

## 세포 외 $K^+$ 에 의한 혈관 수축성 조절 기전: 혈관평활근 수축성과 내피세포 의존성 이완에 미치는 영향

유지영\* · 설근희\*\* · 서석효\*\* · 안재호\*\*\*

### Regulatory Mechanism of Vascular Contractility by Extracellular $K^+$ : Effect on Endothelium-Dependent Relaxation and Vascular Smooth Muscle Contractility

Ji Young You, M.D.\*, Geun Hee Seol, M.S.\*\*, Suk Hyo Suh, Ph.D.\*\*, Jae Ho Ahn, M.D.\*\*\*

**Background:** Extracellular  $K^+$  concentration ( $[K^+]_o$ ) can be increased within several mM by the efflux of intracellular  $K^+$ . To investigate the effect of an increase in  $[K^+]_o$  on vascular contractility, we attempted to examine whether extracellular  $K^+$  might modulate vascular contractility, endothelium-dependent relaxation (EDR) and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in endothelial cells (EC). **Material and Method:** We observed isometric contractions in rabbit carotid, superior mesentery, basilar arteries and mouse aorta.  $[Ca^{2+}]_i$  was recorded by microfluorimeter using Fura-2/AM in EC. **Result:** No change in contractility was recorded by the increase in  $[K^+]_o$  from 6 to 12 mM in conduit artery such as rabbit carotid artery, whereas resistant vessels, such as basilar and branches of superior mesenteric arteries (SMA), were relaxed by the increase. In basilar artery, the relaxation by the increase in  $[K^+]_o$  from 1 to 3 mM was bigger than that by the increase from 6 to 12 mM. In contrast, in branches of SMA, the relaxation by the increase in  $[K^+]_o$  from 6 to 12 mM is bigger than that by the increase from 1 to 3 mM.  $Ba^{2+}$  ( $30 \mu M$ ) did not inhibit the relaxation by the increase in  $[K^+]_o$  from 1 to 3 mM but did inhibit the relaxation by the increase from 6 to 12 mM. In the mouse aorta without the endothelium or treated with  $N^G$ -nitro-L-arginine ( $30 \mu M$ ), nitric oxide synthesis blocker, the increase in  $[K^+]_o$  from 6 to 12 mM did not change the magnitude of contraction induced either norepinephrine or prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . The increase in  $[K^+]_o$  up to 12 mM did not induce contraction of mouse aorta but the increase more than 12 mM induced contraction. In the mouse aorta, EDR was completely inhibited on increasing  $[K^+]_o$  from 6 to 12 mM. In cultured mouse aorta EC,  $[Ca^{2+}]_i$  was increased by acetylcholine or ATP application and the increased  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced by the increase in  $[K^+]_o$  reversibly and concentration-dependently. In human umbilical vein EC, similar effect of extracellular  $K^+$  was observed. Ouabain, a  $Na^+$ - $K^+$  pump blocker, and  $Ni^{2+}$ , a  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger blocker, reversed the inhibitory effect of extracellular  $K^+$ . **Conclusion:** In resistant arteries, the increase in  $[K^+]_o$  relaxes vascular smooth muscle and the underlying mechanisms differ according to the kinds of the arteries;  $Ba^{2+}$ -insensitive mechanism in basilar artery and  $Ba^{2+}$ -sensitive one in branches of SMA. It also inhibits  $[Ca^{2+}]_i$  increase in EC and thereby EDR. The initial mechanism of the inhibition may be due to the activation of  $Na^+$ - $K^+$  pump.

\*한림대학교 강동성심병원 응급의학과

Department of Emergency Medicine, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University

\*\*이화여자대학교 의과대학 생리학교실

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Women's University

\*\*\*이화여자대학교 목동병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Mokdong Hospital, Ewha Women's University

논문접수일 : 2003년 9월 25일, 심사통과일 : 2003년 12월 1일

책임저자 : 안재호 (158-056) 서울시 양천구 목6동 911-1번지, 이화여자대학교 목동병원 흉부외과학교실

(Tel) 02-2650-5151, (Fax) 02-2649-4930, E-mail: jhahn@ewha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

**Key words:** 1. Potassium  
2. Vasodilation  
3. Endothelium-dependent relaxing factor  
4. Calcium

## 서 론

혈관내피세포는 혈관평활근을 이완 혹은 수축시키는 물질들을 분비하여 혈관평활근 수축성을 조절한다[1]. 즉 혈관내피세포는 nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin)과 같은 이완인자들(endothelium-derived relaxing factors, EDRFs) [2-4]과 endothelin, endothelium-derived contracting factors 등과 같은 수축인자[5-7]들을 분비하여 혈관평활근을 이완 혹은 수축시킨다. 한편 혈관평활근이 수축하고 혈관내피세포에서 수축 혹은 이완인자가 분비되기 위해서는 이들 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가가 선행되어야 하며[8-10], 그러므로 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도 조절을 통하여 혈관평활근의 수축성과 혈관내피세포에서의 수축 혹은 이완인자의 분비가 조절된다.

