

신성고혈압쥐에서 혈관내피층이 Phorbol Ester에 의한 수축에 미치는 영향

조선대학교 의과대학 생리학교실,¹ 응급의학교실,² 내과학교실³

정수아¹ · 김 형¹ · 차경훈¹ · 전제열¹ · 윤평진¹

염철호¹ · 박 진² · 조남수² · 홍순표³

Influence of Vascular Endothelium in Contraction Induced by Phorbol Ester in Renal Hypertensive Rats

Soo-Ah Jeong, MD¹, Hyung Kim, MD¹, Kyung-Hun Cha, MD¹,
Jae-Yeoul Jun, MD¹, Pyung-Jin Yoon, PhD¹, Cheol-Ho Yeum, PhD¹,
Jin Park, MD², Nam-Soo Cho, MD² and Soon-Pyo Hong, MD³

¹Department of Physiology, ²Emergency Medicine and ³Internal Medicine, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The vascular endothelium plays an important role in circulation, by modulating the contractile responses of the arterial smooth muscle. This study was aimed at investigating the possible role of the endothelium in the contractile response to phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB) in chronic two-kidney, one clip (2K1C) hypertensive rats. **Materials and Methods** : 2K1C hypertension was induced by clipping the left renal artery of the study rats, with age-matched rats receiving a sham treatment, which served as controls. The thoracic aortae were mounted in tissue baths to measure the isometric tension. **Results** : The PDB showed a dose-dependent contraction, with larger responses in the 2K1C hypertensive than the sham-clipped control rats. N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) and methylene blue (MB) induced an increase in the tension in the presence of PDB, and the potentiating effects of L-NNA or MB were attenuated in the 2K1C rats as compared to the controls. Staurosporine, an inhibitor of protein kinase C, completely inhibited the contractile response to PDB, as well as enhancing the effects of L-NNA and MB. Removal of the endothelium abolished the contractile responses to L-NNA and MB in both the 2K1C and control rats. The relaxation responses to acetylcholine in the aortic rings precontracted with PDB were also attenuated in the 2K1C rats, and L-NNA prevented the effect of the acetylcholine-induced relaxation. Indomethacin, glibenclamide and iberiotoxin did not affect the PDB responses in both the 2K1C and control rats. **Conclusion** : These results indicate the endothelium plays an inhibitory role against PDB-induced contraction in rat aortae, by releasing nitric oxide, and the inhibitory role of the endothelium is impaired in 2K1C renal hypertension. (Korean Circulation J 2003;33(11):1036-1043)

KEY WORDS : Protein kinase C ; Nitric oxide ; Endothelium ; Renal hypertension.

논문접수일 : 2003년 6월 18일

심사완료일 : 2003년 8월 8일

교신저자 : 염철호, 501-759 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 의과대학 생리학교실

전화 : (062) 230-6411 · 전송 : (062) 232-4943 · E-mail : chyum@mail.chosun.ac.kr

서 론

혈관 내피층은 혈관을 수축 및 이완시키는 여러 가지 물질을 유리시켜 혈관 평활근 긴장을 조절하며 이 가운데 이완 인자로서 대표적인 물질이 nitric oxide(NO)이다.¹⁾ NO는 체내 아미노산인 L-arginine으로부터 합성되며 L-arginine과 구조적으로 유사한 NO합성 억제제가 개발되어²⁾ 심혈관 기능의 조절에 있어 혈관 내피층의 생리적 기능을 구명하는데 널리 사용되고 있다.

수용체를 매개한 평활근 수축은 세포막 phosphoinositide(PI) 가수분해와 더불어 세포내에서 생성된 inositol 1, 4, 5-trisphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)에 의해 유발되며 IP₃는 세포내 칼슘농도를 증가시키고 DAG는 protein kinase C(PKC)를 활성화시켜 수축이 유지된다.³⁾ 한편 종양 촉진제(tumor promoter)로 알려진 phorbol ester의 작용이 PKC에 대한 DAG의 작용과 유사함이 밝혀져⁴⁾ phorbol 12, 13-dibutyrate(PDB),^{5,6)} phorbol 12, 13-diacetate(PDA),⁷⁾ 12-deoxyphorbol, 13-isobutyrate(DPB)⁸⁾ 및 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)⁹⁾ 등 여러가지 phorbol ester가 세포내 PKC의 생물학적 기능을 검토하는데 사용되어 왔다. PKC 활성화와 혈관 내피층의 기능에 대하여 PDA에 의한 혈관수축이 N^ω-nitro-L-arginine(L-NNA) 투여 및 혈관 내피층 제거시 크게 항진됨으로써 phorbol ester가 NO 유리를 야기시킨다는 보고가 있는가하면⁷⁾ phorbol ester가 세포내 cGMP 농도를 감소시킴으로써 이완인자의 유리를 억제시킨다는 의견도 있고⁶⁾ 또한 내피층 제거시 PKC 활성화에 의한 혈관수축은 항진되나 이완은 억제됨으로써 이중효과를 나타낸다는 보고도 있는 바⁸⁾ 연구자에 따라 차이를 보이고 있다.

