

토끼 대동맥 혈관내피세포에서 저산소증이 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향

최 수 승*

The Effect of Hypoxia on the Release of Endothelium-derived Relaxing Factor in Rabbit Thoracic Aorta

Soo Seung Choi, M.D.*

Background: To clarify the effect of hypoxia on vascular contractility, we tried to show whether hypoxia induced the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and the nature of the underlying mechanism for this release. **Material and Method:** Isometric contractions were observed in rabbit aorta, and the released EDRF from the rabbit aorta was bioassayed by using rabbit denuded carotid artery. The intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in the cultured rabbit aortic endothelial cells was recorded by a microfluorimeter with using Fura-2/AM. Hypoxia was evoked to the blood vessels or endothelial cells by eliminating the O_2 in the aerating gases in the external solution. Chemical hypoxia was evoked by applying deoxyglucose or CN^- . **Result:** Hypoxia relaxed the precontracted rabbit thoracic aorta that had its endothelium, and the magnitude of the relaxation was gradually increased by repetitive bouts of hypoxia. In contrast, hypoxia-induced relaxation was not evoked in the aorta that was denuded of endothelium. In a bioassay experiment, hypoxia released endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and the release was inhibited by L-NAME or the K^+ channel blocker tetraethylammonium (TEA). In the cultured endothelial cells, hypoxia augmented the ATP-induced increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and this increase was inhibited by TEA. Furthermore, chemical hypoxia also increased the Ca^{2+} influx. **Conclusion:** From these results, it can be concluded that hypoxia might induce the release of NO from rabbit aortic endothelial cells by increasing $[Ca^{2+}]_i$.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:588-596)

- Key words:**
1. Endothelium
 2. Hypoxia
 3. Nitrous Oxide
 4. Calcium

서 론

혈관내피세포는 혈압, 혈류 속도 등과 같은 기계적인 자극이나 세로토닌, 아세틸콜린 등과 같은 화학적 물질 등에 반응하여 여러 가지 혈관활성물질들은 분비하여 혈관의 수축성과 내경을 조절한다[1,2]. 혈관내피세포에서

분비되는 물질들은 혈관평활근을 이완시키는 내피세포성 이완인자(endothelium-derived relaxing factor)와 수축시키는 내피세포성 수축인자(endothelium-derived contracting factor)가 있는데 내피세포성 이완인자로는 nitric oxide (NO)와 endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) 등이 있으며 내피세포성 수축인자로는 endothelium-derived con-

*이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ewha Womans University School of Medicine

논문접수일 : 2009년 5월 13일, 논문수정일 : 2009년 8월 31일, 심사통과일 : 2009년 9월 8일

책임저자 : 최수승 (158-710) 서울시 양천구 목동 911-1, 이화여자대학교 의과대학 흉부외과학교실

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: gratia@unitel.co.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

tracting factor와 endothelin 등이 있다.

혈관내피세포는 호기성 글루코스 분해 활동도가 매우 높고[3] 내피세포성 이완인자의 생산 및 분비에 미토콘드리아 산화성 대사(mitochondrial oxidative metabolism)에서 생성된 에너지가 주로 사용되는 것으로 알려져 있다[4]. 그리고 혈관내피세포에서 NO를 생산하는 데에는 O₂가 필요한 것으로 알려져 있다[5]. 그러므로 혈관내피세포 기능은 허혈과 같이 O₂와 글루코스의 공급이 감소하는 조건에 매우 민감하게 영향을 받을 가능성이 있다.

허혈과 재관류는 myocardial infarction, cerebral ischemia, organ transplantation 등과 같은 많은 병적인 상태에서 발생한다. 혈관내피세포는 혈액과 조직 사이에 위치하고 있어 허혈과 재관류에 의한 변화에 처음 노출되며 이러한 변화에 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 허혈의 가장 중요한 성분인 저산소증은 혈관내피세포를 염증진 형태(pro-inflammatory phenotype)로 활성화시키며 혈관재형성 등을 유발한다[8,9]. 한편 저산소증이 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향에 대해서는 아직 불명확하며 서로 상반된 보고들이 있다. 저산소증은 내피세포성 이완인자의 분비를 감소시켜 저산소증에 의한 혈관수축을 유발시킨다는 보고[10,11]가 있는 반면 저산소증은 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자와 prostaglandin과 같은 물질을 분비하여 혈관평활근을 이완시킨다는 보고도 있다[12,13]. 이외에도 지속적인 저산소증은 토끼 혈관에서 15-lipoxygenase의 발현을 증가시켜 EDHF로 알려진 arachidonic acid 대사체들을 생성하여 혈관을 이완시키는 것으로 알려져 있다[14]. 그리고 사람 망막미세혈관 혈관내피세포에서는 1% O₂에 12시간 노출하는 경우 15-lipoxygenase의 발현이 증가하는 것이 보고되었다[15]. 특히 허혈과 재관류처럼 반복된 저산소증이 혈관내피세포 기능에 미치는 영향에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 저산소증이 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향과 그 기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험 동물

본 실험은 미국 국립보건원(The National Institutes of Health)에서 발표한 실험동물지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, Revised 1996)에 따라 시행하였으며, 본 대학의 실험동물

윤리위원회의 심사를 통과하였다.

총 12마리의 토끼(2.5 kg 내외)를 암수 구별 없이 사용하였다. Sodium pentobarbital (40 mg/kg)과 heparin (2000 units)을 정맥 주사하여 마취시킨 후 대퇴부 동맥을 절단 실험시켜 즉사시켰다. 경동맥과 흉부 및 복부 대동맥을 적출하였으며 주변 조직을 깨끗이 박리한 다음 실험에 사용하였다.

