

# 토끼 흉부 대동맥 절편의 전기자극에 대한 수축 및 이완반응

이 석 기\* · 최 형 호\* · 이 종 은\*\*

## =Abstract=

### **Electrical Stimulation Causes Endothelium-Dependent Relaxation in Isolated Aortic Vessels of the Rabbit**

Seok Ki Lee, M.D.\*, Hyung Ho Choi, M.D.\* , Jong Eun Lee, M.D.\*\*

The present study was aimed at investigating possible transmitter mechanisms in the endothelial cell layer in regulating the tone of the vascular smooth muscle. The thoracic aorta was isolated from the anesthetized male white rabbits and its helical strips were prepared. Electrical field stimulation was delivered to platinum wire electrodes positioned parallel to the vessel segment preconstricted with phenylephrine ( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L) at a distance of 1.5~2.0 mm. The electrical stimulation (70V, 5 msec, 0.5~200 Hz) caused either relaxation only (34%) or a biphasic response (prolonged relaxation following a weak and transient contraction, 66%). The relaxation response was frequency-dependent, and at 200 Hz a complete relaxation was noted. Mechanical rubbing of the endothelial layer abolished or greatly attenuated the relaxation. The relaxation was also markedly attenuated in the presence of *N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester* ( $10^{-3}$  mol/L) or procaine hydrochloride ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L). Tetrodotoxin, guanethidine, atropine or indomethacin failed to block or enhance the relaxation response to electrical field stimulation. It is concluded that the vascular endothelium in the aorta contains diffusible substances that regulates the function of the smooth muscle layer, in which relaxation is more prominent than contraction. Their release by the electrical stimulation in vitro may not involve classic neuronal transmitter release mechanisms or metabolism of arachidonic acids by cyclooxygenase. The release of the relaxing agents may require an increase in cytosolic calcium level. The chemical nature of the relaxant may be, to a large extent, nitric oxide.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 28: 742-6)

**Key words :** 1. Aorta  
2. Vasodilation  
3. Vasodilator agents

## 서 론

혈관내피층은 지혈, 평활근 성장 및 평활근 긴장 조절

등에 관여하며 고혈압과 경화증의 표적이 된다<sup>1)</sup>. 이 가운데 평활근층의 기능에 대한 조절역할은 비교적 근래에 알려진 것으로 내피세포층에서 합성되고 유리된 물질이 인

\* 조선대학교 의과대학 흉부외과학교실

\* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chosun University, Kwangju, Korea

\*\* 전남대학교 의과대학 생리학교실

\*\* Department of Physiology, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

논문접수일 : 940831 심사통과일 : 95년 4월 24일

통신저자 : 이석기, (501-140) 광주직할시 동구 서석동 588, Tel. (062) 220-3160, Fax. (062) 228-1444

접 평활근층에 이르러 이완 또는 수축을 일으키게 된다는 것이다. Furchtgott와 Zawadzki<sup>2)</sup>에 의해 처음 acetylcholine(ACh)의 이완 반응을 매개하는 내피의존 이완인자(endothelium-derived relaxing factor)의 존재가 보고된 뒤 그 본체는 곧 일산화질소(nitric oxide)이거나 그와 밀접히 관련된 물질일 것으로 알려지게 되었다<sup>3)</sup>.

ACh에 이어서 A23187, arachidonic acid, bradykinin, histamine, serotonin, vasoactive intestinal peptide 등의 여러가지 내피의존 이완제들이 발견되는 가운데 De Mey와 Vanhoutte<sup>4)</sup>는 혈관 내피 세포가 이완에뿐 아니라 수축을 일으키는 데에도 공헌함을 관찰하였다. 따라서 혈관내피층은 평활근층의 이완 또는 수축을 일으키는데 중요한 기능을 하는 장소임이 알려지게 된 것이지만 그간의 연구는 대부분 이완을 또는 수축을 따로이 관찰하는데 치우쳐 왔기 때문에 이와 같이 서로 성질이 다른 두 효과가 조직에서 어떻게 발현되는지는 잘 알려지지 않은 듯하다. 다만 Frank와 Bevan<sup>5)</sup>은 폐혈관의 전기자극에 대한 내피층 의존 반응을 관찰하여 이완이 주반응임을 보고한 바 있으나 체순환계 혈관에서는 이와 비슷한 연구보고가 없는 듯하다.