고혈압은 궁극적으로 혈관구경 변화에 의한 말초저항의 상승과 직접적으로 관련된 바 혈관 내피층으로부터 이완인자의 유리가 감소되거나 수축인자의 유리증가 및 이러한 인자들에 의한 혈관 평활근 반응의 변화가 수반될 수 있으며¹⁰⁾ 실제로 고혈압 상태에서는 혈관반응에 대한 내피층의 조절기능이 변이된다고 한다.¹¹⁾¹²⁾ 그러나 고혈압 상태에서 PKC 활성화변화와 관련된 혈관 내피층의 기능변화에 대해서는 아직 보고되지 않은 듯 하다.

본 연구는 적출 흰쥐 흉부 대동맥 표본에서 혈관 내피층이 phorbol ester에 의한 수축반응에 미치는 영향을

검토하고 나아가서 실험적으로 유발시킨 two-kidney, one clip(2K1C) 신성고혈압 흰쥐에서 혈관 내피층의 기능이 정상혈압동물과 차이가 있는지 구명하고자 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물

2K1C 신성고혈압의 유발

동일한 조건에서 번식 사육한 체중 150~200 g의 흰쥐(Sprague-Dawley, ♂)를 thiopental(40 mg/kg, IP) 마취하에 개복한 후 좌측 신동맥에 내경 0.2 mm의 silver clip을 장치하고 신속히 봉합하였다. 마취에서 깨어난 후 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 간격으로 꼬리혈압을 간접법으로(Harvard, K10766) 측정하여 고혈압 유발과정을 확인하였으며 10주 후에¹³⁾ 사용하였다.

정상혈압쥐

신성고혈압쥐와 동일한 조건이나 clip을 장치하지 않은 군(sham-clipped)을 대조군으로 하였다.

혈관의 장력기록

흉부 대동맥 혈관을 적출하여 길이 2~3 mm의 환상 표본을 만들어 15 mL 수조에 매달고 37℃를 유지하면서 95% O₂와 5% CO₂의 혼합기체를 지속적으로 공급하였다. 동맥환 표본의 한쪽 끝은 수조 하단에 고정하고 반대쪽은 등장성 장력변환기(Grass, FTO3)에 연결하여 그 장력변동을 Polygraph(Grass, Model 79)상에 기록하였다. 사용한 영양액의 조성은 NaCl 118.3, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, glucose 11.1 mM 이었으며 pH는 7.4로 유지하였다. 경우에 따라 혈관 내피층을 제거하였으며 phenylephrine(1 μM)에 의한 수축이 acetylcholine(10 μM)에 의해 이완되지 않으면 내피층이 제거된 것으로 간주하였다. 혈관표본에 2 g의 장력을 주어 약 90~120분 동안 평형시켜 장력이 안정되었을 때 먼저 50 mM KCl(영양액 조성을 KCl 변동량 만큼 NaCl로 치환시킴)에 대한 수축반응을 확인한 후 본 실험을 시작하였다.

PDB(10~40 nM)에 의한 수축반응을 60분 동안⁷⁾

기록한 후 NO 합성 억제제인 L-NNA(100 μ M)를 비롯하여 methylene blue(MB, 10 μ M), indomethacin (1 μ M), glibenclamide(3 μ M) 및 iberiotoxin(100 μ M)의 투여가 PDB 수축반응의 크기에 미치는 영향을 2K1C 고혈압군과 대조군에서 각각 비교 검토하였다. 한편 PKC 활성 억제제인 staurosporine(10 nM)을 30분전 전처리하여 PDB와 L-NNA의 수축반응에 미치는 영향을 확인하였으며 아울러 불활성 phorbol ester 인 4 α -phorbol 12, 13-didecanoate(4 α PDD, 1 μ M)의 수축효과를 조사하여 PKC 활성화에 대한 PDB의 작용을 검증하였다. 나아가서 L-NNA 전처치가 PDB(1~300 nM) 농도의존 수축반응에 미치는 영향과 더불어 PDB로 수축시킨 후 acetylcholine(0.01~100 μ M)에 의한 이완반응을 고혈압군과 대조군에서 각각 조사하였다. PDB와 4 α PDD는 ICN사(미국 캘리포니아주, Costa Mesa), glibenclamide는 RBI사(미국 매사추세츠주, Natick)에서 각각 구입하였고 그 외의 시약은 Sigma사(미국 미주리주, ST. Louis) 제품이었다.

