

압력 과부하와 그의 회복에 따른 쥐 경동맥 혈관운동과 재형성

충북대학교 의과대학 내과학교실,¹ 생리학교실,² 신경외과학교실³

권진숙¹ · 이상진² · 김영규³ · 김영철² · 김기석¹

황경국¹ · 연태진¹ · 조명찬¹ · 김동운¹

Effects of Pressure Overload and its Recovery on Vascular Reactivity and Remodeling of the Rat Carotid Artery

Jin-Sook Kwon, DVM¹, Sang-Jin Lee, MD², Young-Gyu Kim, MD³, Young-Chul Kim, PhD²,
Ki-Seok Kim, MD¹, Kyung-Kuk Hwang, MD¹, Tae-Jin Youn, MD¹,
Myeong-Chan Cho, MD¹ and Dong-Woon Kim, MD¹

¹Department of Internal Medicine, ²Physiology and ³Neurosurgery College of Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The Vascular system exhibits altered morphological and functional properties during hypertension and after anti-hypertensive therapy. To characterize such changes, the contractile, histological and molecular responses in the common carotid arteries (CCA) were compared in 35 rats. **Materials and Methods** : By partial transverse aortic constriction (TAC), the right CCAs were made to lie under a high pressure environment, while the left CCAs remained under normotension, the latter being used as control vessels. The ligations were removed after two weeks, to enable the recovery process to begin. **Results** : The vessel contractility, two weeks after the TAC, was nearly abolished. The recovery process from high pressure showed an initial hypercontractile period of around 1-2 week after recovery, prior to the subsequent decline to a normal contractility after 2 weeks. The relaxation response due to acetylcholine was minimal at the end of the hypertensive period, recovered slowly, and reached a normal magnitude after 4 weeks. A high pressure increases the medial thickness & area, and enhances the adventitial tissue formation. These changes persist during the first 4 weeks of recovery, after which normotension returns. Apoptosis at the endothelial layer was significantly increased two weeks after the TAC, but normalized two weeks after recovery. The expression of eNOS was not detect 2 weeks after the TAC, but gradually returned to a basal level at 2 weeks after the untying. **Conclusion** : A high blood pressure causes decreases in the contractility and endothelium-dependent relaxation. It also increases endothelial apoptosis, the medial thickness & area, and enhances the adventitial tissue formation. The recovery processes from high blood pressure are not uniform, but show different normalizations among the structural, contractile and apoptotic parameters. (Korean Circulation J 2003;33(10):936-948)

KEY WORDS : Hypertension ; Arteries ; Contractility ; Remodeling ; Nitric oxide.

논문접수일 : 2003년 4월 2일

심사완료일 : 2003년 5월 2일

교신저자 : 김동운, 361-711 충북 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (043) 269-6386 · 전송 : (043) 273-3252 · E-mail : kdwoon@chungbuk.ac.kr

서론

생체의 모든 세포들이 원활한 활동을 하기 위해서는 적절한 혈류의 공급이 필수적이다. 그리고 혈류량을 조절하기 위해 가장 중요한 것은 적절한 혈압을 유지하는 것이다. 고혈압은 말초혈관저항의 증가와 밀접한 관계가 있다는 것은 잘 알려진 사실이다.¹⁾ 그러므로, 혈관 저항을 조절함으로써 혈압을 조절하는 기전을 이해하는 것은 순환시스템을 이해하는데 중요하다. 고혈압은 성인들의 가장 흔한 성인병중의 하나이며 이차적으로 뇌혈관 질환, 심혈관질환 등 거의 모든 질병 및 노화의 원인이 된다. 고혈압에 노출된 혈관은 동맥의 성질이 구조적 및 기능적으로 변화하므로, 고혈압에 노출된 동맥의 혈관평활근세포와 내피세포의 구조적, 기능적 변화의 이해는 매우 중요하다.¹⁾²⁾

대부분의 백서를 이용한 실험에서는 주로 대동맥을 사용하여 수축 실험들을 행하여 왔다.³⁾⁴⁾ 그러나, 고혈압에 의한 혈관 변화가 임상적으로 가장 중요한 혈관은 경동맥과 관상동맥이며, 혈관은 크기에 따라 성질이 다르므로 대동맥의 성질을 경동맥이나 관상동맥에 직접 적

용·이해하는 것은 큰 의미가 없다. 따라서 경동맥이나 관상동맥의 수축성을 직접 측정하는 것이 가장 이상적이다. 본 연구는 임상적으로 가장 중요한 혈관의 하나인 경동맥을 대상으로 연구를 시행하였다.

이때까지 사용된 백서를 이용한 고혈압 연구 방법은 spontaneously hypertensive rat(SHR)이나³⁾⁴⁾ Dahl salt sensitive rat과 같은 유전적으로 고혈압이 발생하는 백서를 이용하는 방법⁵⁾⁶⁾과 신동맥 협착 등으로 전신적 고혈압을 유도한 백서를 사용하는 방법이다. 그러나 유전적으로 저절로 고혈압이 유발되는 쥐는 후천적인 환경요소도 중요시되는 사람의 고혈압 모델과 상당한 차이가 있고, 또 신동맥 협착 모델같은 경우에는 renin-angiotensin계의 활성이 크게 관여하므로 해석상에 차이점이 생길 수 있다.

이번에 본 연구자가 시도한 고혈압 모델은 한 개체에서 국소적으로 급성 고혈압을 유발하고 고혈압에 노출된 혈관의 시간에 따른 병태적 변화를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 이 혈관을 다시 정상 혈압으로 환원하고서 시간에 따른 혈관의 회복 변화를 관찰할 수 있는 모델이다. 이는 현재의 많은 고혈압 모델과는 달리 급성 고

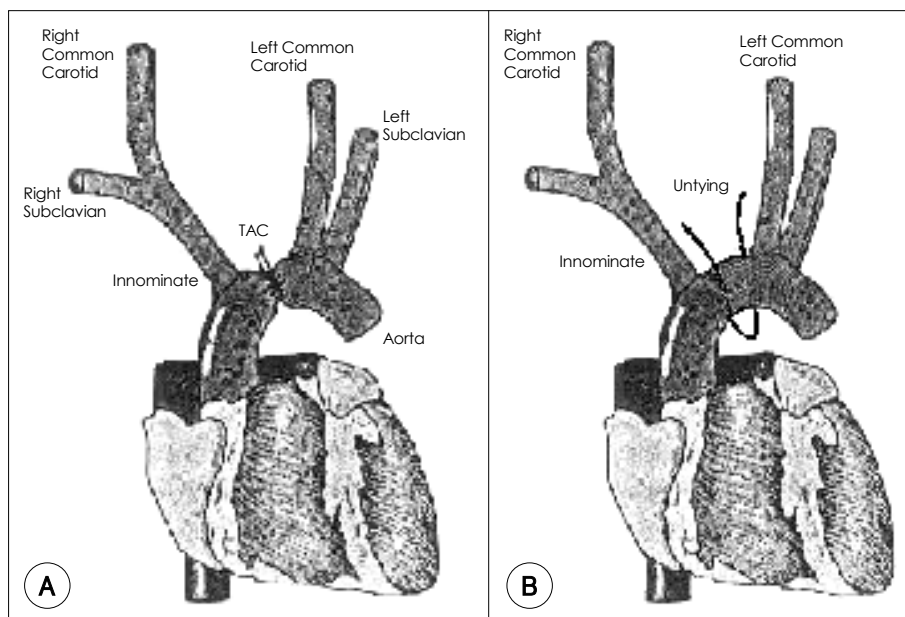


Fig. 1. Schematic illustration of the rat model of unilateral carotid hypertension. A : right common carotid artery is hypertensive because transverse aorta between innominate artery and left common carotid artery was partially banded. Left ventricular hypertrophy subsequently develops due to pressure overload induced by transverse aortic constriction (TAC). B : two weeks after initial banding, pressure overload of the right common carotid artery was relieved by the untying of TAC. The pressure gradient across TAC was disappeared within 10 minutes after untying and right common carotid artery became normotensive.

