Original Articles Korean Circulation J 1998;28(9):1600-1604

신혈관 고혈압이 유발된 백서의 혈관내피세포의 기능에 대한 SOD의 영향

서울대학교 의과내학 내과학교실
조주희 · 조영석 · 김철호 · 오병희 · 이명묵 · 박영배 · 최윤식 · 이영우

The Effect of SOD on Endothelial Function of the Rat Aorta with Renovascular Hypertension

Joo-Hee Zo, MD, Young-Seok Cho, MD, Cheol-Ho Kim, MD, Byung-Hee Oh, MD, Myoung-Mook Lee, MD, Young-Bae Park, MD, Yun-Shik Choi, MD and Young-Woo Lee, MD
Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : It is well known that hypertension attenuate endothelium-dependent vasodilator response. And this finding is closely related to the development of atherosclerosis. Recently it is reported that the expression of NADPH-dependent oxidase is increased in angiotensin-induced hypertension model and superoxide (O_2^-) produced from that might contribute to the development of vascular diseases. The possible mechanism is the degradation of endothelium-derived NO by O_2^-. We hypothesized that SOD prevents endothelial dysfunction via prevention of the degradation of endothelium-derived NO. **Methods and Materials** : We made renovascular hypertension model by constricting abdominal aorta just above the left renal artery of Sprague-Dawley female rats. The descending thoracic aorta was studied in the organ chambers using acetylcholine as an endothelium-dependent vasodilator with or without pretreatment of SOD. **Results** : Blood pressures of all 14 rats were significantly increased (174/123 mmHg, mean 146 mmHg). The residual tensions of the vessels precontracted by phenylephrine were similar in both groups (15.04±19.53% in SOD group vs 11.84±18.57% in non-SOD group, p=0.66). **Conclusions** : The endothelial dysfunctions in the rat aorta with renovascular hypertension were not improved by SOD. There is no acute effect of SOD on endothelial function in high renin/angiotensin state. **(Korean Circulation J 1998;28(9):1600-1604)**

KEY WORDS : Endothelium · SOD · Renovascular hypertension · Acetylcholine.

서 론

1980년에 Furchgott 등이 가토의 대동맥 절편에서 아세틸콜린에 의한 혈관수축을 시도하다가 어떠한 절편에서는 오히려 혈관확장이 일어나는 것을 관찰하고 이것이 혈관내피세포의 유무에 따른 차이임을 밝혀내고 혈관내피세포에서 아세틸콜린에 의해 혈관평활근을 이완시키는 물질이 분비된다고 생각하였다.[1] 그들은 이를 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)라고 명하였고 그 이후 많은 연구에서 혈관내피세포가 혈관의 긴장도를 조절하는 여러가지 혈관반응물질을 생성함이 증명 되었다. 또한 이러한 혈관내피세포에서 분비되는 물

논문접수일 : 1998년 10월 12일
심사완료일 : 1998년 10월 22일
교신저자 : 조주희, 156-012 서울 동작구 신대방 2동 395
서울대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (02) 840-2413 · 전송 : (02) 831-0714
E-mail : jooheezo@plaza.snu.ac.kr

질들은 여러가지 병적인 상태에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[2-4] 혈관내피세포에서는 EDRF라고 알려진 nitric oxide(NO) 뿐만 아니라 prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF) 등 여러물질이 분비되는데 이는 혈관평활근을 이완시켜 혈관의 긴장도를 떨어뜨리고 혈소판의 응집을 억제하고 혈관평활근의 이동 및 성장을 억제하는 기능도 있어 이러한 물질의 분비의 이상이 동맥경화의 발생과 진행에 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.[5-9] 특히 고혈압이나 고지혈증의 동물모델과 환자에서 혈관내피세포의 기능이상이 보고되고 있다.[10][11] 그러나 이러한 혈관내피세포의 기능이상이 어떠한 기전으로 발생하는지는 아직 명확히 밝혀지지 않은 실정이다. 최근의 연구에서 안지오텐신에 의해 유발되는 고혈압에서 NADH 의존성 산화효소의 발현이 증가되고 이에 의해 발생되는 O_2^-가 혈관질환의 발생에 기여하는 것으로 밝혀졌다. 이의 기전은 혈관에서 생성되는 NO가 O_2^-에 의해서 파괴됨으로써 일어나는 것으로 생각되고 이러한 기전의 고혈압의 발생과 유지가 SOD에 의해 방지된다고 보고되었다.[12] 이에 저자 등은 신혈관성 고혈압쥐의 혈관에서 발생하는 혈관내피세포의 기능이상을 SOD가 개선시키는지를 보고자 하였다.