세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가하면 세포 외 K<sup>+</sup> 농도가 증가한다. 이는 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의하여 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel이 활성화되어 세포 내 K<sup>+</sup>이 유출된 결과이다. 그리고 혈관내피세포에서는 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의하여 분비되는 EDHF가 K<sup>+</sup>이라는 보고가 있어[11] 이 역시 세포 외 K<sup>+</sup> 농도 증가에 기여하리라 생각된다. 그러므로 세포 외 K<sup>+</sup>의 농도는 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의하여 수 mM 정도의 범위 내에서 변화할 수 있다[12,13]. 한편 세포 외 K<sup>+</sup>농도의 변화는 혈관평활근의 수축성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 대부분의 평활근들은 세포 외 K<sup>+</sup>농도가 수십 mM 이상 증가하면 수축하며 수 mM 증가하는 경우 저항 혈관 평활근은 이완한다[14,15]. 이런 현상을 K<sup>+</sup>-유발 이완(K<sup>+</sup>-induced relaxation)이라고 하며 특히 저항혈관에서 혈관평활근 수축성 조절에 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

이와 같이 세포 외 K<sup>+</sup> 농도변화는 혈관 수축성 조절에 매우 중요한 역할을 하지만, 혈관 종류에 따른 K<sup>+</sup>-유발 이완의 차이나 세포 외 K<sup>+</sup>이 혈관내피세포 특히 내피세

포 의존성 이완에 미치는 영향에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없어 이를 밝히고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 실험 동물

토끼(가토, 2 kg)와 주령 8~16주 된 쥐(ICR mouse, 200 g)를 암수 구별 없이 사용하였다. 토끼는 귀 정맥에 entobarbital (pentobarbital sodium, 40 mg/kg)를, 쥐는 복강 내에 entobarbital (20 mg)와 heparin (500 U)을 주사하여 마취한 다음 토끼에서는 기저동맥, 상장간막동맥 분지와 경동맥을, 쥐에서는 흉부대동맥을 적출하였으며 주변 조직을 깨끗이 박리한 다음 실험에 사용하였다.

### 2) 등장성 수축 실험

적출한 혈관들을 너비 2~3 mm 정도로 잘라 환형 절편(arterial ring)을 만든 다음, 이 절편을 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>로 포화된 Krebs-Ringer 용액(NaCl 118.3, KCl 4.78, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5, MgSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.22, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 10 mM)이 3 mL/min의 속도로 흐르고 있는 실험용기에 옮겨 근육고정기와 근수축변환기를 연결하고 생체 신호 기록기(physiograph)에서 등장성 수축을 기록하였다.

토끼 혈관들은 phenylephrine (PE)과 histamine을, 쥐 대동맥은 norepinephrine (NE) 혹은 prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)를 사용하여 수축을 유발시키고 수축이 최대한 유발되었을 때 acetylcholine (ACh)을 투여하여 내피세포 의존성 이완을 일으키고 이완이 최대한 유발되었을 때 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 6 mM에서 12 mM까지 단계적으로 증가시켰다.

혈관내피세포는 Furchgott 등[16]의 방법에 따라 작은 솜뭉치를 이용하여 제거하였으며, 내피세포의 제거 여부는 ACh (3 μM)에 의한 내피세포 의존성 이완 반응 발생여부로 판정하였다. 모든 실험은 37°C에서 시행하였다.

