Original Articles Korean Circulation J 1999;29(2):192-208

Protein Kinase C에 의한 막전압 의존성 K^+ 전류 억제 효과가 Histamine에 의한 토끼 관동맥 긴장도 증가에 미치는 효과

연세대학교 의과대학 산부인과학교실,[1] 생리학교실[2]
배상욱[1] · 하미영[2] · 안덕선[2] · 강복순[2]

Effect of PKC-dependent Change of K^+ Current Activity on Histamine-induced Contraction of Rabbit Coronary Artery

Sang-Wook Bai, MD[1], Mi-Young Ha, MD[2], Duck-Sun Ahn, MD[2] and Bok-Soon Kang, MD[2]
[1]Department of Obsterics and Gynecology, [2]Physiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background : Histamine, released from mast cells in atheromatous plaque, has been known to cause cardiac ischemia or sudden cardiac death in atherosclerosis patient. Previous reports have suggested that histamine induced coronary vasoconstriction was due to increase in IP 3 and DAG, which induce release of Ca^{2+} from SR and increase the Ca^{2+} sensitivity of contractile element via activation of PKC. Recently, it was reported that application of histamine cause depolarization of intestinal smooth muscle, which may contribute to histamine-induced contraction via augmenting Ca^{2+} influx through activation of Ca^{2+} channels. However, the underyling mechanism of histamine-induced depolarization and its contribution to the magnitude of coronary vasoconstriction are still uncertain. **Method** : To elucidate the underlying mechanism of Ca^{2+} influx change during histamine-induced vasoconstriction, we examined the effect of Ca^{2+} channel antagonist and PKC blocker on histamine-induced contractions, and then measured the effect of PKC antagonist on whole cell K^+ current using patch clamping method in rabbit coronary smooth muscle cells. **Results** : Application of histamine induced phasic and tonic constraction of coronary rings via activation of H 1 receptors. Pretreatment of Ca^{2+} channel antagonist (nifedipine, 1 μM) or PKC blockers (10 nM staurosporine and 10 μM Gö6976) markedly inhibited histamine-induced tonic contraction, which suggest that the magnitude of tonic contraction depend on the Ca^{2+} influx. Application of 4-AP, a blocker of voltage-dependent K^+ channels, increased resting tone of coronary rings, and combined treatment of nifedipine blocked this 4-AP induced increase of resting tone. Application of active analoge of DAG (1,2-DiC_8) significantly inhibited the activity of voltage-dependent K^+ current in single smooth muscle cell, meanwhile the inactive analogue of DAG (1,3-DiC_8) has no apparent effect on the activity of voltage-dependent K^+ current. Furthermore, pretreatment of calphostin C (1 μM), a blocker of PKC, diminished the 1,2-DiC_8-induced inhibition of K^+ current. **Conclusions** : PKC dependent inhibition of voltage-dependent K^+ current may be responsible for the maintaining of histamine-induced tonic contraction in rabbit coronary artery. **(Korean Circulation J 1999;29(2):192-208)**

KEY WORDS : Histamine · Voltage dependent K^+ current · Protein kinase C · Rabbit coronary artery.

논문접수일 : 1999년 1월 18일
심사완료일 : 1999년 3월 15일
교신저자 : 안덕선, 120 - 140 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 생리학교실
전화 : (02) 361 - 5190 · 전송 : (02) 393 - 0203
E - mail : dsahn@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

말초조직에 공급되는 혈류량의 크기에 커다란 영향을 끼치는 혈관 평활근의 긴장도는 여러 요인에 의해 조절되고 있는데 이중에서도 혈관 평활근 세포의 안정 막전압의 크기 변화는 세포내로의 Ca^{2+} 유입량을 조절함으로써 혈관 긴장도 조절의 중요 인자로 작용하고 있다. 즉 막전압이 안정상태에서 탈분극되는 경우 세포막의 Ca^{2+} 통로의 활성도가 증가되고, 이에 따라 Ca^{2+} 통로를 통한 세포내로의 Ca^{2+} 유입이 증가함으로써 혈관 수축을 초래한다. 반면에 막전압이 과분극되게 되면 세포막의 Ca^{2+} 통로의 활성이 감소하여 이를 통한 Ca^{2+} 유입의 감소와 혈관 긴장도의 저하를 초래한다.[1] 안정시 평활근 세포의 막전압은 대개 -40 -60 mV 사이의 값을 갖고 있으며, 이같은 막전압의 크기는 주로 평활근 세포막에 존재하고 있는 K^+ 이온 통로의 활성도에 의해 결정되나 동물의 종류나 실험 조건에 따라 안정막 전압 결정에 관여하는 K^+ 이온 통로의 종류는 서로 상이함이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다.[2-4] 그런데 토끼 관동맥 절편의 긴장도가 Ca^{2+}-activated K^+ 전류(I_{K-Ca}) 억제제인 chabrytoxin이나 ATP-sensitive K^+ 전류(I_{K-ATP}) 억제제인 glibenclamide에 의해선 별 영향이 없는 반면, 막전압 의존성 K^+ 전류(voltage-dependent K^+ current, I_{dK})의 선택적 차단제인 4-aminopyridine(4-AP)을 투여하는 경우 그의 긴장도가 현저히 증가한다는 본 연구자들의 예비실험결과는 막전압 의존성 K^+ 전류가 토끼 관동맥 평활근 세포의 안정막 전압 및 긴장도 조절에 중요한 역할을 함을 시사한다.

한편 임상적으로 관찰되는 관동맥 경색(coronary vasospasm)의 주요 유발 인자로 알려진 histamine은, 혈관 벽의 부종 부위 등에 많이 분포되어 있는 mast cell로부터 항원-항체 반응에 의해 유리되어 국소적인 관동맥 수축을 유발한다고 알려져 있다.[5] Histamine의 수용체에는 H_1, H_2, H_3 등 3가지 아형(subtype)이 존재한다고 보고되고 있는데, histamine에 의해 관찰되는 관동맥 수축 현상은 주로 H_1 수용체를 경유하여 이루어진다고 알려져 있으며, 일부 동물에서 histamine투여시 관찰되는 이완 반응은 주로 H_2 수용체에 histamine이 결합하여 세포내 cAMP 농도를 증가시켜서 나타난다고 보고되고 있다.[6-9] H_1 수용체에 histamine이 결합하는 경우 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터의 Ca^{2+} 유리가 증가하고, 동시에 세포외로부터의 Ca^{2+} 유입이 증가되어 혈관 긴장도가 증가하게 된다. 이때 Ca^{2+} 저장소로부터의 Ca^{2+} 유리는 histamine에 의해 증가된 IP_3에 의해 이루어진다고 잘 알려져 있으나, 세포 외부로부터의 Ca^{2+} 유입이 증가하는 현상에 대해서는 아직 그 기전이 명확치 않다.[10-13] 그런데 장관 평활근 세포에서 nifedipine 같은 Ca^{2+} 통로 억제제를 투여하거나 또는 K^+ 통로 opener를 투여하는 경우 histamine에 의한 Ca^{2+} 유입이 차단된다는 보고[14]와 histamine 투여시 혈관 평활근 세포의 막전압이 탈분극된다는 보고[15] 등으로 미루어 볼 때 histamine 투여시 평활근 세포막의 K^+ 통로가 억제되어 막전압의 탈분극 및 그에 따른 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입량을 증가시켜 평활근의 수축을 유도한다고 추측되나 histamine에 의한 K^+ 통로 억제기전에 대해서는 아직 불명확하다.[16][17]

한편 histamine 투여시 IP_3의 농도 증가 뿐만 아니라 protein kinase C(PKC)의 활성도 현저히 증가하게 되는데, 이같은 PKC의 활성 증가는 myosin light chain phosphatase의 인산화를 초래하여 세포내 수축 단백질(contractile protein)의 Ca^{2+} 감수성을 증가시켜 혈관 수축력의 증가를 초래한다고 알려져 있다. 또한 세포막에 존재하고 있는 여러 이온 통로, 즉 Ca^{2+} 통로 및 K^+ 통로를 인산화시켜 그들의 활성을 조절함으로써 이차적으로 혈관 수축력을 변화시킬 가능성이 있으나, 이들 이온 통로의 활성 변화 효과가 histamine에 의한 수축력 증가 현상에 관여하는지의 여부에 대해서는 아직 명확치 않은 실정이다.[18-21] 따라서 본 실험에서는 PKC 차단제와 이온 통로 차단제가 histamine에 의한 관동맥 수축반응에 미치는 효과를 장력 측정 실험을 통해 비교 관찰함으로써, 이온 통로의 활성 변화가 histamine에 의한 수축 반응에 관여하는지의 여부와 그에 관여하는 이온 통로의 종류를 규명하고자 하였다. 또한 이온 통로의 활성 변화가 histamine의 수축 반응에 중요한 역할을 한다면, 그같은 활성 변화가 이루어지는 기전이 무엇인지, 즉 histamine 투여시 활성화된 PKC에 의해 이온 통로의 인산화가 증가되어 나타나는 것인지의 여부를 whole cell patch clamp 실험을 통해 규명하고, 이같은 인산화가 이온 통로 활성에 미치는 기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

장력 측정

관동맥환의 제조

체중 2 3 kg의 토끼의 이정맥(ear vein)에 pentobarbital sodium(60 mg/kg)과 heparin(2,000 IU/kg)을 주사하여 마취시킨 후 경동맥을 절단하여 실혈시킨 다음 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 실온에서 혼합기체(95% O_2+5% CO_2)로 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액(KH 용액, mM ; NaCl 119, KCl 4.6, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1, KH_2PO_4 1.2, glucose 11)에 담근 상태에서 관동맥 주위의 심근, 지방 및 결체조직을 제거한 다음 이를 1 2 mm 크기의 관동맥환 형태로 만들어 실험에 사용하였다. 일부 실험에서는 용액에 적신 면봉으로 관동맥 내면을 가볍게 문질러 내피세포를 제거하였으며 내피세포의 제거여부는 10^{-6} M histamine으로 혈관수축을 유도한 후 10^{-6} M acetylcholine을 처리하여 수축된 혈관이 이완되지 않을 경우 내피세포가 제거된 것으로 간주하였다.

장력의 측정

관동맥환의 긴장도는 RADNOTI 회사의 등척성 장력측정계(isometric tension measurement system)을 이용하여 측정하였다. 즉 관동맥환을 KH용액을 채운 실험용기(muscle chamber)에 담근 상태에서 △ 자형으로 된 두 개의 stainless steel wire를 이용하여 고정하였다. 이때 wire의 한끝은 실험용기 바닥에 고정하였고 다른 한 끝은 장력측정기(force transducer)에 연결하여 혈관의 등척성 장력을 기록하였다. 이때 KH 용액은 혼합기체로 포화시켜주었으며, 온도는 37℃로 일정하게 유지하였다. 이후 관동맥환에 500 mg의 안정장력을 가한 상태에서 약 3시간 정도 평형을 유지시키면서 이 기간동안 고농도 K^+ 용액(70 mM K^+-KH 용액)으로 혈관수축을 유도하는 과정을 1시간 간격으로 3회 반복하여 안정장력의 크기 및 효현제(agonist)에 대한 혈관 반응이 일정하게 유지되도록 한 후에 본 실험을 실시하였다.

