

# 재생된 혈관 내피세포를 갖는 돼지 관동맥에서 Endothelin-1에 의한 Endoperoxides와 Thromboxane A<sub>2</sub>의 분비

울산대학교 서울중앙병원 내과학교실

김재중 · 박승정 · 이종구

서울대학교 의과대학 내과학교실

이 영 우

= Abstract =

## Endoperoxides and Thromboxane A<sub>2</sub> in Porcine Coronary Arteries with Regenerated Endothelium

Jae-Joong Kim, M.D., Seung-Jung Park, M.D., Simon Jong-Koo Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea*

Young Woo Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor substance that causes slow and long-lasting contractions of isolated blood vessels. In the aorta of the spontaneously hypertensive rat, endothelin-1 stimulates the release of a cyclooxygenase-dependent, endothelium-derived contracting factor(EDCF), presumably thromboxane A<sub>2</sub>. There have not been any studies about the response of porcine coronary arteries with regenerated endothelium to endothelin-1.

**Methods :** The present study was designed to determine the role of EDCF in the response to endothelin-1 in arteries with regenerated endothelium. Rings of porcine coronary arteries, with and without endothelium of previously deendothelialized left anterior descending coronary artery and native left circumflex coronary arteries, were suspended in conventional organ chambers for the measurement of isometric force.

**Results :** In quiescent rings of the previously deendothelialized left anterior descending coronary artery treated with the nitric oxide synthase inhibitor nitro-L-arginine, endothelin-1 caused contractions which were larger in the rings with endothelium than in those without endothelium. Under the same experimental conditions, in the left circumflex coronary artery, the contractions to endothelin-1 were significantly greater by the removal of the endothelium. In rings with endothelium of the previously deendothelialized left anterior descending coronary artery, indomethacin(inhibitor of cyclooxygenase) and ridogrel(thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, and

inhibitor of thromboxane synthase) shifted the concentration-response curve to endothelin-1 to the right and to a comparable extent. Dazoxiben(inhibitor of thromboxane synthase) and BQ-123(selective antagonist of endothelin-A receptor subtype) inhibited, to the same extent as indomethacin and ridogrel, the response to higher concentrations of endothelin-1. The endothelium-dependent component of the response to lower concentrations of endothelin-1 was inhibited by indomethacin and ridogrel, but not by dazoxiben and BQ-123. In rings without endothelium of both previously deendothelialized left anterior descending and native left circumflex coronary arteries, indomethacin and ridogrel did not affect the contractions to endothelin-1.

**Conclusion :** These findings suggest that in regenerated endothelium, high concentrations of endothelin-1 stimulate the release of thromboxane  $A_2$  through activation of endothelin-A receptors. Endoperoxides generated by activation of endothelial cyclooxygenase may be the endothelium-derived contracting factor(s) released in regenerated endothelium by lower concentrations of the peptide.

**KEY WORDS :** Endothelin-1 · Endothelium-derived contracting factors · Regenerated endothelium.

## 서 론

Endothelin은 혈관 내피세포 배양액에서 처음 발견된 펩타이드(peptide)로 현재까지 알려진 혈관수축 펩타이드(vasoconstrictive peptide)들 중 가장 강력한 물질이다<sup>1)</sup>. Endothelin은 포유동물(mammalian animals)에 투여시 지속적인 혈압상승을 나타내므로 혈압의 유지와 혈관경련(vasospasm)에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.

Endothelin은 21개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 사람에서 3개의 isotypes가 존재하는 것으로 알려져있고<sup>2)</sup>, 현재까지는 적어도 2개의 endothelin 수용체(receptor)가 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>3, 4)</sup>. Endothelin은 또한 phospholipase  $A_2$ 를 활성화하여 prostacyclin, prostaglandin  $E_2$ 와 thromboxane  $A_2$ 를 생성하는데<sup>5)</sup>, 이들 prostanoids와 혈관 내피세포에서 생성된 EDRF가 endothelin에 의한 혈관수축 작용에 영향을 주게 된다.

Endothelin의 발견은 EDRF의 발견 이래 혈관수축 조절 기능의 이해 및 각종 질환에서 수축조절 기능의 병리생리를 이해하는데 획기적인 역할을 하게 되었다. 이러한 병리생리의 연구 모델로 SHR(spontaneously hypertensive rat)와 WKY rat(normotensive Wistar-Kyoto rat)를 이용한 초기 연구에서 SHR의 대동맥에서는 아세틸콜린(acetylcholine)에 의하여 endoperoxide가 수축 물질로 동시에 분

비될 것이라는 시사가 있었다<sup>6,7)</sup>. 이후 SHR의 대동맥에서는 혈관 내피세포가 존재시 EDRF를 분비시키는 아세틸콜린에 의하여 cyclooxygenase-dependent EDCF가 동시에 분비되며, endothelin-1에 의하여 EDRF(nitric oxide)가 분비될 뿐 아니라 endothelin-1에 의하여 cyclooxygenase-dependent EDCF가 분비됨이 알려진 것이다<sup>8-10)</sup>. 이러한 서로 연결된 사슬은 cyclooxygenase의 억제 인자인 indomethacin 외에 thromboxane synthase 억제인자인 dazoxiben, thromboxane  $A_2$  수용체의 길항체인 SQ-29,548를 사용하게 되고, 또한 endothelin-A receptor ( $ET_A$ )의 선택적 길항체인 BQ-123이<sup>11)</sup> 등장하여 조금씩 고리가 풀리게 되었다. Taddei등은<sup>12)</sup> SHR의 대동맥에서 endothelin-1에 의하여 혈관 내피세포에서 유래된 thromboxane  $A_2$ 가 내피세포 의존성 혈관수축에 관여하고 있으며, 이는  $ET_A$  수용체를 통하여 이루어지고, 특히 endothelin-1이 고농도일때 thromboxane  $A_2$ 가 자극분비됨을 시사하였다.