혈압이 혈관에 미치는 영향을 연구할 수 있는 모델이며, 또 압력 과부하를 해소함으로써 고혈압 치료 후의 혈관 반응까지 관찰할 수 있으므로 이번 실험의 결과는 실로 중요한 의미를 가질 수 있다.

또한 혈관의 수축 반응 실험은 백서가 희생될 때의 상태에 따라서 혈관의 반응이 굉장히 다를 수 있는데, 현재까지의 고혈압 연구는 고혈압쥐와 정상쥐라는 다른 개체를 이용한 실험이었다. 그러나, 이번 실험에 사용한 고혈압 모델은 동일 개체가 고혈압과 정상 혈압을 모두 가진 모델로써 이러한 문제를 해결하였다고 생각된다.

재료 및 방법

실험동물모델(Fig. 1)

체중 250 g 정도의 웅성 Sprague-Dawley계 rat을 대상으로 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(2.5 mg/kg)를 복강내로 투여하여 마취를 시킨 후 기관내삽관을 시행하고 소동물 인공호흡기(Harvard rodent ventilator, Model 683, USA)에 연결시켜 인공호흡을 실시하였다. 현미경하에서 좌측 두번째 늑간부위에 작은 구멍을 만들고 박리하여 횡행대동맥이 잘 관찰되면 특별히 제작된 구멍이 있는 microcurette로 좌우 경동맥 중간의 횡행대동맥을 떠올린 후, 그 구멍에 5-0 black silk를 통과시켜 횡행대동맥 아래로 내고 그 위에 22 G의 blunt needle을 위치시킨 후 횡행대동맥을 결찰시키고 needle을 빨리 제거하였다. 이렇게 하면 횡행대동맥협착(transverse aorta constriction, TAC)에 의해 좌심실에 압력과부하가 발생하고 우측 경동맥은 고혈압에 노출되고 좌측 경동맥은 정상 혈압인 모델이 형성되었다.

TAC 수술 2주 후에 다시 마취한 후 인공호흡시키고 경동맥에 손상을 피하기 위해 경동맥 삽관은 피하고, 우측 axillary artery와 우측 femoral artery에 PE50 tube로 삽관하여 pressure transducer에 연결한 후 양쪽의 압력을 동시에 측정하였다. 우측 axillary artery는 우측 경동맥을 우측 femoral artery는 좌측 경동맥을 대변한다. 양쪽의 수축기 압력차가 50 mmHg 이상인 있는 35마리의 쥐를 대상으로 실험을 진행하였다.

실험쥐들을 TAC 수술 2주 후와 Untying 후 1, 3, 7, 14, 28일에 전신마취 후 경동맥을 적출하여 조직 검사, 분자생물학적 검사 및 myograph 실험을 실시하였다.

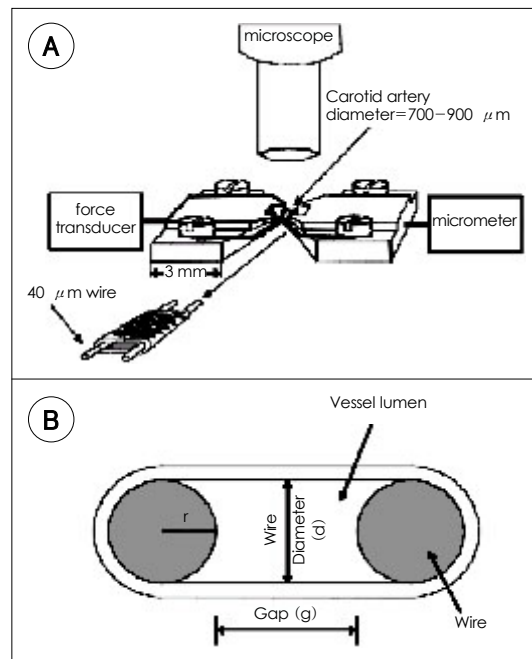


Fig. 2. Schematic illustration of vessel mounting on the small vessel myograph. A : the setup experimental chamber. B : cross section of vessel mounted on two 40 μ m tungsten wires.

수축실험 : Myograph실험(Fig. 2)

백서를 전신 마취 후 혈관에 손상이 가지 않도록 조심하여 좌우측 경동맥을 적출하였다. 정상 생리적 식염수(119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.17 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose and 2 mM CaCl₂, pH=7.4)에 넣고 5% 이산화탄소가 섞인 산소로 bubbling하였다. 박리해 낸 혈관들을 1.5~2.0 mm 길이로 잘라서 소혈관용 Myograph (Mulvany Myograph system 410A)의 chamber에 넣고 jaw에 mounting하였다.⁷⁾ Myograph에는 Fig. 2A와 같은 jaw가 2세트 있어서 한번 실험에 2개의 혈관을 mount할 수 있다. 각각의 jaw에는 stainless steel wire로 그림과 같이 고정하였다.

혈관은 transmural pressure가 80 mmHg가 되도록 늘여서 반경을 측정하였다. 생체내 혈압보다 조금 낮은 80 mmHg를 사용한 것은 혈관손상을 방지하기 위함이다. Normalization은 Mulvany와 Halpern(1977)⁸⁾이 제시한 방법에 의해 길이-장력 곡선을 그려서 하였다. IBM-compatible computer에 연결하여 1 Hz의 sampling rate로 기록하였다.

Normalization이 끝나면 normoxic gas(21% 산소, 5% 이산화탄소, 74% 질소)로 bubbling하며 30분내지 1시간 회복시간을 준 후에 실험을 시작하였다. 전체적으로 오랜 시간이 걸리므로 가능하면 실험은 7시간을 넘지 않도록 하였다.

수축반응 실험

TAC시행 2주 후에, 그리고 Untying 후 1, 3, 7, 14, 28일에 전신마취 후 경동맥을 적출하여 정상혈관과 고혈압혈관에서 여러 농도의 KCl(20, 40, 60, 80 mM), serotonin(10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), phenylephrine (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M)에 대한 수축성의 변화를 비교하였다.

이완반응 실험

압력과부하에 의하여 혈관내피세포의 기능이 장애가 생기고, 압력과부하를 해소함으로써 그 기능이 회복하는지를 알아보기 위하여, serotonin(10^{-5} M)으로 수축을 유발한 후 acetylcholine(10^{-6} M)을 투여하였다. 고혈압 혈관의 이완반응의 정도는 정상 혈관의 이완정도에 대한 백분율로 표시하였다.

조직학적 분석

경동맥을 적출하여 10% formalin액에 고정시켰다. 고정된 경동맥을 파라핀에 포매한 후 연속적인 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하였고 Scion Image Analysis Software(version 1.1)을 이용하여 quantitative morphometry 분석을 시행하였다. 분석에 사용한 인자들은 중막의 두께(T_{intima})와 면적(A_{intima}), 혈관 내경 등이다. 중막의 두께는 혈관의 중심 부위를 기준으로 45° 간격으로 서로 마주 보는 8곳의 중막의 두께를 측정하여 평균하였다. 고정된 혈관은 관류 고정을 하지 않았기 때문에 원형을 유지하지 못하는 경우가 많아 혈관 내부 원호의 길이를 구한 후 혈관이 원형이라고 가정하여 혈관 내경을 구하였다($Diameter=Internal Perimeter/\pi$). 조직 절편은 혈관 외막의 섬유화 정도를 판정하기 위해 Sirius red F3BA(Aldrich Chemical Co, USA) 염색도 실시하여 분석하였다.

세포고사

세포고사의 증감을 알아보기로 In Situ Apoptosis

Detection kit(Intergen, USA)를 이용하여 DNA fragmentation을 특징적으로 염색시킬 수 있는 TUNEL assay를 시행하였다.

