

UV-light 에 의한 혈관 이완작용에 있어서 nitric oxide와 prostanoid의 관련성

김주현*, 심철수, 전석철¹

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소, ¹마산삼성병원 심장센터
(게재승인 : 2002년 8월 29일)

Involvement of Nitric Oxide and Prostanoid on Photorelaxation in Pig Renal Artery

Joo-Heon Kim*, Cheol-Soo Shim and Seok-Cheol Jeon¹

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
and Institute of Animal Medicine, Jinju 660-701, Korea,

*Cardiac center, Masan Samsung General Hospital, Masan 630-522, Korea

(Accepted : August 29, 2002)

Abstracts : The effect of nitric oxide synthase(NOS) inhibitor, N^G-nitro-L-arginine-methyl ester(L-NAME) and prostanoid synthesis inhibitor, indomethacin on the photorelaxation, when was exposed to the long-wave length UV-light, was examined on the precontraction by the phenylephrine in the isolated pig renal artery.

1. UV-light relaxed both with-endothelium and without-endothelium in the pig renal arterial ring contracted by the phenylephrine.

The magnitude of photorelaxation was dependent on the exposure time for UV-light.

2. UV-light induced relaxation was inhibited by L-NAME and indomethacin on the precontraction by the phenylephrine in the isolated pig renal artery.

3. UV-light induced relaxation was inhibited by methylene blue on the precontraction by the phenylephrine in the isolated pig renal artery.

These results suggest that UV-light induced photorelaxation may be due to cGMP involved both nitric oxide and prostanoid on the precontraction by the phenylephrine in the isolated pig renal artery.

Key words : Photorelaxation, L-NAME, indomethacin, methylene blue, renal artery

서 론

Furchgott와 Zawadzki¹의 혈관 내피세포 유래 EDRF (endothelium derived relaxing factor)에 의한 혈관의 이완 작용이 알려진 이래 혈관의 이완작용에 대하여 여러 방면으로 연구들이 진행되고 있다. 혈관의 이완작용에 대한 연구들은 이완작용에 관여하는 전달물질의 규명에 초점이 맞추어져 연구되고 있으며^{2,3,4}, 현재 여러 연구에

서 NO(nitric oxide)가 혈관 이완작용의 중요한 전달 물질로서 확인되고 있는 실정이다^{5,6}.

NO의 작용에 대하여는 혈관뿐만 아니라 장관 평활근^{7,8,9}, 음경후인근^{10,11}, 음경해면체¹², 기관지 평활근¹³에서도 이완작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다.

NO는 L-arginine으로부터 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 생성되며, 세포막을 자유로이 이동할 수 있으며, 세포막 내에서 guanylate cyclase를 활성화시켜서 세포막

* Corresponding author: Dr. Joo-Heon Kim, Dept. of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Republic of Korea (E-mail : Joohkim@nongae.gsnu.ac.kr)

내의 cGMP의 농도를 증가시킴으로서 생리적 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁴.

Ehreich와 Furchgott¹⁵는 visible 또는 ultraviolet light에 의한 평활근의 생리적 반응은 혈관 평활근 뿐만 아니라 소화관 평활근의 억제적 효과를 위저부와 결장류에서 보고된 바도 있다.

이와 같은 빛에 의한 생리적 반응은 guinea-pig의 결장류에서 빛의 직접적인 효과가 아니라 간접적인 매개물질의 영향으로 생기는 현상으로 보고 하였다¹⁶.

Burnstock¹⁷은 guinea-pig결장류에서 생긴 UV-light에 의한 효과가 purinergic신경의 자극이나 adenosine nucleotide 투여에 의한 효과와 비슷한 양상을 나타낸다고 하였다.

그리고 Kim et al¹⁸이 신동맥에 대한 acetylcholine의 이완작용이 NO와 prostanoide와 관련이 있는 것으로 보고 하였다. 그래서 혈관의 이완작용은 NO의 작용으로 반응이 나타나며, NO는 guanylate cyclase의 활성화와 관계되어진 것으로 알려져 있다¹⁹. 그리고 NO는 혈관 내피세포 유래 EDRF와 같은 물질로 알려져 있다.