이러한 연구 결과의 도움을 받아 병행되고 있는 연구가 재생된 혈관 내피세포의 병리생리에 대한 분야이다. 재생된 혈관 내피세포는 내피세포 의존성 혈관확장에 장애를 보이는데 특히 이는 pertussis toxin-sensitive G protein의 기능 저하로 나타나며, 뿐만아니라 serotonin, norepinephrine과 응집 혈소판(aggregated platelets)등에 의한 내피세포 의존성

혈관수축이 항진을 보임이 관찰되었다<sup>13-16)</sup>. 또한 Shimokawa등은<sup>17,18)</sup> 혈관 내피세포의 손상과 이에 따른 혈관 내피세포의 재생이 관동맥 경련에 관여할 수 있을 것이라 시사하였다.

현재까지의 재생된 혈관 내피세포의 기능장애에 대한 많은 연구들은 내피세포 의존성 혈관확장의 장애에 대한 것이 주였고, 재생된 혈관 내피세포에서 내피세포 의존성 혈관수축 특히 endothelin-1에 의한 내피세포성 혈관 수축 인자(EDCF)에 대한 연구는 아직은 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 돼지의 좌전하행지 관동맥 (left anterior descending artery)을 풍선도자를 이용하여 혈관 내피세포를 벗긴다음 4주간 정상 사료로 사육후 재생된 혈관 내피세포를 갖는 좌전 하행지 관동맥과 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥(left circumflex artery)의 혈관윤을 이용하여 endothelin-1에 대한 재생혈관 내피세포에서의 EDCF의 자극분비 및 그 성상을 연구하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 실험 대상 및 준비

실험동물은 생후 8주되고 체중이 20~25Kg인 Yorkshire 돼지 5마리를 사용하였다. 마취는 tiletamine hydrochloride, arylaminocycloalkanone과 zolazepam hydrochloride의 mixture인 Telazol을 100mg 근육주사하고 atropine을 0.4mg 근육주사한 후, 할로탄(halothane)을 매분당 2L로 흡입시켜 유지시켰다. 안정된 마취상태에 도달한 후 무균성 외과적 조작을 통하여 좌측 경동맥을 박리한 후 7 French guiding catheter(hockey stick or multipurpose guiding catheter를 사용하였음)를 방사선 투시장치를 이용하여 박리한 좌측 경동맥을 통하여 좌측 관동맥 기시부에 삽입시켰다. 이 guiding catheter내에 조영제를 투여하여 좌전하행지 관동맥(left anterior descending artery)의 주행을 확인한 후 guiding catheter내로 balloon catheter를 삽입하여 좌전 하행지 관동맥내로 balloon catheter를 삽입하였다. 사용된 balloon catheter는 USC사의 over-the guide wire system의 balloon catheter로 balloon의 크기는 관동맥 조영술로 보이는 좌전 하행지 관동맥의 근위부(proximal portion)의 크기에 따라 선정했다. 실제로

모든 경우에서 balloon의 크기는 2.5mm나 3.0mm의 크기로 가능하였다. 혈관 내피의 박리는 balloon catheter를 좌전하행지 관동맥의 원위부(대략 좌전하행지 관동맥의 기시부에서 3~4cm 떨어진 곳으로 정하였음)에 위치시킨 후 balloon내에 희석 조영제를 주입하여 balloon을 완전히 팽창시킨 후 balloon catheter를 좌전 하행지 관동맥의 기시부까지 당기는 방법으로 박리를 하였다. 성공적인 혈관 내피의 박리 여부는 체표면 심전도상에서 ST분절의 0.1mV 이상의 하강이나 상승을 보이는 허혈성 변화가 나타나거나, 혹은 serotonin을 관동맥내로 체중 kg당 10μg의 용량을 투여시 혈관내경이 감소되면 성공적인 박리로 판정하였다. 혈관 내피 박리를 하는 도중에는 동맥압과 체표면 심전도(lead II와 aVL을 기록하였음)를 지속적으로 관찰하였고, 혈관 내피 박리를 하기전에 헤파린(heparin)을 체중 kg당 100units와 lidocain hydrochloride 20mg을 정맥 투여하였다. 성공적인 박리가 끝나면 마취를 깨운다음 온도조절이 가능한 동물 사육실에서 개별적으로 사육을 하였다. 정상적인 사료로 사육하였으며 3%이상의 체중 증량이 안 되도록 하였다. 각 실험 동물들은 4주간 사육후 organ chamber 실험을 하였다.

### 2. Organ Chamber 실험

혈관 내피 박리후 4주간 사육이 되면 organ chamber 실험에 들어갔다. 실험 동물은 Telazol 100mg을 근육주사하고 sodium pentobarbital을 체중 kg당 12.5mg을 정맥주사하여 마취시킨 후 심장을 적출하였다. 적출된 심장에서 바로 좌전하행지 관동맥과 좌회선지 관동맥(left circumflex artery)을 조심스럽게 박리하여 찬 modified Krebs-Ringer bicarbonate용액(control 용액)에 곧바로 담구었다. 사용된 modified Krebs-Ringer bicarbonate용액은 NaCl 118.3mM, KCl 4.7mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, EDTA 0.026mM, PH는 7.4로 맞추어져 있다. 이 용액에 담근 후 미세수술 기구를 이용하여 동맥 주위에 붙어있는 결체 조직들을 깨끗하게 제거한 후 3~4mm 길이의 혈관윤들을 만들었다. 좌전하행지 관동맥은 근위부 3~4cm 부위를 혈관윤을 만들었고, 좌회선지 관동맥도 근위부를 혈관윤을 만들었다.

