

Nitric Oxide에 의한 혈관내피세포 내 Ca^{2+} 조절 기전 : Cyclic GMP 의존적 및 비의존적 기전

부평 세림병원 내과,¹ 이화여자대학교 의과대학 생리학교실,² 내과학교실³
전성희¹ · 설근희² · 서석효² · 박성훈³

Nitric Oxide-Induced Intracellular Ca^{2+} Modulation in Macrovascular Endothelial Cells

Seong-Hee Jeon, MD¹, Geun-Hee Seol,² Suk-Hyo Suh, MD² and Seong-Hoon Park, MD³

¹Department of Internal Medicine, Bupyeong Serim Hospital, Incheon, ²Department of Physiology and

³Internal Medicine, Ewha Womans College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Nitric oxide (NO) reduces the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in smooth muscle cells, whereas the effect of NO on $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells is still controversial. Therefore, the effect of NO on the $[Ca^{2+}]_i$, and its mechanism in mouse aortic endothelial cells (MAEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were examined. **Materials and Methods :** In primary cultured MAEC and HUVEC, cells were loaded with fura 2-AM and $[Ca^{2+}]_i$ and measured using a microfluorometer. **Results :** The NO donor, sodium nitroprusside (SNP), reduced the $[Ca^{2+}]_i$ in 72% of the cells tested (n=100). In the remaining cells, the effect of SNP was biphasic, or the $[Ca^{2+}]_i$ was increased. In addition, the membrane-permeable cGMP, 8-bromo cGMP, decreased the $[Ca^{2+}]_i$. The effects of SNP and 8-bromo cGMP were inhibited by the soluble guanylate cyclase inhibitor, 1H-[1,2,4] oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), and the cGMP-dependent protein kinase inhibitor, KT5823, respectively. In contrast, in the presence of 8-bromo cGMP or ODQ, SNP increased the $[Ca^{2+}]_i$. **Conclusion :** These results suggest that NO inhibits the $[Ca^{2+}]_i$ through a cGMP-dependent mechanism and increases the $[Ca^{2+}]_i$ through a cGMP-independent mechanism. (Korean Circulation J 2004;34(6):600-609)

KEY WORDS : Endothelium ; Intracellular calcium ; Cyclic GMP ; Nitric oxide.

서 론

혈관내피세포는 혈압, 혈류 속도 등과 같은 자극이나 주변 세포에서 분비된 물질들에 의한 자극 등 물리적 혹은 화학적 자극에 반응하여 여러 가지 혈관활성물질들

을 분비하여 혈관 내경을 조절한다.¹⁾ 이러한 혈관활성 물질들은 혈관평활근을 수축 혹은 이완시키는데, 혈관을 이완시키는 내피세포성 이완인자들(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)로는 nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor, prostaglandin I_2 등²⁻⁶⁾이 있으며 혈관평활근을 수축시키는 물질로는 endothelium-derived contracting factor와 endothelin이 있다.^{6,7)}

이중 NO는 가장 강력한 혈관 이완 작용을 하는 물질로 그 작용 기전은 다음과 같다. 혈관내피세포에서 분비

논문접수일 : 2004년 2월 13일
심사완료일 : 2004년 3월 19일
교신저자 : 박성훈, 158-710 서울 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (02) 2650-5018 · 전송 : (02) 2650-5424
E-mail : pseongh@ewha.ac.kr

된 NO는 직접 혈관평활근 세포막에 있는 이온통로들에 작용하거나 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)를 형성하여 작용하는데,⁸⁾ 증가된 cGMP는 혈관평활근 세포내 Ca^{2+} 농도(intracellular Ca^{2+} concentration, $[Ca^{2+}]_i$)를 감소시키고 그 결과 혈관평활근이 이완하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 이와 같이 NO는 심근세포나 혈관평활근세포와 같은 흥분성 세포에서 $[Ca^{2+}]_i$ 감소를 유발 이완시키는 것으로 잘 알려져 있으나, 혈관내피세포와 같은 비흥분성 세포에 대한 효과는 명확하지 않다. 평활근세포와는 달리 NO는 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC), porcine aortic endothelial cell과 같은 혈관내피세포에서 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시켰다는 보고가 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 한편 NO에 의하여 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 가 감소됨도 보고된 바 있어¹³⁾ NO가 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과는 명확하지 않으며 그 기전 역시 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 혈관내피세포에서 NO가 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과와 그 기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

혈관내피세포의 배양 : 일차 배양(Primary explant) 기법

쥐의 대동맥 혈관내피세포(mouse aortic endothelial cell, MAEC)는 일차 배양 기법을 이용하여 분리 배양하였다. 8~16주된 쥐(ICR mouse)를 암수의 구별 없이 사용하였다. Pentobarbital sodium(40 mg/kg)과 heparin(500 U)을 복강 주사하여 마취시킨 후 대동맥을 분리 적출하고 phosphate-buffered saline(PBS, Dulbecco without Ca^{2+} , Mg^{2+})속에서 외막주변 지방과 결합조직을 깨끗이 제거하였으며 2 mm 길이로 짧게 자른 후 장축으로 잘라 내면을 공개하였다. 다음 6-구멍판(well plate)에 넣은 소량(약 300 μ L)의 Matrigel® (Becton Dickinson, MA, USA) 위에 혈관 조각을 내면이 Matrigel에 면하도록 놓고 배지를 소량 첨가하여 혈관 조각이 Matrigel에 잘 붙도록 하였다.¹⁴⁾ 4~7일 후 혈관 조각을 제거하고 혈관 조각에서 자라난 혈관내피세포들이 자라게 하였다. 계대 1은 Matrigel 속에 있는 혈관내피세포들을 배지를 제거한 다음 dispase(Becton Dickinson, USA) 2 mL/10 cm²(100 U)를 넣고 90분간 노출시킨 다음 12-구멍판에 뿌려서 만들었다. 계대 2부터는 trypsin을 이용하는 일반적인 방법으로