이온 전류의 측정

관동맥 평활근 세포의 분리

토끼 관동맥으로부터 단일 평활근 세포를 얻는 방법은 Ahn 등[22]의 방법을 이용하였는데, 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 체중 1 1.5 Kg의 집토끼의 이정맥에 pentobarbital sodium(60 mg/kg)을 주사하여 마취시킨 후 하퇴동맥을 절단하여 실혈시킨 후 심장을 적출하여 외과 현미경하에서 관동맥 주위의 결체조직을 안과용 미세 가위를 이용하여 제거하였다. 결체조직을 제거한 관동맥을 횡으로 길게 절개하여 내피면을 노출시킨 다음 이를 37℃의 배양액($CaCl_2$ 및 $MgCl_2$를 제거한 Tyrode 용액)에서 10분간 배양한 후 배양액에 collagenase(Wako, Osaka, Japan ; 1 mg/ml)를 첨가하여 다시 60분간 배양하였다. 이후 collagenase가 없는 배양액으로 혈관절편을 옮긴 후 유리 대롱을 이용하여 혈관 절편에서 단일 평활근 세포를 떨어트렸다. 충분한 양의 세포를 얻은 후 배양액 내에 BSA(1 mg/ml ; Sigma, St. Louis, MO, USA)와 $MgCl_2$(1.2 mM)를 첨가한 후 냉장고에서 보관하다가 실험에 사용하였다.

Patch clamp 방법

소량의 평활근 세포 부유액을 실험 용기에 떨어트린 후 약 5 10분 정도 기다려서 평활근 세포가 실험 용기 바닥에 부착되도록 한 후 실험을 실시하였다. 실험용액은 1 ml/min의 속도로 관류되도록 하였으며, 특별한 온도 조절없이 상온에서 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 유리미세전극은 borosilicate hard glass(Sutter Co., Novato, CA, USA)를 vertical puller(Narishige, Japan)를 이용하여, 그의 tip 직경이 약 1 μm 내외가 되도록 만들었다. 유리미세전극과 세포막 사이에 giga ohm seal을 만든후 전극 내부에 음압을 가하여 whole cell을 만들어 실험하였다.[23]

Patch clamp 증폭기(Axopatch 1-D, Axon Inc. USA)를 이용하여 평활근 세포의 막전압을 일정하게 고정한 상태에서 일시적인 탈분극 자극을 세포에 가하여 얻은 막전류의 변화를 analog to digital converter (digidata 1200, Axon Inc. USA)를 이용해서 computer hard disk에 기록하였다. 이때 얻은 전류를 8 pole Bessel filter(5K Hz)를 이용하여 여과한 후 50 KHz

의 빈도로 digitization하여 신호의 변형을 최소화하였다. 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성에 미치는 PKC의 효과를 관찰하기 위해 관류액에 각각 calphostin C와 같은 PKC 억제제와, 1,2 - dioctanoyl - glycerol(1,2 - DiC_8)과 같은 PKC 촉진제, 그리고 PKC 촉진 효과가 없는 비활성화 형태의 diacyl glycerol 유도체(1,3 - dioctanoyl - glycerol, 1,3 - DiC_8)를 각각 첨가하여 이들 물질이 K^+ 전류의 활성에 미치는 효과를 관찰하였다. 이때 이들 약물의 효과를 보다 객관적으로 평가하기 위해 평활근 세포 전체를 통한 외향 전류의 크기를 각 세포의 capacitance를 이용하여 표준화하여 표시하였으며(pA/pF), 이때 세포의 capacitance 값은 - 50mV로 세포막 전압을 고정한 상태에서 20 ms 동안 - 45 mV로 막전압을 탈분극시켰을때 발생하는 capacitive current를 적분하여 구하였다.

실험 용액

관동맥 절편 제작시 사용한 Tyrode 용액의 조성은 다음과 같다(mM) : NaCl 140, KCl 5.6, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.2, HEPES 10, Glucose 10, pH=7.4 with Tris. 세포분리에 사용한 배양액은 위의 조성에서 $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$를 제거하여 작성하였다. 이때 관류액으로는 정상 Tyrode 용액의 조성에서 $CaCl_2$를 $MnCl_2$로 대치한 용액을 사용하였으며, 전극내액으로는 다음과 같은 조성의 용액을 사용하였다(K gluconate 100 mM, KCl 30 mM, $MgSO_4$ 5.7 mM, K 2ATP 5 mM, Na 2GTP 1 mM, BAPTA 10 mM, HEPES 10 mM, pH=7.2 with Tris).

약 물

본 실험에서 사용한 nifedipine, staurosporine, TEA, 4 - AP, cimetidine, pyrilamine, histamine 1,2 - DiC_8, 1,3 - DiC_8 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을, 그리고 Gö6976, calphostin C는 Alexis(San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

결과분석

장력 측정 결과는 개체 간의 차이를 최소화하기 위해 측정된 장력의 크기를 70 mM K^+ - KH 용액에 의한 수축고의 백분율(%)로서 표시하였으며, 이온 전류의 크기 역시 측정 세포에 따른 차이를 최소화하기 위해 각 각의 세포의 capacitance 값으로 측정된 전류를 나눈 값을 사용하였다(pA/pF). 대조군과 약물 투여군간의 차이는 Student's paired t - test를 실시하여 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

Histamine에 의한 혈관 수축반응에 미치는 histamine 수용체 길항제의 효과

동물의 종류에 따라 histamine 투여시 관찰되는 관동맥의 수축 반응이 매우 다양함이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있으며, 이는 관동맥 평활근 세포막에 존재하고 있는 histamine 수용체의 종류나 그 분포의 차이에 기인한다고 알려져 있다.[8] 따라서 토끼 관동맥의 histamine에 의한 혈관 반응 양상과, 이에 미치는 H_1 수용체 및 H_2 수용체의 영향을 우선 알아보고자 하였다. 용액내 histamine의 농도를 10^{-8} M부터 점차 증가

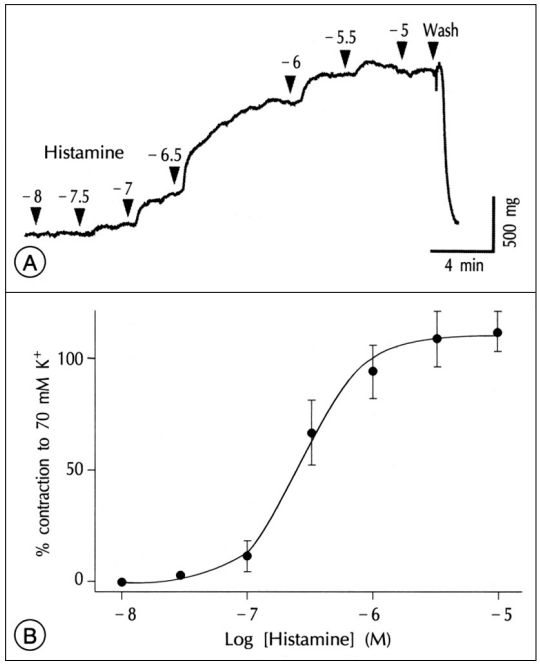

Fig. 1. Histamine-induced contractile response in endothelium denuded rabbit coronary artery. A) Application of histamine to the bath increased contractile response of rabbit coronary strips in a dose dependent manner from 10^{-8} M to 10^{-5} M. B) Concentration-response curve of histamine in rabbit coronary artery. Contractions induced by histamine were expressed as a % of 70 mM K^+-induced contraction. Each data points were expressed as mean±S.E and half maximal concentration of histamine is 254.3±1.1 nM, n = 6.

시킴에 따라 그에 비례하여 토끼 관동맥환의 긴장도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 10^{-5} M histamine 투여시 그의 수축력이 최대에 이르는 것을 관찰하였다 (EC_{50}=254.3±1.1 nM, n=6, Fig. 1). 이때 관동맥환의 내피세포를 제거한 경우 histamine에 의한 수축력의 크기가 일부 증가하는 경향을 보였으나 이 둘 사이에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(내피세포 존재군 및 내피세포 제거군 ; 75.2±11.2 및 107.1±6.0% of 70 mM K^+ contraction, p>0.05, n=6). 따라서 이후 실험에선 내피세포를 제거한 관동맥환을 이용하여 histamine에 의한 혈관수축에 미치는 여러 가지 인자들의 효과를 관찰하였다.

Histamine 투여시 관찰되는 혈관 수축 반응에 관여하는 histamine 수용체의 종류를 확인하기 위해 H_1 수용체 차단제로 알려진 pyrilamine과 H_2 수용체 차단제로 알려진 cimetidine을 각각 전처치한후 이들이 histamine의 수축 작용에 미치는 효과를 관찰하였다. 저농도 pyrilamine(1 μM) 전처치시 10^{-6} M histamine에 의한 혈관 수축반응이 거의 소실되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (대조군 및 pyrilamine 처치군 ; 47.0±8.5% 및 - 1.6 ±0.9%, p<0.05, n=4, Fig. 2). 반면에 H_2 수용체 차단제로 알려진 cimetidine(10 μM)을 전처치한 경우에는 histamine에 의한 수축 반응곡선에 유의한 차이를 관찰할 수 없었으며, 다만 5×10^{-6} M 이상의 고농도 histamine을 투여한 경우 수축력의 크기가 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Fig. 3).

PKC antagonist가 histamine에 의한 혈관 수축반응에 미치는 효과

Histamine 투여시 관찰되는 혈관 수축반응에 histamine에 의한 protein kinase C(PKC)의 활성화 효과가 관여하는지의 여부를 판별하기 위해 PKC의 차단제로 알려진 staurosporine 및 Gö6976을 전처치한 상태에서 histamine의 수축효과를 각각 관찰하였다. 저농도 saturosporine(10 nM) 전처치시 안정상태의 장력의 크기에는 유의한 차이가 없었으나, histamine에 의한 수축력의 크기는 현저히 감소하였다. 특히 histamine 투여시 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 유리되는 Ca^{2+}에 의해 발생한다고 생각되는 일과성 수축(phasic contraction)의 크기는 staurosporine 전처치시 일부 감소하는 경향

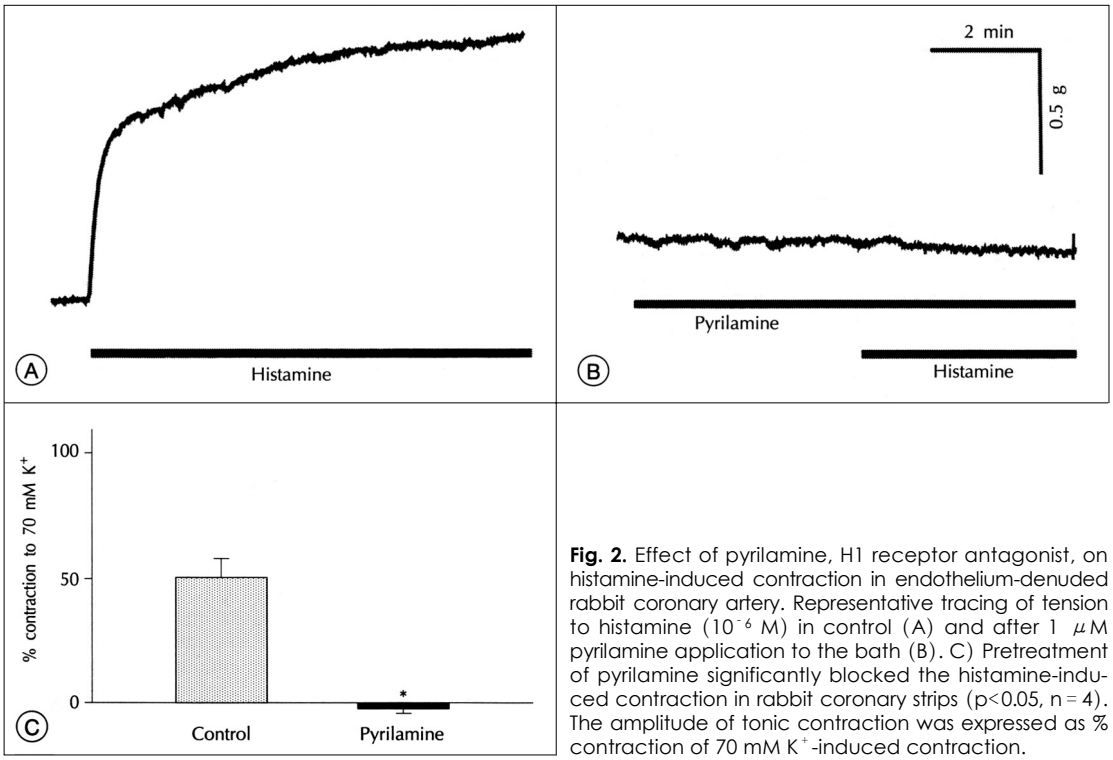

Fig. 2. Effect of pyrilamine, H1 receptor antagonist, on histamine-induced contraction in endothelium-denuded rabbit coronary artery. Representative tracing of tension to histamine (10^{-6} M) in control (A) and after 1 μM pyrilamine application to the bath (B). C) Pretreatment of pyrilamine significantly blocked the histamine-induced contraction in rabbit coronary strips (p<0.05, n=4). The amplitude of tonic contraction was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction.