### 3) 혈관내피세포 배양: 일차 배양(Primary Explant) 기법

적출한 쥐대동맥을 phosphate-buffered saline (PBS, Dulbecco without  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) 속에서 외막주변 지방과 결합 조직을 깨끗이 제거한 후 짧게 자른다. 6-구멍판(well plate)에 matrigel (Becton Dickinson, USA)을 소량 넣고 혈관 조각을 내막이 matrigel에 면하도록 놓고 배양 배지를 소량 첨가한다[17-19]. 배양 배지는 80 mL Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, GIBCO), 10 mL fetal calf serum (GIBCO), 7.5 mg endothelial cell growth supplement (Sigma), 200  $\mu$ L heparin (10 U/mL), 2 mL penicillin/streptomycin (100 U/mL), 1 mL L-glutamine, 그리고 1 mL minimal essential amino acids를 첨가하여 만들었다. 4~7일 후 혈관 조각을 제거하고 혈관 조각에서 자라 나온 혈관내피세포들이 자라게 하였다(fresh isolated endothelial cell). 계대 1은 배양 배지를 제거한 다음 dispase (Becton Dickinson, USA) 0.5 mL/cm<sup>2</sup> (50 U)을 넣고 90분간 배양한 다음 혈관내피세포를 얻어 12-구멍판에 뿌려서 만들었다. 계대 2는 계대 1 세포가 무성하게 되면  $Ca^{2+}$  free PBS으로 씻은 다음 trypsin을 이용하는 일반적인 방법으로 만들었다[20].

배양한 세포들은 면역형광화학검사법을 이용하여 von Willibrand's factor (vWF)의 유무와 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 섭취 여부로 혈관내피세포임을 판정하였다. vWF의 유무는 아래 방법으로 관찰하였다. 배양한 세포들을 tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) buffered saline (TBS, 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 7.5)으로 씻은 다음 methanol/acetone의 7 : 3 혼합용액으로 고정하고 0.25% Triton X100 (TBS에서)으로 30분간 처리하였다. 5% bovine serum albumin (BSA)으로 1시간 처리하여 Triton X100을 억제시킨 다음 토끼 anti-human vWF antibody (DAKO A0082; 1 : 300 in TBS/1% BSA)를 첨가한 다음 4°C에서 하루 동안 두었다. 저밀도 지단백 섭취 실험방법은 다음과 같다. 배양한 세포에 Dil acetylated-LDL (Molecular probe, 1 mg/mL)를 10  $\mu$ L/mL을 넣은 다음 37°C에서 4시간 동안 노출시켰다. 다음 배양액을 제거하고 PBS로 2차례 씻은 다음 mountain medium (DAKO, Nr. S 302380)으로 고정한 다음 관찰하였다.

### 4) 세포 내 $Ca^{2+}$ 측정

Fura-2/AM (acetoxymethyl ester form)을 배양액 첨가하여 (2  $\mu$ M) 37°C에서 25분간 혈관내피세포에 노출시켜 부하

(loading)시킨 다음 Krebs 용액으로 세척하여 실험에 사용하였다. 세포 내  $Ca^{2+}$  측정은 inverted microscope (DM IRB, Leica, Germany)과 microscope photometer (D-104, Photon Technology International Inc, U.S.A.) 등으로 구성된 미세형광측정기(microfluorometer system)를 사용하였다. Fura-2/AM이 부하된 세포에 340 nm와 380 nm의 두 파장을 번갈아 조사(10 Hz)하고 방출(emission)되어 나오는 510 nm의 형광을 photomultiplier 튜브를 이용하여 측정하고 그 비(F340/380)로 세포 내  $Ca^{2+}$  농도를 계산하였다(Felix, version 1.4, PTI, U.S.A.). 이 실험에 사용된 용액은 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid (HEPES), 10 mM glucose, 1.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ 을 첨가하여 만들었으며 pH는 7.4에 맞추었다.