실온에서 3.0% 과산화수소를 5분간 처리하고, PBS로 5분간 2회 세척하였다. Equilibration buffer를 실온에서 30분간 처리하고 terminal deoxynucleotidly transferase와 digoxigenin-dUTP를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 anti-digoxigenin-peroxidase를 37°C에서 1시간 반응시켰다. DAB(peroxidase substrate kit, VECTOR, Burlingham)로 4분간 발색시키고, hematoxylin으로 대조염색한 후 glass cover slip을 덮고 광학 현미경하에서 관찰하였다.

ecNOS 면역조직학적 검사

파라핀 블록의 절편을 알루미늄이 코팅되어 있는 슬라이드 글라스에 붙인 후 deparafin, dewax, rehybrization 과정을 거친 후 phosphate-buffered saline(PBS)에 5분간 침강 처리한 후 염색에 사용했다. 조직 슬라이드는 10% normal horse serum을 전처리(실온, 1시간)한 후, PBS로 세척했다. 1 : 500으로 희석한 anti-ecNOS antibody(Transduction Laboratories, USA)를 37°C에서 90분 동안 반응시켰다. Secondary antibody는 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, USA)를 1 : 200으로 희석해 처리한 후 chamber에 넣고 실온에서 60분간 반응시켰다. Solution of peroxidase linked ABC(ABC kit, Vector Laboratories, USA)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 모든 과정의 슬라이드는 건조되지 않도록 wet chamber에 넣고 반응시켰다. DAB(Vector Laboratories, USA)로 8분간 발색시킨 후 hematoxylin(Vector Laboratories, USA)으로 대조 염색한 후 광학 현미경에서 관찰하였다.

Western Blot Analysis

실험동물로부터 채취한 경동맥을 즉시 증류수와 함께 분쇄하여 원심분리한 후 상층액을 제거하고 남은 pellet에 약 10배의 volume으로 solubilization buffer를 넣고 4°C에서 1시간 방치하였다. 이것을 원심분리하여 상층액을 모아 실험에 사용하였다. 단백질 농도를 측정하고 단백질 10 μ g/10 μ L에 100 mM의 dithiothreitol을 포함한 sample buffer 10 μ L를 넣고 95°C에서 5분간

처리 후, miniature gel apparatus(Mini-protean ; Bio-Rad Labs, USA)안에서 8% SDS-polyacrylamidegel에 전기영동시켰다. Nitrocellulose membrane에 electrotransfer(120 volts, 90분)시켰다. 비특이적인 단백질 결합을 방지하고자 blocking buffer(2% skim milk)용액에 membrane을 넣고 4℃에서 하룻밤을 방치한 후 익일에 일차 항체(anti-mouse ecNOS monoclonal Ab, Transduction laboratories, USA)를 blocking buffer에 1 : 500으로 희석한 후 실온에서 90분간 방치하였다. PBS로 세척(15분, 3회)한 후 이차 항체(anti-mouse Ig, horseradish peroxidase linked whole Ab, Amersham, USA)를 blocking buffer에 1 : 1000으로 희석한 후 실온에서 60분간 방치하였다. PBS로 세척(15분, 3회)한 후, enhanced chemiluminescence(ECL-kit, Amersham)를 1분간 처리하여 X-Ray 필름에 1분간 노출시켜 발현정도를 알아보았다.

통계처리

모든 자료의 값은 평균±표준편차로 표시하였으며 유의성은 paired Student t-test를 통해 검증하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적인 의의를 두었다.

결 과

수축반응

고혈압 2주 후의 수축반응(n=6)

정상혈관에서의 혈관장력은 KCl(20, 40, 60, 80 mM),

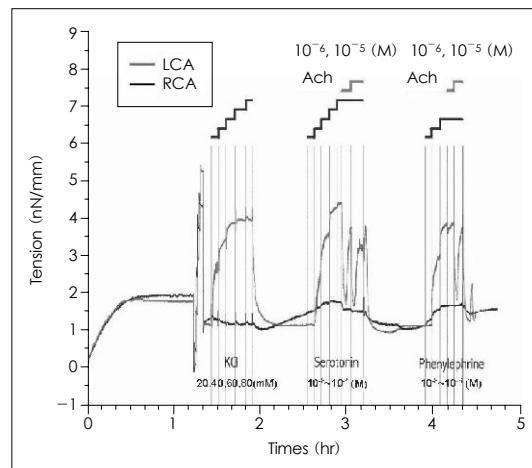


Fig. 3. An example of contractility and relaxation response in the hypertensive right carotid artery (RCA) and normotensive left carotid artery (LCA) 2 weeks after transverse aortic constriction (TAC).

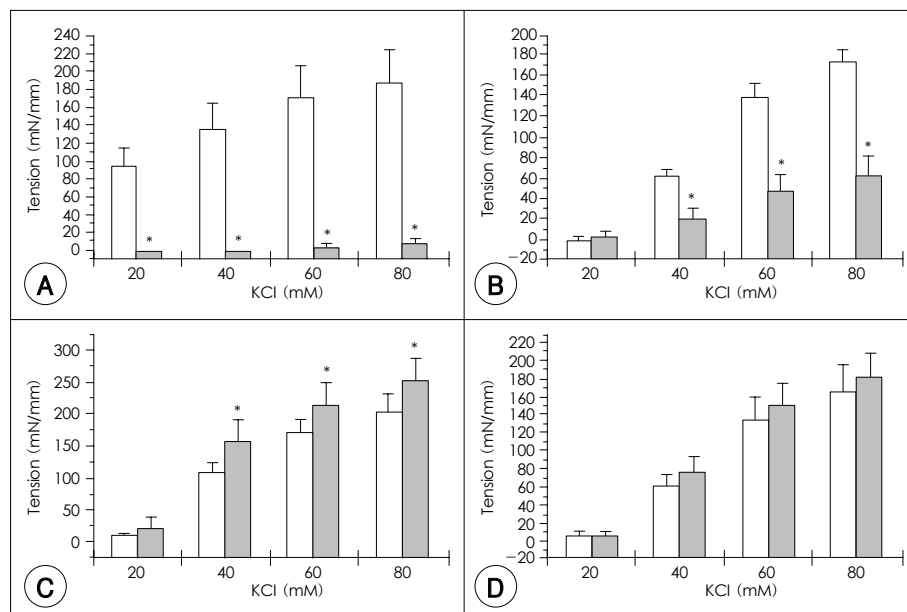


Fig. 4. Effects of pressure overload and recovery on the contractile response to KCl. In the normotensive left common carotid arteries (□), contractile response to KCl was dose-dependently increased. Right common carotid arteries (■) were exposed to hypertension for 2 weeks and relieved from pressure overload by untying of TAC. A : contractile response to KCl was evaluated at 2 weeks after TAC, B : 1 and 3 days after recovery, C : 7 days after recovery and D : 14 days after recovery from hypertension. * : $p < 0.05$ vs left common carotid artery. TAC : transverse aortic constriction.