그러나 UV-light에 의한 생리적 반응이 혈관뿐만 아니라 소화관 평활근과 호흡기 평활근에서 억제적 효과를 나타내는 것과 Burnstock의 보고에서와 같이 purinergic 신경 작용이나 adenosine nucleotide의 효과와 유사하다는 것으로 보아 NO 뿐만 아니라 또 다른 매개물질이 관여할 것으로 추측되어진다.

그래서 돼지 적출 신동맥의 UV-light에 의한 영향이 어떤 전달물질을 이용하는 지를 확인하고자 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물

임상적으로 건강하다고 인정되는 Landrace 종 돼지 50두(체중 90±5kg)를 사용하였다.

혈관 평활근 ring제작

실험동물을 타격에 의해 실신시킨 후 즉시 복강을 열고 신동맥을 적출하였다. 적출한 신동맥을 4°C의 냉한 정상 생리적 영양액에 95% O₂ 와 5% CO₂의 혼합가스를 공급하면서 0.5 cm길이의 혈관 ring을 제작하였다.

영양액의 조성

정상생리적 영양액은 NaCl, 120 ; KCl, 4.25 ; CaCl₂ 1.7 ; MgSO₄ 1.2 ; NaHCO₃, 25.0 ; KH₂PO₄, 1.2 ; Glucose, 6.4(mM)로 조성하여 사용하였다.

운동성의 기록

제작한 혈관 ring을 10 ml용 organ bath에 옮겨서 한 쪽 끝은 organ bath 밑바닥에 고정시키고, 다른 쪽 끝은 상하 높이를 조절할 수 있도록 준비된 근수축변환기(isometric force transducer, FT03, Grass)에 연결하여 Polygraph(79D, Grass)를 통하여 혈관 평활근의 등척성 수축(isometric contraction)을 기록하였다. 10 ml organ bath 내의 영양액은 37±1°C 로 유지하고, 95% O₂ 와 5% CO₂의 혼합가스를 계속 공급하면서 혈관 평활근 ring에 1.0 g의 기초장력을 가하여 60분간 평형시킨 후 실험을 실시하였으며, 각 실험간의 평형시간도 60분으로 하였다.

Photorelaxation의 기록

혈관 평활근 ring을 1 μM phenylephrine을 처리하여 전 수축시킨 후 UV-light(366 wave length, UVL-56, San Gabriel)에 organ bath 약 5 cm 지점에서 혈관 ring에 평형으로 노출실험을 실시하였다. UV-light에 대한 반복 노출실험시에는 3분 이상의 실험간격을 배려하였다. 모든 실험에서의 혈관 ring의 이완정도는 phenylephrine의 수축에 대한 백분율로 계산하여 mean±S.E.M.으로 나타내었으며 student t-test를 통하여 P<.05인 경우를 유의한 것으로 표시하였다.

약물처리와 사용된 약물

약물처리는 20 ml organ bath 에 200 ul 이하의 약물을 처리하여 100배 이상 희석되도록 하였으며, 약물처리 후 정상 생리적 영양액으로 3번 이상 세척하여 60분간 평형시킨 후 다음 실험을 실시하였다.

본 실험에 사용된 약물은 phenylephrine, N^G-nitro-L-arginine-methyl ester(L-NAME) indomethacin, methylene blue, tetrodotoxin은 Sigma제품을 사용하였으며, 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

결 과

1. UV-light 노출 시간에 대한 영향

UV-light에 대한 돼지 적출 신동맥 내피세포의 관련성을 관찰하고자 acetylcholine에 의한 이완효과가 나타나는 혈관 내피세포 존재와 acetylcholine에 의한 이완작용이 나타나지 않는 혈관 내피세포 제거의 경우에서 모두 이완작용이 관찰되었다(fig. 1). 그리고 UV-light에 노출되어진 시간에 대한 혈관 평활근의 반응을 관찰하고자 노출시간을 5에서 30초까지 실험을 실시한 결과 혈관 내피세포 존재 여하에 관계없이 시간이 길어지면 길어질수록 이완정도가

증가하는 노출시간 의존적 이완효과를 나타내었다(fig. 2).