여기서 좌전하행지 관동맥의 근위부를 잘라서 만든 혈관윤은 혈관 내피 박리후 재생된 혈관 내피를 갖는 혈관윤의 실험모델이 되며, 좌회선지 관동맥의 근위부를 잘라서 만든 혈관윤은 정상 혈관 내피를 갖는 대조군 모델이 된다. 위 모델의 혈관윤으로 organ chamber 실험시 각 모델에서 혈관 내피세포가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우로 다시 나뉘어 실험을 하게된다. 혈관윤에서 혈관 내피세포의 박리는 혈관윤을 찬 control 용액으로 적신 페이퍼 티슈(paper tissue)위에 올려놓고 watchmaker's forcep을 이용하여 혈관 내면을 수차례 부드럽게 문질러 주어 박리를 하였다. 이러한 혈관윤을 25cc의 37°C로 유지된 control 용액으로 채워져있고, PH 7.4로 유지되며, 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스가 공급되는 organ chamber에 수직으로 걸어서 실험을 하였다. 실험은 우선 혈관윤의 길이 장력관계(length-active tension relation)의 최적점(optimal point)을 구하여 혈관윤을 이 상태로 유지시키면서 진행을 하게된다. 길이 장력관계의 최적점은 혈관윤에 점진적인 부하를 주면서 각 부하에서 60mM KCl로 혈관윤을 수축시켰을 때의 장력을 재어 최대 활동장력(active tension)이 나타나는 부하치로 구하였다. 이 최적점의 부하는 대개는 6~8g이었다. 최적점의 부하를 건 후에 60mM KCl을 투여하여 각 혈관윤의 장력을 측정한 후(2번째 테스트한 값으로 정하였음) 이 장력을 앞으로 시행하는 혈관 수축실험에서 100% 장력으로 정하였다. 위의 과정이 끝나면 organ chamber내 용액을 새로운 control용액으로 교체한 후 1시간 평형화(equilibration)를 시켰다. 1시간 후 혈관 내피세포의 존재유무를 확인하기 위해서 혈관윤을  $2 \times 10^{-6}$ M의 prostaglandin  $F_{2\alpha}$ 에 노출시켜 수축을 일으킨 후 다시  $10^{-8}$ M의 bradykinin에 노출시켰을 때 혈관확장 유무를 관찰하였다. 혈관확장이 일어나면 혈관 내피세포가 존재하는 것으로 규정하였다. 이러한 과정이 끝나면 본 실험에 들어가게 되는데, 같은 동맥에서 만들어진 혈관윤들 중에서 혈관 내피세포가 존재하는 혈관윤과 존재하지 않는 혈관윤을 동시에 organ chamber 실험을 하였다. 실험의 근간은 endothelin-1의 혈관윤의 농도별 농도-수축반응의 관계를 보는 것으로 endothelin-1의 농도는  $10^{-10}$ 에서  $10^{-7}$ M의 단계로 나누었다. En-

dothelin-1의 농도변화에 따른 변화는 혈관윤을 control용액에만 노출시킨 경우와, endothelin-1의 혈관 내피세포에 대한 영향을 보기 위하여 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin ( $10^{-5}$ M), thromboxane synthase 억제제인 dazoxiben( $10^{-4}$ M), thromboxane  $A_2$  수용체의 길항체인 ridogrel( $10^{-6}$ M)과 endothelin-A 수용체( $ET_A$ )의 선택적 길항체인 BQ-123(혈관 평활근에 대한 직접적인 억제 효과가 나타나지 않는  $3 \times 10^{-8}$ M로 실험하였음)을 넣어 45분간 노출시킨 경우를 동시에 관찰하였다. Endothelin-1의 혈관 내피세포에서의 내피세포성 수축인자(EDCF)의 분비 및 혈관수축을 보는 실험은 nitro-L-arginine ( $10^{-4}$ M)을 주어서 nitric oxide(NO)의 생성을 억제시킨 후에 실험을 하였다.

### 3. 실험 약제

아래의 약제들을 사용하였다. Indomethacin을 제외한 모든 약제는 실험 당일날 증류수를 이용하여 만들어서 사용하였다. Indomethacin은 물과  $Na_2CO_3$ 에 녹인 후 sonication하여 사용하였다. 본 논문에 기재된 모든 약제의 농도는 organ chamber내 용액에서의 final molar(M) concentration으로 표기하였다.

- 1) Bradykinin (Sigma Chemical Company, St. Louis)
- 2) Endothelin(ET) -1 (Sigma Chemical Company, St. Louis)
- 3) Indomethacin (Sigma Chemical Company, St. Louis)
- 4) Potassium Chloride (Sigma Chemical Company, St. Louis)
- 5) Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) (Sigma Chemical Company, St. Louis)
- 6) BQ-123 (Banyu Pharmaceuticals, Tokyo)
- 7) Dazoxiben (Pfizer, Groton)
- 8)  $NC$ -nitro-L-arginine (Aldrich, Milwaukee)
- 9) Ridogrel (R68070) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium)

### 4. 통 계

통계처리는 endothelin-1의 각 농도에서 paired t-test를 사용하였으며, P 값이 0.05미만인 경우 통계적 유의성을 두었다.