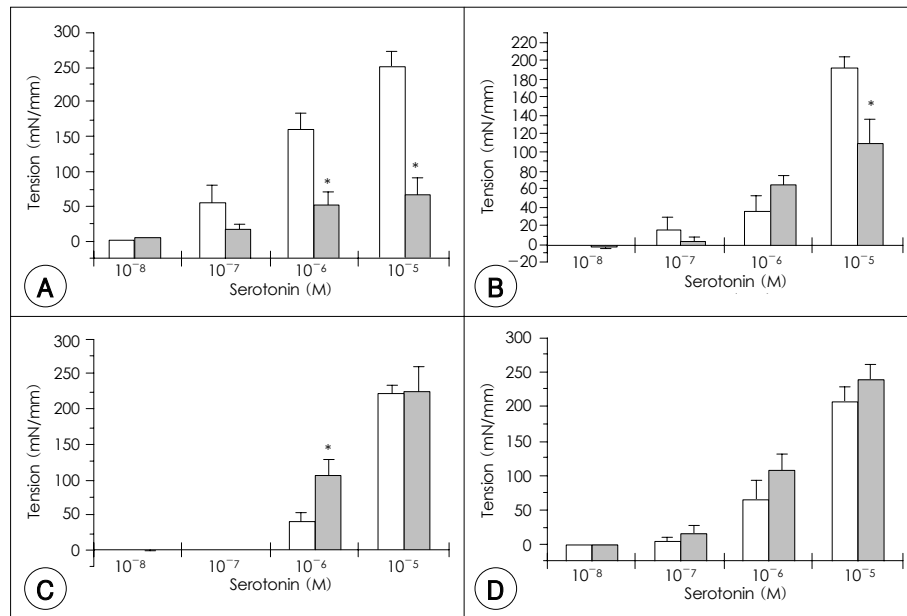


Fig. 5. Effects of pressure overload and recovery on the contractile response to serotonin. In the normotensive left common carotid arteries (□), contractile response to serotonin was dose-dependently increased. Right common carotid arteries (■) were exposed to hypertension for 2 weeks and relieved from pressure overload by untying of TAC. A : contractile response to serotonin was evaluated at 2 weeks after TAC, B : 1 and 3 days after recovery, C : 7 days after recovery and D : 14 days after recovery from hypertension. * : $p < 0.05$ vs left common carotid artery. TAC : transverse aortic constriction.

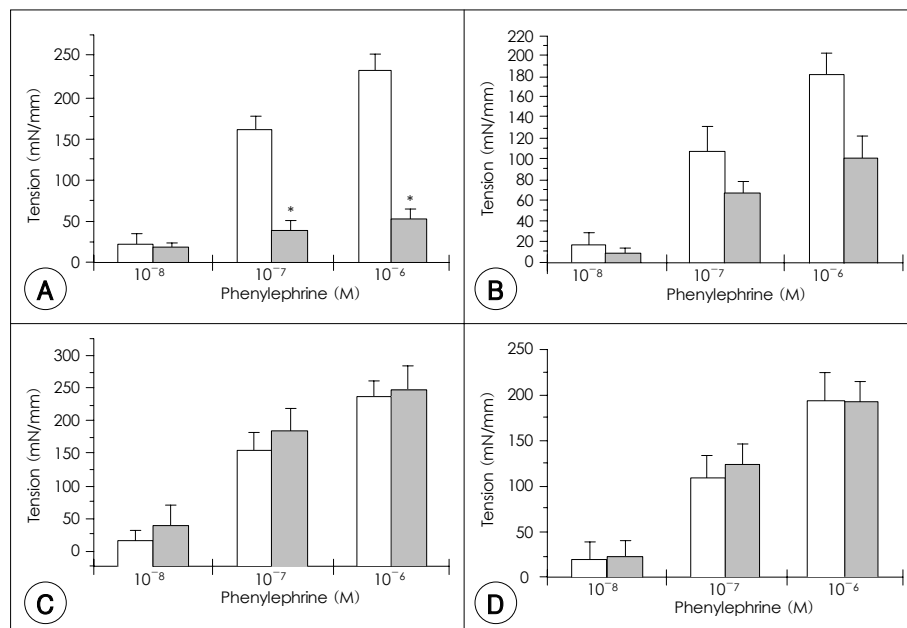


Fig. 6. Effects of pressure overload and recovery on the contractile response to phenylephrine. In the normotensive left common carotid arteries (□), contractile response to phenylephrine was dose-dependently increased. Right common carotid arteries (■) were exposed to hypertension for 2 weeks and relieved from pressure overload by untying of TAC. A : contractile response to phenylephrine was evaluated at 2 weeks after TAC, B : 1 and 3 days after recovery, C : 7 days after recovery and D : 14 days after recovery from hypertension. * : $p < 0.05$ vs left common carotid artery. TAC : transverse aortic constriction.

serotonin(10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), phenylephrine (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M)에서 농도 의존적으로 증가하였다. 고혈압에 2주간 노출된 경동맥의 수축성은 매우 감소하거나 거의 없어졌다(Fig. 3, 4A, 5A, 6A).

혈압정상화 1~3일 후의 수축반응(n=7)

고혈압 혈관의 KCl, serotonin, phenylephrine에 대한 수축성은 고혈압 2주 후 혈관에 비하여 약간 증가하였으나, 정상혈관에 비하여서는 유의하게 감소한 상태를 유지하였다(Fig. 4B, 5B, 6B).

혈압정상화 7일 후의 수축반응(n=6)

정상혈관에 비교한 고혈압 혈관의 serotonin과 phenylephrine에 대한 수축성 감소현상은 없어졌고(Fig. 5C, 6C), serotonin 10^{-6} M에서는 오히려 고혈압 혈관의 수축성이 유의하게 증가하는 현상이 나타났다(Fig. 5C).

이러한 현상은 KCl에서 더욱 분명하게 나타났는데, KCl의 농도가 40, 60, 80 mM에서 정상혈관에 비하여

고혈압 혈관의 수축성이 오히려 증가되었다(Fig. 4C).

혈압정상화 14일 후의 수축반응(n=10)

정상혈관에 비교한 고혈압 혈관의 KCl, serotonin, phenylephrine에 대한 수축성은 모두 정상화되었다(Fig. 4D, 5D, 6D).

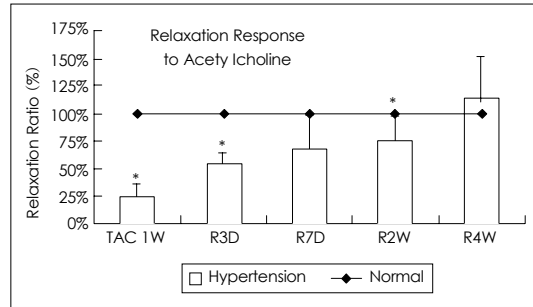


Fig. 7. Endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation of hypertensive or pressure unloaded right carotid artery (RCA). Data were expressed as the percentage of normotensive left carotid artery (LCA). * : $p < 0.05$ vs left common carotid artery.

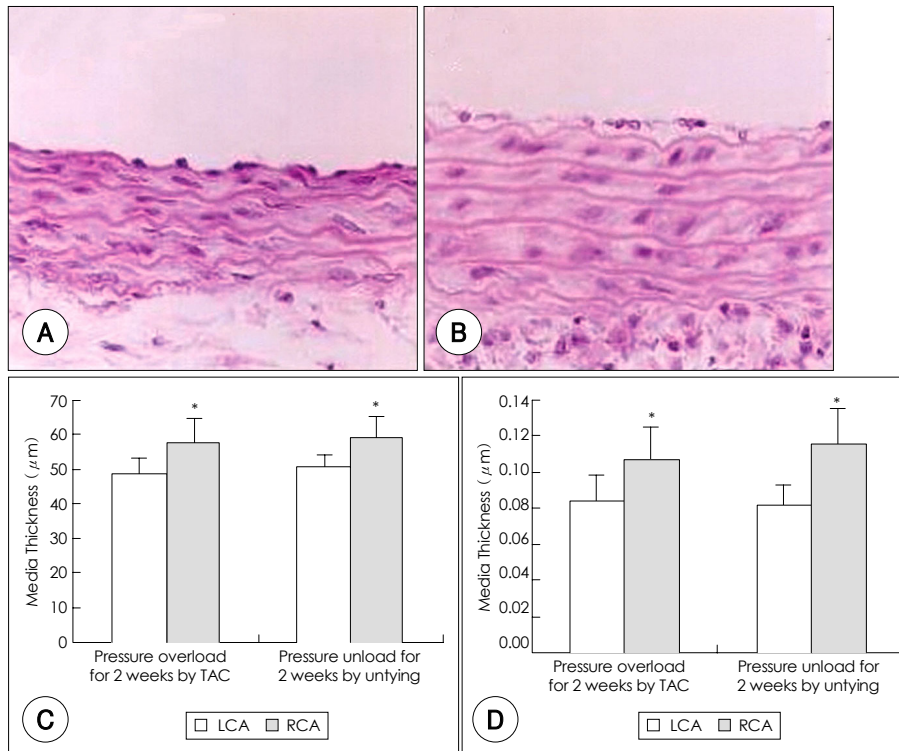


Fig. 8. Photomicrographs of the normotensive left carotid artery (LCA) (A) and hypertensive right carotid artery (RCA) (B). Hypertensive right carotid artery that were exposed to hypertension for 2 weeks by pressure overloading showed increased medial thickness (C) and area (D) without neointimal formation. These structural changes still persisted until 4 weeks of recovery from high blood pressure. * : $p < 0.05$ vs LCA. H & E staining, Magnification $\times 400$.