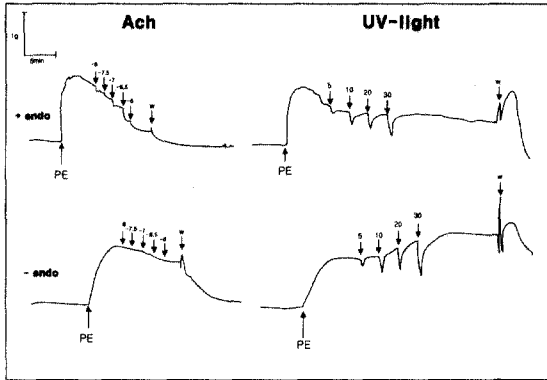


Fig. 1. Effects of UV light irradiation on vascular relaxation of isolated pig renal artery. Phenylephrine(PE, 1 μ M)- induced precontraction in isolated pig renal artery which had been incubated in normal Krebs solution with endothelium(+endo) and without endothelium(-endo). The tracing of acetylcholine(Ach, numbers indicate log molar concentration)-induced relaxation with endothelium and without endothelium. The tracing of UV light-induced photorelaxation in which the numbers indicate UV light exposure time(seconds) with endothelium and without endothelium.

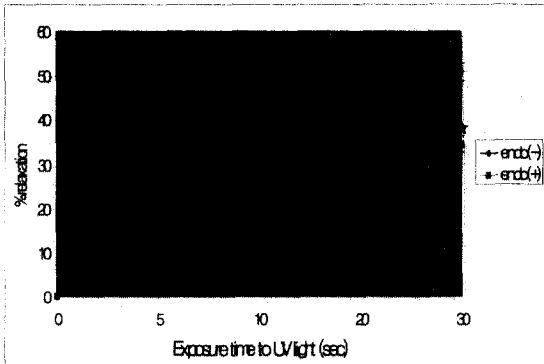


Fig. 2. Potentiations of photorelaxation on with-endothelium and without-endothelium in the isolated pig renal artery. The arterial rings were relaxed in exposure-time dependent manner. The results are measured as peak amplitudes and expressed as percentages of the phenylephrine-induced contraction in same vessel rings(n=10). Data are the mean \pm S.E. * P<.05.

2. UV-light에 의한 이완작용의 neural blocker인 tetrodotoxin의 영향

돼지 적출 신동맥의 UV-light에 의한 이완작용이 빛에

의한 혈관 주변 신경에 대한 영향을 관찰하고자 신경차 단제인 TTX에 대한 영향을 관찰하였다. TTX(1 μ M)전처리 에 의해 UV-light에 의한 혈관 평활근의 이완작용은 전혀 영향을 받지 않았다(fig. 3).

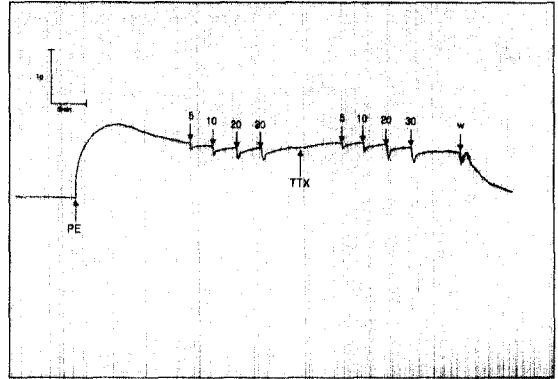


Fig. 3. The effect of neural blocker tetrodotoxin(TTX, 1 μ M) on the UV light-induced photorelaxation of isolated pig renal artery. Photorelaxation was not affected by the tetrodotoxin.

3. UV-light에 의한 이완작용의 NOS 억제제인 L-NAME의 영향

돼지 적출 신동맥의 UV-light에 의한 이완작용이 NO 와의 관계를 알아보고자 NOS억제제인 L-NAME의 영향을 관찰하였다. L-NAME(10 μ M) 전처리에 의해 UV-light 에 의한 이완작용이 억제되는 경향을 나타내었다(fig. 4).

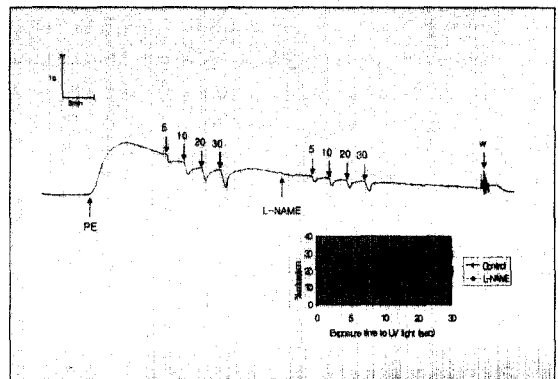


Fig. 4. The effect of NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methyl ester(L-NAME, 10 μ M) on the UV light -induced photorelaxation of isolated pig renal artery. Photorelaxation was inhibited by L-NAME. Lower panel : Summarized results obtained with control and treatment with L- NAME. * P<.05 compared to the control relaxant effect of L-NAME(n=10).