만들었다.¹⁵⁾ 계대 4까지는 형태적인 변화가 없었으며 본 실험에는 계대 2까지만 이용하였다. HUVEC으로는 인간제대정맥 내피세포를 hybridization하여 만든 permanent human cell line인 EA.hy926(EA) cell을 이용하였다.¹⁶⁾

von Willibrand's Factor(vWF) 유무를 통한 혈관내피세포의 확인

vWF 발현 유무를 면역형광기법(immunohistochemical technique)을 이용하여 확인하였다. 배양한 MAEC들을 tris(hydroxymethyl) aminomethane(Tris)-buffered saline(TBS, 50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7.5)으로 세척한 다음 methanol과 acetone을 7 : 3의 비율로 혼합한 용액으로 고정하였다. 고정된 세포들은 TBS로 3번 세척한 다음 0.25% Triton X-100/TBS에 30분 동안 노출시키고 TBS로 3번 세척하였다. 다음 1시간 동안 5% BSA(in TBS)로 처리하고 4°C에서 rabbit-anti-human vWF Ab(DAKO A0082)(1 : 300 in TBS/1% BSA)에 밤새 노출시켰다. vWF Ab에 노출된 세포들을 0.1% Tween 20이 있는 TBS로 3번 세척하고 실온에서 alkaline phosphatase-conjugated monoclonal anti-rabbit IgG(Sigma A-2556 1 : 200)에 한시간 동안 노출시킨 다음 TBS/0.1% Tween 20로 3번 세척하였다. 다음 NBT(nitro blue tetrazolium)\ BCIP(5-bromo-4-chloro dolyphosphate-p-toluidin) (Sigma 5656)으로 10분간 발색시킨 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

저밀도지단백(Low density lipoprotein, LDL) 섭취 유무를 통한 혈관내피세포의 확인

12 mm cover glass를 24-구멍판에 넣고 gelatin(1%) 처리를 하고 약 10,000개의 혈관내피세포를 뿌린 다음 24시간 동안 배양하였다. 다음 Dil-acetylated LDL(Molecular probe L3484)을 10 μ L/mL 넣고 4시간 동안 노출시켰다. 다음 PBS로 2번 세척한 후 3% formaldehyde로 고정하고, fluorescence mounting medium을 한 방울 떨어뜨린 후 형광현미경으로 관찰하였다.

세포내 Ca^{2+} 농도 측정

Ca^{2+} 과 결합할 수 있는 막투과성 형광 표지자인 fura

2-AM(acetoxymethyl ester form)을 배양액에 첨가하여 혈관내피세포에 37℃에서 25분간 노출시킨 다음 실험에 사용하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 측정은 역위현미경과 microscope photometer(D-104, Photon Technology International Inc, U.S.A.) 등으로 구성된 미세형광 측정기를 사용하였다. Fura 2-AM이 부하된 세포에 340 nm와 380 nm의 두 파장을 번갈아 조사시키고 그 빈도는 매초 10회로 하였다. Fura 2-AM으로부터 방출되어 나오는 510 nm의 형광을 photomultiplier tube를 이용하여 측정하고 그 비(F340/F380)로 $[Ca^{2+}]_i$ 를 계산하였다(Felix, version 1.4, PTI, USA).

F340/F380(R)

$$=K_d \times [(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)] \times Sf2/Sb2$$

(R_{\min} , R_{\max} : Ca^{2+} 이 없거나 Ca^{2+} 으로 포화된 경우의 R, Sf2 : Ca^{2+} 이 없는 상태에서 F380, Sb2 : Fura 2가 Ca^{2+} 으로 포화된 상태에서 F380, K_d : 분리 상수)

Ca^{2+} 이 없는 실험용액으로는 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 μ M Fura를, Ca^{2+} 이 높은 용액은 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 2 μ M Fura를 혼합하여 사용하였다. 그리고 10 mM EGTA와 CaEGTA를 이용하여 Ca^{2+} 농도를 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2 μ M에 고정된 용액을 만들고 이 용액들을 실험용기에 30 μ L씩 떨어뜨린 다음 형광을 측정하였다. 다음 $(R-R_{\min})/[Ca^{2+}]$ 를 Y 값으로 ($R-R_{\min}$)을 X 값으로 그린 그래프의 기울기(m)를 구하고 K_d 는 다음 공식을 이용하여 구하였다.

$$K_d = -1/(m \times Sf2/Sb2)$$

실험용액과 시약

세포의 용액은 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 그리고 10 mM glucose를 첨가하여 만들었고 pH는 7.4에 맞추었으며 삼투질농도는 320 mOsm이었다. 혈관내피세포 배양에 사용된 배지는 80 mL Dulbecco's minimum essential medium(GIBCO-BRL 41965), 10 mL fetal calf serum(GIBCO-BRL 10270), 7.5 mg endothelial cell growth supplement(Sigma E-2759), 200 μ L heparin(10 U/mL final), 2 mL penicillin/streptomycin(100 U/mL final, GIBCO-BRL 15070), 1 mL L-glutamine(100x, GIBCO-BRL 25030-024), 그리고 1 mL minimal essential amino acid(100x, GIBCO-BRL 11140-035)를 첨가하여 만들었다. N^G -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)와 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxaline-1-one(ODQ)은 Biomol에서, Fura-2/AM은 Molecular Probe에서 구입하였고 특별한 언급이 없는 시약은 Sigma에서 구입하였다.