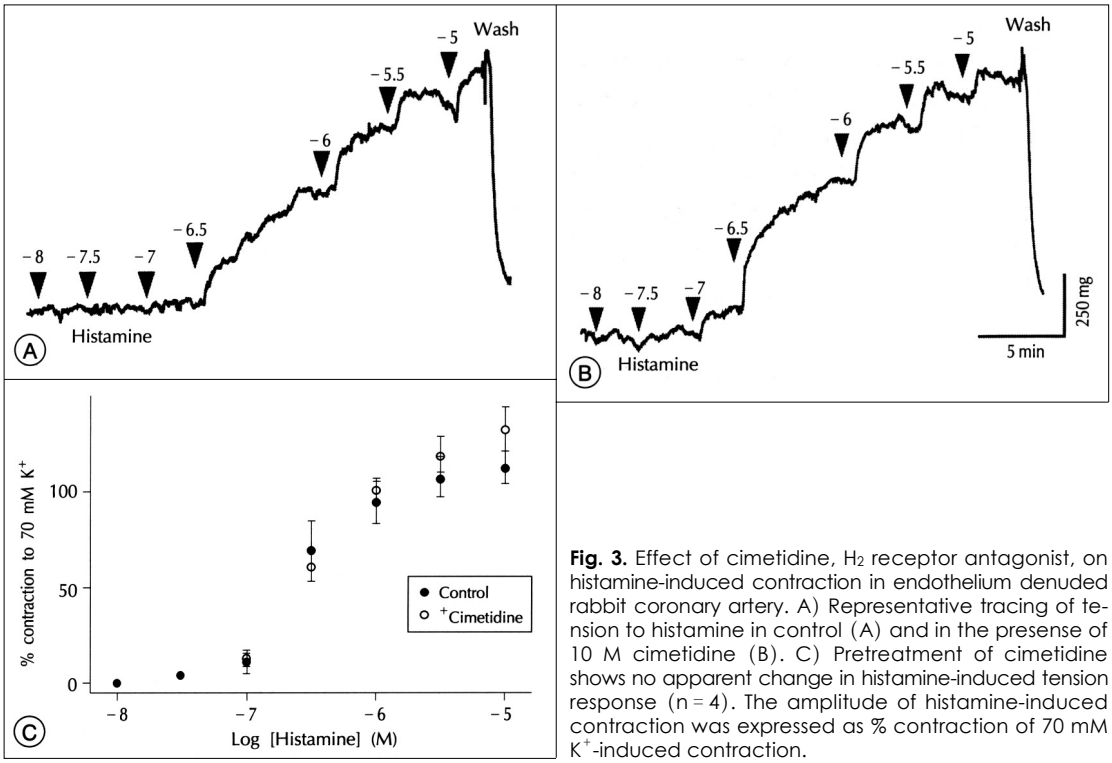

Fig. 3. Effect of cimetidine, H_2 receptor antagonist, on histamine-induced contraction in endothelium denuded rabbit coronary artery. A) Representative tracing of tension to histamine in control (A) and in the presense of 10 M cimetidine (B). C) Pretreatment of cimetidine shows no apparent change in histamine-induced tension response (n = 4). The amplitude of histamine-induced contraction was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction.

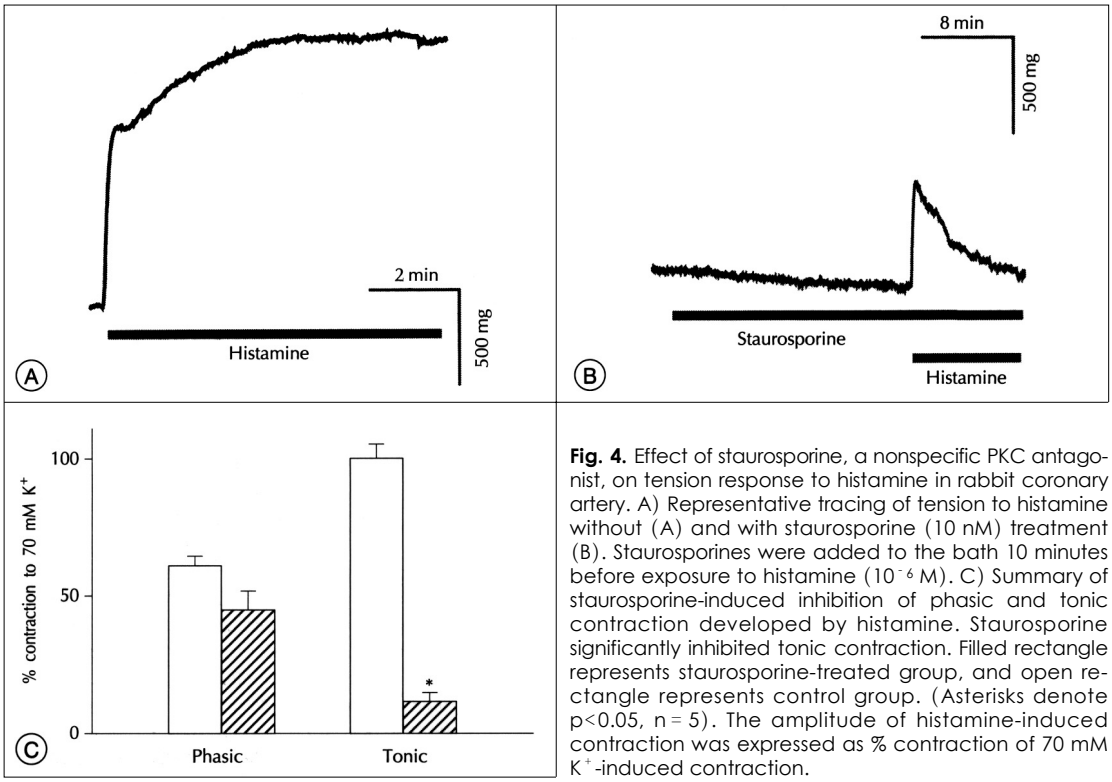

Fig. 4. Effect of staurosporine, a nonspecific PKC antagonist, on tension response to histamine in rabbit coronary artery. A) Representative tracing of tension to histamine without (A) and with staurosporine (10 nM) treatment (B). Staurosporines were added to the bath 10 minutes before exposure to histamine (10^{-6} M). C) Summary of staurosporine-induced inhibition of phasic and tonic contraction developed by histamine. Staurosporine significantly inhibited tonic contraction. Filled rectangle represents staurosporine-treated group, and open rectangle represents control group. (Asterisks denote $p<0.05$, n = 5). The amplitude of histamine-induced contraction was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction.

을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 볼 수 없었던 반면에(대조군 및 staurosporine 처치군 ; 62.1±5.0% 및 43.8±8.9%, p>0.05, n=5), 지속성 수축(tonic contraction)의 크기는 유의하게 억제되는 것이 관찰되었다(대조군 및 staurosporine 처치군 ; 102.2±7.9% 및 8.0±1.3%, p<0.05, n=5, Fig. 4).

이같은 staurosporine의 효과가 그의 비특이적 효과로 인해 나타났을 가능성을 배제하기 위해 PKC의 선택적 차단제로 알려진 Gö6976이 histamine의 수축반응에 미치는 효과를 관찰하였다. 5 μM Gö6976을 10분간 전처치한 후 10^{-6} M histamine을 관류액에 첨가시 대조군에서 관찰되었던 일과성 수축의 양상에는 별영향이 없었으나(대조군 및 Gö6976 처치군 ; 46.1±5.5% 및 43.2±1.8%, n=4) 지속성 수축의 크기는 현저히 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(대조군 및 Gö6976 처치군 ; 58.2±11.1% 및 14.7±5.7%, p<0.05, n=5, Fig. 5).

세포외로부터의 Ca^{2+} 유입이 histamine에 의한 혈관 수축반응에 미치는 효과

Staurosporine이나 Gö6976 전처치시 histamine에 의한 지속성 수축이 억제되는 현상이 1) PKC에 의한 수축 단백질의 Ca^{2+} 감수성 증가 효과가 차단되어 나타나는 것인지, 혹은 2) PKC에 의한 이온 통로 인산화 효과가 억제되어, 즉 K^+ 통로의 활성 억제를 통해 이차적으로 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 증가시켜주는 histamine의 효과가 차단되어 나타난 것인지를 알아보고자 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine, 그리고 K^+ 통로 차단제인 TEA 및 4-AP를 각각 투여하여 관동맥 긴장도에 미치는 효과를 관찰하였다.