저자는 흉부 대동맥에서 수축과 이완의 두 효과가 실제로 어떻게 나타나는가를 알아보기 위해 적출 토끼 대동맥 혈관을 시험관에 매달고 전장자극(electrical field stimulation)에 대한 내피층 의존 반응이 어떻게 나타나는가를 조사하였다.

## 대상 및 방법

실험재료는 수컷 흰색 집토끼(체중 2.0~2.5 kg)를 사용하였다. Urethane(1 g/kg, 정맥내 주사) 마취하에 가슴을 열고 흉부 대동맥을 적출하였다. 표본은 즉시 4°C의 영양액에 담근 채 해부 현미경하에서 내피층에 손상이 가지 않도록 주의하면서 나선상 표본을 만들었다. 내피세포층과 괴표본을 만들기 위해서는 솜을 감은 가는 철사로 내피층을 두어번 문질러 주었다.

동맥의 한쪽 끝은 실로 매달아 시험관 바닥에 고정하고 다른 한쪽 끝은 force transducer에 연결하여 등장성 장력(isometric tension)을 Polygraph(Grass 7 series) 상에 기록하였다. 이때에 혈관표본은 서로 마주보는 두 쪽의 백금판 사이에 매달리도록 하여 백금판을 통하는 전류로부터 발생한 전장이 표본을 자극하도록 하였다. 시험관 용적은 10 mL이었으며 관내 영양액은 37°C에서 95% 산소와 5% 탄산ガ스로 포화되도록 하였다. 영양액의 조성은 NaCl 112,

KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, glucose 11.5 mmol/L 이었다.

동맥 표본을 시험관에 매달고 2g의 장력을 주어 1.5~2시간 평형시킨 후 먼저 phenylephrine에 대한 용량-반응곡선을 구하였다. 본 실험에서는 최고수축장력의 80% 정도를 보이는  $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L 농도를 택하여 표본을 수축시키고 그 장력이 일정해졌을 때 전기자극에 의한 효과를 관찰하였다. 전기자극 여건은 70 V, 5 msec, 0.5~200 Hz로 30초간 자극하였다. 한 Hz에서의 반응이 일정해지면 다음 빈도의 자극을 계속하였다(대체로 3분~4분).

전기자극에 의한 이완의 정도는 phenylephrine에 의해 얻은 최고수축높이로부터 백분율로 구하였다. 실험결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며 약물처치 전후성적의 비교는 t-test로 하였다.

사용한 약물은 phenylephrine, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), procaine hydrochloride, guanethidine hydrochloride, atropine sulfate, indomethacin 등으로 모두 Sigma 사 제품이었다.