통계분석

모든 자료는 Micro Origin 6.0(Microcal Software, USA)을 이용하여 분석하였다. 통계자료는 평균과 표준 오차로 표시하고 paired t-test와 unpaired t-test를 실시하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

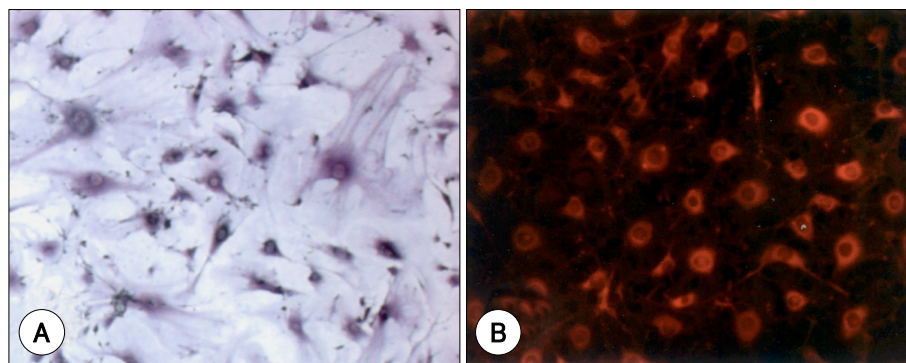


Fig. 1. Characterization of endothelial phenotype of the cells isolated from the inner layer of mouse aorta. A: immunocytochemistry of the explanted cells and a representative staining of the isolated cells with anti-von Willibrand factor antibody. B: LDL uptake test of the explanted cells. LDL : low density lipoprotein.

결 과

혈관내피세포의 확인

vWF는 혈관내피세포 특이인식자 중의 하나이지만 섬유모세포 등에서도 발견된다. 그러나 섬유모세포 등은 저밀도지단백을 섭취하지 못하므로 저밀도지단백 섭취 실험은 혈관내피세포와 섬유모세포를 구분할 수 있다. 배양한 MAEC에는 vWF가 발현되었으며(Fig. 1A), 저밀도지단백 섭취 실험결과 대부분의 세포들이 노랗거나 붉은 형광을 보여 저밀도지단백을 섭취하였음을 알 수 있었다(Fig. 1B). 그러므로 일차배양 기법을 통하여 쥐 대동맥에서 분리된 세포들이 대부분 혈관내피세포임을 알 수 있었다.

혈관내피세포에서 세포내 Ca^{2+} 농도에 미치는 NO의 효과

혈관내피세포에서 NO가 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 에 미치는 영향을 밝히기 위해 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 에 미치는 NO donor들의 효과를 알아보았다. HUVEC(Fig. 2A)과 MAEC(Fig. 2B) 모두 ATP 투여에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 증가하였으며 NO 생성 억제제인 L-NAME를 전처리한 후 NO donor인 so-

dium nitroprusside(SNP)를 투여하면 72%(100세포 중 72세포)의 세포에서 농도 의존적으로 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 감소하였다. 그러나 나머지 세포들에서는 이와는 다른 반응을 보였다. SNP 저농도에서 감소하던 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 고농도(10 μM)에서는 오히려 증가하는 세포들(Fig. 2A), 농도와 관계없이 SNP에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 증가하는 세포들(Fig. 3A), SNP에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 일시적으로 감소한 후 증가하는 세포들(Fig. 3B) 등 세포에 따라 다양한 반응을 보였다.

SNP 뿐만 아니라 NO 생성 억제제인 L-NAME의 효과도 세포에 따라 다른 반응을 보였는데, L-NAME에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 감소되거나(Fig. 3A, 4A) 혹은 증가되는(Fig. 4B) 서로 상반된 반응을 보였다. 이렇게 서로 상반된 반응을 보이는 세포들도 cGMP 효과는 동일하였는데, 두 세포 모두 세포막을 통과할 수 있는 cGMP인 8-bromo cGMP에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 감소하였으며 이러한 8-bromo cGMP의 효과는 cGMP 억제제인 KT5823에 의하여 억제되었다. 즉, SNP와 L-NAME의 효과와는 달리 cGMP의 효과는 세포에 따른 차이가 없이 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 감소시킴을 알 수 있었다. 그리고 SNP