Histamine(10^{-6} M)에 의한 관동맥의 수축력이 평형상태에 도달한 후, 관류액에 nifedipine(1 μM)을 첨가하여 그의 효과를 관찰하였다. Nifedipine 투여시 대조군의 경우와는 달리 지속성 수축이 유지되지 못하고 현저히 이완되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(대조군 및 nifedipine 처치군 ; 103.7±13.3% 및 8.9±9.7%, p<0.05, n=9, Fig. 6-A, B). 또한 관류액에 nifedipine 1 μM을 전처치한 경우, PKC antagonist를 투여한 것과 유사하게, histamine에 의한 일과성 수축의 크기에는 별 영향이 없었으나(대조군 및 nifedipine 전처치군 ; =62.0±4.5% 및 50.4±4.3%, n=7, p>0.05), 지속성 수축의

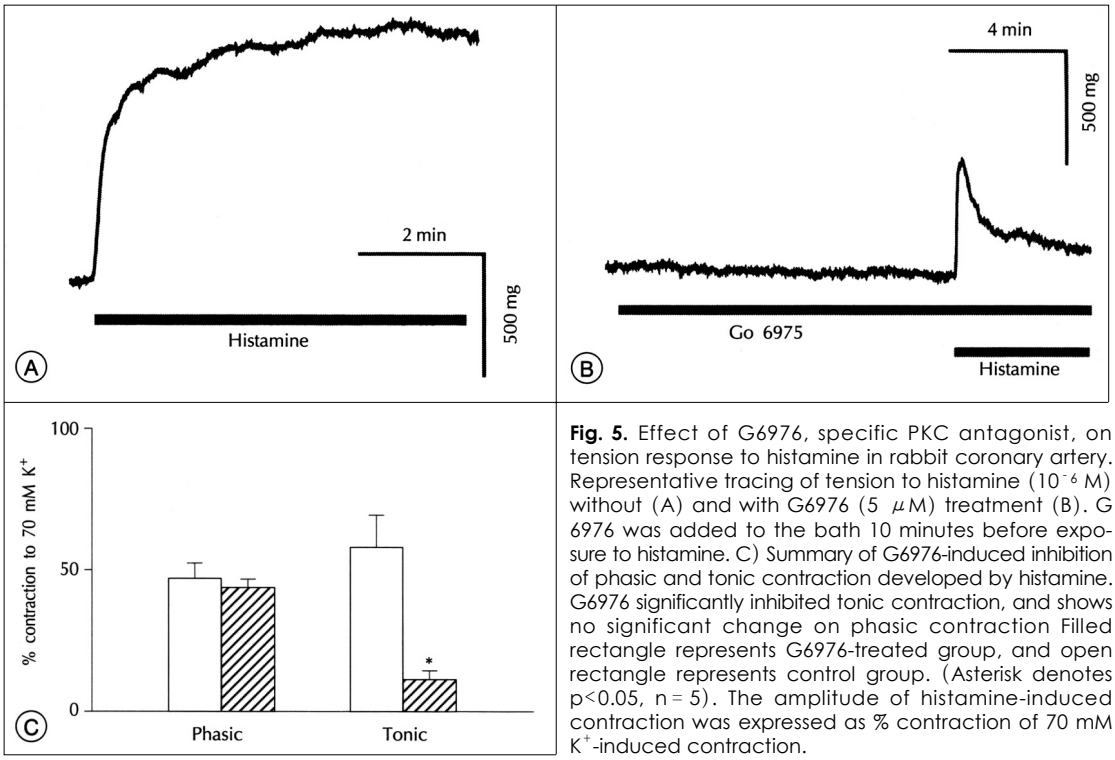

Fig. 5. Effect of G6976, specific PKC antagonist, on tension response to histamine in rabbit coronary artery. Representative tracing of tension to histamine (10^{-6} M) without (A) and with G6976 (5 μM) treatment (B). G 6976 was added to the bath 10 minutes before exposure to histamine. C) Summary of G6976-induced inhibition of phasic and tonic contraction developed by histamine. G6976 significantly inhibited tonic contraction, and shows no significant change on phasic contraction Filled rectangle represents G6976-treated group, and open rectangle represents control group. (Asterisk denotes p<0.05, n=5). The amplitude of histamine-induced contraction was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction.

양상 및 크기는 현저히 억제되는 효과를 관찰할 수 있었다(대조군 및 nifedipine 전처치군 ; 92.8±11.1% 및 19.7±3.4%, $p<0.05$, n=7, Fig. 6 - C, D).

한편 histamine에 의한 지속성 수축 유지에 중요한 역할을 하고 있는 Ca^{2+} 유입량의 변화에 관여하는 이온 통로의 종류를 규명하기 위해 Ca^{2+} 통로 차단제 및 K^+ 통로 차단제가 안정시 관동맥 긴장도에 미치는 효과를 각각 측정하였다. Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine이나 Ca^{2+} - activated K^+ 통로 차단제인 저농도 TEA (1 mM)를 투여한 경우에는 관동맥의 긴장도에 영향이 없거나 미약한 증가를 관찰할 수 있었으나 막전압 의존성 K^+ 통로 차단제인 4 - AP(5 mM)을 투여한 경우에는 안정장력의 크기가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며(89.5±5.0% of 70 mM K^+ contraction, $p<0.05$, n=5), 이같은 4 - AP에 의한 장력 증가는 nifedipine 투여시 완전히 소실되었다(- 0.6±0.7% of 70 mM K^+ contraction, $p<0.05$, n=5, Fig. 7).

막전압 의존성 K^+ 전류의 활성에 미치는 PKC의 효과

평활근 세포막에 높은 밀도로 존재한다고 알려진 Ca^{2+} - activated K^+ 전류를 제거하기 위해 관류액의 $CaCl_2$를 $MnCl_2$로 대치하였고, 전극내액으로는 고농도 BAPTA(10 mM)을 첨가한 용액을 사용하였다. 이같은 실험조건에서 관찰되는 외향전류는 주로 막전압 의

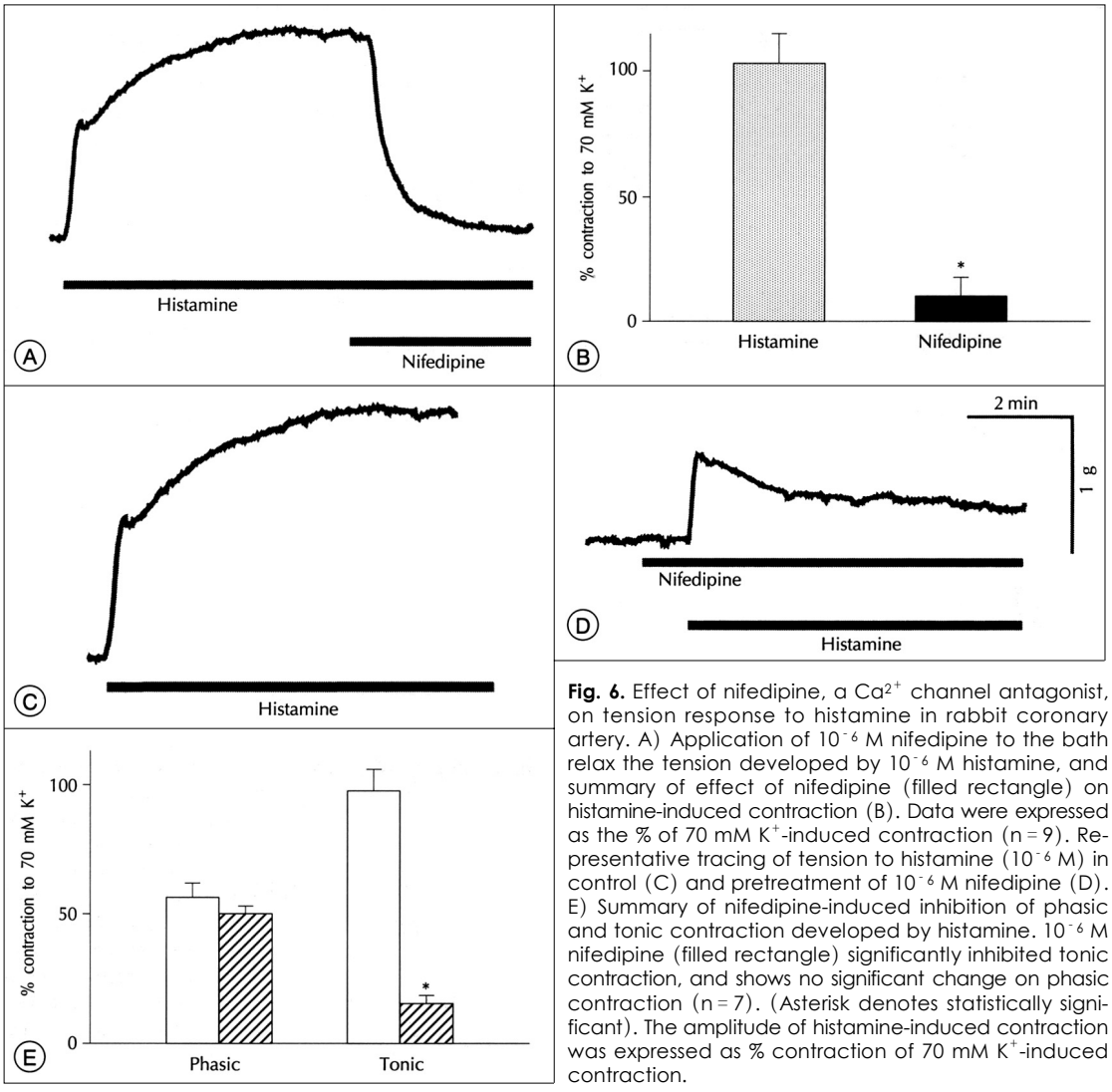

Fig. 6. Effect of nifedipine, a Ca^{2+} channel antagonist, on tension response to histamine in rabbit coronary artery. A) Application of 10^{-6} M nifedipine to the bath relax the tension developed by 10^{-6} M histamine, and summary of effect of nifedipine (filled rectangle) on histamine-induced contraction (B). Data were expressed as the % of 70 mM K^+-induced contraction (n = 9). Representative tracing of tension to histamine (10^{-6} M) in control (C) and pretreatment of 10^{-6} M nifedipine (D). E) Summary of nifedipine-induced inhibition of phasic and tonic contraction developed by histamine. 10^{-6} M nifedipine (filled rectangle) significantly inhibited tonic contraction, and shows no significant change on phasic contraction (n = 7). (Asterisk denotes statistically significant). The amplitude of histamine-induced contraction was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction.

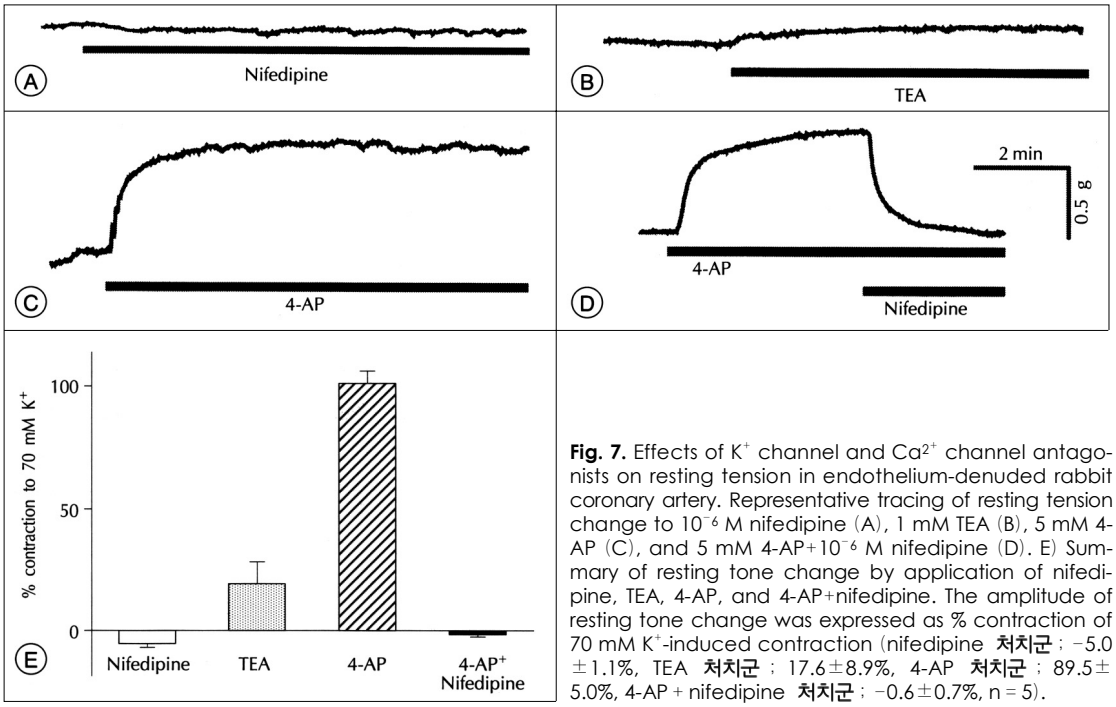

Fig. 7. Effects of K^+ channel and Ca^{2+} channel antagonists on resting tension in endothelium-denuded rabbit coronary artery. Representative tracing of resting tension change to 10^{-6} M nifedipine (A), 1 mM TEA (B), 5 mM 4-AP (C), and 5 mM 4-AP+10^{-6} M nifedipine (D). E) Summary of resting tone change by application of nifedipine, TEA, 4-AP, and 4-AP+nifedipine. The amplitude of resting tone change was expressed as % contraction of 70 mM K^+-induced contraction (nifedipine **처치군** ; −5.0 ±1.1%, TEA **처치군** ; 17.6±8.9%, 4-AP **처치군** ; 89.5± 5.0%, 4-AP + nifedipine **처치군** ; −0.6±0.7%, n = 5).