Phenylephrine, acetylcholine, iberiotoxin 및 MB는 3차 증류수에 용해하였으며 그 외의 시약은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하였다. 수조내 DMSO의 최종농도는 0.05% 이내로 하였다.

분석 및 통계

실험결과는 평균 \pm 표준오차로 나타냈으며 수축반응의 크기는 50 mM KCl 반응에 대한 %로 표시하였다.

EC₅₀ 값은 logistic 공식(Origin Software)에 의해 산출하였다. 각 군간 차이는 Student's t test를 이용하여 p<0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

10주째에 간접법으로 측정된 수축기 혈압은 2K1C 고혈압군(189 \pm 4 mmHg, n=35)이 대조군(135 \pm 5, n=37)에 비해 유의하게 (p<0.05) 높았다. 50 mM KCl에 대한 수축반응의 크기는 고혈압군(1.23 \pm 0.06 g)과 대조군(1.12 \pm 0.08 g)에서 차이가 없었다.

PDB 투여시 대조군의 경우 10 nM에서부터 서서히 지속적인 수축양상을 나타냈으며 그 반응은 농도의존성을 보였다. L-NNA 단독투여에 의한 수축의 크기는 아주 미약하였으나(0.04 \pm 0.007 g) PDB로 수축시킨 상태에서 L-NNA 투여시 수축반응이 유의하게 증가되었으며 그 크기는 PDB 양에 따라 용량의존성 있게 항진되었다. 2K1C 고혈압군은 PDB에 의한 수축반응이 대조군에 비해 강화되었으며 PDB 저농도에서는 L-NNA 투여시 수축반응이 증가되었으나 그 정도는 대조군에 비해 약화됨을 보임으로써 30 nM 이상에서는 차이가 없었다(Fig. 1). L-NNA 투여에 의한 PDB 수축반응의 증가는 cGMP 억제제인 MB를 투여한 경우에도 양군에서 유사한 양상을 보였다(Fig. 2).

고혈압군과 대조군에서 PDB 수축반응 및 L-NNA와 MB에 의한 수축의 증가는 PKC 활성 억제제인 stauro-

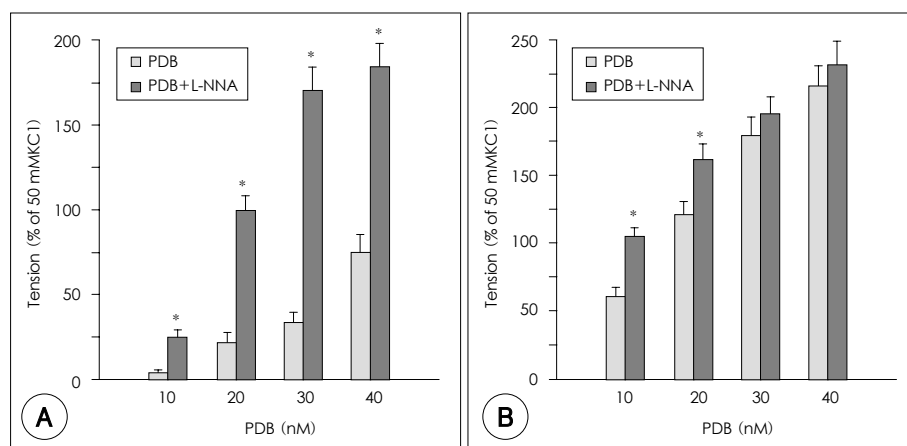


Fig. 1. Effects of N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) on concentration responses to PDB in isolated aortic rings from (A) sham-clipped and (B) 2K1C rats. The rings were preincubated with PDB for 60 min prior to application of L-NNA. Values are expressed as the mean \pm SE of 6-8 experiments. *: p<0.05, compared with corresponding control values. PDB: Phorbol 12,13-dibutyrate.

sporine을 전처리하면 소실되었으며 불활성 phorbol ester인 4 α PDD 투여 후에는 기초장력 및 L-NNA 추가투여에 의한 장력변동을 볼 수 없었다. 또한 PDB로 수축시킨 후 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin, ATP 민감성 K⁺ 통로 차단제인 glibenclamide 및 칼슘 의존성 K⁺ 통로 차단제인 iberiotoxin의 추가투여는 PDB 수축반응에 영향을 미치지 않았다(수치 보이지 않음).

PDB(1~300 nM)에 의한 수축반응은 L-NNA 전처리시 대조군에서는 그 곡선이 왼쪽으로 이동되면서 수축의 크기가 향진되었으나(EC₅₀ : 53.7 \pm 5.2 nM에서 18.2 \pm 1.4 nM ; p<0.05) 고혈압군은 차이가 없었다(EC₅₀ : 17.2 \pm 1.1 nM에서 14.7 \pm 1.3 nM, Fig. 3).