대상 및 방법

연구 대상

동물 모델

4 6주된 암컷 Sprague-Dawley rat을 ketamine 80 mg/kg, xylazine 10 mg/kg을 복강내로 주사하여 마취하였다. 상복부를 정중선으로 절개하여 우측신동맥과 좌측신동맥 사이에 21게이지 주사침을 위치시키고 이와 함께 좌측신동맥의 직상부에서 복부대동맥을 결찰한 후 주사침을 제거하여 협착을 만들었다. 시술 후 4 8주를 사육하여 신혈관성 고혈압의 쥐로 사용하였다(n=14).

연구 방법

혈압의 측정

대상쥐를 ketamine 80 mg/kg로 마취시키고 fluid-filled 폴리에틸렌 튜브를 우측 경동맥에 삽입한 후 physiograph(Grass, 미국)를 이용하여 혈압을 기록하였다.

Organ Chamber Study

우선 NaCl 118 mM/L, KCl 5.9 mM/L, NaH_2PO_4 1.2 mM/L, $MgSO_4$ 1.2 mM/L, $CaCl_2$ 2.0 mM/L, $NaHCO_3$ 25 mM/L, glucose 10 mM/L의 농도가 되는 Kreb용액을 만들고 쥐의 하행흉부대동맥을 채취하여 차가운 Kreb 용액에 담가 두었다. 30 ml의 organ chamber를 이용하여 Kreb-Henseleit 용액을 채우고 각 chamber에 95%의 산소와 5%의 이산화탄소의 혼합가스를 주입시키면서 온도를 37℃로 유지하였다. 보관하여둔 쥐의 대동맥을 2 3 mm의 길이로 잘라 고리형태를 만들고 내막이 안으로 향하도록 하여 chamber내의 고리에 걸고 다른 한 쪽은 봉합용 견사를 이용하여 transducer에 연결시켜 기초장력이 1.5 g이 되도록 하고 30분간 평형상태를 유지시켰다. 기초장력이 안정이 되면 norepinephrine을 10^{-7} M의 농도가 되도록 투여하여 혈관을 수축시킨 후 장력이 plateau에 이르면 Kreb 용액으로 씻어낸후 장력을 증가시키고 수축과 이완 과정을 반복하여 적정한 장력을 구하였다.

적정한 기초장력이 구해지면 이를 baseline으로 맞추고 수축-이완 실험을 시행하였다. baseline을 맞추고 30분간 평형상태가 되도록 기다린후 phenylephrine 10^{-7} M을 투여하여 등장성 수축을 만들었다. SOD 투여군에는 수축을 시키기 30분전에 SOD를 100 U/ml의 농도가 되도록 chamber내에 미리 전처치를 하였다. 수축이 plateau를 이루면 각 chamber에 acetylcholine을 10^{-9} M부터 10^{-5} M까지 cumulative하게 투여하면서 이완반응의 차이를 보았다. Transducer와 physiograph는 미국의 Grass회사제이었고 organ chamber는 미국의 Radnotti 회사제를 사용하였다.

통계방법

두군간의 이완정도는 수축시의 장력을 100%로 하였을 때의 잔여장력을 %로 표시하였고 이의 비교는 t-test로 하였다. 통계학적인 유의성은 p값이 0.05이하인 경우로 하였다.