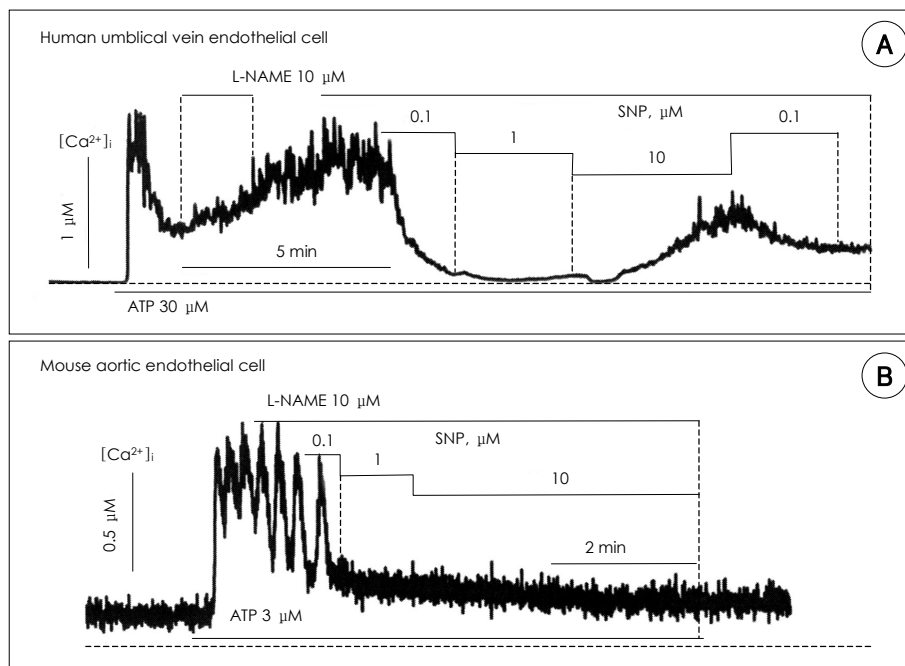


Fig. 2. Inhibitory effect of sodium nitroprusside (SNP) on intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in endothelial cells. SNP suppressed the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) (A) and mouse aortic endothelial cells (MAEC) (B). In some cells, the suppressed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was increased on increasing of SNP concentration (A). L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester, ATP: adenosine triphosphate, SNP: sodium nitroprusside.

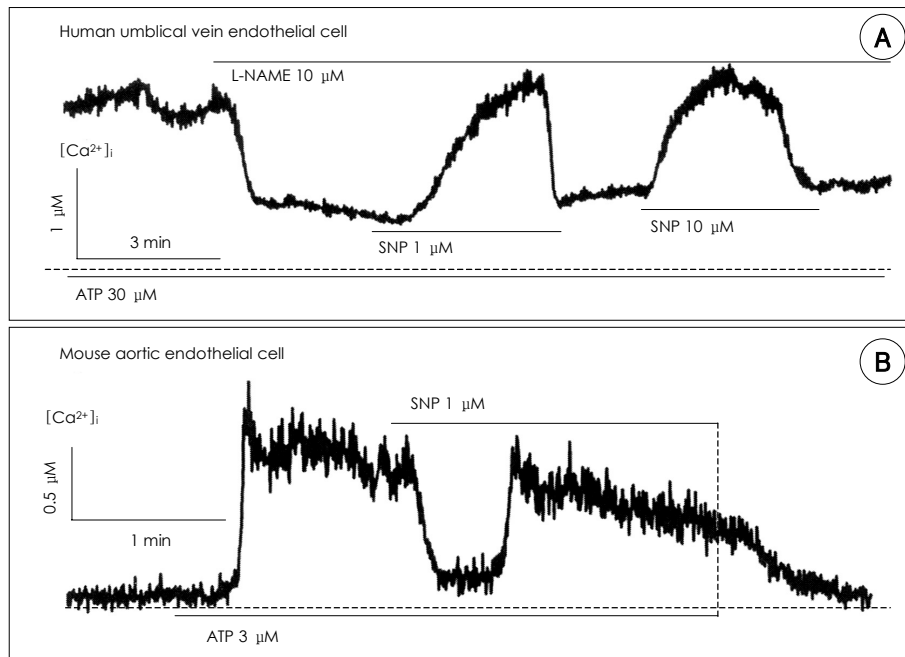


Fig. 3. Various effect of sodium nitroprusside (SNP) on $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells. The increased $[Ca^{2+}]_i$ was suppressed by L-NAME and increased by SNP (A). In some cells, the effect of SNP on $[Ca^{2+}]_i$ was biphasic: SNP decreased $[Ca^{2+}]_i$ transiently and the decreased $[Ca^{2+}]_i$ then was elevated in spite of the presence of SNP (B). L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester, ATP: adenosine triphosphate, SNP: sodium nitroprusside.