혈관 내피층을 제거한 상태에서도 PDB(대조군 : 30 nM, 고혈압군 : 20 nM)의 수축반응은 대조군에서 고혈압군에 비해 향진되었으며(대조군 : 463 \pm 27%, 고혈압군 : 142 \pm 12%, p<0.05) 그 정도는 내피층 존재하에서 PDB 수축후 L-NNA에 의해 증가된 크기(대조군 : 502 \pm 25%, 고혈압군 : 135 \pm 13%, p<0.05)와 유사하였다. 고혈압군과 대조군에서 혈관내피층이 제거된 상태에서는 PDB에 의한 수축반응이 L-NNA나 MB 투여에 의한 영향을 받지 않았다(Fig. 4).

PDB 수축 후 acetylcholine에 의한 이완반응은 고혈압군에서 대조군에 비해 약화되었으며(IC₅₀ : 0.57 \pm 0.05 μ M 및 0.33 \pm 0.07 μ M ; p<0.05) 잔여부분은 staurosporine에 의해 양군에서 각각 완전히 이완됨을

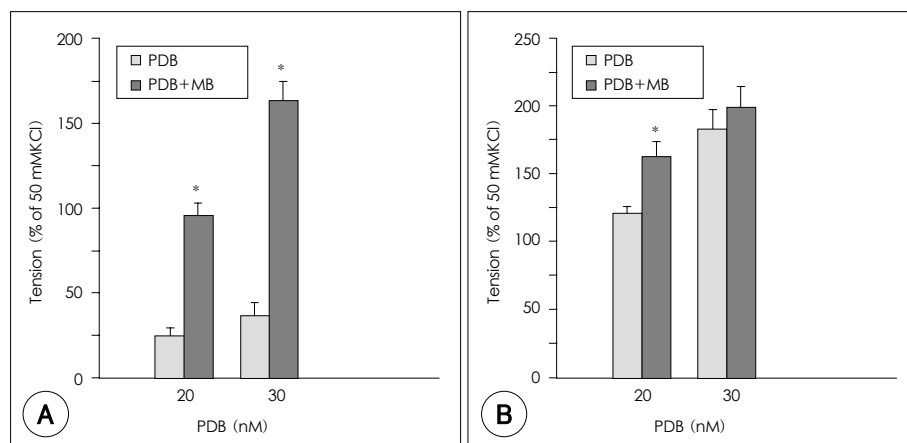


Fig. 2. Effects of methylene blue (MB) on concentration responses to PDB in isolated aortic rings from (A) sham-clipped and (B) 2K1C rats. The rings were preincubated with PDB for 60 min prior to application of MB. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 experiments. * : p<0.05, compared with corresponding control values. PDB : Phorbol 12,13-dibutyrate.

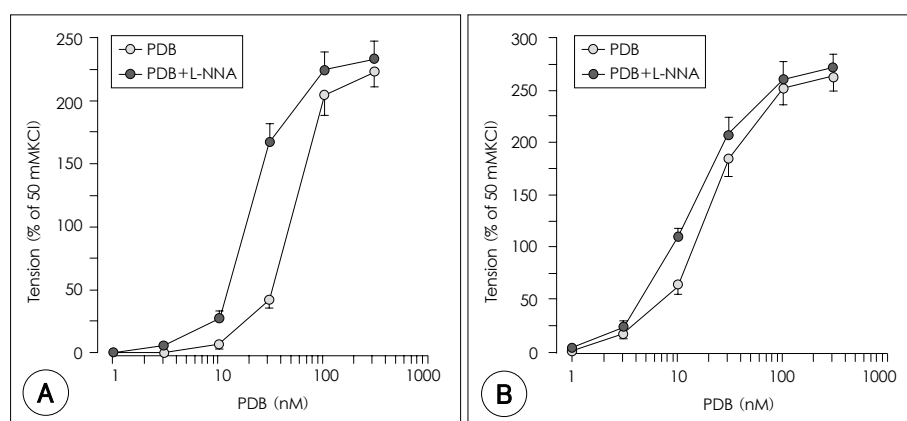


Fig. 3. Concentration response curves for PDB in the absence and presence of N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) in isolated aortic rings from (A) sham-clipped and (B) 2K1C rats. Values are expressed as the mean \pm SE of 6–8 experiments. PDB : Phorbol 12,13-dibutyrate.