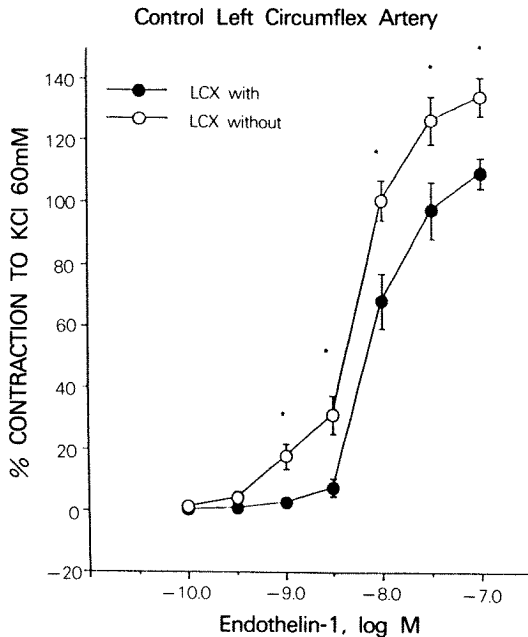
## 결 과

혈관수축을 보는 실험 특히 내피세포성 수축인 자에 관한 실험에서는 내피세포성 확장인자인 nitric oxide의 생성을 억제시켜 이로 인하여 내피세포 의존성 혈관수축에 저해를 오지 않게 하기 위하여 nitric oxide 생성을 억제시키는 nitro-L-arginine( $10^{-4}$  M)을 넣어준 상태에서 실험을 하게 된다. 그런데 어떤 혈관윤에서는 nitro-L-arginine을 투여시 혈관 수축이 심하게 오게 되는데, 본 실험에서는 nitro-L-arginine을 투여후 혈관수축이 1g의 장력을 넘어 가게 되면 그 혈관윤은 실험에 사용하지 않았다. 본 실험에서 nitro-L-arginine을 투여시 혈관 내피 세포가 존재하는 혈관윤에서 혈관수축 정도는 평균  $0.88 \pm 0.12$ g 이었다.

### 1. 정상 혈관 내피세포를 갖는 관동맥

(대조군 모델)

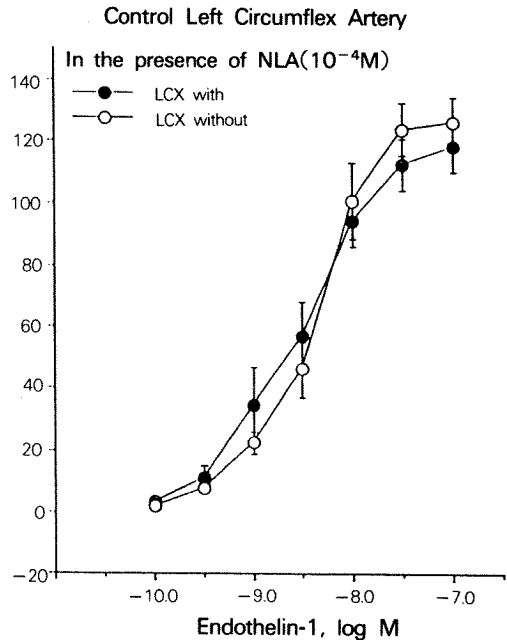
정상 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥의 혈관



윤에서(quiescent ring) endothelin-1의 농도변화에 따른 혈관수축 정도는 Fig. 1의 좌측 그래프에서 보듯이 혈관 내피세포가 존재하는 경우가 존재하지 않는 경우보다 의미있게 적었다. 그러나 nitric oxide의 생성 억제제인 nitro-L-arginine의 존재하에서는 Fig. 1의 우측 그래프에서 볼 수 있듯이 혈관 내피세포의 존재유무에 따른 차이가 없어졌다. 또한 nitro-L-arginine 존재하에서 arachidonic acid cascade의 각 단계별 억제제로 indomethacin, dazoxiben, ridogrel(R68070)등을 투여하여 단계별 억제를 유도한 경우 endothelin-1에 대한 혈관수축에 의미 있는 변화가 나타나지 않았으며 더우기 이는 혈관 내피세포의 존재 유무와도 관계가 없었다(Table 1). 이는 endothelin-A 수용체의 선택적 길항체인 BQ-123을 투여시에도 같은 결과가 나타났다(Table 1).

### 2. 재생된 혈관 내피세포를 갖는 관동맥(좌전하행지 관동맥 모델)

미리 balloon catheter를 이용하여 혈관 내피를 박리한 후 4주간의 재생기간을 두어 재생된 혈관

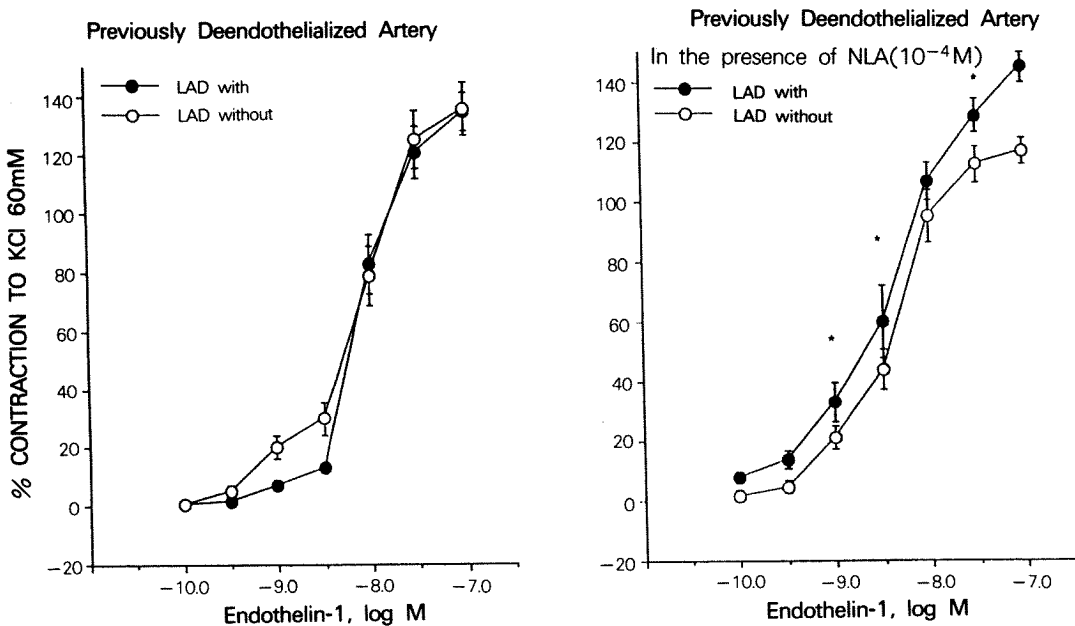


**Fig. 1.** Cumulative concentration-response curves to endothelin-1 ( $10^{-10}$ – $10^{-7}$  M) in quiescent rings, with (with) and without(without) endothelium, of control left circumflex porcine coronary arteries(LCX) in control solutions(left panel), and in the presence of nitro-L-arginine (NLA;  $10^{-4}$  M)(right panel). Data are shown as means $\pm$ SEM( $n=5$ ), and expressed as percent of a reference contraction to KCl(60 mM). The asterisks denote statistically significant differences between rings with and without endothelium ( $P<0.05$ ).