2) 등장성 수축 실험(Isometric contraction experiment)

적출한 흉부 대동맥을 너비 2~3 mm 정도로 잘라 환형 절편(arterial ring)을 만든 다음, 이 절편을 95% O₂/5% CO₂로 포화된 Krebs-Ringer 용액(NaCl 118.3, KCl 4.78, CaCl₂·2H₂O 2.5, MgSO₄·6H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.22, NaHCO₃ 25.0, glucose 10 mM)이 3 mL/min의 속도로 흐르고 있는 실험용기에 옮겨 근육고정기와 근수축변환기를 연결하고 생체신호 기록기(physiograph)에서 등장성 수축을 기록하였다.

혈관은 norepinephrine (NE) 혹은 prostaglandin (PG) F_{2α}를 투여하여 수축을 유발시켰다. 혈관내피세포는 작은 슝뭉치로 혈관내면을 부드럽게 마찰하여 제거하였으며, 혈관내피세포의 제거 여부는 acetylcholine에 의한 내피세포 의존성 이완 반응 발생여부로 판정하였다. 모든 실험은 37°C에서 시행하였다.

3) 생체 검증 실험(bioassay experiment)

적출한 흉부대동맥(길이 약 5 cm)에서 분지(branch)들을 모두 절찰하여 관류액이 이 분지를 통해 빠져 나오지 않도록 하였다. 다음 흉부 대동맥의 양쪽에 폴리에틸렌관을 넣고 묶은 다음 Krebs-Ringer 용액이 담겨 있는 실험 용기에 옮겼다(Fig. 1). 흉부대동맥은 roller pump (Pharmacia Fine Chemicals)를 사용하여 실험용액을 분당 2 mL 속도로 관류시켰다[16]. 이외에도 폴리에틸렌관만을 관류할 수 있는 경로도 설치하였다. 흉부대동맥 혹은 폴리에틸렌관을 관류한 관류액은 혈관내피세포를 제거한 경동맥(검증혈관)에 직접 떨어지도록 하였는데, 경동맥에 떨어지는 용액을 이 두 관류액 중에서 선택할 수 있도록 설치하였다. 이 경동맥의 한쪽 끝에 수축변환기(an isometric force transducer; Grass FT03)를 연결하고 등장성 수축을 생리기록기를 이용하여 기록하였다(Grass physiograph model 7E).

먼저 폴리에틸렌관을 통과한 95% O₂/5% CO₂로 포화시킨 실험용액이 경동맥에 떨어지도록 설치 후 한 시간이 지난 다음 경동맥의 안정장력이 약 2 g이 되도록 신장시

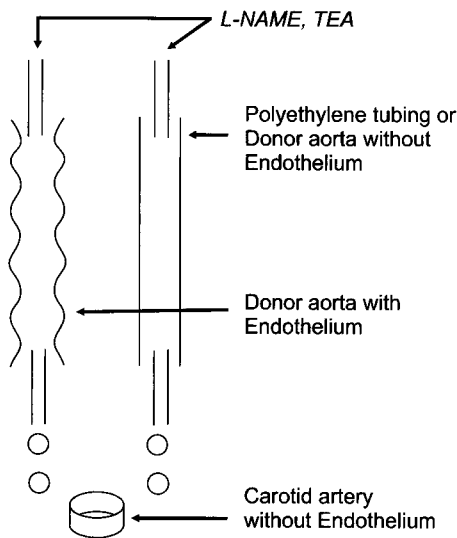


Fig. 1. A schematic presentation of bioassay system. A carotid arterial ring without endothelium (bioassay test ring) was mounted for isometric tension recording and perfused with Krebs-Ringer bicarbonate solution that had passed through polyethylene tubing or through aortic segment with endothelium. NAME=Nitroarginine methyl ester; TEA=Tetraethylammonium chloride.

졌다. 다시 한 시간 후 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자의 분비에 영향을 주지 않는 PG F_{2α}를 흉부대동맥과 폴리에틸렌관을 관류하는 실험용액에 첨가하여 경동맥이 수축하도록 하였다[16]. 검증혈관의 수축이 최고에 도달했을 때 관류액을 폴리에틸렌을 관류한 용액에서 흉부대동맥을 관류한 용액(95% O₂/5% CO₂로 포화시킨 용액)으로 교체하였다. 관류액을 교체한 후 검증혈관의 수축력이 다시 안정상태에 도달하면 관류액을 95% N₂/5% CO₂로 포화시킨 용액을 교환하여 저산소증(hypoxia)을 유발시켰다. 본 실험을 통해 흉부대동맥에서 검증혈관 수축에 영향을 미치는 인자의 분비 여부를 알 수 있는데, 검증혈관에 떨어지는 용액을 95% O₂/5% CO₂로 포화시킨 폴리에틸렌관을 관류한 용액에서, 95% O₂/5% CO₂로 포화시킨 흉부대동맥을 관류한 용액으로 교체하였을 때에는 안정 상태에서 분비되는 인자의 유무를, 다시 95% N₂/5% CO₂로 포화시킨 흉부대동맥을 관류한 용액으로 교체하였을 때에는 저산소증에 노출되었을 때 분비되는 인자 유무를 알 수 있었다.

4) 혈관내피세포 배양

적출한 흉부대동맥을 Ca²⁺을 제거한 정상 Tyrode 용액에서 외막 주변 지방과 결합조직을 깨끗이 제거한 후 대

동맥의 분지들을 모두 절찰하였다. 흉부대동맥 양쪽 끝에 폴리에틸렌관을 넣고 절찰한 다음 혈관 안은 0.2% collagenase (Worthington type 1) 용액으로 채운 다음 Ca²⁺이 없는 정상 Tyrode 용액 속에 넣었다. 그런 다음 37°C에서 4~6분간 처치를 한 후 혈관 속에 Ca²⁺ 제거한 정상 Tyrode 용액을 넣어 혈관을 부풀어 오르게 하여 혈관내피세포를 분리하여 배양하였다. 배양 배지는 80 mL Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, GIBCO), 10 mL fetal calf serum (GIBCO), 2 mL penicillin/streptomycin (100 U/mL), 1 mL L-glutamine, 그리고 1 mL minimal essential amino acids를 첨가하여 만들었으며, 세포는 5번째 계대 배양한 것까지 실험에 이용하였다.