존성 K^+ 전류가 기록되게 된다.[24)]

이같은 조건에서 기록된 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성에 미치는 PKC agonist의 효과를 관찰하기 위해 diacylglycerol 유도체인 1,2 - dioctanoyl - glycerol (1,2 - DiC_8, 10 μM)을 관류액에 첨가한 후 I dK 활성에 미치는 효과를 관찰하였다. 막전압을 - 80 mV로 고정한 상태에서 +10 mV의 탈분극 자극을 매 10초 간격으로 가하여 얻은 전류의 크기를 대조군으로 삼은 후, 관류액에 1,2 - DiC_8을 첨가하는 경우 K^+ 전류의 크기가 감소하고 비활성화가 촉진되는 것을 관찰할 수 있었으며, 1,2 - DiC_8을 관류액에서 제거한 경우 K^+ 전류의 크기가 대조군 상태로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 8 - A). Fig. 8 - B는 탈분극 자극의 크기를 - 50 mV에서 +25 mV까지 5 mV 간격으로 변화시켜가면서 얻은 전류 - 전압 관계(current - voltage relation)에 미치는 1,2 - DiC_8의 효과를 보여주고 있다. 관류액에 1,2 - DiC_8을 첨가시 K^+ 전류의 크기가 모든 막전압 값에서 억제되었으며, washout시 전류의 크기가 대조군 상태로 회복되는 것을 관찰할 수 있다. 측정에 사용된 6개의 세포에서 얻은 결과를 Fig. 8 - C에 표시하였으며, 1,2 - DiC_8 투여시 K^+ 전류의 크기가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다($p<0.01$, $n=6$).

한편 이같은 K^+ 전류의 억제 효과가 1,2 - DiC_8의 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)의 효과일 가능성을 배제하기 위해 관류액에 DMSO를 실제 실험에 사용한 농도(0.02%)와, 그보다 높은 농도(0.05%)가 되게 첨가한 후 K^+ 전류의 활성에 미치는 효과를 각각 관찰하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 DMSO 단독 투여로는 K^+ 전류에 대한 효과가 없는 것으로 보아 1,2 - DiC_8에 의해 K^+ 전류의 활성이 억제된 것을 알 수 있었다.

PKC agonist의 K^+ 전류 감소 작용에 미치는 PKC 차단제의 효과

Diacylglycerol 유도체(1,2 - DiC_8)에 의한 K^+ 전류 억제 효과가 PKC의 활성 증가를 통해 이루어지는지의 여부를 알아보기 위해 PKC 촉진 효과가 없는 비활성 diacylglycerol 유도체(1,3 - DiC_8)가 K^+ 전류의 활성에 미치는 효과와 PKC 차단제인 calphostin C 전처치가 1,2 - DiC_8에 의한 K^+ 전류 감소에 미치는 효과를 각각 관찰하였다. 관동맥 평활근 세포의 막전압을 - 80 mV로 고정한 상태에서 +10 mV의 탈분극 자극에 의해 유도되는 K^+ 전류의 크기는 관류액에 비활성 PKC 촉진제인 1,3 - DiC_8을 첨가한 경우 거의 변화가 없었

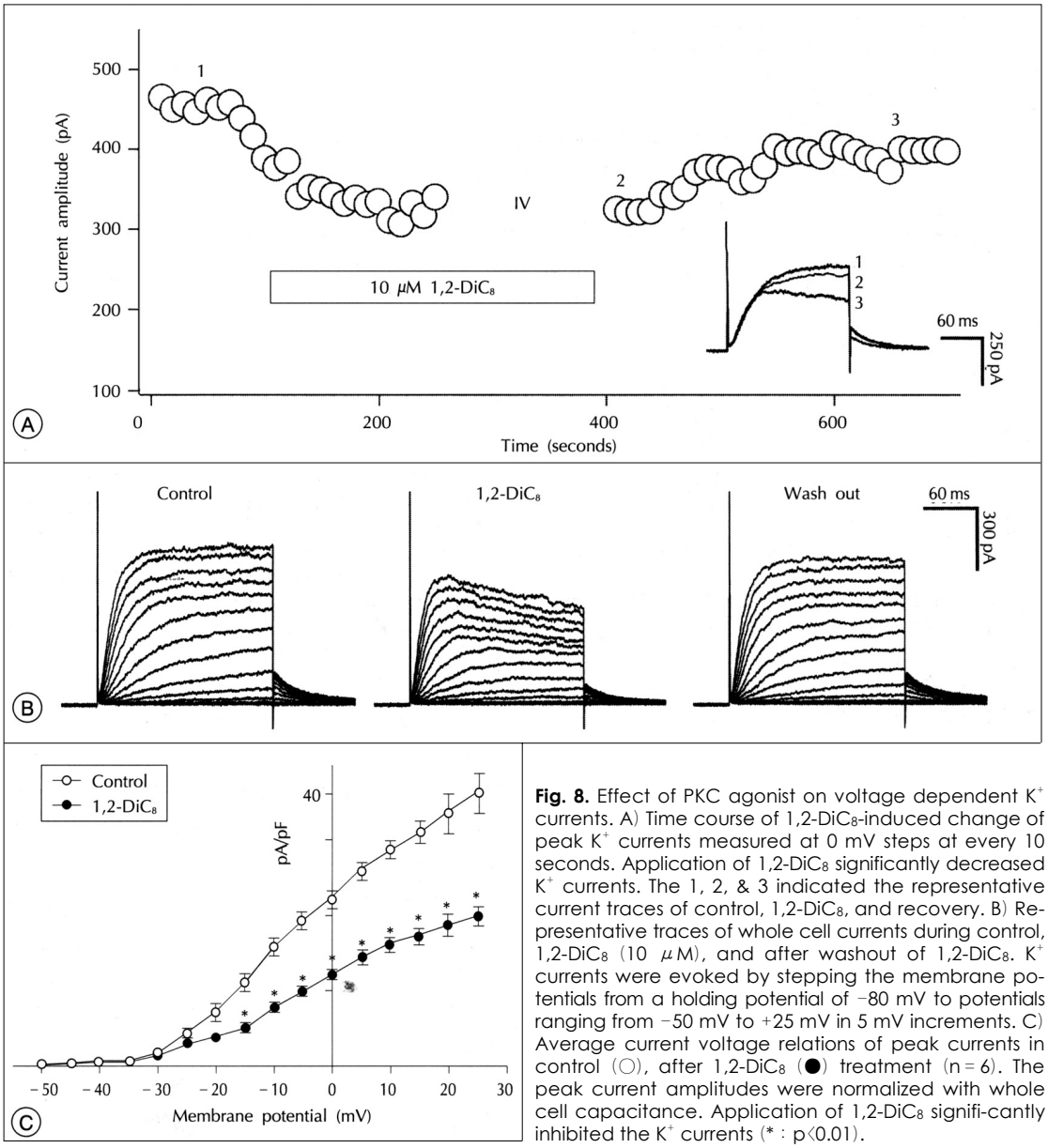

Fig. 8. Effect of PKC agonist on voltage dependent K^+ currents. A) Time course of 1,2-DiC_8-induced change of peak K^+ currents measured at 0 mV steps at every 10 seconds. Application of 1,2-DiC_8 significantly decreased K^+ currents. The 1, 2, & 3 indicated the representative current traces of control, 1,2-DiC_8, and recovery. B) Representative traces of whole cell currents during control, 1,2-DiC_8 (10 μM), and after washout of 1,2-DiC_8. K^+ currents were evoked by stepping the membrane potentials from a holding potential of −80 mV to potentials ranging from −50 mV to +25 mV in 5 mV increments. C) Average current voltage relations of peak currents in control (○), after 1,2-DiC_8 (●) treatment (n = 6). The peak current amplitudes were normalized with whole cell capacitance. Application of 1,2-DiC_8 signifi-cantly inhibited the K^+ currents (* : $p<0.01$).

으나, 다시 1,2 - DiC_8을 첨가시 현저히 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10 - A).

이같은 비활성 PKC 촉진제가 K^+ 전류의 전류 - 전압 관계에 미치는 효과를 Fig. 10 - C에 표시하였다. 그림에서 보는 바와 같이 1,3 - DiC_8 투여시 K^+ 전류의 크기가 일부 감소하는 경향을 보이나 통계적으로 유의한 차이는 볼 수 없었다($p>0.05$, n=4). 또한 PKC 차단제로 알려진 calphostin C(1 μM)를 전처치한 경우에는 1,2 - DiC_8에 의한 K^+ 전류 감소 효과가 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(1,2 - diC_8 처치군 및 calphostin C+1,2 - DiC_8 처치군 ; 59.4±1.9 vs 84.1±9.6% of control current amplitude, $p<0.05$, n =4, Fig. 11). 이같은 1,2 - DiC_8에 의한 억제 효과가 K^+ 전류의 막전압 의존 성질(voltage dependent pro - perty)을 변화시켜 나타나는지를 알아보기 위해 steady - state activation curve 및 inactivation curve가 1,2 -

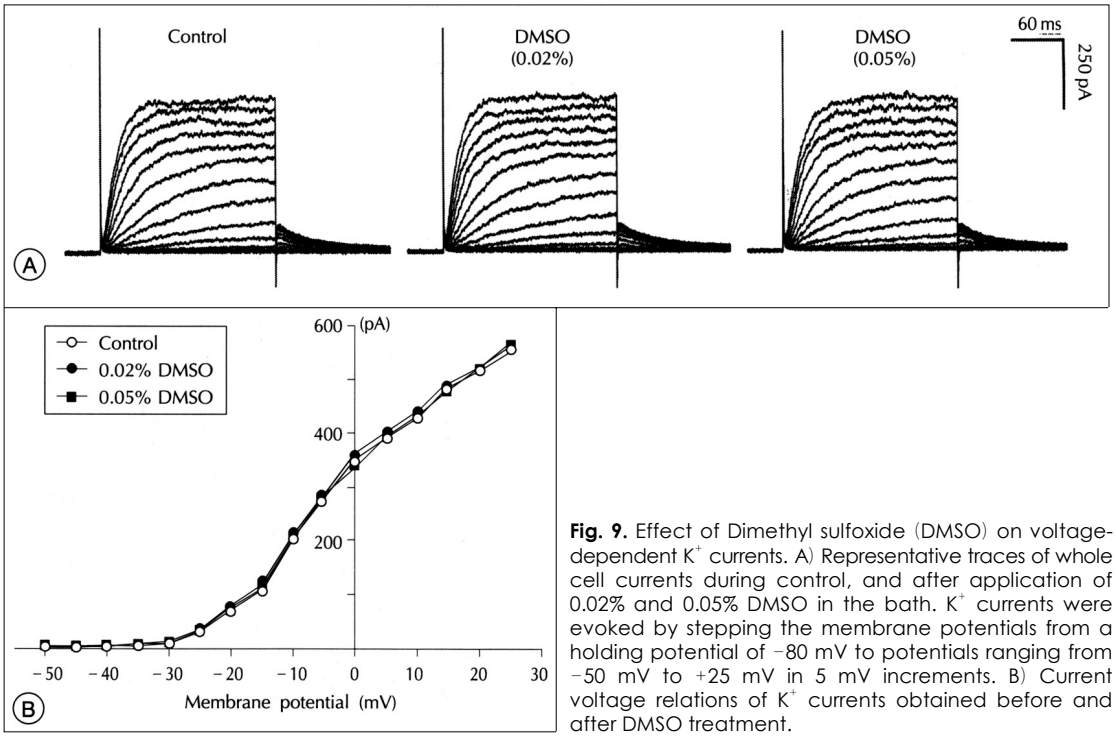

Fig. 9. Effect of Dimethyl sulfoxide (DMSO) on voltage-dependent K^+ currents. A) Representative traces of whole cell currents during control, and after application of 0.02% and 0.05% DMSO in the bath. K^+ currents were evoked by stepping the membrane potentials from a holding potential of −80 mV to potentials ranging from −50 mV to +25 mV in 5 mV increments. B) Current voltage relations of K^+ currents obtained before and after DMSO treatment.