결 과

대상쥐의 혈압은 수축기혈압이 174±26 mmHg, 이완

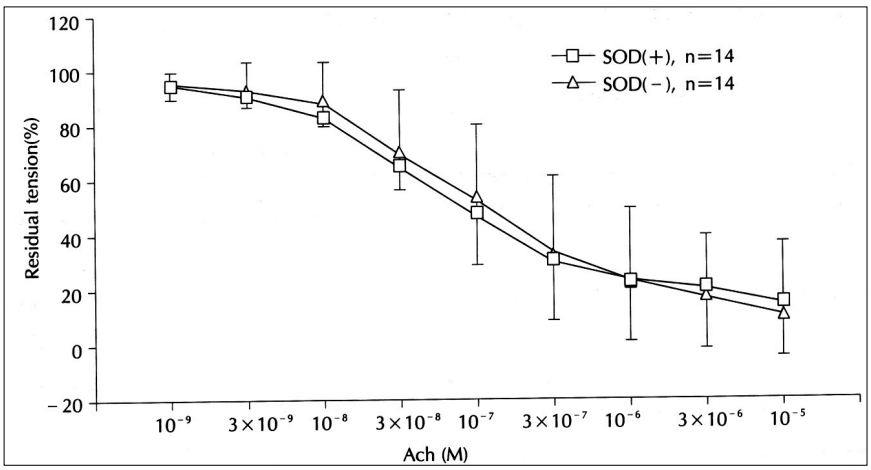

Fig. 1. Residual tension of rat aorta in response to acetylcholine showes no differences between SOD-pretreatment group and non SOD-pretreatment group.

기혈압이 123±16 mmHg, 평균혈압이 146±20 mmHg로 높아져 있었다.

아세틸콜린의 최대농도에 대한 이완반응시의 잔류장력은 SOD 전처치 군이 15.04±19.53%이었고 비전처치군은 11.84±18.57%로 두군간의 차이가 없었다(Fig. 1, p=0.66).

고 찰

본 연구에서 신혈관성 고혈압의 백서에서 나타나는 혈관내피세포의 기능저하가 항산화효소인 SOD에 의해 개선되지 않았다. 일측성 신허혈에 의한 고혈압은 안지오텐신 II의 증가에 의해 발생되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 실제로 혈중 안지오텐신 II의 농도를 측정하지 않은 것이 문제점이나 이는 기존의 연구 결과에 의해서 밝혀져 있으므로 안지오텐신 II의 농도를 측정하지 않았다.

안지오텐신 II를 주입한 쥐에서 p22phox의 발현이 증가되고 이는 NADPH/NADH 산화효소를 생성한다.[13] 이러한 NADPH/NADH 산화효소는 혈관에서 O_2^-의 생성에 주된 원천이다.[14] 최근 수년간의 연구에 의하면 O_2^-는 혈관의 긴장도의 조절과 동맥경화, 고혈압등의 발생에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다.[15-18]

안지오텐신 II에 의해 유발되는 고혈압의 발생과 유지에 NADH 의존성 산화효소에 의해 생성되는 O_2^-가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[12] 또한 O_2^-는 혈관내피세포의 기능도 저하시키는 것으로 알려져 있다. O_2^-는 혈관내피세포에서 분비되는 혈관확장 물질인 NO를 파괴하여 이의 생체이용률을 감소시킴으로서 이러한 작용을 하는 것으로 생각되고 있다. SOD는 $O2^-$를 대사시키는 작용이 있으므로 NO의 파괴를 억제할 수 있을 것으로 생각되고 이러한 기전을 통하여 혈관확장반응을 개선시킬 것으로 생각하였으나 급성처치 후의 혈관확장반응은 SOD를 투여하지 않은 군과 비교하여 차이가 없었다. 이는 본 실험이 생체 실험이 아니고 시험관 실험이므로 효소의 작용에 차이를 보였을 가능성이 있다. 만일 신허혈성 고혈압을 만든후에 SOD를 쥐에 직접 먹임으로서 작용을 시킨다면 다른 결과가 나올 수도 있었을 것이다.[19] O_2^-는 SOD에 의해 H_2O_2로 대사되고 다시 peroxidase에 의해 대사되는데 시험관 내에서는 이러한 peroxidase가 없기 때문에 이에 의한 영향도 배제 할 수 없다.[20]

또한 SOD 자체로 투여한 경우에는 조직에로의 이행이 어렵기 때문에 효과를 나타내지 못하였을 가능성도 있다. 본래의 SOD는 음성의 전기를 띠고 있어 혈관벽의 세포에 의해 반발된다. NO는 간질을 통하여 이행하기 때문에 SOD가 NO의 파괴를 막으려면 SOD의 간질 내로의 이행이 중요하다.[20][21] 기존의 연구 결과에도 SOD를 그대로 투여하였을 때에는 항산화 효과가 충분치 않다는 보고가 있고 이를 극복하기 위해서는 liposome으로 싸서 투여하는 방법을 사용하여야 할 것이다.