이상의 결과를 종합하면 혈관의 수축력은 압력 과부하 2주 후에 대부분 소멸되었다. 회복기전이 시작된 후 1주일 후에 부분적으로 과수축현상을 보였고, 2주 후에는 정상 수축력으로 대부분 회복되었다(Fig. 4, 5, 6).

혈관내피세포의존성 이완 반응

Acetylcholine 투여 후 혈관 내피세포 의존성 혈관 이완 반응은 결찰 1주 후(n=2)에 감소하였으며, 2주 후(n=6)에는 수축 자체가 미미하여 정확히 평가가 곤란하였지만 대부분 소멸되었으며(Fig. 3), 압력 부하 제거 후에 2주(n=6)에는 75% 정도의 회복을 보였고, 4주(n=7) 후에 완전히 회복되었다(Fig. 7).

혈관재형성 및 세포고사

압력과부하에 노출된 지 2주 후에 오른쪽 경동맥은 신생내막의 형성을 동반하지 않고 중막의 두께와 면적이 증가하였다. 이러한 변화는 압력과부하의 환경을 정상상태로 회복시킨 후 4주까지도 계속적으로 남아있었다. 압력과부하는 혈관의 외막의 형성 또한 증가시켰다(Fig. 8). Collagen이 붉게 염색되는 Sirius-Red F3BA염색을 실행한 결과 외막의 collagen의 증가가 관찰되었다. 혈관 외막의 두께는 혈압정상 후 4주까지 지속되었지만 collagen의 밀도는 약간 감소한 것으로 보였다(Fig. 9).

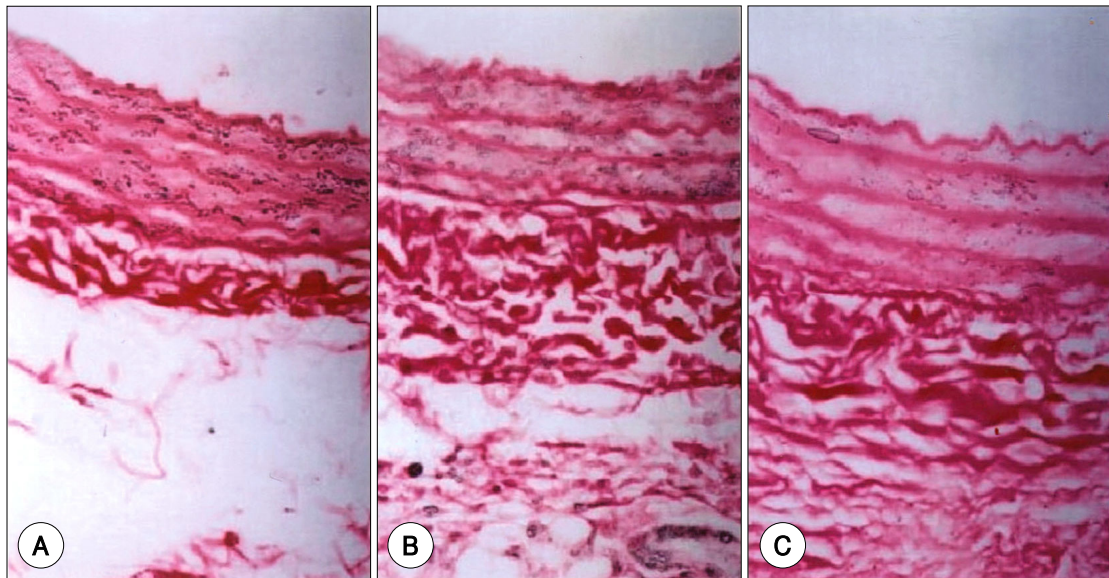


Fig. 9. Photomicrographs demonstrating adventitial tissue formation by Sirius red F3BA staining. A : normal vessel, B : hypertensive right carotid artery exposed pressure overload for 2 weeks, C : pressure unloaded right carotid artery for 4 weeks by untying. Magnification $\times 400$.

압력과부하에 노출된 지 2주 후에 오른쪽 경동맥의 내막에서 TUNEL stain 양성 세포가 매우 증가한 양상을 보였다. 이러한 변화는 혈관의 중막부위에서는 발견되지 않았고, 혈압과부하를 정상으로 회복시키면서 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보였으며 2주 후에는 발견할 수 없었다(Fig. 10).

수술 2주 후에 관류 고정없이 적출하여 고정한 정상

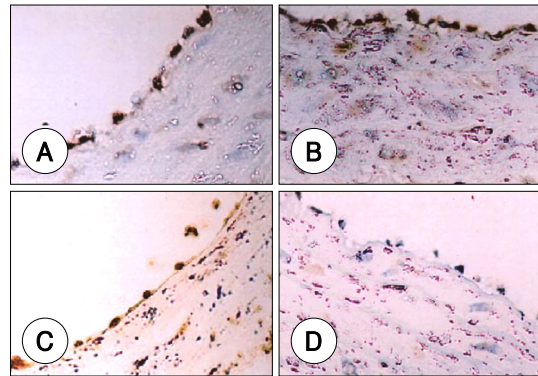


Fig. 10. Photomicrographs demonstrating TUNEL-positive cells (brown color). TUNEL positive cells were detected in the endothelial layer of hypertensive right carotid artery exposed pressure overload for 2 weeks (A), Pressure unloaded right carotid arteries for 3 days (B), 7 days (C), 14 days (D) by untying of TAC. Sections were co-counter-stained with hematoxylin. Magnification $\times 400$. TAC : transverse aortic constriction.