4. UV-light에 의한 이완작용의 cyclooxygenase억제제인 indomethacin의 영향

돼지 적출 신동맥의 UV-light에 의한 이완작용이 prostanoids와의 관계를 알아보고자 cyclooxygenase억제제인 indomethacin의 영향을 관찰하였다. Indomethacin(10 μ M)의 전처리에 UV-light에 의한 혈관 이완작용이 억제되었다(fig. 5).

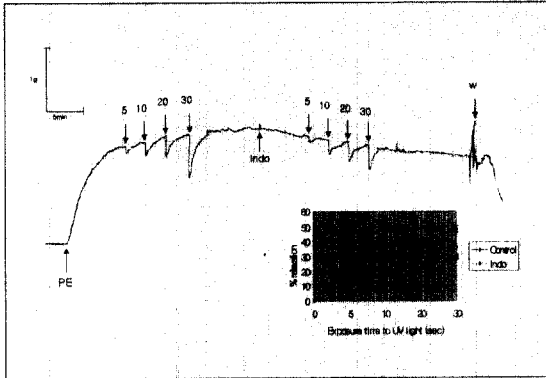


Fig. 5. The effect of cyclooxygenase inhibitor indomethacin (Indo, 10 μ M) on the UV light -induced photorelaxation of isolated pig renal artery. Photorelaxation was inhibited by indomethacin. Lower panel : Summarized results obtained with control and treatment with indomethacin. * $P < 0.05$ compared to the control relaxant effect of indomethacin ($n=10$).

5. UV-light에 의한 이완작용의 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue의 영향

돼지 적출 신동맥의 UV-light에 의한 이완작용이 cGMP와의 관계를 관찰하고자 guanylate cyclase억제제인 methylene blue에 대한 영향을 관찰하였다. Methylene blue(10 μ M) 전처리에 의해 UV-light에 의한 혈관 평활근의 이완작용이 억제되어졌다(fig 6).

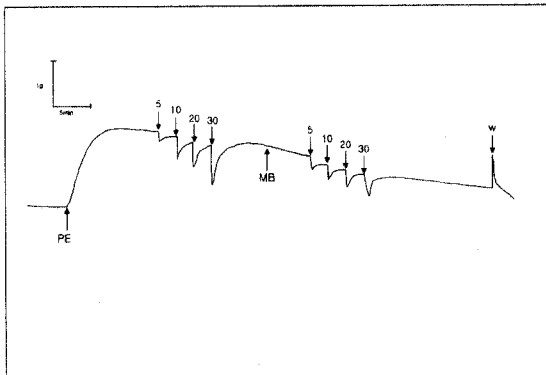


Fig. 6. The effect of guanylate cyclase inhibitor methylene

blue(MB, 10 μ M) on the UV light -induced photorelaxation of isolated pig renal artery. Photorelaxation was inhibited by methylene blue.

고 찰

Furchgott와 Zawadzki¹가 혈관의 이완작용이 혈관 내피세포 유래 EDRF(endothelium derived relaxing factor)에 의해 일어나며, 현재 NO(nitric oxide)가 혈관 이완작용의 중요한 전달 물질로서 인정되고 있다.

UV-light에 의한 이완작용이 UV-light에 노출되어진 시간이 길어지면 길어질수록 이완정도가 증가되어지며, NOS억제제인 L-NAME의 전처리에 의해 UV-light에 의한 이완작용이 억제되어지는 것으로 보아 UV-light에 의한 이완작용에서도 NO가 관련된 이완작용인 것으로 추측되어진다.

그러나 UV-light에 의한 이완작용은 Chang et al¹³과 Kim et al¹⁹의 보고에서와 같이 혈관 내피세포의 존재 여부에 관계없이 이완작용이 나타난다고 보고한 것은 본 실험의 경우와 일치되어진 결과로 UV-light에 의한 이완작용은 내피세포 유래 NO 뿐만 아니라 또 다른 전달물질이 관여하는 것으로 사료되어진다

그래서 빛에 의한 이완작용은 빛의 평활근에 대한 직접적인 작용이 아니라 어떤 전달매체를 이용한 간접적인 영향으로 나타나는 것으로 사료되어진다.