## 결 과

### 1. 대동맥 절편의 전기자극에 대한 반응

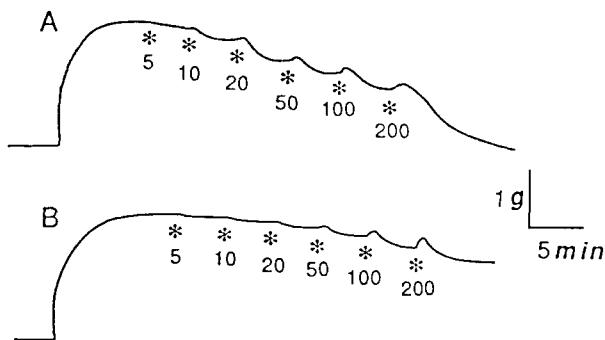
Phenylephrine( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L)으로 수축된 대동맥 표본을 자극강도 70 V, 자극기간 5 msec로 고정하고 빈도를 0.5~200 Hz로 변화시키면서 30초간 자극하였다. 이때에 혈관표본은 0.5, 1, 2 Hz에 대하여 아무런 영향을 받지 않았으나 5 Hz에서부터 반응이 나타나기 시작하여 이완반응을 나타내거나(110례중 34%) 또는 일시적이며 약한 수축반응과 뒤이어 지속해서 이완되는 이상성 반응을 나타내었다(66%). 이상성 반응을 보인 예에서 수축반응은 자극빈도에 따라 크게 영향받지 않았으나 이완반응은 자극빈도를 높임에 따라 점차 증가하여 200 Hz에서 완전히 이완되었다(Fig. 1).

내피층 제거 표본을 전기자극할 때에 수축반응에는 변화를 보이지 않으나 이완반응은 현저히 억제되거나 소실되었다(Fig. 1).

Guanethidine( $10^{-5}$  mol/L), atropine( $10^{-5}$  mol/L) 또는 indomethacin( $10^{-4}$  mol/L) 전처치는 전기자극에 의한 수축 및 이완반응에 아무런 영향을 끼치지 않았다.

### 2. 전기자극효과에 미치는 L-NAME의 영향

일산화질소 합성억제제인 L-NAME( $10^{-3}$  mol/L, 1시간) 전처치후 phenylephrine으로 수축시킨 상태에서 전기자극



**Fig. 1.** A representative tracing of tension. Contraction was attained by addition of phenylephrine ( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L) to the tissue bath. **A.** Control. **B.** Endothelium-removed preparation. Asterisks indicate start of a 30-s train of electrical impulses (70 V, 5 msec, frequencies as shown in numerals from 5 to 200).

을 가하면 수축반응은 L-NAME 처치 않은 때에 비하여 영향받지 않았으나 이완효과는 유의하게 약화되었다(Fig. 2).

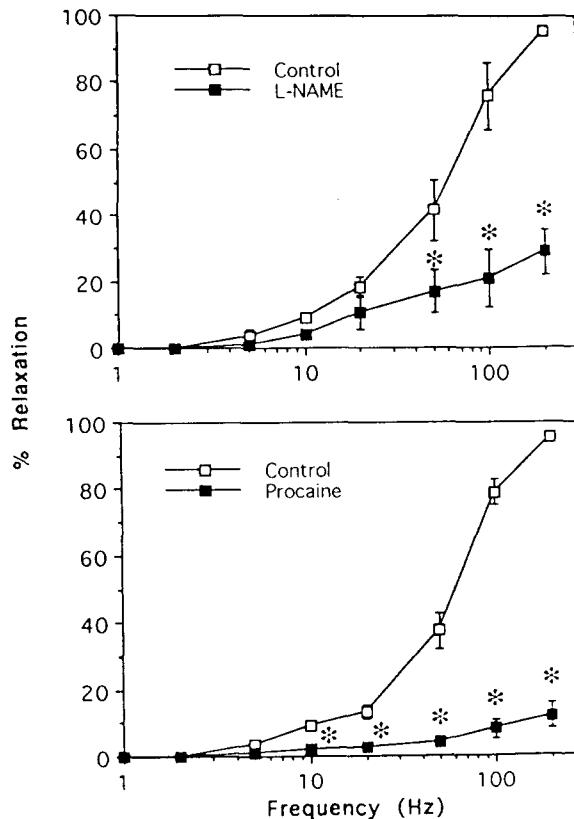
### 3. 전기자극효과에 미치는 Tetrodotoxin 또는 Procaine의 영향

Tetrodotoxin ( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L) 존재하에 혈관표본을 phenylephrine으로 수축시킨 상태에서 전기자극을 가하면 (70 V, 5 msec, 1~200 Hz) 수축 및 이완반응은 tetrodotoxin이 없는 때에 비하여 그 정도가 변화되지 않고 여전하였다. 그러나 procaine ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L) 존재하에서 표본의 전기자극에 의한 이완반응의 정도는 현저히 감소하였다(Fig. 2).