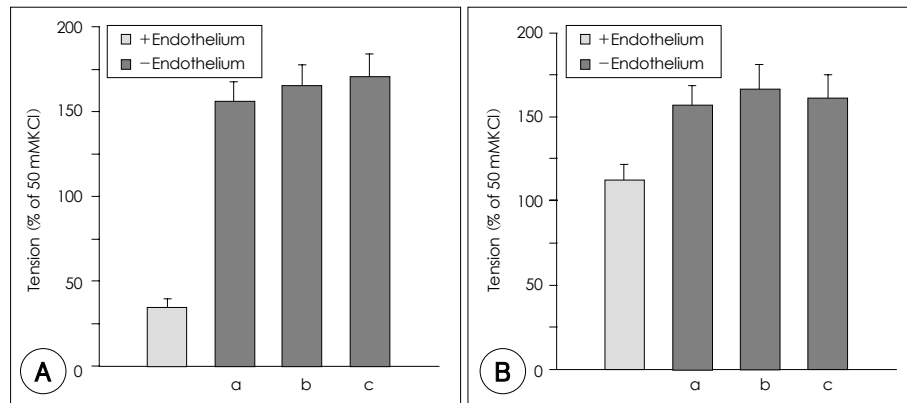


Fig. 4. Effects of removal of endothelium on the contractile response to first PDB (30 nM in sham-clipped and 20 nM in 2K1C) and then N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) and methylene blue (MB) in isolated aortic rings from (A) sham-clipped and (B) 2K1C rats. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 experiments. Symbols : (a) response to PDB (b) plus L-NNA (c) plus MB.

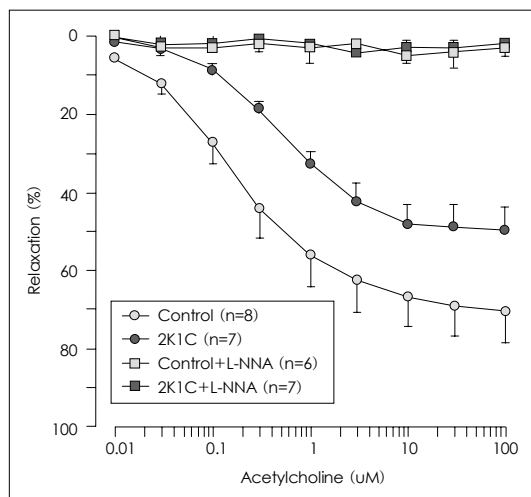


Fig. 5. Dose-relaxation curves in response to acetylcholine in aortic rings from control and 2K1C rats. Relaxation is expressed as a percent change from the submaximal contraction attained by PDB (30 nM in control and 20 nM in 2K1C). The relaxation response to acetylcholine was completely abolished by pretreatment with N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) for 30 min in both groups. Values are expressed as the mean \pm SE of n experiments.

보였다. L-NNA를 전처리하면 acetylcholine에 의한 이완반응은 소실되었으며 glibenclamide (10 μ M)는 양군에서 acetylcholine의 이완반응에 영향을 미치지 않았다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서 PKC 활성화제로 사용된 PDB는 대조군의

경우 저농도에서 미미한 수축을 보였으나 NO 합성 억제제인 L-NNA를 추가투여시 수축의 크기가 유의하게 항진되었으며 그 양상이 PDB의 농도에 따라 용량의존성을 보임으로써 PDB의 수축반응에 NO가 관여함을 시사하고 있다. 더구나 L-NNA에 의한 PDB 수축반응의 증가는 cGMP 억제제인 MB를 투여하거나 혈관 내 피층을 제거한 경우에도 유사한 양상을 나타냈으며 또한 내피층이 제거된 상태에서는 PDB 수축반응에 대한 L-NNA 및 MB의 효과가 소실됨으로써 혈관 내피층과 관련된 NO의 활성이 PDB에 의한 수축반응을 조절함을 재입증하고 있다. 이와 관련하여 또 다른 phorbol ester인 PDA에 의한 수축반응이 혈관 내피층을 제거하거나 L-NNA 및 MB 투여에 의해 증가됨이 보고되었으며⁷⁾ 더불어 MB가 DPB에 의한 수축반응을 항진시킨다는 것도 확인된 바⁸⁾ 이러한 결과는 PKC 활성화가 NO의 유리를 야기시켜 수축에 억제적으로 작용하고 있음을 시사하는 관점에서 본 연구의 결과와 일치하고 있다. 한편 Smith 등⁶⁾은 돼지의 혈관내피세포 배양을 통하여 substance P 및 ATP에 의해 야기시킨 세포 내 cGMP 농도의 증가가 PDB에 의해 억제됨을 확인하고 phorbol ester가 이완인자의 유리를 억제시킴을 시사한 바 아마도 이러한 차이는 실험동물의 종 및 실험방법의 차이에 기인할 가능성을⁷⁾ 배제할 수 없을 듯하다. 나아가서 생체외 실험에서 NO의 혈관확장성 기초 긴장을 확인하기 위해서는 조직표본에 대한 자극이 요구된다고 하며⁷⁾ 본 실험에서도 L-NNA 만의 수축반응은 아주 미약함을 보였다.