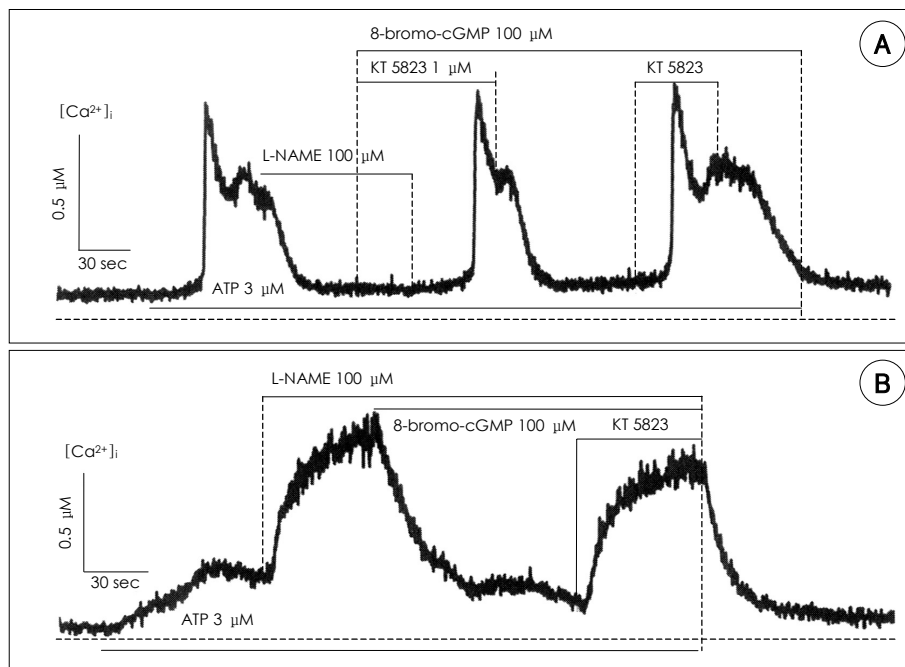


Fig. 4. Various effect of L-NAME on $[Ca^{2+}]_i$ in mouse aortic endothelial cells. In some cells, the increased $[Ca^{2+}]_i$ was suppressed by L-NAME (A) and, in the other cells, $[Ca^{2+}]_i$ was increased by L-NAME (B). L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester, ATP: adenosine triphosphate.

이외에도 S-nitroso-N-acetyl-d,l-penicillamine (SNAP), 3-morpholino-sydnominine-hydrochloride (SIN-1) 등과 같은 NO donor들도 유사한 효과를 보였는데 이러한 결과들로 미루어 NO는 혈관내피세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시킬 뿐만 아니라 증가시킬 수도 있음을 알 수 있었다.

$[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 억제하는 SNP의 효과는 soluble

guanylate cyclase 활성화를 억제하여 NO에 의한 cGMP 생성을 억제하는 ODQ에 의하여 억제되었다(Fig. 5A). 한편 MAEC 뿐만 아니라 HUVEC도 cGMP에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 억제되었으며 cGMP 효과는 cGMP 억제제인 KT5823에 의하여 억제되었다(Fig. 5B). SNP 즉 NO에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 감소하는 세포들은 ATP를 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하였으며 L-NA-

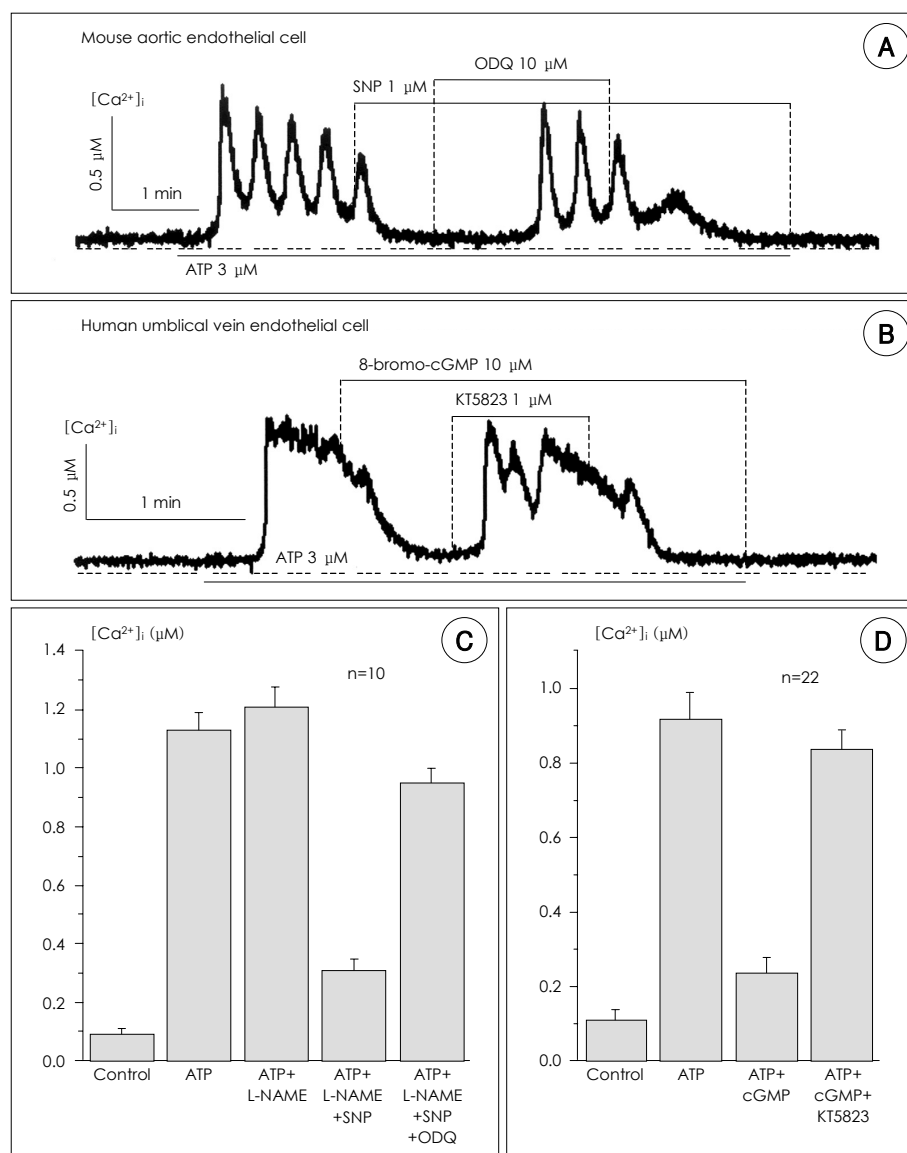


Fig. 5. cGMP-dependent inhibitory effect of sodium nitroprusside (SNP) on $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells. The inhibitory effect of SNP on $[Ca^{2+}]_i$ was suppressed by the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ (A) and the increased $[Ca^{2+}]_i$ was inhibited by 8-bromo cGMP (B). Pooled data also showed cGMP-dependent inhibitory effect of SNP on $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells (C, D). cGMP: cyclic guanosine monophosphate, ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxaline-1-one, L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester, ATP: adenosine triphosphate, SNP: sodium nitroprusside.