Kim et al¹⁹의 보고에 의하면 acetylcholine의 이완작용이 L-NAME에 의해 억제되어지지만 cyclooxygenase억제제인 indomethacin은 단독으로는 효과가 없으나 L-NAME의 첨가로서 L-NAME 단독보다도 indomethacin 첨가처리로서 더 큰 억제효과를 보여서 NO와 prostanoid가 관련된 이완작용이라고 보고한 것과 Zenge et al²⁰이 양태아 폐혈관의 이완작용에서 NO가 prostanoid보다 더 강한 혈관 이완효과를 보인다는 결과로 보아 혈관의 이완작용이 NO와 또 다른 전달물질로서 prostanoid가 관계되어지는 것으로 생각되어진다.

아울러 Hurwitz et al²¹은 쥐의 황체에서 progesterone형성에 관계되는 NO의 생성이 황체세포에서 prostaglandin 형성을 자극한다는 보고와 Ahmad et al²²의 NO가 간의 대식세포에서 cyclooxygenase의 작용을 조절한다는 보고와 Summy-Long et al²³이 쥐의 oxytocin분비에 대한 연구에서 NO는 oxytocin의 신경분비작용을 cyclooxygenase 작용을 억제함으로써 prostaglandin의 기능을 억제함으로써 oxytocin의 유리가 억제된다는 보고는 NO가 prostanoid의 작용에 영향을 미치는 것으로 추측하게 한다.

본 실험에서도 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin

의 전처리에 의해 UV-light에 의한 이완작용이 억제되어진 결과로 보아 UV-light에 의한 이완작용이 prostanoid와 관련이 있음을 암시하는 결과로 보아진다.

NO는 주로 soluble guanylate cyclase를 활성화시켜서 cGMP의 생성을 증가시키고 증가된 cGMP가 2차 전달물질로서 작용하여 세포내 표적단백질을 인산화시킴으로써 세포반응을 유발하는 것으로 알려져 있는데, Furchgott와 Jothianandan²⁴는 UV-light에 의한 혈관의 이완작용 cGMP에 의한 이완작용이라고 보고하였으며, Chang et al¹³도 역시 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의해 UV-light에 의한 이완작용이 억제되어지는 것으로 보아 cGMP가 관련이 있음을 시사하였으며, 또한 Kim et al¹⁹도 쥐 대동맥에서 UV-light에 의한 이완작용이 methylene blue에 의해 억제되어짐을 보고한 바 있다. 그리고 Li et al²⁵은 토끼 폐동맥에서 progesterone의 이완작용이 nitric oxide synthase 억제제와 guanylate cyclase 억제제에 의해 이완작용이 줄어들어진 현상으로 NO와 cGMP를 통한 이완작용이라고 하였다.

이와같은 결과들은 본 실험의 돼지 적출 신동맥에서 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue의 전처리에 의해 UV-light에 의한 이완작용이 억제되어진 것으로 보아 일치된 결과로 보아진다.

그래서 UV-light에 의한 혈관의 이완작용은 NO와 prostanoid가 관련된 guanylate cyclase의 활성화에 의한 cGMP에 의한 효과로 추측되어진다.

결 론

돼지 적출 신동맥의 phenylephrine에 의한 전수축상태에서 UV-light에 대한 혈관 이완효과를 관찰하고, 이완작용이 nitric oxide와 prostanoid와의 관련성을 관찰하였다.

1. UV-light에 의하여 혈관 내피세포의 존재여부에 관계없이 UV-light에 대한 노출시간의 증가에 따라 이완정도가 증가하는 경향을 보였다.
2. UV-light에 의한 혈관 이완작용이 NOS 억제제인 L-NAME과 cyclo-oxygenase 억제제인 indomethacin에 의해 억제되어졌다.
3. Guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의해 UV-light에 의한 이완작용이 억제되어졌다.

이상 결과로서 돼지 적출 신동맥에 대한 UV-light에 의한 혈관 이완작용은 NO와 prostanoid가 관련된 cGMP

를 통한 이완작용으로 사료되어진다.