고혈압이나 동맥경화증과 같은 병적 상태에서는 평활근 세포내에서 PI 대사를 비롯한 칼슘의 유리 및 PKC 활성화 등이 증가되어 혈관 활성물질에 대한 수축반응이 항진된다.¹⁴⁾¹⁵⁾ 본 연구에서도 PDB에 의한 혈관수축 반응의 크기가 2K1C 고혈압 상태에서 대조군에 비해 전반적으로 항진됨을 보였다. 따라서 2K1C 고혈압 모델에서도 평활근 세포내의 여러가지 수축조절기전의 변화가 PDB의 수축반응이 대조군에 비해 증가되는데 부분적으로 영향을 미쳤을 것으로 추측된다. 더불어 고혈압 상태에서 평활근 자체의 긴장성이 달라질 가능성도 생각할 수 있으나 본 실험에서 수축 유발기전이 다른 KCl에 의한 수축양상은 2K1C 고혈압군과 대조군에서 차이가 없었으며 이는 다른 연구자에 의해서도 확인된 바 있다.¹⁶⁾

본 실험에서 관심이 집중되는 부분은 PDB 투여후 L-NNA에 의한 수축반응의 항진효과가 2K1C 고혈압군에서 대조군에 비해 약화된 결과이다. 또한 고혈압군에서 감약된 양상을 보인 L-NNA에 의한 수축효과는 혈관 내피층을 제거한 경우나 MB 투여시에도 유사함을 보였으며 PDB 농도에 따른 수축곡선도 L-NNA 전처치시 대조군은 EC₅₀ 치가 감소되면서 곡선이 왼쪽으로 이동되었으나 고혈압군은 거의 차이가 없었다. 이는 PDB의 수축반응에 대한 혈관 내피층의 억제효과가 고혈압상태에서는 대조군에 비해 감소됨을 의미한다. 이와 관련하여 고혈압 상태에서는 내피층과 관련된 혈관 확장성 기능이 변조됨이 여러 고혈압 모델에서 보고된 바 있으며¹¹⁾¹²⁾¹⁷⁾ 본 교실에서도 2K1C 신성고혈압 모델에서 norepinephrine 및 phenylephrine의 혈관수축 반응에 대한 내피층의 억제기능이 고혈압군에서 대조군에 비해 약화됨을 확인한 바 있다.¹⁸⁾ 따라서 2K1C 고혈압 상태에서 PKC 활성화에 의해 야기된 혈관수축반응에 있어서도 혈관 내피층의 기능변이가 수반됨을 알 수 있으며 또한 그러한 변화가 부분적으로는 고혈압을 유지하는데 기여할 것으로 추측된다.

한편 phorbol ester는 PKC를 활성화시키는 작용 이외에도 비 특이적으로 교감신경 수용체¹⁹⁾나 G 단백질²⁰⁾ 및 insulin 수용체²¹⁾ 등의 인산화에 관여함이 보고된 바 있으나 본 실험의 경우 고혈압군과 대조군에서 PDB와 L-NNA에 의한 수축효과는 PKC 활성 억제제인 staurosporine을 전처치하면 소실되었으며 또한 불활성 phorbol ester 인 4 α PDD의 투여는 기초장력 및 L-

NNA 투여에 의한 장력변동을 보이지 않았다. 이는 본 실험에서 사용된 PDB의 수축반응이 PKC 활성 자극에 의해 유발되었음을 간접적으로 시사하고 있다. 나아가서 혈관 내피층에서는 NO 이외에도 혈관확장성 prostaglandin²²⁾ 및 K⁺ 통로를 활성화시킴으로써 평활근 세포막을 과분극 시키는 인자²³⁾ 등이 유리되는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서 PDB의 수축반응은 고혈압군과 대조군에서 indomethacin, glibenclamide 및 ibexotoxin에 의해 영향받지 않았다. 따라서 내피층으로부터의 억제성 prostaglandin이나 과분극인자의 유리가 PDB 수축반응에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