## 고 찰

혈관내피층은 평활근층의 이완 또는 수축반응을 매개하는 데에 중요한 역할을 함이 잘 알려져 있다. 그러나 종전의 연구결과들은 흔히 수축제 또는 이완제에 대한 반응만을 따로이 관찰함으로써 실제로 조직에서 서로 질이 다른 두 효과간에 어떤 관계가 있는가 하는 것은 소홀히 취급되었다. 본 연구에서는 혈관의 내인성 물질로서 이완물질과 수축물질을 모두 유리시키기 위해 전장자극을 했으며 그에 따른 혈관근의 장력반응을 관찰하였다.

적출 혈관표본은 전기자극에 대하여 선행수축 및 후속이완되는 이상성 반응을 (34%) 또는 수축없이 이완반응만을 (66%) 나타내었다. 그러나 이상성 반응을 보이더라도



**Fig. 2.** Effects of L-NAME(**A**) and procaine(**B**) on the relaxation response to electrical field stimulation. Control denotes the responses before treatment with either L-NAME or procaine. L-NAME denotes the response in the presence of L-NAME ( $10^{-3}$  mol/L, 1 h), and Procaine that in the presence of procaine ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L, 30 min). Means  $\pm$  SEM from 16~20 experiments are shown. \*  $P < 0.01$ , compared with control.

이완효과가 더 크고 지속적이므로 전기자극에 의해 유리된 물질에 대해 평활근에서 이완효과가 더 우세함을 암시하였다. 또 다른 가능성으로는 혈관수축물질이 먼저 유리되지만 신속히 그 활성이 종료되거나 이완물질이 더 강력할 뿐더러 지속적으로 유리되기 때문에 수축반응을 차폐시킴을 의미한다.

한편 내피층을 파괴한 표본에서는 전기자극에 의한 이완반응이 소실되거나 크게 감약되었으므로 이 이완반응에는 내피층의 역할이 필수적임을 알 수 있었다. 즉 내피세포층이 화학물질을 유리시켜 이 물질이 평활근층에 이르러 이완반응을 낸 것이라 추측된다.

그러나 이 화학물질은 신경밀단으로부터 유리된 것은 아닐 것으로 추측되었다. 왜냐하면 전기자극에 대한 반응

은 tetrodotoxin 존재하에서 영향받지 않았기 때문이다. 더욱이 반응을 일으키는 자극빈도가 5Hz 미만일 때는 표본에 영향을 미치지 않았으며 최대효과를 내는 빈도는 200Hz로서 생리적 범위(>16Hz)를 현저히 벗어났으므로 역시 전기자극에 대한 반응이 신경에서 활동전압 발달 기전에 의한 것이 아닐 가능성을 시사한 것이다. 다만 활동전압이 전달되지 않은 상태에서도 전장자극에 의해서 신경 말단 varicosity가 직접 자극되어 신경전도물질이 유리되었을 가능성을 배제할 수는 없을 것이다.

다만 이완기전이 궁극적으로 세포질내 칼슘 증가와 관련되어 있음을 시사하였다. 국소마취제인 procaine은 혈관평활근에서 세포내(아마도 근형질내망계) 저장 칼슘 유리를 억제시킴이 알려져 있으므로<sup>6)</sup> 이 약물 처치하에 이완반응이 유의하게 약화된 실험결과는 칼슘 매개를 통한 결과로서 이완을 일으키는 화학물질이 유리되었을 가능성 을 암시하기 때문이다.