5) 혈관내피세포의 확인

배양한 세포가 혈관내피세포인지는 von Willibrand's factor (vWF) 발현 유무와 dil-acetylated low density lipoprotein (LDL)의 섭취 유무로 확인하였다. vWF 발현 유무는 면역형광기법(immunohistochemical technique)을 이용하여 확인하였다(Fig. 2A). 배양한 혈관내피세포를 tris aminomethane (Tris)-buffered saline (TBS)으로 세척한 다음 methanol과 acetone을 7 : 3의 비율로 혼합한 용액으로 고정하였다. 고정된 세포들은 TBS로 3번 세척한 다음 0.25% Triton X100 (TBS 용액)에 30분간 노출시키고 TBS로 3번 세척하였다. 다음 1시간 동안 5% BSA (TBS 용액)로 처리한 후 vWF 항체(DAKO A0082)에 밤새 노출시켰다. vWF 항체에 노출된 세포들은 0.1% Tween 20 (TBS 용액)으로 3번 세척하고 alkaline phosphatase conjugated monoclonal anti-rabbit IgG에 1시간 노출시킨 다음 0.1% Tween 20으로 3번 세척하였다. 그런 다음 nitro blue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro dolyphosphate-p-toluidin으로 10분간 발색시킨 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

Dil acetylated LDL 섭취 유무는 젤라틴을 코팅한 12 mm 커브글라스에 배양한 세포에 Dil-acetylated LDL을 10 μL/mL 넣고 4시간 노출시킨 다음 관찰하였다(Fig. 2B). 즉 Dil acetylated LDL에 노출시킨 세포를 Ca²⁺과 Mg²⁺이 없는 정상 Tyrode 용액으로 세척한 다음 3% 포르말데하이드로 고정한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

6) 세포내 Ca²⁺ 측정

Fura-2/AM (acetoxymethyl ester form)을 배양액 첨가하여 (2 μM) 37°C에서 25분간 배양한 혈관내피세포에 노출시켜 부하(load)시킨 다음 Krebs 용액으로 세척하여 실험

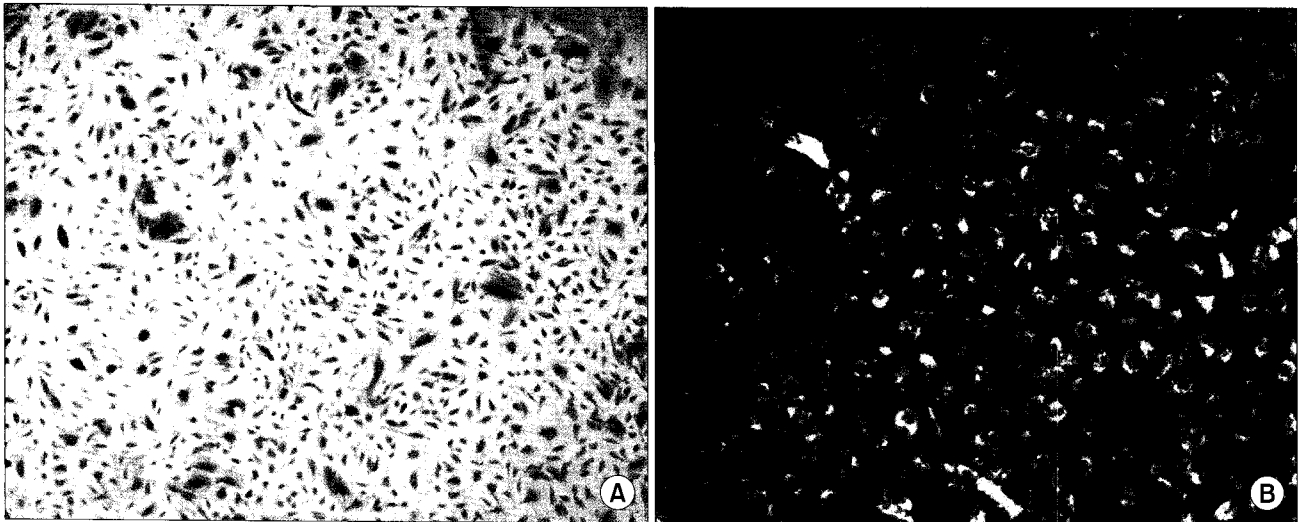


Fig. 2. Characterization of endothelial phenotype of the cells cultured from the inner layer of rabbit aorta. (A) Immunohistochemistry of the cultured cell and a representative staining of the cells with anti-von Willibrand factor antibody. (B) Dil-acetylated low density lipoprotein uptake test of the cultured cells (H&E, ×100).

에 사용하였다. 세포내 Ca^{2+} 측정은 inverted microscope (DM IRB, Leica, Germany)과 microscope photometer (D-104, Photon Technology International Inc, USA) 등으로 구성된 미세형광측정기(microfluorometer system)를 사용하였다. Fura-2/AM이 부하된 세포에 340 nm와 380 nm의 두 파장을 번갈아 조사(10 Hz)하고 방출(emission)되어 나오는 510 nm의 형광을 photomultiplier 튜브를 이용하여 측정하고 그 비(F340/380)로 세포내 Ca^{2+} 농도를 계산하였다(Felix, version 1.4, PTI, USA). 이 실험에 사용된 용액은 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid (HEPES), 10 mM glucose, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ 를 첨가하여 만들었으며 pH는 7.4에 맞추었다.

7) 통계

모든 통계자료는 평균과 표준편차로 표현하고 유의성 정도는 paired T-test로 하여 유의 수준 $p < 0.05$ 로 검증하였다.