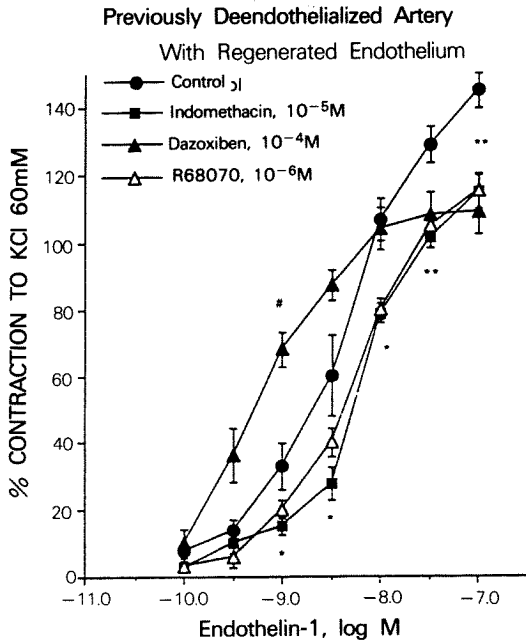
**Table 1.** Effect of indomethacin, dazoxiben, R68070 and BQ-123 on contractions evoked by endothelin-1 in porcine coronary arteries with and without endothelium

	ED <sub>50</sub> (-log M)		Maximal contraction(%)	
	Denuded		Denuded	
	LAD	LCX	LAD	LCX
Rings with endothelium				
Control	8.68±0.15	8.73±0.20	145±5.2 <sup>#</sup>	119±8.3
Indomethacin, 10 <sup>-5</sup> M	8.28±0.03*	8.46±0.15	114±2.7*	119±6.2
Dazoxiben, 10 <sup>-4</sup> M	9.32±0.09*	8.96±0.14	109±6.6*	118±3.7
BQ-123, 3×10 <sup>-8</sup> M	9.02±0.09	9.03±0.17	113±2.7*	119±7.8
R68070, 10 <sup>-6</sup> M	8.31±0.07*	8.49±0.10	115±3.9*	118±7.3
Rings without endothelium				
Control	8.48±0.11	8.57±0.17	117±3.4	126±8.2
Indomethacin, 10 <sup>-5</sup> M	8.34±0.15	8.52±0.17	128±4.9	122±5.5
Dazoxiben, 10 <sup>-4</sup> M	8.79±0.23	8.86±0.22	103±5.8	116±4.5
BQ-123, 3×10 <sup>-8</sup> M	9.01±0.14	8.94±0.17	120±8.7	124±5.3
R68070, 10 <sup>-6</sup> M	8.35±0.09	8.55±0.11	130±6.7	123±6.2

Data are expressed as mean±SEM; N=5. ED<sub>50</sub>: effective concentration producing 50% of the maximal response to KCl 60mM. Maximal contraction: maximal contraction to KCl 60mM. Denuded: previously balloon endothelial denuded; LAD: left anterior descending coronary artery; LCX: left circumflex coronary artery. \*P<0.05 compared with controls. <sup>#</sup>P<0.05 compared with LCX. All experiments were performed in the presence of nitro-L-arginine 10<sup>-4</sup>M.



**Fig. 2.** Cumulative concentration-response curves to endothelin-1 (10<sup>-10</sup>–10<sup>-7</sup> M) in quiescent rings with (with) and without (without) endothelium of previously deendothelialized porcine left anterior descending coronary arteries(LAD) in control solution (left panel), and in the presence of nitro-L-arginine (NLA; 10<sup>-4</sup> M) (right panel). Data are shown as means SEM (n=5), and expressed as percent of a reference contraction to KCl (60 mM). The asterisks denote that contractions of the rings with regenerated endothelium of the left anterior descending artery are statistically significantly greater than those of rings without endothelium(P<0.05).



**Fig. 3.** Effect of indomethacin, dazoxiben, BQ-123 and R68070 on contractions evoked by endothelin-1 in the presence of nitro-L-arginine ( $10^{-4}$  M) in quiescent rings with endothelium of previously deendothelialized left anterior descending coronary arteries. Data are shown as means SEM ( $n=5$ ), and expressed as percent of a reference contraction to KCl (60 mM). Statistically significant differences ( $P<0.05$ ) between control rings and arteries treated with indomethacin and R68070 are indicated by mark\*, significant differences between control rings and arteries treated with indomethacin, R68070 and dazoxiben indicated by mark\*\*, and significant differences between control rings and arteries treated with dazoxiben indicated by mark#.