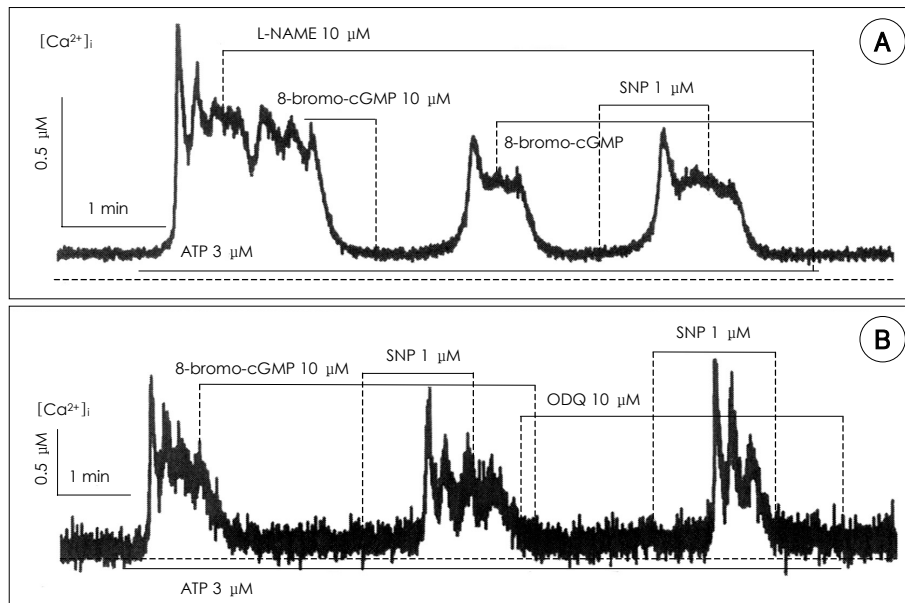


Fig. 6. cGMP-independent stimulatory effect of sodium nitroprusside (SNP) on $[Ca^{2+}]_i$ in mouse aortic endothelial cells. SNP increased $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of 8-bromo cGMP (A) and ODQ (B). cGMP: cyclic guanosine monophosphate, ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxaline-1-one. L-NAME : N^G-nitro-L-arginine methyl ester, ATP: adenosine triphosphate, SNP: sodium nitroprusside.

ME에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 더욱 증가하였다가 SNP에 의하여 감소하였고 ODQ투여로 다시 증가하였다. cGMP에 의한 반응도 SNP와 유사한 반응을 보였는데 ATP를 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 가 $0.11 \pm 0.03 \mu M$ 에서 $0.92 \pm 0.07 \mu M$ 로 증가하였으며 8-bromo cGMP에 의하여 $0.24 \pm 0.04 \mu M$ 로 감소하였다가 KT5823에 의하여 $0.84 \pm 0.05 \mu M$ 로 다시 증가하였다(Fig. 5C, D). 이와 같은 실험결과로 미루어 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 감소 효과는 NO에 의하여 활성화된 soluble guanylate cyclase에 의하여 생성된 cGMP에 의함을 알 수 있었다.

SNP 즉 NO에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하는 효과는 특히 cGMP가 이미 증가된 경우나 cGMP 생성을 억제하면 나타났다(Fig. 6). ATP에 의하여 증가된 $[Ca^{2+}]_i$ 는 8-bromo cGMP 투여로 감소하였지만 이렇게 감소한 $[Ca^{2+}]_i$ 는 cGMP가 고농도로 있는 상태에서 SNP를 투여하는 경우 오히려 SNP에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하였다(Fig. 6A). ODQ를 전처치하여 NO에 의한 cGMP 생성을 억제시킨 경우에도 SNP는 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시켰다(Fig. 6B). 이와 같은 실험결과로 미루어 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가효과는 cGMP 경로를 거치지 않는 cGMP 비의존적 경로를 통하여 일어남을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구는 혈관내피세포에서 NO는 세포내 soluble guanylate cylase를 활성화하여 cGMP 농도를 증가시키는 기전 즉 cGMP 의존적인 기전을 통하여 $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시키지만, cGMP 비의존적인 기전으로는 오히려 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시킬 수 있음을 보여 준다. 혈관내피 세포에서 분비되는 NO는 혈관 구경을 조절하고 혈액 응고를 억제하는 등 혈류역학에 매우 중요한 역할을 함을 고려할 때, NO의 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과에 대한 본 연구결과는 NO 분비에 직접적인 영향을 주는 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 조절기전을 밝히는데 매우 중요할 것으로 사료된다.