혈관이완 물질의 본체는 부분적으로는 EDRF 즉 일산화질소일 것으로 추측되었다. 왜냐하면 일산화질소 합성을 억제하는 L-NAME 처치하에서는 전장자극에 대한 이완반응이 유의하게 감소되었기 때문이다. 그러나 완전히 소실되지는 않고 남은 내피의존 이완은 다른 인자들이 관여한 결과일 것으로 생각된다. 그러한 물질들에는 EDHF 이외에도 vasoactive intestinal peptide, 이완 prostaglandin 등이 포함된다. 그러나 이완반응은 atropine 처치하에서도 일어났기 때문에 그 물질이 ACh일 가능성은 제외되었다. De Mey와 Vanhoutte<sup>4)</sup>는 처음으로 개의 정맥표본이 arachidonic acid에 의해 수축이 강화되며 내피제거된 표본에서는 이와 같은 수축강화 효과가 나타나지 않음을 관찰하고 이와 같은 사실은 내피층이 수축효과가 있는 prostanoïd를 유리시킨 결과일 것으로 추리하였다. 그러나 본 연구에서 indomethacin은 혈관반응에 전혀 영향을 미치지 않았으므로 수축이나 이완물질로서 prostaglandin에 관여 할 가능성은 없는 듯하다.

본 연구에서 전기자극에 의해 일어나는 초기 수축반응의 기전은 명확히 설명할 수 없다. 다만 혈관수축반응은 guanethidine 처치하에서도 영향받지 않았으므로 교감신경계 기전이 관여했을 가능성은 없는 듯하다. 그러나 endothelin<sup>7)</sup>이 관여했는가에 대해서는 본 실험결과로는 알 수 없으므로 추후 endothelin 차단제 등을 사용한 상세한 연구가 필요하다.

Endothelin은 여러가지 기전에 의해 억제되는데 예컨대 일산화질소, nitroglycerine, atrial natriuretic peptide, 3-morpholino sydnonimine(SIN-1) 등에 의해 cGMP 기전이

활성화되어 endothelin 유리를 억제시킨다<sup>8)</sup>. 반대로 endothelin은 내피세포로부터 일산화질소와 prostacyclin을 유리시키는데 이는 negative feedback 기전이라 할 수 있다<sup>9)</sup>. 이와 같은 결과들은 내피세포가 동시에 서로 효과가 다른 두 인자를 유리하지 않음을 시사한다. 즉 생체에서 필요에 따라 혈관은 수축되거나 이완될 것이므로 이완될 필요가 있을 때에는 수축은 상대적으로 억제될 것이며 수축될 필요가 있을 때 이완이 억제될 것이기 때문이다. 다만 본 연구에서의 전기자극은 생체내에서의 생리적 상태를 재현한 것은 아니므로 내피층의 내재기능인 서로 다른 두 효과가 그 우열순에 따라 이상성으로 또는 한 가지만 나타났을 것으로 생각된다.

또한 유전 고혈압 흰쥐<sup>10)</sup>, 뇌동맥 경련<sup>11)</sup> 등과 같은 병적 상태에서는 내피의존이완에 비해 상대적으로 수축이 우세하므로 이완인자 유리 억제는 반대로 수축인자를 유리시키는 경향이 있음도 알 수 있다. 유전 고혈압 흰쥐에서는 혈관수축 prostaglandin 합성이 증가되어 있으며<sup>12)</sup>, 실제로 많은 고혈압의 예에서 그 구체적 화학물질이 무엇이든 내피의존 이완이 약화되어 있다<sup>13)</sup>. 뿐만 아니라 항고혈압 치료에 의해 내피의존 이완도 회복됨을 볼 수 있다<sup>14)</sup>.