DiC_8에 의해 이동(shifting)되는지 여부를 다음과 같은 방법을 사용하여 관찰하였다.

관동맥 평활근 세포의 막전압을 -80 mV로 고정한 상태에서 일시적으로 막전압을 -50 mV에서 +25 mV까지 단계적으로 변화시켜 K^+ 전류를 활성화시킨 후 다시 -50 mV로 재분극시켜 주었다. 이같은 재분극 자극에 의해 발생하는 전류(tail current)의 크기를 측정한 후 이를 이용하여 K^+ 전류의 활성화 곡선을 얻었다. 대조군 및 1,2-DiC_8 처치군에서 얻은 활성화 곡선 사이에는 유의한 차이를 발견할 수 없었다(대조군 및 1,2-DiC_8 처치군의 half maximal activation values ; -14.6±0.4 및 -16.2±0.7, $p>0.05$, $n=10$, Fig. 12). 또한 평활근 세포의 막전압을 여러 가지 크기의 탈분극된 상태(-100 mV부터 +20 mV까지)로 장기간(10 sec) 유지한 후 다시 일정크기의 탈분극 자극(+10 mV)을 가하여 K^+ 전류의 비활성화 곡선을 구하였다. 1,2-DiC_8 처치군의 경우 비활성화 곡선의 일부 이동이 관찰되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(대조군 및 1,2-DiC_8 처치군의 half maximal inactivation values ; -31.2±0.6 and -35.5±0.4, $p>0.05$, $n=5$, Fig. 12).

고 안

관동맥의 수축 양상에 미치는 histamine의 효과를 조사한 본 실험을 통해 얻은 주요한 결과는 다음과 같다. 즉 1) Histamine에 의한 혈관 수축은 일과성 수축과 지속성 수축으로 구분될 수 있었으며, 지속성 수축의 크기는 PKC 차단제인 staurosporine이나 Gö6976 전처치시, 또는 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine을 전처치하거나 histamine과 병행투여하는 경우 현저히 억제되었다. 2) 관동맥 평활근 세포에서 기록된 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성은 PKC 촉진제인 1,2-dioctanoyl-glycerol(1,2-DiC_8) 투여에 의해 현저하게 억제되었으나 비활성 PKC 촉진제인 1,3-dioctanoylgly-cerol (1,3-DiC_8)을 투여한 경우에는 K^+ 전류의 활성에 유의한 차이를 관찰할 수 없었으며, 또한 PKC 차단제인 calphostin C를 전처치 한 경우에는 1,2-DiC_8을 단독으로 투여한 경우에 비해 1,2-DiC_8의 K^+ 전류 활성 감소 효과가 억제되었다. 이같은 결과는 agonist에 의한 혈관 수축 현상이 주로 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터의 Ca^{2+} 유리 및 세포내 수축 단백질의 Ca^{2+} 감수성

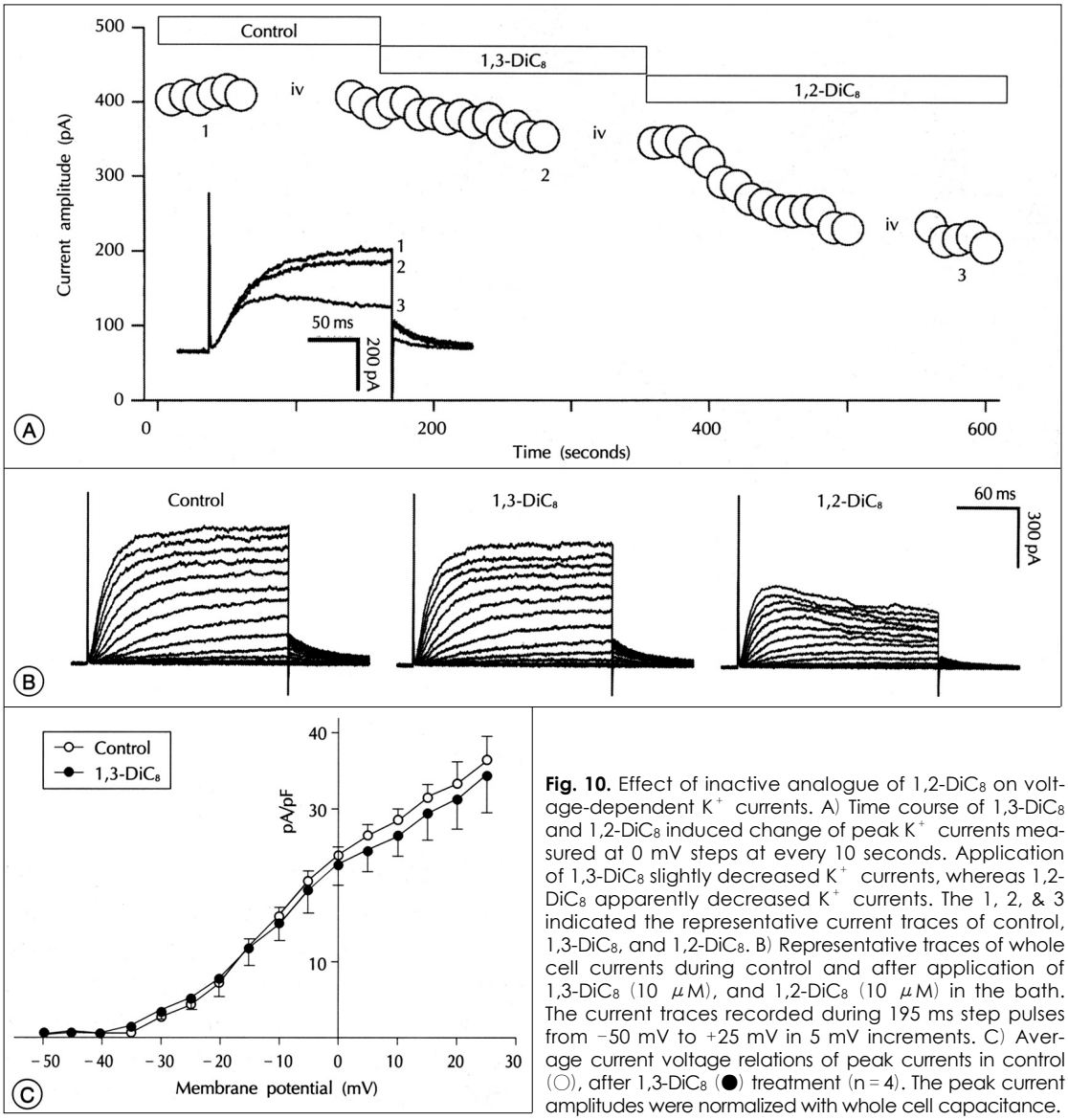

Fig. 10. Effect of inactive analogue of 1,2-DiC$_8$ on voltage-dependent K^+ currents. A) Time course of 1,3-DiC$_8$ and 1,2-DiC$_8$ induced change of peak K^+ currents measured at 0 mV steps at every 10 seconds. Application of 1,3-DiC$_8$ slightly decreased K^+ currents, whereas 1,2-DiC$_8$ apparently decreased K^+ currents. The 1, 2, & 3 indicated the representative current traces of control, 1,3-DiC$_8$, and 1,2-DiC$_8$. B) Representative traces of whole cell currents during control and after application of 1,3-DiC$_8$ (10 μM), and 1,2-DiC$_8$ (10 μM) in the bath. The current traces recorded during 195 ms step pulses from −50 mV to +25 mV in 5 mV increments. C) Average current voltage relations of peak currents in control (○), after 1,3-DiC$_8$ (●) treatment (n = 4). The peak current amplitudes were normalized with whole cell capacitance.

증가에 기인한다는 기존의 보고[12)25)]와는 달리 histamine에 의한 관동맥 수축시 세포외로부터의 Ca^{2+} 유입량의 증가가 그의 수축 유지에 매우 중요한 역할을 하며, 이같은 Ca^{2+} 유입량의 변화는 주로 평활근 세포막의 K^+ 통로의 활성 변화를 통해 이루어지며, 특히 PKC에 의한 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성 감소 및 그에 따른 막전압의 탈분극이 histamine에 의한 수축 유지에 매우 중요한 역할을 함을 시사하고 있다.

세포외로부터의 Ca^{2+} 유입이 histamine에 의한 관동맥 수축에 미치는 효과

Histamine은 주로 죽상괴(atheromatous plaque)나 혈관의 부종부위에 많이 존재하고 있는 mast cell로부터 유리되어 관동맥의 수축을 유발하고, 이같은 관동맥의 수축은 심근허혈이나 심실부정맥과 같은 치명적 심질환을 초래한다고 보고되고 있다.[5)26)27)] 그런데 이같은 histamine의 효과는 사용한 동물이나 부위에 따라 서로 다르게 보고되고 있다. 즉 원숭이나 개의 관동맥