궁극적으로 본 실험의 결과는 PDB의 수축반응에 있어 혈관 내피층으로부터 유래된 NO의 조절작용이 2K1C 고혈압군과 대조군에서 차이가 있음을 제시하고 있다. NO는 물리적 환경변화나 활성물질의 자극에 의해 유리가 촉진되나 기초상태에서도 지속적으로 유리되어 혈압조절에 관여하고 있다.¹⁰⁾ 본 실험을 통하여 PDB에 의한 PKC 활성화가 혈관 내피층으로부터 NO의 유리를 자극하였는지 또는 기초상태에서 유리된 NO가 PDB의 수축반응에 억제적으로 작용하였는지 확인할 수 없으나 L-NNA에 의한 수축 항진효과가 PDB 농도에 따라 용량의존성을 보이는 것으로 보아 적어도 PKC 활성화가 내피층으로부터 NO의 유리에 영향을 미쳤을 것으로 추정된다. 더불어 내피세포 내에서 NO의 합성은 부분적으로 칼슘의존성이며²⁴⁾ phorbol ester는 세포 내로의 칼슘이동을 촉진시키는 것으로 알려진 바⁹⁾ PKC 활성화가 세포내 칼슘의존성 NO 합성에 관여할 가능성도 추측할 수 있다. 나아가서 본 실험에서 대조군의 경우 PDB의 농도의존 수축반응이 L-NNA 전처치시 증가되었음에도 불구하고 100 nM 이상의 고농도에서는 차이가 없음을 알 수 있다. 이는 아마도 PDB가 고농도에서는 혈관 내피층의 기능에 영향을 미치지 않으면서 전적으로 평활근 세포에 작용하여 수축이 유지되기 때문에 L-NNA의 영향을 받지 않는 것으로 생각되며 PDA의 경우에도 그와 유사한 양상을 보임이 확인된 바 있다.⁷⁾

Phorbol ester는 혈관의 내피의존 이완반응을 억제시킴이 여러 연구자에 의해 보고된 바⁶⁾²⁵⁾²⁶⁾ 본 연구에서도 내피층 존재하에서 PDB로 수축시킨 후 acetylcholine에 의한 이완반응은 그 최대치가 대조군의 경우

약 70%를 보임으로써 이는 norepinephrine이나 phenylephrine으로 수축시킨 상태에서 acetylcholine에 의한 최대 이완반응의 크기가 약 95% 임에⁷⁾¹⁸⁾ 비추어 볼 때 acetylcholine에 의한 내피의존 이완반응이 PDB 존재하에서 억제되었음을 의미하며 PDA의 경우에도 이와 유사한 양상을 나타냄이 보고되었다.⁷⁾ PDB 존재하에서 내피의존 이완반응의 억제현상은 간접적으로 내피층으로부터 NO 유리의 감소를 시사한 바 본 실험에서 PDB 수축반응을 통해 추정한 결과와는 다른 양상을 보인 것이다. 이와 관련하여 다른 phorbol ester인 DPB에 의한 수축반응이 혈관 내피층 제거시 항진되지만 내피의존 이완반응은 억제됨이 보고되었으며⁸⁾ 또한 phorbol ester에 의한 PKC 활성화는 수용체-연결 합성과정(receptor-coupled synthesis)의 음성 되먹이기 기전에 의해 혈관 내피층으로부터 이완인자의 유리를 초기에는 증가시키나 후기에는 억제시킴이 시사된 바 있다.²⁷⁾ 나아가서 고혈압 상태에서는 혈관의 내피의존 이완반응이 억제되며¹⁷⁾ 2K1C 고혈압에서도 확인된 바¹⁸⁾²⁸⁾ PDB 존재하에서 acetylcholine에 의한 이완반응 역시 2K1C 고혈압군에서는 대조군에 비해 약화됨을 보였다. 이는 고혈압 상태에서 PKC 활성화와 관련된 혈관 내피층의 기능변이가 수축시뿐만 아니라 이완시에도 야기됨을 의미하며 2K1C 고혈압상태에서의 혈관 내피층과 평활근 세포와의 상호작용이 PKC 활성화변화에 의해 서로 다른 혈관 활성물질의 경우¹⁸⁾²⁸⁾와 유사하게 나타날 수 있음을 시사한다.

이상의 실험결과를 요약하면 혈관 내피층은 NO를 유리시킴으로써 PDB의 수축 반응을 억제시키며 2K1C 고혈압 상태에서는 PDB 수축반응에 대한 내피층의 억제기능이 약화될 것으로 사료된다.

요 약

배경 및 목적 :

혈관 내피층이 PKC 활성화제인 phorbol ester에 의한 수축에 미치는 영향을 확인하고 나아가서 혈관 수축반응에 대한 내피층의 기능이 two-kidney, one clip(2K1C) 신성고혈압 모델에서 차이가 있는지 구명하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

흰쥐 일측 신동맥에 clip을 장치한 고혈압군과 대조군

의 흉부 대동맥 표본에서 phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB)에 의한 혈관의 등장성 장력을 기록하면서 N^ω-nitro-L-arginine(L-NNA)을 비롯한 몇가지 약물을 투여하여 그 영향을 양군에서 비교 검토하였다.