결 과

1) NE에 의한 혈관평활근의 수축에 미치는 저산소증의 영향

토끼 대동맥을 NE를 투여하여 수축 시킨 다음 저산소증의 효과를 관찰하였다(Fig. 3). 95% $O_2/5\%$ CO_2 로 포화시킨 실험용액(정상 용액)으로 혈관을 관류하면서 NE를 투

여 수축을 유발시켰으며 약 2분 정도 후 안정상태에 도달한 다음 95% $N_2/5\%$ CO_2 로 포화시킨 용액(저산소 용액)으로 교체를 하여 저산소증을 유발하였다. 저산소증 노출에 의하여 수축한 혈관이 이완하였으며 저산소증에 반복하여 노출시키면 이완 정도는 더욱 증가하였다. 이러한 저산소증에 의한 혈관 이완은 혈관내피세포를 제거한 혈관에서는 관찰되지 않아 혈관내피세포 의존적인 현상임을 알 수 있었다.

2) 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 저산소증의 영향

저산소증이 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자를 분비시키는 지 알아보고자 생체검증 실험(bioassay experiment)을 시행하였다(Fig. 4). 검증혈관에 폴리에틸렌관을 관류한 용액이 떨어지도록 한 다음 PG $F_{2\alpha}$ 를 관류 용액에 첨가하여 검증혈관의 수축을 유발시켰다. 다음 흉부대동맥을 관류한 용액으로 교체를 하면 검증혈관의 수축이 조금 증가하였으며 저산소 용액으로 교체를 하면 검증혈관이 이완하였다. 그런 다음 다시 폴리에틸렌관을 관류한 용액으로 교체를 하면 검증혈관의 수축력이 다시 증가하였으며 흉부대동맥을 관류한 용액으로 교체를 하면 검증혈관이 이완을 하였으며 이어서 저산소 용액으로 교체를 하면 이완 정도가 더 크게 증가하였다(Fig. 4A). 반면 폴리에틸렌관을 관류한 용액을 저산소 용액으로 교체하면 검증혈관이 이완하였지만 그 이완 정도는 흉부대동맥을 통

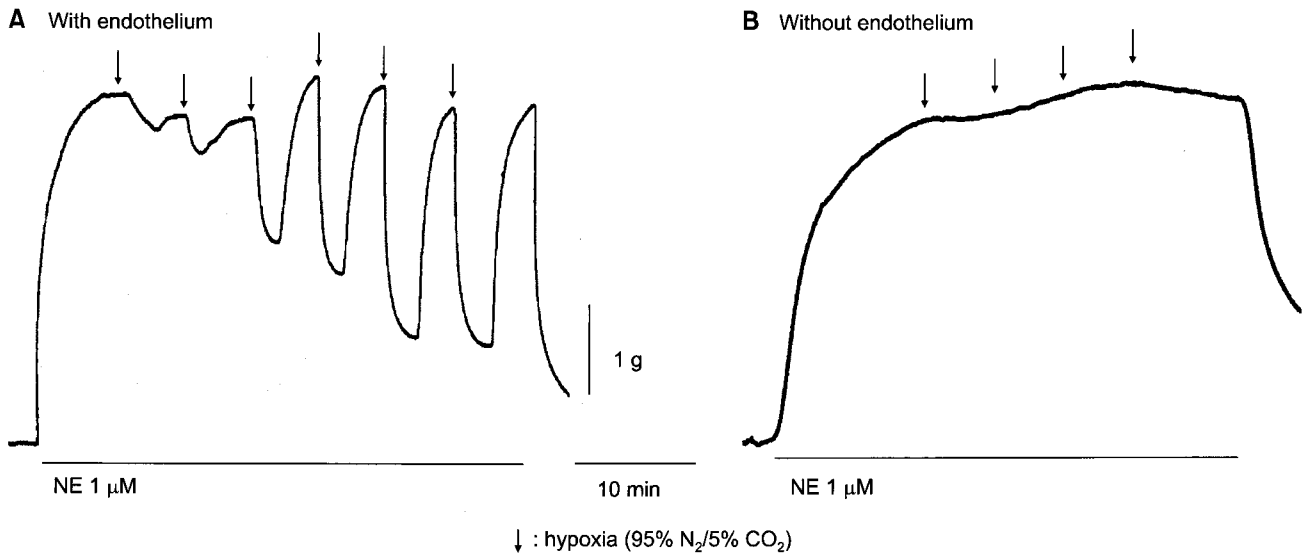


Fig. 3. Hypoxia-induced relaxation of rabbit aorta in an isometric contraction experiment. (A) Norepinephrine (NE) produced contraction in rabbit aorta and the contracted aorta was relaxed by hypoxia. The relaxed aorta was re-contracted by re-oxygenation and the hypoxia-induced relaxation was gradually increased by re-exposure to hypoxia. In contrast, rabbit aorta without endothelium was not relaxed by hypoxia (B).