본 연구결과는 내피세포층으로부터 유리된 화학물질에 의해서 혈관표본이 수축 또는 이완됨을 보여주었다. 그러나 수축과 이완의 두가지가운데 이완이 훨씬 지속적이고 우세하며 이완물질의 본체는 적어도 부분적으로 일산화질소일 것으로 추측되었다. 이와 같은 결과는 정상적으로 내피세포층이 평활근층에 대하여 이완성 조절을 함으로써 혈관근 긴장을 결정하는 중요한 요인이 되고 있음을 시사한다. 실제로 토끼에서 일산화질소 합성 억제에 의하여 지속적인 혈압상승을 일으킨다는 실험보고<sup>15)</sup>는 역시 전신혈관계가 내피세포로부터 유리된 일산화질소에 의해서 기본적으로 이완된 상태에 있음을 암시한다.

## 결 롬

적출 토끼 대동맥 표본을 시험관에 매달고 전장자극(electrical field stimulation)에 대한 내피층의존 반응이 어떻게 나타나는가를 조사하였다.

Phenylephrine( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L)으로 수축된 대동맥 표본은 전기자극(강도 70V, 기간 5msec, 빈도 0.5~200Hz)에 대해 이완반응(110례중 34%) 또는 일시적이며 약한 수축반응에 뒤이어 지속적으로 이완되는 이상성 반응(66%)을 나타내었다. 이때에 이완반응은 자극빈도를 높임에 따라 점차 증가하여 200Hz에서 표본은 완전히 이완되었

다. Tetrodotoxin ( $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L), guanethidine ( $10^{-5}$  mol/L), atropine ( $10^{-5}$  mol/L), indomethacin ( $10^{-4}$  mol/L) 등은 수축 및 이완반응에 아무런 영향을 끼치지 않았다. 일산화 질소 합성억제제인 L-NAME ( $10^{-3}$  mol/L) 또는 procaine ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol/L) 전처치에 의하여 이완반응의 정도는 현저히 감소되었다.

본 연구결과는 내피세포층으로부터 유리된 화학물질에 의해서 혈관표본이 수축 또는 이완되지만 수축과 이완의 두가지가운데 이완이 훨씬 지속적이고 우세하며 이완물질의 본체는 적어도 부분적으로 일산화질소임을 암시하였다. 이와 같은 결과는 내피세포층이 평활근층에 대하여 이완성 조절을 함으로써 혈관근 긴장을 결정하는 중요한 요인으로 되고 있음을 시사한다.

### 참 고 문 헌

1. L scher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: Modulator of cardiovascular function*. 1st ed. Boca Raton, USA: CRC Press. 1990
2. Furchtgott RF, Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature 1980;288:373-6
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature 1980;327:524-6
4. De Mey JG, Vanhoutte PM. *Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium*. Circ Res 1982;51:439-47
5. Frank GW, Bevan JA. *Electrical stimulation causes endothelium-dependent relaxation in lung vessels*. Am J Physiol 1983;244:793-8
6. Itoh T, Kuriyama H, Suzuki, H. *Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells the Guinea-pig mesenteric artery*. J Physiol 1981;321:513-35
7. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature 1988;332:411-5
8. Boulanger CM, L scher TF. *Hirudin and nitric oxide donors inhibit the thrombin-induced release of endothelin from the intact porcine aorta*. Circ Res 1991;68:1768-72
9. L scher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. *Endothelium-derived contracting factors*. Hypertension 1992;19:117-30
10. L scher TF, Vanhoutte PM. *Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. Hypertension 1986;8:344-8
11. Kim P, Sundt TM, Vanhoutte PM. *Alterations in endothelium-dependent responsiveness of the canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg 1989;71:430-6
12. Kato T, Iwana Y, Okamura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. *Prostaglandin H<sub>2</sub> may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat*. Hypertension 1990;15:475-82
13. Rinaldi G, Bohr D. *Endothelium-mediated spontaneous response in aortic rings of deoxycorticosterone acetate-hypertensive rats*. Hypertension 1989;13:256-61
14. L scher TF, Vanhoutte PM, Raij L. *Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension*. Hypertension 1987;9:193-7
15. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:3375-8