References

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 299 : 373-376, 1980.
2. Forstermann U, Neufang B. The endothelial mediated relaxation of rabbit aorta : Effects of antioxidants and nitric oxide synthase inhibitors. *Br J Pharmacol*, 82 : 765-767, 1984.
3. Griffith TM, Edward DH, Lewis MJ et al. The nature of endothelium derived vascular relaxant factor. *Nature*, 308 : 645-647, 1984.
4. Singer HA, Saye JA, Peach MJ. Effects of cytochrome P-450 inhibitors on endothelium dependent relaxation in rabbit aorta. *Blood vessel*, 21 : 223-230, 1984.
5. Palmer RMJ Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*, 327 : 524-527, 1987.
6. Ignarro LK. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 : 9265-9269, 1987.
7. Mizumoto A, Mochiki E, Suzuki H et al. Neuronal control of motility changes in the canine lower esophageal sphincter and stomach in response to meal ingestion. *J Smooth Muscle Res*, 33 : 211-222, 1997.
8. Barbier AJ, Lefebvre RA. Influence of S-nitrosothiols and nitrate tolerance in the rat gastric fundus. *Brit J Pharmacol*, 111:1280-1286, 1994.
9. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide mediate non-adrenergic inhibitory transmission to smooth muscle of rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*, 191:303-309, 1990.
10. Mun KW, Kim JY, Kim TW et al. Nitric oxide mediating non-adrenergic noncholinergic relaxation in the boar retractor penis muscle. I Mediators of nonadrenergic, noncholinergic relaxation of porcine retractor penis muscle : nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *Kor J Vet Res*, 35:447-458, 1995.
11. Sheng H, Schmitt HHW, Nakane M et al. Characterization and isolation of nitric oxide synthase in non-adrenergic noncholinergic nerves bovine retractor penis muscles. *Brit J Pharmacol*, 106 : 768-773, 1992.
12. Chen X, Gillis CN. Methylene blue enhanced photore-

- laxation in aorta, pulmonary artery and corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun*, 190 : 559-563, 1993.
13. Chang KC, Chong WS, Park BW et al. NO- and NO₂-carrying molecule potentiate photorelaxation in rat trachea and aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, 191: 509-514, 1993.
 14. Stuehr DJ and Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol*, 65 : 287-346, 1992.
 15. Ehrreich SJ, Furchgott RF. Relaxation of mammalian smooth muscles by visible and ultraviolet radiation. *Nature*, 218:682-684, 1968.
 16. Furchgott RF. Effects of various agents on photorelaxation of rabbit aortic strips. In *Physiology and Pharmacology of Vascular Neuroeffector Systems*, edited by Bevan JA, Furchgott RF, Maxwell RA, Sollo AP. Basal:Karger, 247-262, 1971.
 17. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62 : 491-503, 1976.
 18. Kim JH, Shim CS, Jeon SC. Involvement of nitric oxide and prostanoic acid on the endothelium-dependent vasodilatation by acetylcholine in the isolated rabbit renal artery. *Kor J Vet Res*, 42:299-304, 2001.
 19. Kim TW, La JH, Yang IS. The inhibitory action of nitric oxide donor on the slow wave and spontaneous contraction in the guinea pig antral circular muscle. *Kor J Vet Res*, 40:691-699, 2000.
 20. Zenge JP, Rairigh RL, Grover TR et al. NO and prostaglandin interactions during hemodynamic stress in the fetal ovine pulmonary circulation. *Am J Physiol*, 281 : L1157-1163, 2001.
 21. Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A et al. Regulation of cyclooxygenase activity and progesterone production in the rat corpus luteum by inducible nitric oxide synthase. *Reproduction*, 123:663-669, 2002.
 22. Ahmad N, Chen LC, Gordon MA et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol*, 71:1005-1011, 2002.
 23. Summy-Long JY, Bui V, Gestl S et al. Nitric oxide, interleukin and prostaglandin interactions affecting the macrocellular system. *Brain Res*, 940:10-20, 2002.
 24. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and independent vasodilatation involving cGMP : Relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood vessels*, 28:52-61, 1991.
 25. Li HF, Zheng TZ, Li W et al. Effect of progesterone on the contractile response of isolated pulmonary artery in rabbits. *Can J Physiol Pharmacol*, 79:545-550, 2001.