내피세포를 갖게 한 좌전하행지 관동맥에서 얻은 혈관윤(quiescent ring) 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥의 혈관윤에서와는 달리 endothelin-1의 농도변화에 따른 수축 정도가 혈관 내피세포의 존재 유무에 따른 차이를 보이지 않았다(Fig. 2 왼쪽 그래프). 그러나 재생된 혈관 내피세포를 갖는 좌전하행지 관동맥의 혈관윤에서 endothelin-1( $10^{-7.5}$ – $10^{-7}$ M)에 의한 수축정도는 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥의 혈관윤에서 같은 농도의 endothelin-1에 의한 수축정도보다 의미있게 더 큰 수축을 나타내었다(Fig. 1, 2

와 Table 1). 반면에 nitro-L-arginine을 투여하여 nitric oxide의 생성을 억제시킨 후에는 endothelin-1의 농도에 따른 혈관 수축정도는 대조군 모델인 좌회선지 관동맥의 혈관윤에서와는 달리 혈관 내피세포가 있는 경우가 없는 경우보다 더 큰 혈관수축을 나타내었다. Nitro-L-arginine의 존재하에서 arachidonic acid cascade의 단계별 억제제로 indomethacin과 ridogrel(R68070)을 투여하면 endothelin-1의 농도에 따른 수축반응 곡선이 우측편위(rightward shift)를 보이니 dazoxiben과 BQ-123은 endothelin-1의 고농도( $10^{-7.5}$ – $10^{-7}$ M)에서만 endothelin-1에 의한 혈관수축 정도를 의미있게 억제하였다(Fig. 3과 Table 1). 그러나 혈관 내피세포가 존재하지 않는 경우에는 이러한 arachidonic acid cascade의 억제제나  $ET_A$ 수용체의 선택적 길항체인 BQ-123에 의하여 endothelin-1에 의한 혈관수축 정도가 영향을 받지 않았다(Table 1).

## 고 안

본 연구는 재생된 혈관 내피세포를 갖는 돼지 관동맥에서 endothelin-1에 의하여 내피세포성 수축인자가 분비됨을 시사하였다. 지금까지 endothelin의 수용체로 2개가 밝혀져 있고 이미 유전자적인 구조가 밝혀져 있다. 하나는 endothelin-1과 endothelin-2에 큰 친화력을 갖는 것으로 주로 혈관 평활근에 발현되고 있고( $ET_A$  수용체), 다른 하나는 endothelin의 3가지 타입에 같은 정도의 친화력을 갖는 것으로  $ET_B$ 라 불리며 주로 혈관 내피세포에 발현되어 있다<sup>3</sup>). 이 두번째 수용체인  $ET_B$ 는 endothelin의 자극에 의하여 prostacyclin과 내피세포성 확장인자(EDRF)의 분비에 관여한다고 밝혀졌다<sup>4</sup>). 또한 혈관 내피세포를 제거하거나 혹은 nitric oxide synthase의 억제제인 nitro-L-arginine을 투여시 endothelin에 의한 혈관수축이 증가한다는 것도 알려져 있다<sup>8,9,19</sup>).

본 연구에서 정상 혈관 내피세포를 갖는 모델인 좌회선지 관동맥의 혈관윤으로 실험시 endothelin-1에 의한 혈관수축 정도가 혈관 내피세포가 존재하는 경우 존재하지 않는 경우에 비하여 의미있게 작았고, nitric oxide synthase 억제제인 nitro-L-arginine으로 처리시에는 endothelin-1에 의한 혈관 수

축정도가 혈관 내피세포가 존재하는 경우 증가되어 혈관 내피세포가 존재하지 않는 경우와 비교시 차이가 없게 되었다. 이러한 결과들은 다음의 2가지로 해석할 수 있겠다. 돼지의 관동맥에서 endothelin-1은 직접적으로 EDRF(nitric oxide)의 분비를 자극하여 혈관 내피세포가 존재하는 경우의 혈관 수축이 존재하지 않는 경우보다 작아지게 된다. 혹은 endothelin-1이 직접적으로 EDRF의 분비를 자극하지는 않으나 정상 상태에서 혈관 내피세포에서 EDRF의 기저분비(basal release)가 일어나고 있어 이 EDRF가 endothelin-1에 의한 혈관 수축을 어느 정도 약화시킴으로 인하여 혈관 내피세포가 존재하는 경우 수축정도가 작아지게 된다고 설명할 수 있다.

정상 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥의 혈관 윤에서 cyclooxygenase억제제인 indomethacin, thromboxane synthase억제제인 dazoxiben과 thromboxane A<sub>2</sub> 수용체의 길항제인 ridogrel의 투여시 endothelin-1에 의한 혈관수축에 의미 있는 영향을 주지 못하였으며, endothelin-A 수용체(ET<sub>A</sub>)의 선택적 길항제인 BQ-123을 투여시에도 endothelin-1에 의한 혈관수축에 영향을 주지 못하였고 이는 혈관 내피세포의 존재 유무와도 관계가 없었다. 따라서 이러한 결과로 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥에서는 혈관 내피세포나 평활근에서 endothelin-1에 의한 cyclooxygenase 의존성 수축인자의 분비가 일어나지 않으며, EDRF의 분비는 아마도 혈관 내피세포에 존재하는 ET<sub>B</sub>수용체와 관계있을 것이라 생각할 수 있다.

재생된 혈관 내피세포를 갖는 모델인 돼지의 좌전하행지 관동맥의 혈관윤으로 한 실험에서 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. Endothelin-1에 의한 혈관 수축정도를 보는 실험에서 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 혈관윤에서와는 다른 결과가 나타났다. 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤에서 endothelin-1에 의한 수축이 정상 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤에서 보다 더 크게 나타났으며, 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤은 nitric oxide 억제제인 nitro-L-arginine을 투여시 내피세포가 존재하는 혈관윤이 존재하지 않는 혈관윤보다 endothelin-1에 더 큰 혈관수축을 나타내었다. 이러한 결과는 재생된 혈관 내피세포에서 EDRF의

기저 분비가 유지되고 있거나 재생된 혈관 내피세포에서 endothelin-1에 의하여 EDRF를 분비함을 나타내는 것으로 재생된 혈관 내피세포가 EDRF를 분비하는 기능이 보존되어 있음을 나타낸다. 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤에서 내피세포가 존재시 cyclooxygenase억제제인 indomethacin과 thromboxane A<sub>2</sub> 수용체의 길항제인 ridogrel을 투여시 endothelin-1에 의한 혈관수축 정도가 억제되는데 이는 재생된 혈관 내피세포에서 endothelin-1에 의하여 EDCF가 생성되어 분비되고, 이 EDCF의 생성은 cyclooxygenase 의존성이며, 작용은 혈관 평활근에 있는 thromboxane 수용체를 통하여 이루어 진다는 것을 암시하는 실험결과라 하겠다.