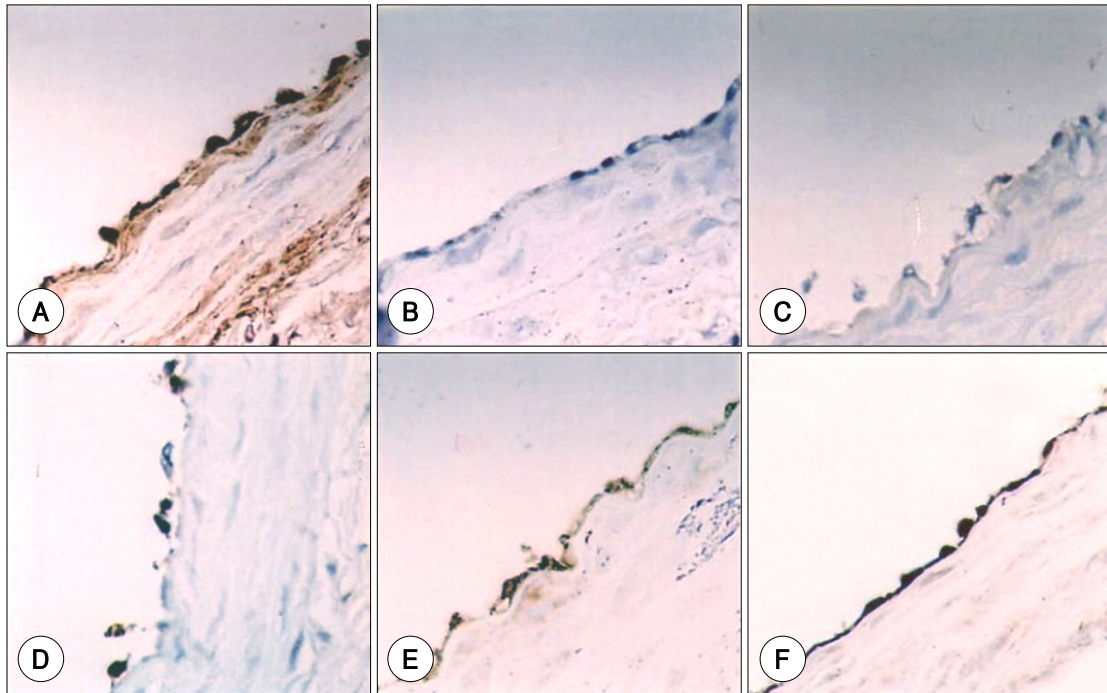


Fig. 11. Immunostaining of carotid arteries with anti-eNOS antibody (brown color). A : normal vessel, B : hypertensive right carotid artery exposed pressure overload for 2 weeks, C-F : pressure unloaded right carotid arteries for 3 days (C), 7 days (D), 14 days (E) and 28 days by untying of TAC (F). Sections were counter-stained with hematoxylin. Magnification $\times 400$. TAC : transverse aortic constriction.

혈관(n=12)의 내경이 $578 \pm 93 \mu\text{m}$ 이고, 고혈압 혈관(n=12)의 내경은 $641 \pm 93 \mu\text{m}$ 으로 고혈압 혈관이 유의하게 커져 있었으나, 혈관 수축성 실험을 위해 80 mmHg의 압력을 준 후 측정된 혈관 내경은 정상혈관(n=12)은 $837 \pm 107 \mu\text{m}$ 이고, 고혈압 혈관(n=12)은 $828 \pm 25 \mu\text{m}$ 이어서 두 혈관사이에 내경의 차이를 보이지 않았다. 이것은 고혈압 혈관의 신축성이 감소되어 있다는 것을 보여주는 결과이다. 이러한 변화는 압력과부하를 해소한 후 2주(n=5) 후에도 여전히 남아 있었다.

Endothelial NO Synthase(ecNOS) 발현

ecNOS는 면역조직검사상 정상 혈관에서 혈관내피세포에서 특이적으로 발현한다. 면역조직학적검사에서 압력과부하에 노출된 2주의 경동맥 조직에서 ecNOS의 발현을 관찰할 수 없었다. ecNOS의 발현은 압력과부하를 정상으로 회복시킨 후 3일까지 관찰할 수 없었고, 1주 후부터 다시 나타나기 시작하여 2주 후에는 거의 정상상태로 회복되었다(Fig. 11).

면역조직검사 소견과 마찬가지로, western blot analy-

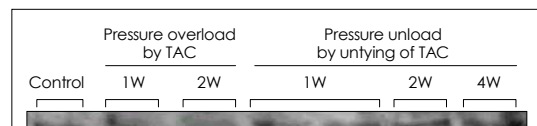


Fig. 12. Protein level of ecNOS in the hypertensive and pressure unloaded carotid arteries analyzed by Western blot. ecNOS protein was not detectable at 1 and 2 weeks after pressure overload and it was normalized from 2 weeks after pressure unloading.

sis에서도 ecNOS 단백질을 압력과부하 1주와 2주 후에는 관찰되지 않았고, 압력과부하 제거 후 1주 후 관찰되었으며, 2주 후부터 거의 정상화되었다(Fig. 12).

고 찰

혈관성질의 변화에 대한 실험은 초기에는 생체모델에서 동맥압을 측정하면서 반응을 유발하는 특정한 매개물질을 찾으려는 노력이 주를 이루었고, 이후에는 동맥혈관을 박리해 내서 수축실험을 하였다. 초기에는 작은

혈관에서의 실험이 가능하지 않았으므로 직경이 큰 혈관에서의 결과를 직경이 작은 혈관에 그대로 적용하여 결과를 해석하였다. 그러나 혈관은 그 크기에 따라 구조적, 기능적으로 달라서 대동맥의 결과를 모든 혈관에 그대로 적용할 수 없다는 사실이 최근에 보고되고 있다.⁹⁾¹⁰⁾

이때까지 사용된 백서를 이용한 고혈압 연구 방법은 spontaneously hypertensive rat (SHR)이나³⁾⁴⁾ Dahl salt-sensitive rat과 같은 유전적으로 고혈압이 발생하는 백서를⁵⁾⁶⁾ 이용하는 방법과 신동맥 협착 등으로 전신적 고혈압을 유도한 백서를 사용하는 방법이다. 신동맥 협착 모델 같은 경우에는 renin-angiotensin계의 활성이 크게 관여하므로 해석상에 문제점이 생길 수 있다.

많은 고혈압 동물 모델이 있지만, 사람 고혈압을 연구할 수 있는 완벽한 모델은 없다. 본 연구에서는 새로운 고혈압 모델을 사용하였는데, 이 고혈압 모델은 편측 경동맥에 압력과부하를 가하여 압력과부하에 의한 동맥의 변화를 살펴볼 수 있는 모델이다(Fig. 1). 이 모델은 압력과부하에 의한 심실비대연구에 이미 사용되어 오고 있는 모델이나,¹¹⁾ 압력과부하에 의한 혈관 변화에 사용된 적은 없다. 이 모델은 다른 동물 모델에 비해 몇가지 장점을 가지고 있다. 첫째로, 개체내에서 고혈압 혈관과 정상혈압 혈관을 비교하므로 개체간의 차이에 따른 문제점을 최소화할 수 있었다. 둘째로, 혈관에 압력 과부하를 주기 시작한 시간을 정확히 알 수 있어 시간에 따른 변화를 관찰할 수 있다. 셋째로, 고혈압의 많은 요인 중에서 압력의 효과만을 비교적 분리하여 실험할 수 있다는 장점이 있었다. 넷째로, 압력과부하를 해소할 수도 있어 혈관의 회복에 관한 연구도 할 수 있다. 이 모델의 제한점으로는 첫째로 혈압 상승과 하강이 급격히 일어난다는 것이다. 이러한 급격한 혈압 변화는 일반적인 본태성 고혈압과는 다른 양상이라는 문제점이 있다. 반면에 갑작스런 혈압 상승이 일어나는 상황에 대한 좋은 모델이 될 가능성이 있다. 둘째로, 혈관에 압력과부하만이 아니라 우측 경동맥에 혈류량의 증가도 가져온다는 문제점이 있다. 셋째로, 좌심실 압력과부하에 따른 natriuretic peptide system의 activation에 따른 영향이 있을 수 있다. 마지막으로 좌측 경동맥은 거의 정상 혈압이었으나 정확히는 약간의 저혈압 환경에서 정상 혈압으로 되는 과정이라고 볼 수 있다는 점이다.

혈관의 수축성의 조절에는 기본적으로 혈관 평활근 세포의 세포내 칼슘저장고와 이온통로가 중요시되며 이에

대한 결과들은 대단히 많이 나오고 있다. 일반적으로 이온통로로는 칼슘통로와 칼륨통로가 혈관의 장력을 결정하는데 중요하다고 여겨지는데 혈관계에는 대체로 4종류의 칼륨통로가 존재하는 것으로 알려지고 있다.¹²⁻¹⁵⁾ 그러나, 고혈압 혈관에서의 이온통로의 변화에 대해서는 아직 많이 알려져 있지 않고 이러한 변화가 실제 혈관의 수축성과 어떻게 연결될 수 있는지 명확하게 알려진 바가 없다. 더구나 현재까지는 단일세포를 분리하여 막전압고정법을 시행한 결과들 간에 그 결과가 상호 일치하지 않아 그 기전을 해석하기 어려운 상태인데, 이들 문제점의 일부는 단일세포의 종류가 균일하지 않다는 것으로 해석된다. 기본적으로 이온통로의 변화가 직접적인 수축성의 변화를 보여주는 것은 아니며 결국 수축실험의 결과와 맞추어서 해석해야만 의미를 가질 수 있다. 따라서 소혈관용 Myograph를 이용한 소동맥에서의 수축실험이 가장 중요한 근간 자료가 되고 있다.