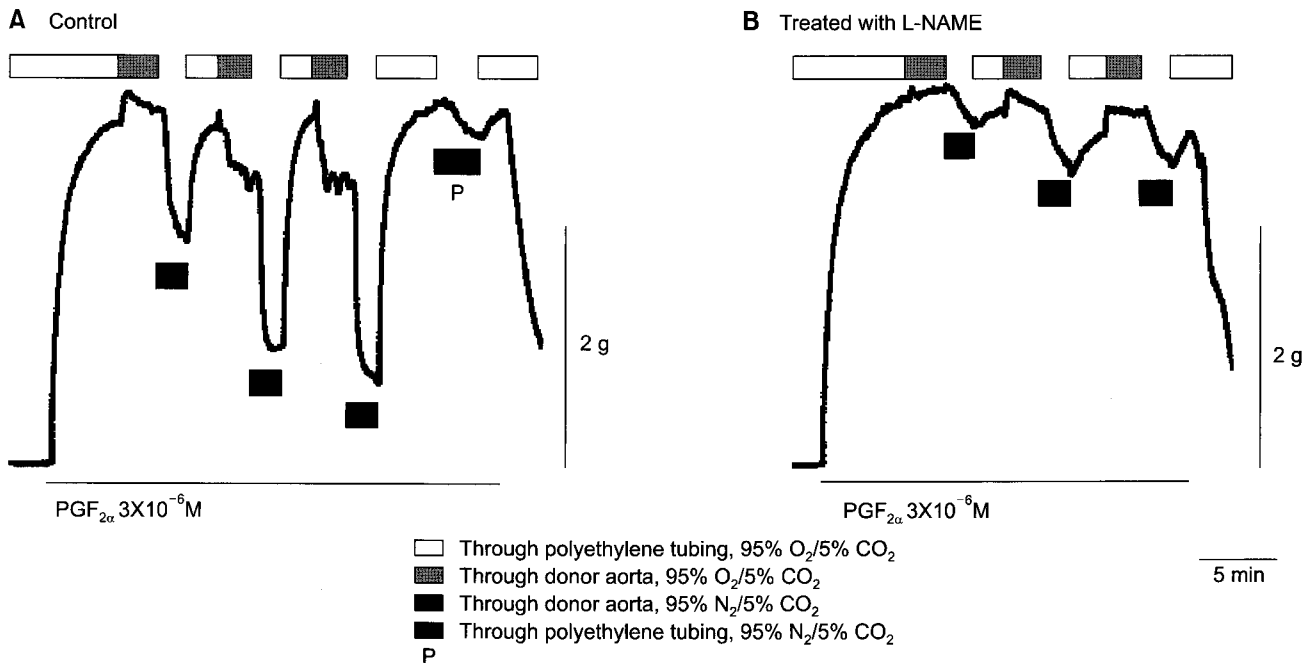


Fig. 4. Effect of hypoxia on the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). In a bioassay system, carotid artery without endothelium was contracted by prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ (3×10^{-6} M/L). (A) When the solution perfusing the donor aorta was switched to hypoxia, the perfusate through the aorta with intact endothelium relaxed bioassay ring markedly. Subsequent hypoxia followed by hypoxia-reoxygenation induced a further decrease in the tension of carotid artery. In contrast, the hypoxic perfusate through polyethylene tubing slightly relaxed carotid artery. (B) When the EDRF donor aorta (the aorta with endothelium) was pretreated with the NO synthase inhibitor L-NAME (10^{-5} M/L) for 30 minutes, the perfusate through the donor aorta did not relaxed carotid artery and subsequent hypoxia followed by hypoxia-reoxygenation did not induce a further decrease in the tension of carotid artery. NAME=Nitroarginine methyl ester.

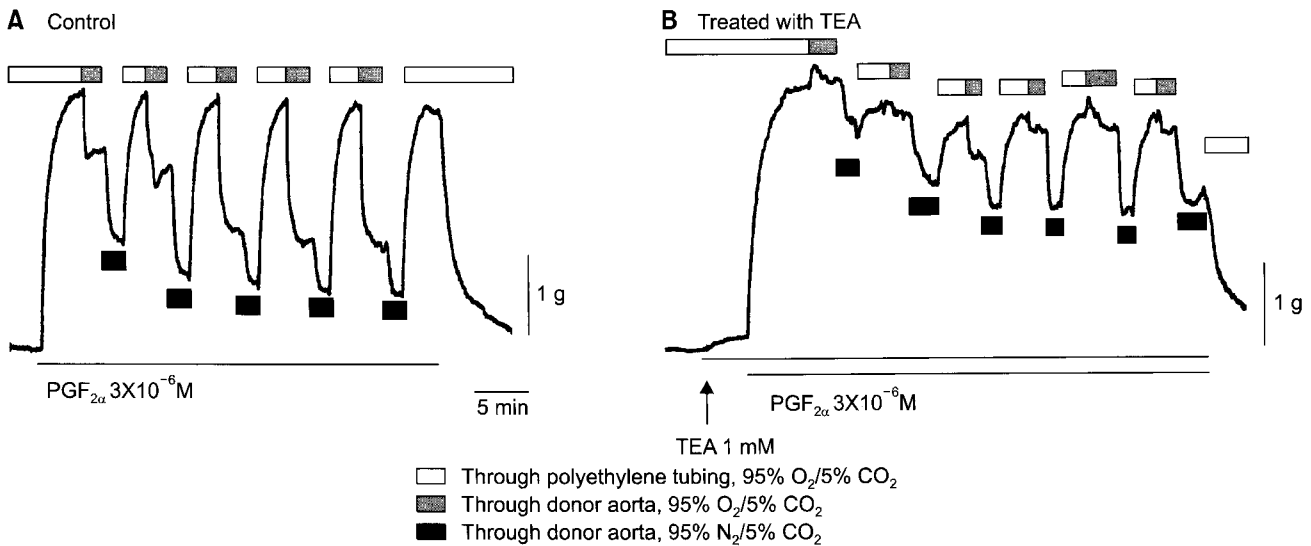


Fig. 5. Effect of TEA on hypoxia-induced release of EDRF. In a bioassay system, carotid artery without endothelium was contracted by prostaglandin $F_{2\alpha}$ (3×10^{-6} M/L). (A) When the solution perfusing the donor aorta was switched to hypoxia, the perfusate through the aorta with intact endothelium relaxed bioassay ring markedly. Subsequent hypoxia followed by hypoxia-reoxygenation induced a further decrease in the tension of carotid artery. (B) When the EDRF donor aorta (the aorta with endothelium) was pretreated with the K^+ channel inhibitor TEA (10^{-3} M/L) for 5 minutes, the perfusate through the donor aorta also relaxed carotid artery, but the magnitude of the relaxation was markedly decreased. TEA=Tetraethylammonium chloride.