결 과 :

PDB로 수축시킨 후 L-NNA 투여시 수축반응은 용량 의존성있게 항진되었으며 L-NNA에 의한 수축의 증가는 2K1C 고혈압군에서 대조군에 비해 약화되었다. L-NNA에 의한 PDB 수축반응의 증가는 methylene blue(MB)를 투여하거나 혈관내피층을 제거한 경우에도 양군에서 유사한 양상을 보였다. PDB 농도의존 수축곡선은 L-NNA 전처치시 대조군에서는 왼쪽으로 이동되었으나 2K1C 고혈압군은 차이가 없었다. 혈관내피층이 제거된 상태에서 PDB 수축반응은 L-NNA나 MB에 의해 양군 모두 영향받지 않았다. PDB로 수축시킨 상태에서 acetylcholine에 의한 이완반응은 2K1C 고혈압군에서 대조군에 비해 약화되었다. Indomethacin, glibenclamide 및 iberiotoxin의 투여는 양군에서 PDB에 의한 수축반응에 영향을 미치지 않았다.

결 론 :

이상의 실험결과는 혈관내피층이 NO를 유리시켜 PDB의 수축반응을 조절하며 2K1C 신성고혈압 상태에서는 PDB 수축반응에 대한 내피층의 조절기능이 변이됨을 시사한다.

중심 단어 : 단백 키나제 C ; 산화질소 ; 혈관내피층 ; 신성고혈압.

본 논문은 2002년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

REFERENCES

- 1) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
- 2) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101:746-52.
- 3) Hathaway DR, March KL, Lash JA, Adam LP, Wilensky RL. Vascular smooth muscle: a review of the molecular basis of contractility. *Circulation* 1991;83:382-90.
- 4) Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982;257:7847-51.

- 5) Lewis MJ, Henderson AH. *A phorbol ester inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor. Eur J Pharmacol* 1987;137:167-71.
- 6) Smith JA, Lang D. *Release of endothelium-derived relaxing factor from pig cultured aortic endothelial cells, as assessed by changes in endothelial cell cyclic GMP content, is inhibited by a phorbol ester. Br J Pharmacol* 1990;99:565-71.
- 7) Huang Y. *Influence of endothelium in contraction induced by phorbol ester in isolated rat aortic rings. Life Sci* 1997;60:1749-56.
- 8) Sakata K, Karaki H. *Phorbol ester-induced release of endothelium-derived relaxing factor. Eur J Pharmacol* 1990;179:207-10.
- 9) Murphy HS, Maroughi M, Till GO, Ward PA. *Phorbol-stimulated influx of extracellular calcium in rat pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol* 1994;267:L145-51.
- 10) Luscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: modulator of cardiovascular function. Boca Raton: CRC Press; 1990. p.134-75.*
- 11) Vanhoutte PM, Boulanger CM. *Endothelium-dependent responses in hypertension. Hypertens Res* 1995;18:87-98.
- 12) Dohi Y, Kojima M, Sato K. *Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. Hypertension* 1996;28:732-7.
- 13) Sigmon DH, Beierwaltes WH. *Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. Hypertension* 1998;31:649-56.
- 14) Turla MB, Webb RC. *Augmented phosphoinositide metabolism in aortas from genetically hypertensive rats. Am J Physiol* 1990;258:H173-8.
- 15) Mecca TE, Webb RC. *Vascular responses to serotonin in steroid hypertensive rats. Hypertension* 1984;6:887-92.
- 16) Ceron PI, Bendhack LM. *Increased contractile response induced with ouabain is abolished by thapsigargin in aorta of renal hypertensive rats. Gen Pharmacol* 1997;29:707-12.
- 17) Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. *The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. Hypertension* 1986;8:II61-6.
- 18) Jun JY, Yeum CH, Moon SH, Cho CH, Jun KB, Chung JH, Yoon PJ. *Altered endothelial modulation of vasoconstriction in chronic two-kidney, one clip hypertensive rats. Korean J Nephrol* 2001;20:381-92.
- 19) Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, Lomasney JW, Debernardis JF, Lefkowitz RJ, Caron MG. *Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5651-5.
- 20) Katada T, Gilman AG, Watanabe Y, Bauer S, Jakobs KH. *Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine nucleotide binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. Eur J Biochem* 1985;151:431-7.
- 21) Takayama S, White MF, Lauris V, Kahn CR. *Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hematoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:7797-801.
- 22) Toda N. *Endothelial-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. Br J Pharmacol* 1984;81:301-7.
- 23) Komori K, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Blood Vessels* 1990;27:238-45.
- 24) Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. *Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension* 1994;23:1121-31.
- 25) Komori K, Suzuki H. *Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. Circ Res* 1987;61:586-93.
- 26) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- 27) De Nucci G, Gryglewski RJ, Warner TD, Vane JR. *Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2334-8.
- 28) Lee J, Choi KC, Yeum CH, Kim W, Yoo K, Park JW, Yoon PJ. *Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in chronic two-kidney one clip hypertensive rats. Nephrol Dial Transplant* 1995;10:619-23.