SHR에서 알려진 소혈관의 수축성은 일치하지 않는다. 고혈압에 의해서 수축성이 감소한다는 보고들¹⁶⁾¹⁷⁾과 증가한다는 보고들¹⁸⁾¹⁹⁾ 또 변화가 없다는 보고들²⁰⁻²²⁾이 모두 존재한다. 아마도 이러한 차이는 SHR이 나이가 들면서 고혈압이 서서히 진행하기 때문에 노화, 고혈압의 정도, 혈관의 hypertrophy의 정도 등의 여러 인자가 다르기 때문으로 여겨진다. 이 실험 결과는 수축성이 감소하는 것으로 나타났으며 이는 급격한 50 mmHg 이상의 압력 과부하에 의해서는 혈관의 수축성이 감소하는 것으로 해석할 수 있다. 고혈압의 발생이 서서히 진행된다면 세포 비후를 유발할 수 있다. 수축력이 증가하는 경우는 주로 세포의 hypertrophy가 오는 기전과 연관된 것일 가능성이 많으며,¹⁷⁾ 이는 안지오텐신 II를 비롯한 여러 호르몬의 작용과 연관되어 있다.

고혈압의 결과로 혈관의 이완성이 소실되는 것은 가장 중요한 현상중의 하나인데, 이것은 주로 섬유화가 증가함에 기인한다. 그러나, 평활근 세포의 기능 부전도 관여할 수 있을 것이다. 이번 실험 결과는 이 두 가지 과정이 관여할 가능성을 보여주고 있다. 압력과부하가 있으면 결체조직의 형성이 조장될 수 있을 것으로 생각할 수 있고, 본 실험에서 조직점사상 혈관 외막에서 섬유화가 증가하였다. 비록 세포 고사가 중막에서는 증가하지 않았지만, 압력과부하상태에서 감소되어 있던 혈관의 수축력이 압력과부하 후에 회복되는 것을 보면 혈관평활근세포의 기능 부전 또한 관여할 가능성도 있다. 아직 이

기능 부전이 평활근세포의 위축에서 오는지, 평활근세포 주위의 결합조직의 증가에 기인하는지, 평활근세포내부의 수축에 관여하는 부분의 변화에 의한 것인지는 분명하지는 않다.

고혈압에 의하여 혈관이 경직되고 이완성이 감소하였다는 증거는 본 실험의 다른 결과에서도 관찰할 수 있었다. 본 실험은 혈관의 수축성 검사 및 분자 생물학적 검사를 위해 관류 고정을 하지 않았다. 그래서 혈압이 0 mmHg인 상태로 고정되었다고 볼 수 있다. 압력과부하 2주 후 고정된 고혈압 혈관의 내경이 정상 혈관의 내경보다 유의하게 컸다(HT vs control ; $641 \pm 93 \mu\text{m}$ vs $578 \pm 93 \mu\text{m}$). 혈관 수축성 실험을 위해 80 mmHg의 압력을 주었는데 이렇게 하면 혈관의 내경은 늘어날 것이다. 만약 신축성과 이완성이 좋다면 더 많이 늘어날 것으로 기대할 수 있다. 80 mmHg의 압력을 주고 측정 한 혈관 내경은 0 mmHg인 상태로 고정된 고혈압 혈관의 내경이 정상 혈관보다 컸음에도 불구하고, 양 혈관 사이에 차이가 없었다(HT vs control ; $828 \pm 25 \mu\text{m}$ vs $837 \pm 107 \mu\text{m}$). 이것은 고혈압 혈관의 신축성과 이완성이 감소되어 있다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 변화는 압력과부하를 해소한 후 2주 후에도 여전히 남아 있어 혈관 경직성은 혈압 정상화 이후에도 상당 기간 지속될 수 있다는 것을 보여주었다.

혈관내피세포는 혈액학적 변화와 혈액을 통한 각종 신호에 감지하고 혈관에 작용하는 물질들을 분비한다. 이러한 것에 장애가 생기면, 혈관수축, 백혈구 침착, 혈소판 활성화, 세포분열, 산화, 혈전 형성, 혈액응고장애, 염증 반응, 죽상경화 등이 조장된다. 혈관내피세포의 장애가 고혈압에서 일어나고 동맥경화를 잘 일어나게 한다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다.²³⁾²⁴⁾ 본 연구에서는 혈관내피세포의 기능을 평가하기 위하여 혈관내피세포의존성 혈관이완반응, 혈관내피세포고사, ecNOS 발현을 관찰하였다. Acetylcholine은 혈관내피세포로부터 혈관을 이완시키는 물질의 분비를 자극하여 혈관이완을 유도한다.²⁵⁾ Nitric oxide는 혈관 장력과 반응성을 유지하는 역할을 하는 혈관내피세포에서 분비되는 주된 이완물질이다.²⁶⁾ 압력과부하 1주 후에는 acetylcholine성 혈관이완 반응이 감소하였고 2주 후에는 대부분 수축자체가 경미하거나 거의 사라져버려 측정이 어려웠으나 수축이 있어 실험이 가능한 경우에는 역시 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 혈관내피세포기능부전의 증거

가 될 수 있다. 압력과부하 2주 후에 혈관내피세포층에 세포고사가 증가하고 ecNOS의 발현이 사라지는 것과 잘 일치되는 소견이다. 세포고사가 중막에서는 증가되지 않았다. 혈관내피세포는 압력과부하에 약하고, 혈관평활근세포는 비교적 강하다고 시사하는 소견이다. 압력과 부하를 해소한지 2주 후에 세포고사정도와 ecNOS 발현은 정상화되었음에도 불구하고 acetylcholine에 의한 이완반응은 여전히 억제되어 있었다. 이러한 현상은 잔존된 혈관내피세포의 기능부전, 결합조직형성의 증가 및 혈관평활근 세포의 이상 등으로 설명할 수 있을 것이다.

고혈압은 중막의 두께와 면적을 증가시키고, 외막의 섬유화를 조장하였다. 압력과부하 해소 2~4주 후에는 혈관의 수축능과 이완능이 정상화되었음에도 불구하고, 이러한 변화는 4주 후에도 여전히 사라지지 않았다. 혈관의 내막중막 두께의 증가와 혈관의 경직성은 심혈관 질환의 위험인자이기 때문에 이러한 결과들은 중요한 것으로 생각되며, 형태학적인 변화를 감소시키는 방법들에 대한 연구 및 형태학적 변화가 생긴 후 빠르게 회복할 수 있는 방법에 대한 또 다른 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 재미있는 현상을 발견할 수 있었다. 첫째로, 혈관에 50 mmHg 이상의 갑작스런 압력과부하가 걸렸을 때는 혈관수축성이 감소한다는 것이다. 이런 것은 임상적으로 갑작스런 혈압의 상승이 일어나는 경우에 적용될 수 있을 것이다. 예를 들자면 갑작스런 혈압의 상승이 일어나 뇌혈관의 수축성이 감소(자동조절현상이 파괴)되며 hypertensive emergency를 일으키는 과정이나 고혈압 치료 중에 갑자기 혈압강하제를 중지하는 경우 등에 적용될 수 있을 것이다. 둘째로, 다시 수축성이 회복될 때 과도한 보상기전의 시기가 존재할 가능성이 있다는 것이다. 회복과정에서의 과도한 보상수축시키는 KCl과 serotonin에 의한 실험에서 잘 보여 주었다. 그러나, phenylephrine에서는 이러한 현상을 관찰할 수 없었다. 이러한 약제간 차이는 혈관수축에는 많은 내피세포와 혈관평활근세포에 관여하는 대사경로가 있고 각 약제에 관계되는 대사 경로의 차이 때문에 기인할 수도 있다. 혹은, Nitric oxide의 내피세포에서 분비능 회복보다 내피세포의 수축물질 분비능 회복이 더 빨라서 회복시 과도한 수축반응이 일시적으로 나타날 가능성도 있을 것이다.