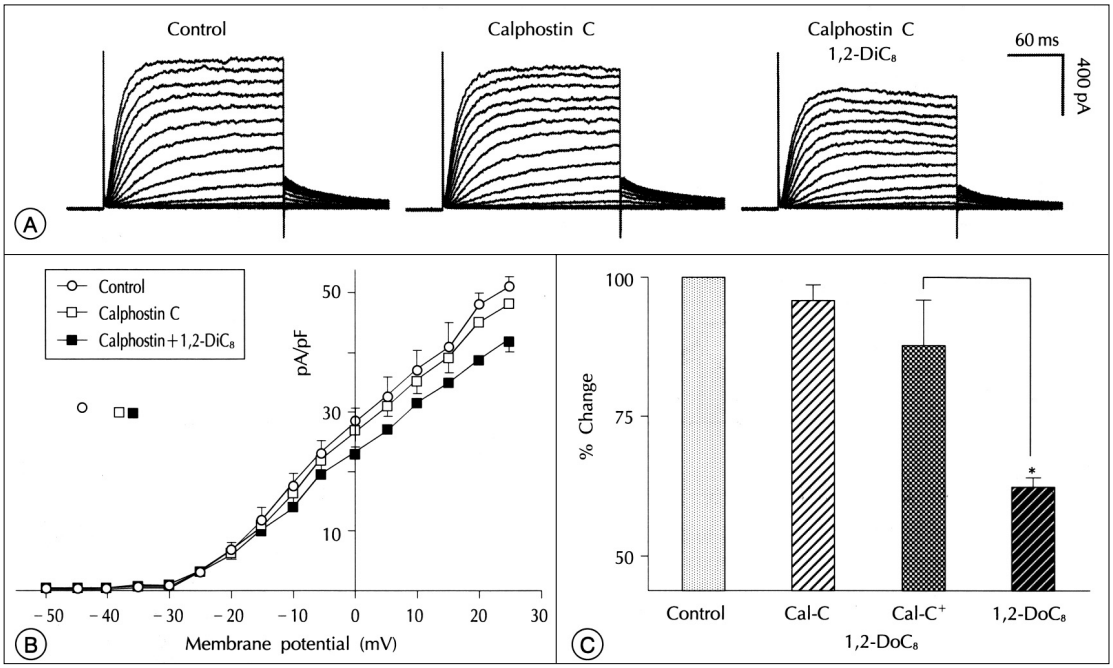

Fig. 11. Inhibition of PKC-dependent change of voltage-dependent K^+ current by calphostin C. A) representative traces of whole cell currents during control and after application of calphostin C (1 μM), and 1,2-DiC$_8$ (10 μM) in the bath. The current traces recorded during 195 ms step pulses from −50 mV to +25 mV in 5 mV increments. B) Average current voltage relations of peak currents in control (○), after calphostin C treatment (□), and calphostin C+1,2-DiC$_8$ (■) treatment (n = 4). The peak current amplitudes were normalized with cell capacitance. C) Summary of voltage-dependent K^+ current amplitudes recorded at 0 mV steps. The current amplitudes were expressed as the percent of control current amplitudes. Cal-C and Cal-C+1,2-DiC$_8$ represent calphostin C and calphostin C+1,2-DiC$_8$ treatment, respectively. Pretreatment of calphostin C significantly attenuated the 1,2-DiC$_8$-induced inhibition of K^+ current (1,2-DiC$_8$ treated group vs calphostin C+1,2DiC$_8$ treated group ; 59.4±1.9 vs 84.1±9.6% of control current amplitude* : $p<0.05$, n = 4).

의 경우 histamine 투여시 오히려 관동맥의 이완이 관찰되고 있는 반면 사람의 관동맥은 현저한 수축효과를 관찰할 수 있었다.[7)8)] 그런데 내피세포를 제거한 토끼 관동맥 절편에 histamine을 투여한 경우 농도 의존적으로 관동맥의 수축력이 증가하며(Fig. 1), 이같은 효과가 H_1 수용체 길항제인 pyrilamine 투여시 완전히 차단되는 반면에 H_2 수용체 길항제인 cimetidine을 전처치한 경우에는 오히려 histamine의 수축 효과가 증가한다는 본 실험 결과는 원숭이나 개의 관동맥과는 달리 토끼 관동맥 평활근 세포막에는 주로 H_1 수용체가 분포하는 것을 시사하고 있다(Figs. 2 and 3).

한편 Histamine이 평활근 세포막의 H_1 수용체에 결합하는 경우 phospholipase C가 활성화되어 평활근 세포내 inositol trisphosphate(IP_3) 생성이 증가하여 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터의 Ca^{2+} 유리를 증가시켜 평활근의 수축을 유도함은 잘 알려져 있다.[8)9)13)] 즉 Kotlikoff 등은 배양한 기관 평활근 세포에서 histamine 투여시 세포내 Ca^{2+} 농도가 일시적으로 증가하는 것을 보고하였으며, Matsumoto 등은 대동맥 평활근 세포에서 histamine에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가 현상이 세포외액의 Ca^{2+}을 EGTA를 사용하여 제거한 경우에도 나타나는 것으로 보아 주로 세포내 Ca^{2+} 저장소로 부터의 Ca^{2+} 유리에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 일어남을 시사하고 있다.[14)28)] 또한 활성화된 phospholipase C에 의해 생성된 DAG에 의한 PKC의 활성증가는 평활근 세포내 thin filament, 즉 caldesmon 및 calponin 등을 인산화시켜 이들의 actomyosin ATPase 억제 작용을 완화시킬 뿐 아니라 myosin light chain phosphatase의 인산화를 통해 그의 작용을 억제함으로써 낮은 농도의 Ca^{2+}에 의해서도 수축이 유지(수축단백질의 Ca^{2+} 감수성 증가)될 수 있게 한다고 보고되고 있다.[25)29)30)] 그런데 histamine에 의한 지속성 수축

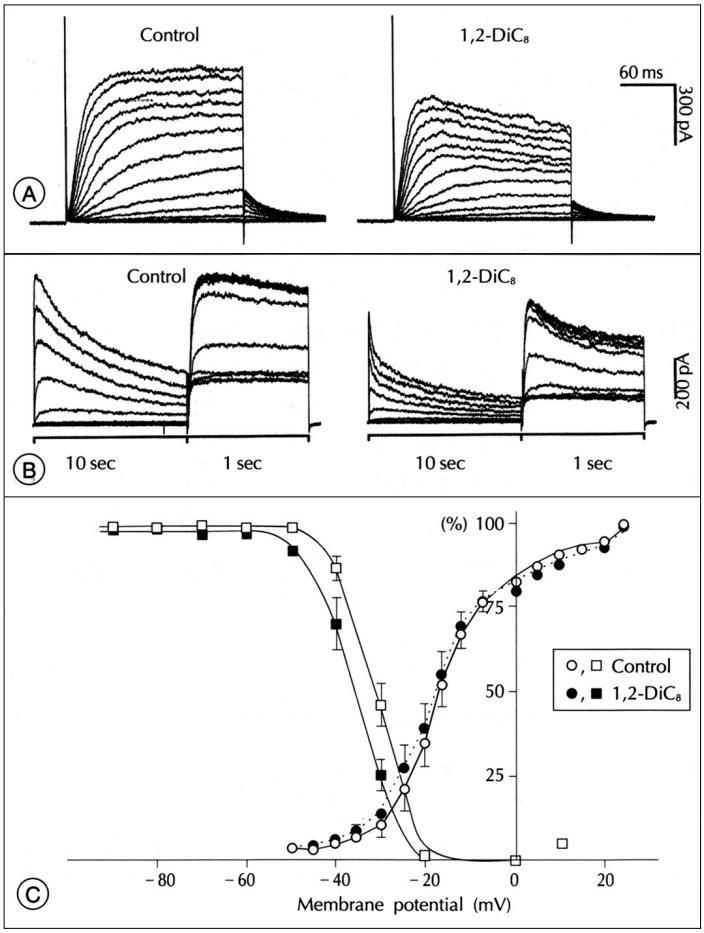

Fig. 12. Effects of 1,2-DiC$_8$ on steady-state activation and inactivation of voltage-dependent K^+ currents. A) Representative traces of control current elicited by pulsing from −50 mV to 25 mV in 5 mV increment from a holding potential of −80 mV. Tail currents evoked upon repolarization to −50 mV. Traces at top right show the effects of 10 μM 1,2-DiC$_8$ on currents evoked by an identical protocol of control. B) Current traces were generated by double pulse protocol. 10 seconds preconditioning steps ranging from −100 to +10 mV were applied from a holding potential of −80 mV. Each preconditioning pulse was followed by a constant 1 sec test pulse to +10 mV to record IdK. Traces at right show the effects of 10 μM 1,2-DiC$_8$ on currents evoked by an identical protocol of control. C) Relative states of activation and inactivation at each voltage were fitted by boltzman functions, and their fits are shown for control (○, □ for activation & inactivation) and 1,2-DiC$_8$ (●,■ ; for activation & inactivation). Half maximal activation values are −14.6±0.4 and −16.2±0.7 in control and 1,2-DiC$_8$ treated group (n=10). Half maximal inactivation values are −31.2±0.6 and −35.5±0.4 in control and 1,2-DiC$_8$ treated group (n=7).

의 크기가 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine 처치시 현저히 억제되며, PKC 차단제인 staurosporine이나 Gö6976을 전처치한 경우와 동일한 효과를 보인다는 본 실험의 결과(Figs. 4 - 6)는 기존의 보고, 즉 histamine 투여시 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터의 Ca^{2+} 유리 증가나 수축단백질의 Ca^{2+} 감수성 증가에 의해서만 혈관 수축이 유발되는 것이 아니라 세포외부로부터의 Ca^{2+} 유입량의 증가가 histamine에 의한 관동맥 긴장도 증가에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다.

이같은 평활근 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입량의 변동은 주로 평활근 세포의 막전압의 크기에 따라 조절되고 있음이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있으며, 관동맥 평활근 세포의 경우 주로 막전압 의존성 K^+ 통로(I_{dK})의 활성 변화에 의해 조절된다고 알려져 있다.[3)31)] 본 실험에서도 Ca^{2+} - activated K^+ 통로 차단제인 저농도 TEA나 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine의 단독투여에 의해서는 안정장력의 변화를 거의 관찰할 수 없었던 반면 막전압 의존성 K^+ 통로 차단제인 4 - AP(5 mM)를 투여하는 경우에는 관동맥의 긴장도가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이같은 긴장도 증가가 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine 투여시 현저히 억제되는 것으로 보아 평활근 세포막에 존재하고 있는 여러 이온 통로 중에서 주로 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성 변화에 의해 관동맥의 긴장도가 조절됨을 알 수 있었다 (Fig. 7). 그런데 이같이 막전압 결정에 중요한 역할을 하고 있는 I_{dK}의 활성 조절 인자에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 즉 I_{dK}의 활성이 막전압의 탈분극에 따라 증가함은 잘 알려져 있으나, 이외에 이의 생리적 활성 조절인자에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 그런데 histamine 투여시 활성화된다고 알려진 PKC는

평활근 세포내 수축단백질의 인산화 효과이외에도 이온통로의 인산화를 통해 그의 활성을 조절함이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다. 즉 Ca^{2+} activated K^+ 통로나 ATP sensitive K^+ 통로의 활성이 PKC에 의한 인산화에 의해 억제된다는 보고나 Ca^{2+} 통로의 활성이 PKC 촉진제의 농도에 따라 증가 혹은 감소한다는 보고 등은 PKC에 의한 이온통로의 인산화가 이온통로의 활성조절에 중요한 역할을 하며, 본 실험에서 관찰되는 PKC 차단제에 의한 관동맥의 긴장도 변화 효과 역시 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성이 PKC에 의해 억제되어 나타날 가능성을 시사하고 있다.[19)20)32)]

PKC에 의한 막전압 의존성 K^+ 통로의 활성 변화

Histamine 투여시 관찰되는 관동맥의 지속성 수축이 막전압의존성 K^+ 전류의 활성 감소를 통해 일어남을 시사하는 장력 측정 결과를 단일 평활근 세포를 이용한 막전압 고정법 실험을 통해 확인하고자 하였다. 그런데 평활근 세포막에는 안정시 평활근 세포막 전압 결정에 중요한 역할을 하고 있다고 알려진 막전압의존성 K^+ 전류 이외에도 Ca^{2+}-activated K^+ 전류, ATP-sensitive K^+ 전류(I_{K-ATP}), 그리고 inward rectifier K^+ 전류(I_{Kir}) 등이 존재한다고 보고되고 있다.[4)33-36)] 따라서 측정된 외향전류에 막전압의존성 K^+ 전류 이외에 다른 종류의 K^+ 전류가 포함될 가능성이 있으나 본 실험에서 사용한 실험조건, 즉 고농도 ATP(5 mM) 및 BAPTA(10 mM)를 첨가한 전극내액의 사용 및 탈분극 자극 등은 측정된 외향전류의 대부분이 막전압의존성 K^+ 전류로 구성되어 있음을 시사하고 있다.[24)37)] 이 같은 조건에서 PKC activator인 1,2-DiC_8을 투여하는 경우 막전압의존성 K^+ 전류의 크기가 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이때 1,2-DiC_8의 용매로 사용한 DMSO만을 처리한 경우에는 막전압의존성 K^+ 전류의 크기에 영향이 없는 것으로 보아 1,2-DiC_8 처리시 관찰되는 막전압 의존성 K^+ 전류의 크기 감소는 세포막의 유동성 변화에 의한 것이 아니라 활성화된 PKC에 의한 이온 통로 인산화에 의해 막전압의존성 K^+ 전류의 활성이 억제됨을 시사하고 있다(Figs. 8 and 9).

