. 향후 벽면전단응력 분포가 변화된 제브라피쉬 내 백혈구 분포를 분석함으로써 벽면전단응력과 관련된 백혈구 거동의 연구에 제브라피쉬의 활용 적합성을 확인하고자 한다.

후 기

본 연구는 교육과학기술부/한국연구재단 창의적연구진흥사업 (생체유동현상 규명 및 생체모방 연구)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- (1) Kovach, Melissa A. et. al., 2012, "The function of neutrophils in sepsis." *Current Opinion in Infectious Diseases*, pp. 321 ~ 327.
- (2) Annette Ploppa et. al., 2010, "Mechanisms of leukocyte distribution during sepsis: an experimental study on the interdependence of cell activation, shear stress and endothelial injury." *Critical Care*, R201.
- (3) Novoa, B et. al., 2009, "LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*)." *Fish & Shellish Immunology* pp. 326 ~ 331.