한 관류액에 비하여 크게 작았다(Fig. 4A). 이러한 흥부대 동맥을 관류한 저산소 용액에 의한 이완은 NO synthase 억제제인 L-NAME을 전처리하였을 때(Fig. 4B)와 K^+ 통로 억제제인 TEA를 전처리하였을 때 억제되었다(Fig. 5).

3) 저산소증 혹은 화학적 저산소증이 세포내 Ca^{2+} 증가에 미치는 영향

배양한 토끼 흥부대동맥 혈관내피세포에 ATP를 투여하면 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하였는데 저산소 상태에서 증가시킨 다음 정상 용액으로 교체를 하면 세포내 Ca^{2+} 농도가 감소하였다(Fig. 6A). 이러한 ATP에 의한 세포내 Ca^{2+} 증가는 TEA에 의하여 감소하였다(Fig. 6A). ATP $3 \mu M$ 에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도는 정상에서 $0.87 \pm 0.13 \mu M$, 저산소 용액에서 $1.23 \pm 0.15 \mu M$ 로 저산소 용액에서 유의하게 높았다(Fig. 6B). 저산소 용액 이외에도 2-deoxyglucose를 이용하여 ATP 에너지를 고갈시키거나 CN^- 를 투여하여 화학적 저산소증을 유발하였을 때에도 세포내 Ca^{2+} 이 증가하였다. 즉, 2-deoxyglucose에 의하여 세포내 Ca^{2+} 이 증가하였으며 이러한 Ca^{2+} 의 증가는 세포외 Ca^{2+} 을 제거하면 억제되었다(Fig. 6C). 그리고 세포외 Ca^{2+} 을 제거한 후 endoplasmic reticulum Ca^{2+} pump를 억제하는 2'-di (tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ)를 투여하여 세포내 Ca^{2+}

저장고에서 Ca^{2+} 을 분비, 고갈시킨 후 세포외 Ca^{2+} 을 투여하여 store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)를 활성화시켰다. 다음 CN^- 를 투여하였는데 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하여, CN^- 는 SOCE를 통한 Ca^{2+} 유입을 증가시키는 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 6D).

고찰

1) 저산소증이 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향

저산소증은 혈관내피세포에서 NO 분비를 유발하는 것으로 추정된다. 저산소증은 혈관내피세포에서 혈관평활근 이완인자를 분비하여 내피세포 의존적인 이완을 유발하는데 이러한 혈관평활근 이완인자의 분비는 NO synthase 억제제인 L-NAME에 의하여 억제되는 것으로 미루어, 저산소증에 의하여 혈관내피세포에서 분비되는 이완인자는 NO일 것으로 추정된다.

이러한 저산소증에 의한 NO 분비는 저산소증에 반복 노출할수록 증가하는 것으로 추정된다. 저산소증에 반복 노출할수록 혈관내피세포 의존성 이완이 증가하였고(Fig. 3A), L-NAME에 억제되는 이완이 증가하여(Fig. 4) 저산소증에 의한 NO, 분비는 저산소증을 반복할수록 증가하는