Thromboxane synthase 억제제인 dazoxiben이나 endothelin-A 수용체의 선택적 길항제인 BQ-123을 투여시에는 indomethacin이나 ridogrel과는 달리 endothelin-1의 농도가 낮은 경우( $10^{-10}$ – $10^{-8}$ M)에는 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤의 endothelin-1에 의한 수축을 억제하지 못하였다. 이는 재생된 혈관 내피세포에서 저농도의 endothelin-1에 의하여 생성 분비되는 cyclooxygenase 의존적인 EDCF는 아마도 thromboxane A<sub>2</sub> 보다는 endoperoxides일 것이라는 것을 시사한다고 하겠다. 실제로 thromboxane synthase 억제제인 dazoxiben은 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤에서  $10^{-9}$ M의 endothelin-1에 대한 혈관수축을 오히려 항진시켰다. 이러한 항진은 아마도 dazoxiben에 의한 thromboxane synthase억제시 재생 내피세포에서 저농도 endothelin-1에 의하여 분비된 endoperoxides의 축적을 초래하여 이들 축적된 endoperoxides가 혈관수축을 항진시켰을 것으로 생각한다. 이는 endoperoxides가 thromboxane 수용체들을 통하여 혈관 평활근의 수축을 일으킬 수 있다는 다른 연구결과에서<sup>20,21)</sup> 미루어 짐작할 수 있다. 반면에 고농도 ( $10^{-7.5}$ – $10^{-7}$ M)의 endothelin-1에 대한 재생된 혈관 내피세포를 갖는 혈관윤의 수축은 indomethacin과 ridogrel에 의한 억제정도 만큼 dazoxiben과 BQ-123 투여시에도 억제 되었다. 따라서 이 결과는 재생된 혈관 내피세포에서 고농도의 endothelin-1에 의하여 분비되는 cyclooxygenase 의존적인 EDCF는 아마도 thromboxane A<sub>2</sub>이며 이의 생성 분비에 관여하는 endothelin수용체는 재생된 혈관 내피세포에 존재



하는 ET<sub>A</sub>일 것이라는 것을 시사한다 할 수 있겠다.

즉, 본 연구의 결과를 종합해 보면 재생된 혈관 내피세포를 갖는 돼지 관동맥에서 endothelin-1에 의한 혈관수축이 항진되어 나타나는데 이는 endothelin-1에 의하여 생성분비되는 cyclooxygenase 의 존적인 EDCF에 의하여 나타나며, thromboxane A<sub>2</sub> 와 endoperoxides가 다 EDCF로 작용할 것이라는 것을 짐작할 수 있다.

임상적으로 사람에서 혈액내에 존재하는 endothelin-1을 측정해 보면 급성심근경색증과 같은 여러 허혈성 심질환에서 증가되어 있는 것을 알 수 있다<sup>22-24</sup>). 실질적으로 endothelin들은 혈관 내피세포내에 저장되지 않으므로 순간적인 내피세포 의존성 혈관수축을 일으키는 데에는 관여하기 어렵고, 허혈성 심질환에서 이들의 수치가 증가되는 것은 혈관 내피세포에서의 단백질 합성의 증가를 필요로 하게 된다. 따라서 endothelin-1의 인체내 생리학적 작용은 혈관 수축능(vascular tone)의 장기적이며 지속적인 조절에 있을 것이라는 것이 일반적이다<sup>25</sup>). 이에 반하여 Yang등은<sup>26</sup>) 저농도의 endothelin-1에 의해서 norepinephrine과 serotonin의 혈관수축 반응이 항진되는 endothelin-1의 역치농도(threshold concentration,  $3 \times 10^{-10}M$ )를 발표하였고, 이 역치농도에서 endothelin-1에 의한 norepinephrine의 수축항진은 nitric oxide억제제인 L-NG-monomethyl arginine에 의하여 영향받지 않으며 칼슘길항제인 darodipine에 의하여 억제된다고 발표하였다. 이러한 현상과 본 연구의 결과를 같이 생각해보면 재생된 혈관 내피세포 특히 동맥경화등으로 인하여 손상된 내피세포를 갖는 관동맥에서 endothelin-1의 국소적 증가는 EDCF의 분비와 혈관 수축반응의 항진을 일으켜서 간접적으로 관동맥 경련에 관여할 수 있으리라고 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

재생된 혈관 내피세포의 기능장애에 관한 많은 연구가 있었으나 아직까지는 재생된 혈관 내피세포에서 내피세포 의존성 혈관수축 특히 endothelin-1에 의한 내피세포성 수축인자(EDCF)에 대한 연구는 없었다.

### 방 법 :

본 연구는 재생된 혈관 내피세포를 갖는 동맥에서 endothelin-1에 의한 EDCF의 분비 및 역할을 관찰하고자 하였다. 미리 풍선도자를 이용하여 혈관 내피를 벗겨낸 후 4주간 재생시킨 돼지의 좌전하행지 관동맥과 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥에서 혈관윤을 만들어 각각에서 혈관 내피의 유무에 따른 endothelin-1에 의한 혈관수축 반응을 통상적인 organ chamber를 이용하여 관찰하였다.