본 연구를 요약하여 보면, 압력과부하에 의한 혈압의 상승은 혈관의 수축력과 이완력이 감소 혹은 소실되는 생리학적인 변화, 혈관 내피세포의 고사, 중막의 두께와 면적 및 외막의 섬유화가 증가되는 구조적 변화, ecNOS의 발현이 소실되는 분자생물학적 변화가 발생하며, 압력과부하를 제거하여 정상혈압으로 회복시키면 이러한 변화들은 가역적이었으나 균일한 양상을 보이지는 않았다. 즉 혈관의 수축능은 혈압이 정상화될 때 과보상에 의하여 수축성이 오히려 증가되었다가 2주 후에 정상으로 돌아왔으며 혈관 내피세포의 고사 정도나 ecNOS의 발현이 2주 후에는 정상화되는데 불구하고, 혈관의 이완능은 정상화 되는데 4주가 걸리고 구조적인 변화는 계속 남아있었다. 본 연구를 통해 알게된 이러한 사실들은 고혈압의 이해와 치료에 유용하게 사용될 수 있는 기초 자료가 되리라 생각된다.

요 약

배경 및 목적 :

혈관계는 고혈압에 노출되거나 항고혈압 치료를 받은 후 형태학적·기능학적 변화를 보인다. 고혈압에 따른 변화를 본 연구들이 있으나, 이들은 자발성 고혈압 환경과 같은 유전적으로 정상과 다른 쥐를 연구하거나, 고혈압의 형성과정만을 실험하였다. 그러나, 본 연구에서는 환경의 경동맥에서 2주간의 고혈압을 유발한 후 다시 혈압을 정상화하여 4주간의 변화를 관찰하여 고혈압의 발생 및 치료 후의 생리학적인, 형태학적, 분자생물학적 변화를 모두 관찰하였다.

방 법 :

35마리의 Sprague-Dawley rat의 횡행동맥을 부분적으로 결찰(transverse aortic constriction, TAC)함으로써 우측 경동맥은 고혈압이 되고 좌측 경동맥은 정상혈압이 유지하는 모델을 생성하고 수술 2주 후에 압력과부하에 의한 우측 경동맥 변화를 관찰하였다. TAC 2주 후에 결찰을 풀어줌으로써 압력과부하를 제거하여 우측 경동맥을 정상혈압으로 회복시킨 1일, 3일, 7일, 14일, 그리고 28일 후에 우측 경동맥의 변화를 관찰하였다.

결 과 :

우측 TAC의 제거로 정상혈압으로 회복시키면 혈관의 수축능은 점진적으로 호전되며 7일 후에는 일시적인 과수축현상을 보였으나 14일 후에는 정상 수축력으로 대

부분 회복되었다. 우측 경동맥의 내피세포 의존성 이완 반응은 2주간 고혈압에 노출되면 대부분 소멸되었으나, 정상혈압으로 회복시키면 혈관의 내피세포 의존성 이완 능이 14일 후에는 75%, 28일 후에는 완전히 회복되었다. 압력과부하에 의한 2주간의 혈압 상승은 우측 경동맥의 중막의 두께와 면적을 증가시키고, 혈관 외막의 섬유화를 증가시키는 혈관재형성을 나타내었다. 이러한 변화는 정상 혈압으로 회복시킨 4주 후까지도 계속적으로 잔존하였다. 우측 경동맥에 2주간의 압력과부하를 가하였을 때 혈관의 내막에서만 세포고사가 증가하여 혈압 정상화 1주까지도 남아있었으나 2주 후에는 세포고사가 관찰되지 않았다. 고혈압에 2주간 노출된 우측 경동맥은 ecNOS의 발현이 소실되었으며 TAC의 제거로 압력과부하를 없애주면 2주 후 정상수준으로 회복되었다.

결 론 :

압력과부하에 의한 혈압의 상승은 혈관의 수축력과 이완력이 감소 혹은 소실되는 생리학적인 변화, 혈관 내피세포의 고사, 중막의 두께와 면적 및 외막의 섬유화가 증가되는 구조적 변화, ecNOS의 발현이 소실되는 분자생물학적 변화가 발생하며, 압력과부하를 제거하여 정상혈압으로 회복시키면 이러한 변화들은 가역적이었으나 균일한 양상을 보이지는 않았다.

중심 단어 : 고혈압 ; 동맥 ; 수축능 ; 혈관재형성 ; Nitric oxide.

본 연구는 2000년도 대한 순환기학회 학술연구비의 지원으로 이루어졌음.

JS Kwon and SJ Lee contributed equally to this work.

REFERENCES

- 1) Rusch NJ, de Lucena RG, Wooldridge TA, England SK, Cowley AW Jr. A Ca^{2+} -dependent K^{+} current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:301-7.
- 2) Holtz J. Peripheral circulation: fundamental concepts, comparative aspects of control in specific sections and lymph flow. In: Greger R, Windhorst U, editor. *Comprehensive Human Physiology*. Berlin: Springer; 1996. p.1865-916.
- 3) Li P, Ferrario CM, Brosnihan KB. Losartan inhibitors thromboxane A_2 -induced platelet aggregation and vascular constriction in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:198-205.
- 4) Gray GA, Clozel M, Clozel JP, Baumgartner HR. Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993;22:569-76.
- 5) Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA. Heme

- oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in dahl rats. *Hypertension* 2003;41:149-55.
- 6) Boegehold MA. Microvascular structure and function in salt-sensitive hypertension. *Microcirculation* 2002;9:225-41.
 - 7) Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976;260:617-9.
 - 8) Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977;41:19-26.
 - 9) Archer SL. Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J Lab Clin Med* 1996;127:524-9.
 - 10) Sasaki S, Kobayashi N, Dambara T, Kira S, Sakai T. Structural organization of pulmonary arteries in the rat lung. *Anat Embryol* 1995;191:477-89.
 - 11) Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8277-81.
 - 12) Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989;245:177-80.
 - 13) Benham CD, Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells of rabbit jejunum and guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol* 1986;371:45-67.
 - 14) Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch* 1987;409:561-8.
 - 15) Hirst GD, Silverberg GD, van Helden DF. The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J Physiol* 1986;371:289-304.
 - 16) Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension* 2001;37:313-21.
 - 17) Qiu HY, Valtier B, Struyker-Boudier HA, Levy BI. Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995;33:159-70.
 - 18) Clark JF, Radda GK, Boehm EA. The effects of anti-hypertensive therapy on the structural, mechanical and metabolic properties of the rat aorta. *J Muscle Res Cell Motil* 2000;21:255-67.
 - 19) Nunes JP, Guimaraes S. Wall tension and contraction of the aorta in 6-month-old spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 2000;20:265-9.
 - 20) Chamiot-Clerc P, Colle MH, Legrand M, Sassard J, Safar ME, Renaud JF. Evidence for a common defect associated with pressure in the aorta of two hypertensive rat strains. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:883-8.
 - 21) Hsu MM, Lai CT, Hsieh CC, Lai GM, Lau YT. Vascular contractile properties in hypertension: I. a study of testing methods. *Chin J Physiol* 1993;36:95-9.
 - 22) Kam KL, Hendriks MG, Pijl AJ, van Marle J, van Veen HA, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Contractile responses to various stimuli in isolated resistance vessels from simultaneously hypertensive and streptozotocin-diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:167-75.
 - 23) Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:23-37.
 - 24) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
 - 25) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
 - 26) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.