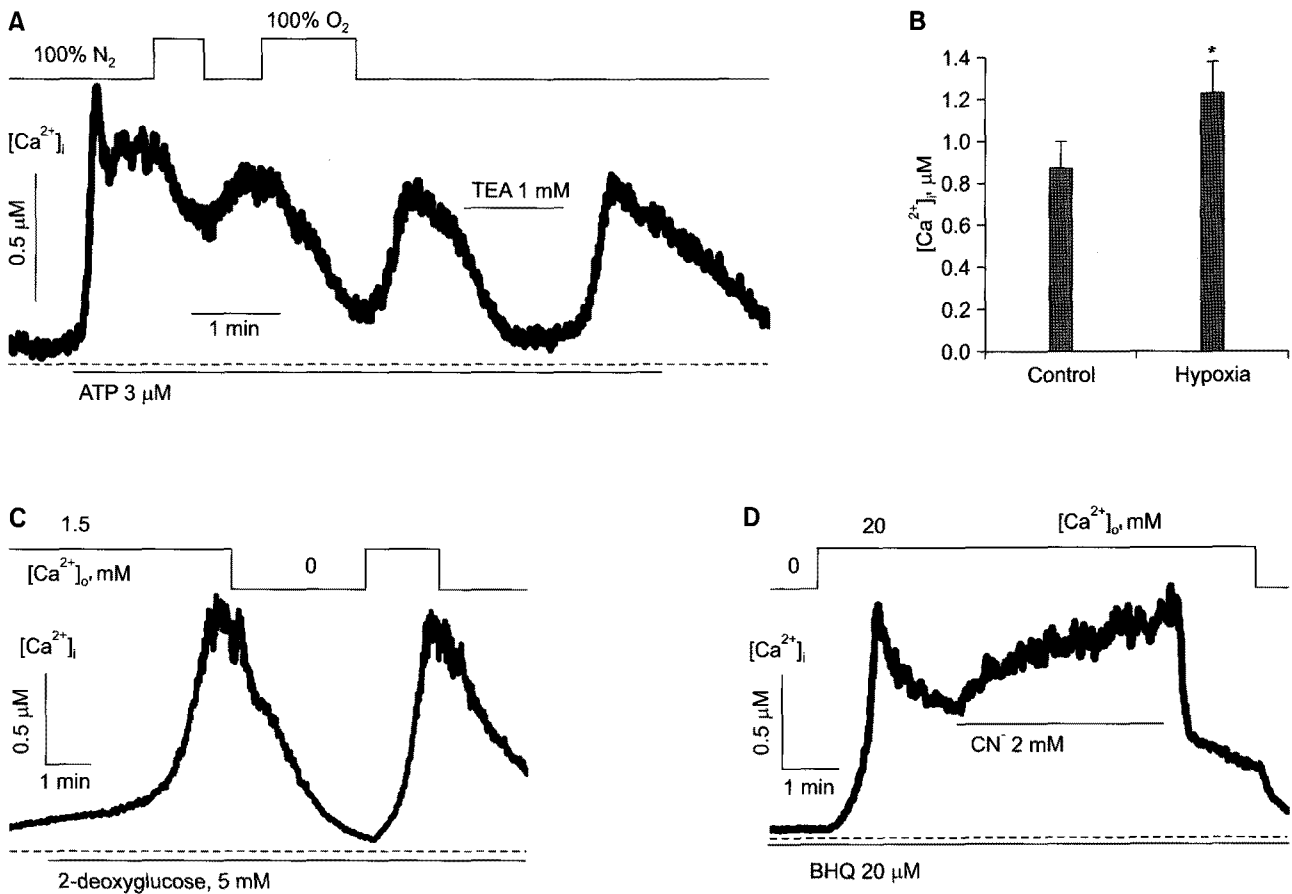


Fig. 6. Effects of hypoxia on intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in cultured rabbit aortic endothelial cells. (A) In hypoxic condition, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was increased by ATP and the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was decreased by reoxygenation. In addition, the K^+ channel blocker TEA completely inhibited ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in hypoxic condition. (B) Summary of the effect of hypoxia on ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase ($n=8$); $*p<0.01$. (C, D) Effects of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose or CN^- on $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 2-deoxyglucose increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was decreased by elimination of extracellular Ca^{2+} (C). CN^- also increased Ca^{2+} influx (D). Intracellular Ca^{2+} store was depleted by BHQ in Ca^{2+} free solution and store-operated Ca^{2+} entry was activated by readdition of extracellular Ca^{2+} . The store-operated Ca^{2+} entry was further enhanced by CN^- .

것으로 결론 내릴 수 있었다.

2) 혈관내피세포에서 저산소증에 의한 NO 분비 기전

혈관내피세포에서 NO를 생산하는 NO synthase (eNOS)는 세포내 Ca^{2+} 에 의존적으로 활성화되며[18] 내피세포 의존성 이완은 세포의 Ca^{2+} 을 제거하면 억제된다[19]. 그러므로 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면 eNOS의 활동도는 증가하며 혈관내피세포에서 NO 분비는 세포내 Ca^{2+} 증가에 의한다[18,19]. 혈관내피세포에서 세포내 Ca^{2+} 증가는 처음 빠르고 일시적인 Ca^{2+} 증가와 이후 나타나는 지속적인 증가로 나눌 수 있는데 처음의 빠르고 일시적인 증가는 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 유출된 Ca^{2+} 에 의하며

이후 나타나는 지속적인 증가는 세포밖 Ca^{2+} 의 유입에 의한 것으로 알려져 있다[17]. 본 실험에서는 ATP로 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킨 다음 저산소증과 대조 간의 차이를 관찰하였으므로 지속적인 증가에 대한 영향만을 관찰할 수 있었다. 그 결과 저산소증은 혈관내피세포에서 ATP에 의한 세포내 Ca^{2+} 증가를 더욱 증가시켰으므로 저산소증은 세포내 Ca^{2+} 유입을 증가시키는 것으로 사료된다. 반면 저산소증에 반복 노출하였을 때 세포내 Ca^{2+} 농도는 처음 저산소증에 노출하였을 때와 비교하여 더 크게 증가하지 않았다. 그러므로 저산소증에 반복적으로 노출하였을 때 NO의 분비가 더욱 증가한 기전은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 의한 것이 아니라 다른 기전에 의한 가능성이

있다.

그리고 글루코스 분해 과정을 deoxyglucose를 사용하여 억제하였을 때와 산화성 대사과정을 CN^- 로 억제하였을 때에도 저산소증과 동일한 효과를 보였다. 글루코스 분해 과정 억제와 산화성 대사과정의 억제는 저산소증 상태에서 관찰될 수 있는 변화들이므로 저산소증에 의한 변화는 글루코스 분해 과정 억제나 산화성 대사과정 억제에 의하여 발생하였을 가능성이 있다. 그러나 저산소증, deoxyglucose, CN^- 모두 산화성 스트레스를 높일 가능성이 있으므로 산화성 스트레스에 의하여 이러한 변화가 발생하였을 가능성도 있다.

3) 생리학적 중요성

저산소증은 허혈에 의하여 발생하는데 허혈은 죽상경화증 등 혈관질환이 있는 경우 발생한다. 저산소증에 의하여 혈관내피세포 Ca^{2+} 이 증가하여 NO 생성을 증가시키므로 허혈 등에 의하여 혈관이 저산소증에 빠지는 경우 혈관내피세포에서 NO의 분비가 증가하여 혈관평활근을 이완시킬 것으로 추정된다. 혈관평활근이 이완하면 혈류량이 증가하므로, 이러한 저산소증에 의한 혈관내피세포의 반응은 허혈에 빠진 혈관을 보호하는 기전으로 작용할 것으로 추정된다. 그리고 반복적인 저산소증에 노출하는 경우 NO의 분비가 증가하였으므로, 허혈-재관류에 미리 노출된 경우 뒤 이어서 오는 허혈에 의한 NO 생성이 더욱 증가할 것으로 추정된다. NO 생성이 증가하는 경우 허혈-재관류 손상을 억제할 수 있으므로 이 기전은 선행된 허혈-재관류의 보호 기전의 일부를 설명한다.

결론

저산소증은 혈관내피세포 Ca^{2+} 유입을 촉진하여 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시켜 NO 등 내피세포성 이완인자의 분비를 증가시키고 이러한 내피세포성 이완인자의 분비에 의하여 혈관평활근 이완이 유발되는 것으로 추정할 수 있었다. 이러한 저산소증에 의한 혈관평활근 이완 기전은 저산소증을 유발하는 허혈과 같은 병적인 상황에서 혈관을 이완시켜 혈류 순환을 도와주는 즉 병적 상황에 대응하는 중요한 보상 기전으로 생각된다. 한편 저산소증에 의하여 혈관내피세포 Ca^{2+} 이 증가하는 기전은 더 연구가 필요하다고 사료된다.