NO에 의한 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 조절 기전

NO의 cGMP 의존적 효과는 본 실험결과와 같이 증가된 cGMP에 의하는데 cGMP가 직접 세포내 Ca^{2+} 저장고에서의 Ca^{2+} 유리를 억제하거나, cGMP에 의하여 활성화된 protein kinase G가 세포내 여러 가지 효소와 이온통로들을 인산화하여 이들의 활동을 변화시켜 일어난다. cGMP 비의존적 효과는 NO가 직접 $[Ca^{2+}]_i$

증가를 유발한 결과로 그 기전은 아직 불명확하지만, NO가 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 관여하는 물질과 반응하여 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 유발하였을 것으로 생각할 수 있다. 가능성 있는 기전으로 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 관여하는 물질들의 nitrosylation¹⁷⁾¹⁸⁾ 혹은 다른 radical과 반응하여 형성된 peroxynitrite에 의한 자극¹⁹⁻²¹⁾ 등이 예상되지만 아직 밝혀진 바 없으며 추후 연구가 요망된다. 이와 같이 NO는 여러 가지 경로를 통하여 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 영향을 미치며, 본 실험결과와 같이 NO가 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과가 다양한 것은 서로 상반된 cGMP를 통한 효과와 cGMP를 통하지 않는 효과의 상대적 크기가 세포에 따라 다르게 나타나기 때문으로 생각된다. 즉 cGMP를 통한 효과가 더 크게 나타나는 세포는 NO에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 감소하며 cGMP를 통하지 않는 효과가 더 크게 나타나는 세포는 NO에 의하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하는 것으로 사료된다. 동일한 세포에서는 NO농도에 따라 반응의 차이가 있을 가능성이 있다. 즉, 저농도 NO에서는 cGMP 의존적 기전이 우세하다가 고농도에서는 cGMP 비의존적 기전이 더 크게 나타날 가능성이 있다(Fig. 2A).

한편 혈관평활근세포와는 달리 혈관내피세포에서 NO가 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시키는 효과가 나타나는 것은 혈관내피세포와 같은 비흥분성세포와 혈관평활근세포와 같은 흥분성세포 간에 세포외 Ca^{2+} 유입 기전이 서로 다르기 때문으로 사료된다. 세포외 Ca^{2+} 유입통로는 혈관평활근세포는 voltage operated Ca^{2+} channel(VOC)이며 혈관내피세포는 Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel(CRAC)과 nonselective cation channel(NSC)이다.²²⁻²⁴⁾ VOC는 막전압이 저분극되면 전도도가 증가하여 Ca^{2+} 유입이 증가되고 과분극되면 전도도가 감소하여 Ca^{2+} 유입이 감소한다. 반면에 CRAC과 NSC의 전도도는 막전압의 영향을 받지 않으며 오히려 막전압은 Ca^{2+} 에 대한 원동력(driving force)으로 작용한다. 그러므로 막전압이 과분극되면 VOC와는 달리 CRAC과 NSC를 통한 Ca^{2+} 유입은 증가한다.²²⁻²⁴⁾ NO는 세포막 전압을 과분극시키는데, 그 기전 중의 하나가 Ca^{2+} -activated K^+ channels 활성화로 알려져 있다. 그러므로 혈관평활근세포에서 NO가 Ca^{2+} -activated K^+ channels을 활성화하면²⁵⁻²⁷⁾ 막전압이 과분극되어 VOC가 억제되며 그 결과 $[Ca^{2+}]_i$ 가 감소하였을 것으로 추정

된다. 그러나 막전압 과분극이 $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시키는 효과는 혈관내피세포에서는 일어나지 않는다. 즉, 혈관내피세포에서는 NO에 의하여 막전압이 과분극되면 Ca^{2+} 에 대한 원동력이 증가하여 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가할 수 있다.

한편, NO가 Ca^{2+} -activated K^+ channel을 활성화한다는 보고와는 달리 Haburcak 등²⁸⁾은 NO는 Ca^{2+} -activated K^+ channel에 직접 영향을 끼치지 않는다고 보고하였다. 이와 같이 혈관내피세포에서 NO가 세포외 Ca^{2+} 의 세포내 유입을 관장하는 여러 이온통로들에 미치는 영향은 아직 미진하고 다양한 결과를 보여 NO는 여러 가지 경로를 통해서 이러한 이온통로들에 영향을 미칠 것으로 추정된다. 그리고 cGMP가 혈관내피세포의 이온통로들에 미치는 영향에 대해서는 밝혀진 바가 거의 없으므로 NO가 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 영향을 밝히기 위해서는 이러한 이온통로들에 미치는 NO와 cGMP의 영향을 밝히는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

생리학적 의미

혈관내피세포에서 NO가 분비될 때 NO 농도는 대개 수 μM 범위 내에서 조절되는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ NO의 cGMP 의존적 기전은 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 억제함으로써 NO의 과량 분비를 억제하는 음성 피드백이 기전으로 작용하여 혈관내피세포에서 내피세포성 이완인자의 분비를 조절하는 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 cGMP 비의존적 기전의 역할은 불분명하다. 이 기전이 활성화되면 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시켜 NO 분비를 더욱 증가시키게 된다. SNP 저농도에서 감소하던 $[Ca^{2+}]_i$ 가 고농도에서는 오히려 증가하는 것으로 미루어 cGMP 비의존적 기전은 NO가 과량 분비되는 병적인 상황에서 활성화되어 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시켜 NO 분비를 더욱 증가시키게 될 것으로 추정된다. 그러나 일부 세포에서는 SNP 저농도에서도 $[Ca^{2+}]_i$ 이 증가하는 것으로 미루어 정상적으로도 이 기전이 활성화될 가능성이 있다.

요 약

배경 및 목적 :

혈관내피세포에서 분비되는 nitric oxide(NO)는 혈관평활근세포 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)를 감소시키지만 혈관

내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 영향에 대해서는 다양한 보고가 있으며 그 기전도 명확하지 않다. 이에 본 연구에서는 혈관내피세포에서 NO가 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 영향과 그 기전을 밝히고자 하였다.