### 결 과 :

재생된 혈관 내피세포를 갖는 좌전하행지 관동맥의 quiescent 혈관윤에서 nitric oxide synthase 억제제인 nitro-L-arginine의 존재시 endothelin-1에 의한 수축반응은 재생된 혈관 내피가 존재하는 경우가 없는 경우보다 더 크게 나타나나, 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥에서는 같은 실험 조건에서 endothelin-1에 의한 수축반응이 혈관 내피세포가 없는 경우가 더 크게 나타났다. 좌전하행지 관동맥의 혈관윤에서 혈관 내피세포가 존재시 endothelin-1의 혈관수축 반응이 cyclooxygenase억제제인 indomethacin과 thromboxane A<sub>2</sub> 수용체의 길항제인 ridogrel(R68070)에 의하여 억제되어 endothelin-1의 농도에 따른 농도-수축반응 곡선이 우측편위 되었다. Thromboxane synthase 억제제인 dazoxiben과 endothelin-A 수용체의 선택적 길항제인 BQ-123에 의해서도 endothelin-1에 대한 수축반응의 억제가 indomethacin이나 ridogrel과 같은 정도로 나타나나 이 억제는 endothelin-1의 농도가 낮을때는 안나타나다가 고농도가 되어야만 나타났다. 즉 endothelin-1의 저농도에서 나타나는 내피세포 의존성 혈관수축은 indomethacin과 ridogrel에 의해서는 억제가 되나 dazoxiben과 BQ-123에 의하여서는 억제되지 않았다. 반면 혈관 내피세포를 벗겨내면 재생된 혈관 내피세포를 갖는 좌전하행지 관동맥이나 정상 혈관 내피세포를 갖는 좌회선지 관동맥의 혈관윤에서 이러한 약제들에 의하여 endothelin-1에 의한 수축 반응이 영향을 받지 않았다.

### 결 론 :

이상의 결과에서 재생된 혈관 내피세포는 고농도의 endothelin-1에 의하여 endothelin-A의 수용체가 자극되어 thromboxane A<sub>2</sub>의 분비를 일으키고, 저농도의 endothelin-1에 의하여서는 내피세포의

cyclooxygenase가 활성화되어 endoperoxides를 분비시키며, 이 들이 endothelin-1에 의하여 분비되는 EDCF로 작용할 것이라는 것을 짐작할 수 있다.

## References

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. *Nature(London)* 322 : 411-415, 1988
- 2) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T : The human endothelin family : Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 86 : 2863-2867, 1989
- 3) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S : Cloning and expression of a cDNA encoding and endothelin receptor. *Nature(Lond)* 348 : 730-732, 1990
- 4) Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al : Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature(Lond)* 348 : 732-735, 1990
- 5) Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR : Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158 : 279-286, 1989
- 6) Luscher TF, Vanhoutte PM : Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8 : 344-348, 1986
- 7) Auch-Schwellk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM : Contractions to oxygen derived free radicals are augmented in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13 : 859-864, 1989
- 8) Wright CE, Forzard JR : Differences in regional vascular sensitivity to endothelin-1 between spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rat. *Br J Pharmacol* 100 : 107-113, 1990
- 9) Schini VB, Kim ND, Vanhoutte PM : The basal and stimulated release of EDRF inhibits the contractions evoked by endothelin-1 and endothelin-3 in aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 17(suppl.7) : S267-S271, 1991
- 10) Auch-Schwellk W, Vanhoutte PM : Contractions to endothelin in normotensive and spontaneously hypertensive rats : Role of endothelium and prostaglandins. *Blood Pressure* 1 : 45-49, 1992
- 11) Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M : Biological profile of highly potent novel endothelin antagonists selective for ET<sub>A</sub> receptor. *Life Sci* 50 : 247-255, 1992
- 12) Taddei S, Vanhoutte PM : Role of endothelium in endothelin-evoked contraction in the rat aorta. *Hypertension* 21 : 9-15, 1993
- 13) Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM : Pertussis toxin inhibits endothelium dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol(Lond.)* 408 : 549-560, 1989
- 14) Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM : Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Cir Res* 61 : 256-270, 1987
- 15) Shimokawa H, Flavahan NA, and Vanhoutte PM : Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal on porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Cir Res* 65 : 740-753, 1989
- 16) Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM : Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 83 : 652-660, 1991
- 17) Vanhoutte PM, Shimokawa H : Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 80(1) : 1-9, 1989
- 18) Shimokawa H, Vanhoutte PM : Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 17 : 1197-1202, 1991
- 19) Namiki A, Hirata Y, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, Machii K : Endothelin-1 and endothelin-3 induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci* 50 : 677-682, 1992
- 20) Coleman RA, Humphrey PP A, Kennedy I, Levy GP, Lumley P : Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H<sub>2</sub>-analog, in those of prostaglandin and thromboxane A<sub>2</sub> on some isolated

- smooth muscle preparations. Br J Pharmacol* 73 : 773-778, 1981
- 21) Moncada S, Vane JR : *Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. Pharmacol Rev* 30 : 293-331, 1979
  - 22) Emori T, Hirata Y, Aizawa T, Ando T, Ando K, Shichiri M, et al : *Plasma endothelin levels in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary angioplasty. Circulation* 80(suppl II) : II2327, 1989
  - 23) Yasuda M, Kohno M, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, et al : *Circulating immunoreactive endothelin in ischaemic heart disease. Am Heart J* 119 : 801-806, 1990
  - 24) Salminen K, Tikkanen I, Saijonmaa O, Nieminen M, Fyhrquist F, Frick MH : *Modulation of coronary tone in acute myocardial infarction by endothelin. Lancet* II : 747, 1989
  - 25) Vanhoutte PM : *Other endothelium-derived vasoactive factors. Circulation* 87(suppl V) : V9-V17, 1993
  - 26) Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, et al : *Threshold concentration of endothelin-1 potentiates contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm ? Circulation* 82 : 188-195, 1990