참고 문헌

1. Nilius B, Droogmans G. *Ion channels and their functional role in vascular endothelium*. *Physiol Rev* 2001;81:1415-59.
2. Inagami T, Naruse M, Hoover, R. *Endothelium as an endocrine organ*. *Annu Rev Physiol* 1995;57:171-89.
3. Dobrina A, Rossi F. *Metabolic properties of freshly isolated bovine endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta* 1983;762:295-301.
4. Cappelli-Bigazzi M, Battaglia C, Pannain S, Chiariello M, Ambrosio G. *Role of oxidative metabolism on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated vessels*. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:871-9.
5. Hashimoto M, Close LA, Ishida Y, Paul RJ. *Dependence of endothelium-mediated relaxation on oxygen and metabolism in porcine coronary arteries*. *Am J Physiol* 1993;265(1 Pt 2):H299-306.
6. Forman MB, Puett DW, Virmani R. *Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications*. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:450-9.
7. Suval WD, Duran WN, Boric MP, Hobson RW, Berendsen PB, Ritter AB. *Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury*. *Am J Surg* 1987;154:211-8.
8. Flamant L, Toffoli S, Raes M, Michiels C. *Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells*. *Exp Cell Res* 2009;315:733-47.
9. Michiels C, Arnould T, Remacle J. *Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions*. *Biochim Biophys Acta* 2000;1497:1-10.
10. Rodman DM, Yamaguchi T, Hasunuma K, O'Brien RF, McMurtry IF. *Effects of hypoxia on endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery*. *Am J Physiol* 1990;258(4 Pt 1):L207-14.
11. Johns RA, Linden JM, Peach MJ. *Endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia*. *Circ Res* 1989;65:1508-15.
12. Brown IP, Thompson CI, Belloni FL. *Role of nitric oxide in hypoxic coronary vasodilatation in isolated perfused guinea pig heart*. *Am J Physiol* 1993;264(3 Pt 2):H821-9.
13. Archer SL, Tolins JP, Raij L, Weir EK. *Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor*. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:1198-205.
14. Aggarwal NT, Pfister SL, Gauthier KM, Chawengsub Y, Baker JE, Campbell WB. *Chronic hypoxia enhances 15-lipoxygenase-mediated vasorelaxation in rabbit arteries*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H678-88.
15. Bajpai AK, Blaskova E, Pakala SB, et al. *15(S)-HETE*

- production in human retinal microvascular endothelial cells by hypoxia: Novel role for MEK1 in 15(S)-HETE induced angiogenesis.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:4930-8.
16. Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM. *Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines.* Am J Physiol 1985;249(1 Pt 2):H95-101.
17. Suh SH, Vennekens R, Manolopoulos VG, et al. *Characterization of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and Ca^{2+} signalling.* Pflugers Arch 1999;438:612-20.
18. Buckley BJ, Mirza Z, Whorton AR. *Regulation of Ca^{2+} -dependent nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells.* Am J Physiol 1995;269:C757-65.
19. Winquist RJ, Bunting PB, Schofield TL. *Blockade of endothelium-dependent relaxation by the amiloride analog dichlorobenzamil: possible role of Na^+/Ca^{2+} exchange in the release of endothelium-derived relaxant factor.* J Pharmacol Exp Ther 1985;235:644-50.

=국문 초록=

배경: 저산소증이 혈관평활근 수축성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 저산소증이 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향과 그 기전을 규명하고자 하였다. 대상 및 방법: 토끼 대동맥에서 내피세포 의존성 이완과 관찰하고, 토끼 대동맥에서 내피세포성 이완인자 분비 정도를 내피세포를 제거한 경동맥의 수축에 미치는 영향으로 생물검증을 하였다. 마지막으로, 배양한 토끼 대동맥 혈관내피세포에서 세포내 Ca^{2+} 변화를 측정하였다. 저산소증은 세포외 용액에 공급되는 산소를 질소로 대체하여 제거한 후 이 용액을 혈관 혹은 세포에 공급하여 유발하거나, deoxyglucose 혹은 CN^- 를 투여하여 화학적인 저산소증을 유발시켰다. 결과: 노에피네프린으로 토끼 대동맥을 수축시킨 다음 저산소증에 노출시키면 대동맥이 이완을 하였으며 저산소증에 반복하여 노출시키면 저산소증에 의한 이완이 더 크게 증가하였다. 이러한 저산소증에 의한 이완은 혈관내피세포를 제거한 대동맥에서는 관찰되지 않았다. 토끼 대동맥에서 분비되는 내피세포성 이완인자 분비를 내피세포를 제거한 경동맥을 이용하여 생물검정한 결과 저산소증에 의하여 내피세포성 이완인자의 분비가 증가하였는데 반복된 노출에 의하여 더 크게 증가하였다. 그리고 저산소증에 의한 내피세포성 이완인자 분비는 NO 생성을 억제하는 경우와 K^+ 통로 억제제인 tetraethyl ammonium (TEA)에 의하여 억제되었다. 배양한 혈관내피세포에서 ATP에 의하여 증가한 세포내 Ca^{2+} 은 저산소증에 의하여 유의하게 증가하였으며 TEA에 의하여 억제되었다. Deoxyglucose에 의하여 세포내 Ca^{2+} 이 증가하였으며 세포외 Ca^{2+} 을 제거하면 감소하였다. CN^- 역시 혈관내피세포 Ca^{2+} 유입을 증가시켰다. 결론: 이러한 실험 결과로 미루어 토끼 대동맥에서 저산소증은 내피세포 의존성 이완을 유발하는데 이는 저산소증에 의한 세포내 Ca^{2+} 유입 증가에 의하여 NO 생성이 증가되어 일어난 것으로 추정할 수 있었다.

- 중심 단어 : 1. 혈관내피세포
2. 저산소증
3. 산화질소
4. 칼슘