고혈압이나 동맥경화 등의 혈관질환에서 O_2^-의 역할이 중요시 되고 있는데 이의 작용을 방지하는 방법으로 SOD의 사용이 향후 임상적으로 중요한 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 SOD의 효과가 나타나지 않았지만 이번 연구의 경험을 토대로 향후 문제점을 보완하여 계속적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

배 경 :

고혈압이 혈관내피세포의 기능이상을 초래하고 이는 동맥경화의 유발과 밀접한 관계가 있음이 잘 알려져 있다. 최근 안지오텐신에 의해 유발되는 고혈압에서 NADH 의존성 산화효소의 발현이 증가되고 이에 의해 발생되는 O_2^-가 혈관질환의 발생에 기여하는 것으로 밝혀졌다. 이의 기전은 혈관에서 생성되는 NO가 O_2^-에 의해서 파괴됨으로써 일어나는 것으로 생각되고 있다. 이에 저자들은 신혈관고혈압이 유발된 백서의 대동맥을 이용하여 O_2^-의 작용을 방지할 수 있는 superoxide dismutase(SOD)의 혈관내피세포 기능에 대한 효과를 알아보고자 하였다.

방 법 :

스프라그-돌리 백서의 좌측 신동맥 직상부의 대동맥을 결찰하여 일정 기간 사육하여 고혈압을 유발시킨 후 흉부 하행대동맥을 채취하여 organ chamber에서 SOD를 전처치한 군과 전처치하지 않은 군의 아세틸콜린에 대한 혈관이완 반응을 비교하였다.

결 과 :

실험에 사용된 14마리의 쥐의 혈압은 174/123 mmHg (mean 146mmHg)로 모두 정상 혈압보다 유의하게 혈압이 높아져 있었다. phenylephrine 10^{-7} M로 수축시킨 대동맥의 아세틸콜린에 대한 최대 이완반응시의 잔류장력은 SOD 전처치 군이 15.04±19.53%이고 비전처치군은 11.84±18.57%로 두군간의 차이가 없었다(p=0.66).

결 론 :

신혈관 고혈압에서 혈관내피세포의 기능이 감소되어 있고 이는 SOD에 의해 개선되지 않음이 관찰되었다. 즉 고 레닌/안지오텐신 상태에서 유발된 고혈압에서 발생한 혈관내피세포의 기능이상에 대한 SOD의 급성 효과는 없는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 혈관내피세포 · SOD · 신혈관성 고혈압 · 아세틸콜린.

■ 감사문

본 연구는 1995년도 서울대학교병원 일반연구비의 보조로 이루어졌음.

REFERENCES

1) Furchgott RF, Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.*
2) Cherry P, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. *The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79: 2106-10.*
3) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;317:534-6.*
4) Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omoigui N. *Vascular biology and medicine in the 1990s: Scope, concepts, potentials, and perspectives. Circulation 1993;87:705-19.*
5) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. *Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120:227-37.*
6) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43:109-42.*
7) Moncada S, Higgs A. *The L-argininenitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329:2002-12.*
8) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 333:664-6.*
9) Furchgott RF. *Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. Circ Res 1983;53:557-73.*
10) Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, Garcia CE, Quyyumi AA, Cannon RO III. *Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. Circulation 1994;90:35-41.*
11) Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO III. *Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension; Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. Circulation 1995;91:1732-8.*
12) Laursen JB, Rahagopala S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. *Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. Circulation 1997;95:588-93.*
13) Fukui T, Ishizaka N, Rahagopalan S, Laursen JB, Capers Q IV, Taylor WR, *et al. p22phox m RNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. Circ Res 1997;80:45-51.*
14) Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion pr-oduction detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. Am H Physiol 1994;267:L815-L822.
15) Alexander RW. *Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response. Hypertsion 1995;25:155-61.*

16) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest 1993;91:2546-51.*
17) Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. *Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:10045-8.*
18) Wolin MS. *Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. Klin Wochenschr 1991;69:1046-9.*
19) Mgge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. *Chronic treatment with polyethylene glycolated superoxide disutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterolfed rabbits. Circ Res 1991;69:1293-300.*
20) Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. *Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. J Clin Invest 1984;73:87-95.*
21) Freeman BA, Young SL, Crapo JD. *Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. J Biol Chem 1983;258:12534-42.*