그런데 Jung 등[38)]은 diacyl glycerol 유도체와 같은 PKC activator 사용시 관찰되는 이온 전류의 억제효과가 PKC의 활성화를 통한 이온 통로의 인산화를 통해 이루어지는 것이 아니라 이들이 직접 이온 통로에 결합하여 그의 활성을 억제시킴을 보고하였다. 따라서 이같은 가능성을 확인하기 위해 PKC 활성 효과가 없다고 보고된 diacyl glycerol 유도체인 1,3-DiC_8와 PKC 차단제인 calphostin C를 전처치한 상태에서 각각 그의 효과를 관찰하였다. 막전압 의존성 K^+ 전류의 크기가 1,3-DiC_8 투여시 대조군에 일부 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 관찰할 수 없었던 반면에 같은 농도의 1,2-DiC_8을 투여하는 경우 막전압의존성 K^+ 전류의 크기가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 또한 calphostin C와 같은 PKC 차단제를 전처치한 경우 1,2-DiC_8에 의한 K^+ 전류 감소 효과가 현저히 억제되는 것으로 보아 토끼 관동맥 평활근 세포의 경우 diacyl glycerol 유도체가 직접 이온 통로의 활성을 조절하는 것이 아니라 PKC의 활성 증가를 통해 막전압의존성 K^+ 전류의 활성을 억제함을 시사한다(Fig. 11).

한편 세포에서 측정된 이온 전류의 크기는 세포막에 존재하고 있는 이온 통로의 개수(N), 이온 통로의 열릴 확률(p), 그리고 이온통로 하나를 통한 전류의 크기(i)에 의해 결정되게 되며, 이같은 관계는 $I=N \cdot p \cdot i$의 수식으로 표현될 수 있다. 따라서 PKC에 의한 통로 인산화에 의해 막전압 의존성 K^+ 전류의 크기가 감소하는 기전에 대해서는 아직 불명확하나 막전압 의존성 K^+ 전류의 전압의존성질(steady state activation and inactivation parameter)에 변동이 없는 본 실험의 결과로 볼 때(Fig. 12) PKC에 의한 인산화에 의해 막전압에 반응하여 열릴 수 있는 K^+ 이온 통로의 절대 숫자(N) 등이 감소하여 나타나리라 추측되나[39)] 이는 단일통로고정법(single channel patch clamp) 등의 방법을 통해 차후에 규명해야 할 과제라고 생각한다.

결 론

토끼 관동맥의 장력 및 이온 전류의 활성에 미치는 histamine의 효과를 관찰한 본 실험을 통해 기존에 보고된 수축 단백질의 Ca^{2+} 감수성 증가나 SR로부터의 Ca^{2+} 유리 증가 효과 이외에도 막전압 의존성 K^+ 전류의 억제 및 이를 통한 세포막 전압의 탈분극이 histamine에 의한 관혈관의 긴장도 증가에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 즉 histamine에 의한 관동맥의 긴

장도 증가 현상은 세포외로부터의 Ca^{2+} 유입량에 크게 의존하고 있으며, PKC에 의한 막전압 의존성 K^+ 전류의 활성 억제는 막전압의 탈분극을 초래하여 이차적으로 평활근 세포막의 Ca^{2+} 통로의 활성을 증가시킴으로써, histamine 투여시 관찰되는 지속성 수축의 유지에 중요한 역할을 한다고 생각된다.

중심 단어 : Histamine · 막전압 의존성 K^+ 전류 · Protein kinase C · 토끼 관동맥.

본 논문의 요지는 1998년도 대한생리학회 학술대회에서 발표되었음.
본 연구는 1997년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원을 받아 이루어졌음.

REFERENCES

1) Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. *Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. Am J Physiol 1990;259:C3-C18.*
2) Beckerath NV, Cyrys S, Dischner A, Dart J. *Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: An analysis of the underlying mechanism. J Physiol 1991; 442:297-319.*
3) Leblanc N, Wan X, Leung PM. *Physiological role of Ca^{2+}-activated and voltage-dependent K^+ currents in rabbit coronary myocytes. Am J Physiol 1994;266:C1523-C37.*
4) Nelson MT, Quayle JM. *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. Am J Physiol 1995;268:C799-C822.*
5) Masini E, Mannaioni PF. *Effect of histamine on smooth muscle. In: Szekeres L, Papp JG, editors. Pharmacology of smooth muscle. Springer-Verlag;1994. p.193-225.*
6) Ghtert M, Garbarg M, Hey JA, Schlicker E, Schwartz JC, Levi R. *New aspects of the role of histamine in cardiovascular function: Identification, characterization, and potential pathophy-siological importance of H_3 receptors. Can J Physiol Pharmacol 1995;73:558-64.*
7) Toda N. *Mechanism of histamine-induced relaxations in isolated monkeys and dog coronary arteries. J Pharmacol Exp Ther 1986;239:529-35.*
8) Toda N. *Mechanism of histamine actions in human coronary arteries. Circ Res 1987;61:280-6.*
9) Voorde JV, Brochez V, Vanheel B. *Heterogenous effects of histamine on isolated rat coronary arteries. Eur J Pharmacol 1994;271:17-23.*
10) Donaldson J, Hill SJ. *Histamine-induced inositol phospholipid breakdown in the longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum. Br J Pharmacol 1985;85:499-512.*
11) Carson MR, Shasby SS, Shasby DM. *Histamine and inositol phosphate accumulation in endothelium: cAMP and a G protein. Am J Physiol 1989;257:L259-L64.*
12) Komori S, Kawai M, Takewaki T, Ohashi H. *GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guineapig ileal muscle. J Physiol 1992;450:105-26.*
13) Fukami K, Itagaki M, Komori S, Ohashi H. *Contractile response to histamine and GTPS in β-escin-treated skined smooth muscle of guinea pig ileum. Jpn J Pharmacol 1993;63:171-9.*
14) Matsumuto T, Kanaide H, Nishimura J, Kuga T, Kobayashi S, Nakamura M. *Histamine-induced calcium transients in vascular smooth muscle cells: Effects of verapamil and diltiazem. Am J Physiol 1989;257:H563-H70.*
15) Dessy C, Godfraind T. *The effect of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle. Br J Pharmacol 1996;119:142-8.*
16) Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. *Modulation of Ca^{2+} and K^+ channels by histamine H_1-receptor stimulation in rabbit coronary artery cells. J Physiol 1993;468:379-400.*
17) Watanabe Y, Suzuki A, Suzuki H, Itoh T. *Effect of membrane hyperpolarization induced by a K^+ channel opener on histamine-induced Ca^{2+}-mobilization in rabbit arterial smooth muscle. Br J Pharmacol 1996;117:1302-8.*
18) Hirano K, Kanaide H, Abe S, Nakamura M. *Temporal changes in the calcium-force relation during histamine-induced contractions of strips of the coronary artery of the pig. Br J Pharmacol 1991;102:27-34.*
19) Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y. *Protein kinase C inhibits the Ca-activated K channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 1993;190:263-9.*
20) Schuhmann K, Groschner K. *Protein kinase C mediates dual modulation of L-type Ca channels in human vascular smooth muscle. FEBS Lett 1994;341:208-12.*
21) Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP, Cole WC. *Protein kinase C inhibits delayed rectifier K^+ current in rabbit vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1996;271:H109-H19.*
22) Ahn DS, Jeong YK, Lee YH, Kang BS. *Activation of Ca^{2+}-activated K^+ channels by beta agonist in rabbit coronary smooth muscle cells. Yonsei Med J 1995;36: 232-42*
23) Hamil OP, Marty A, Neher El, Sakmann B, Sigworth FJ. *Improved patch clamp techniques for high resolutuion current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 1981;391:85-100.*
24) Ahn DS, Hume JR. *pH regulation of voltage-dependent K^+ channels in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. Pflugers Arch 1997;433:758-65.*
25) Buus CL, Aalkjar C, Nilsson H, Juul B, Moller JV, Mulvany MJ. *Mechanisms of Ca-sensitization of force production by noradrenaline in rat mesenteric small arteries. J Physiol 1998;510:577-90.*
26) Ginsburg R, Bristow MR, Kantrowitz N, Baim DS, Harrison DC. *Histamine provocation of clinical coronary artery spasm: Implications concerning pathogenesis of variant angina pectoris. Am Heart J 1981;102:819-22.*
27) Forman MB, Oates JA, Robertson D, Roberts LJ, Virmani R. *Increased adventitial mast cells in a patient with coronary spasm. N Engl J Med 1985;313:1138-41.*
28) Kotlikoff MI, Murray RK, Reynolds EE. *Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells. Am J Physiol 1987;253:*

C561-C6.
29) Masuo M, Reardon S, Ikebe M, Kitazawa T. *A novel mechanism for the Ca-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: Inhibition of myosin light chain phosphatase. J Gen Physiol 1994;104:265-86.*
30) Walsh MP. *Regulation of vascular smooth muscle tone. Can J Physiol Pharmacol 1994;72:919-36.*
31) Ishikawa T, Eckman DM, Keef KD. *Characterization of delayed rectifier K currents in rabbit coronary artery cells near resting membrane potential. Can J Physiol Pharmacol 1997;75:1116-22.*
32) Hatakeyama N, Wang Q, Goyal RK, Akbarali HI. *Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K channel in rabbit esophageal smooth muscle. Am J Physiol 1995;268:C877-C85.*
33) Ishizaka H, Kuo L. *Acidosis-induced coronary arteriolar dilation is mediated by ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. Circ Res 1996;78:50-7.*
34) Volk KA, Shibata EF. *Single delayed rectifier potassium channels from rabbit coronary artery myocytes. Am J Physiol 1993;264:H1146-H53.*
35) James AF, Okada T, Horie M. *A fast transient outrard current in cultured cells from human pulmonary artery smooth muscle. Am J Physiol 1995;268:H2358-H65.*
36) Quayle JM, Dart C, Standen NB. *The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. J Physiol 1996;494:715-26.*
37) Robertson BE, Nelson MT. *Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. Am J Physiol 1994;267:C1589-C97.*
38) Chung ID, Shin HK, Kim KS, Schlichter L. *DiC8, a diacylglycerol analoge, inhibits the T-cell KV1.3 channel by a phosphorylation-independent mechanism. Federation Meeting of Korean Basic Medical Scientist Abstract;1998. p.143.*
39) Peretz T, Levin G, Moran O, Thornhill WB, *Chikvashvili D, Lotan I. Modulation by protein kinase C activation of rat brain delayed-rectifier K channel expressed in xenopus oocytes. FEBS Lett 1996;381:71-6.*