방 법 :

일차 배양 기법을 이용하여 분리한 쥐의 대동맥 혈관 내피세포(mouse aortic endothelial cell, MAEC)와 인간제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)에서 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 변화를 측정하였다.

결 과 :

SNP는 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대하여 다양한 반응을 보였다. 농도 의존적으로 $[Ca^{2+}]_i$ 가 감소한 경우는 72%의 세포(총 100세포)에서 관찰되었으며 나머지 세포에서는 오히려 증가하는 경우, 일시적 감소 후 증가하는 경우, 저농도에서 감소하다가 고농도에서 증가하는 경우 등 다양한 반응을 보였다. NO 생성 억제제인 L-NAME도 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대하여 세포에 따라 감소 혹은 증가시키는 서로 상반된 효과를 보였다. 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 는 세포막을 통과하는 cGMP인 8-bromo cGMP에 의하여 감소되었으며, 이러한 8-bromo cGMP의 효과는 cGMP 억제제인 KT5823에 의하여 억제되었다. 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시키는 SNP의 효과는 NO dependent soluble guanylate cyclase 억제제인 ODQ에 의하여 억제되었다. 혈관내피세포를 8-bromo cGMP로 전처리하거나 또는 ODQ로 전처리하고 SNP를 투여하는 경우 저농도에서도 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하였다.

결 론 :

이상의 연구결과로 NO는 혈관내피세포 $[Ca^{2+}]_i$ 를 cGMP 의존적인 기전으로 감소시키며 비의존적 기전으로는 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 혈관내피세포에서 NO는 cGMP 의존적 기전과 비의존적 기전의 상대적인 활성도 정도에 따라서 $[Ca^{2+}]_i$ 에 영향을 미치며 NO 분비에 영향을 줄 것으로 추정된다.

중심 단어 : 혈관내피세포 ; 세포내 칼슘 ; Cyclic GMP ; Nitric oxide.

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10466-0) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- 1) Inagami T, Naruse M, Hoover R. *Endothelium as an endocrine organ. Annu Rev Physiol* 1995;57:171-89.
- 2) Feletou M, Vanhoutte PM. *Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. Br J Pharmacol* 1988;93:515-24.
- 3) Fleming I, Busse R. *NO: the primary EDRF. J Mol Cell Cardiol* 1999;31:5-14.
- 4) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature* 1987;327:524-6.
- 5) Taylor SG, Weston AH. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. Trends Pharmacol Sci* 1988;9:272-4.
- 6) Furchgott RF, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J* 1989;3:2007-18.
- 7) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature* 1988;332:411-5.
- 8) Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. *Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension* 1994;23:1121-31.
- 9) Komalavilas P, Lincoln TM. *Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. J Biol Chem* 1996;271:21933-8.
- 10) Publicover NG, Hammond EM, Sanders KM. *Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2087-91.
- 11) Volk T, Mading K, Hensel M, Kox WJ. *Nitric oxide induces transient Ca^{2+} changes in endothelial cells independent of cGMP. J Cell Physiol* 1997;172:296-305.
- 12) Berkels R, Suerhoff S, Roesen R, Klaus W. *Nitric oxide causes a cGMP-independent intracellular calcium rise in porcine endothelial cells-a paradox? Microvasc Res* 2000;59:38-44.
- 13) Dedkova EN, Blatter LA. *Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells. J Physiol* 2002;539:77-91.
- 14) McGuire PG, Orkin RW. *Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata. Lab Invest* 1987;57:94-105.
- 15) Voets T, Wei L, de Smet P, van Driessche W, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. *Downregulation of volume-activated Cl^- currents during muscle differentiation. Am J Physiol* 1997;272:C667-74.
- 16) Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:3734-7.
- 17) Gong L, Pitari GM, Schulz S, Waldman S. *Nitric oxide signaling: systems integration of oxygen balance in defense of cell integrity. Curr Opin Hematol* 2004;11:7-14.
- 18) Nelson EJ, Connolly J, McArthur P. *Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. Biol Cell* 2003;95:3-8.
- 19) Anggard E. *Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine.*

- Lancet* 1994;343:1199-206.
- 20) Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide: looking at the dark side. *Chest* 1994;105 (Suppl):79S-84S.
 - 21) Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;78:931-6.
 - 22) Kamouchi M, Mamin A, Droogmans G, Nilius B. Nonselective cation channels in endothelial cells derived from human umbilical vein. *J Membr Biol* 1999;169:29-38.
 - 23) Kamouchi M, Philipp S, Flockerzi V, Wissenbach U, Mamin A, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol* 1999;518:345-58.
 - 24) Suh SH, Droogmans G, Nilius B. Effects of cyanide and deoxyglucose on signaling in macrovascular endothelial cells. *Endothelium* 2000;7:155-68.
 - 25) Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K^+ channel, *Hslo*, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1998;273:32950-6.
 - 26) Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* 1999;274:10927-35.
 - 27) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368:850-3.
 - 28) Haburcak M, Wei L, Viana F, Prenen J, Droogmans G, Nilius B. Calcium-activated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide. *Cell Calcium* 1997;21:291-300.
 - 29) Blatter LA, Taha Z, Mesaros S, Shacklock PS, Wier WG, Malinski T. Simultaneous measurements of Ca^{2+} and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ Res* 1995;76:922-4.