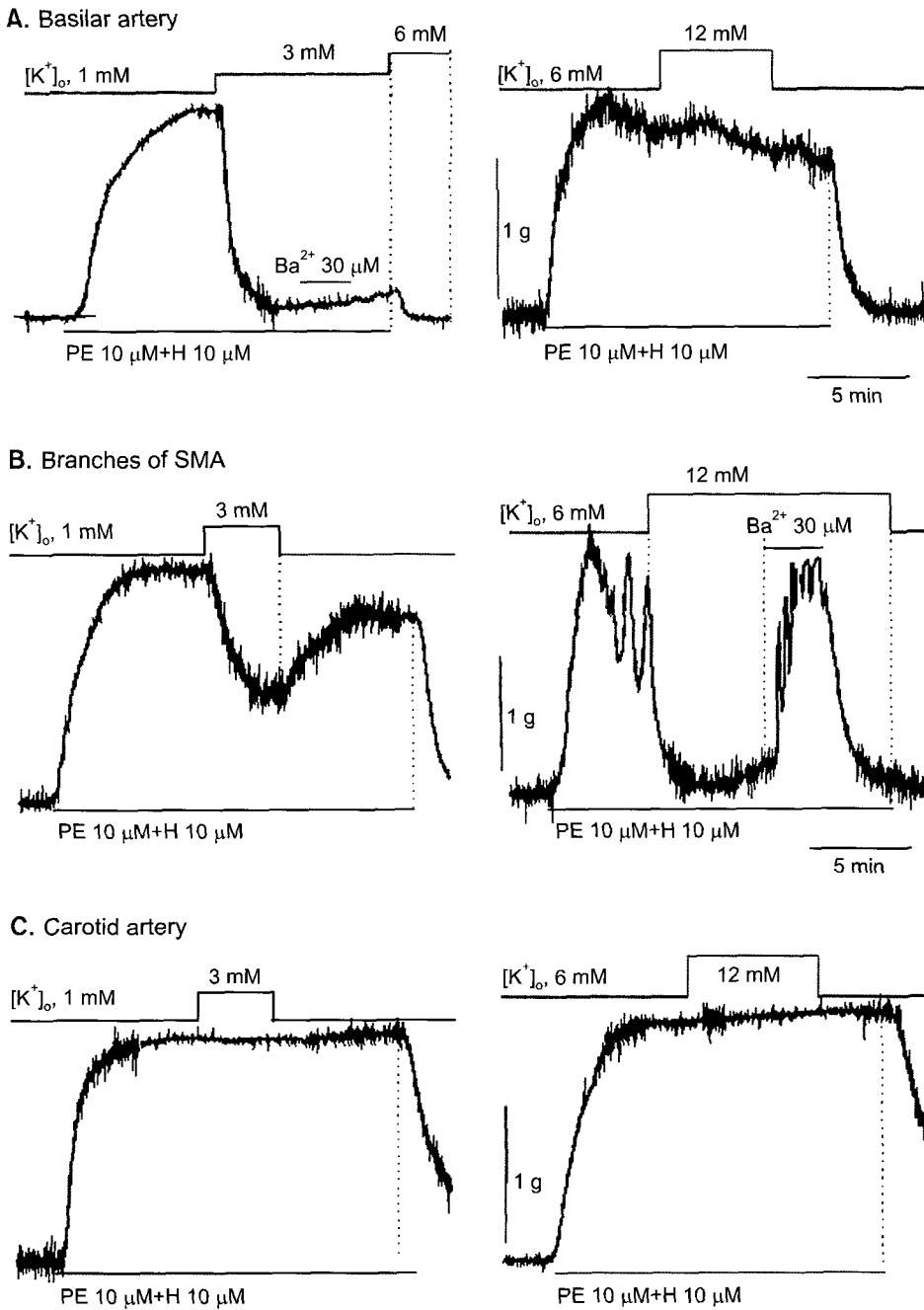
### 5) 통계

모든 통계자료는 평균과 표준편차로 표현하고 유의성 정도는 paired T-test와 unpaired T-test로 하여 유의 수준  $p < 0.05$ 로 검증하였다.

## 결 과

### 1) 세포 외 $K^+$ 이 혈관평활근의 수축성에 미치는 영향

저항혈관으로는 토끼 기저동맥과 상장간막동맥 분지를 도관혈관으로는 토끼 경동맥을 사용하였다. 기저동맥과 상장간막동맥 분지는 PE과 histamine의 투여에 의하여 수축하였으며 이 수축은 세포 외  $K^+$  농도를 1에서 3 mM 혹은 6에서 12 mM로 증가시킴으로써 억제되었다( $K^+$ -유발 이완)(Fig. 1A, B).  $K^+$ -유발 이완은 저항혈관들 중에서도 혈관 종류에 따른 차이를 보였는데, 세포 외  $K^+$  농도를 1에서 3 mM 혹은 6에서 12 mM로 증가하는 경우 기저동맥은 1에서 3 mM의 증가에서 상장간막동맥 분지는 6에서 12 mM로 증가에서 혈관평활근의 이완이 더 크게 일어났다. 그리고  $K^+$  유발 이완 중 세포 외  $K^+$ 의 6에서 12 mM로 증가에 의한 이완은  $Ba^{2+}$ 에 의하여 억제되었으나 1에서 3 mM로 증가에 의한 이완은 억제되지 않아 최소한 2가지 기전( $Ba^{2+}$ -sensitive &  $Ba^{2+}$ -insensitive)이 공존하고 있음을 알 수 있었다. 반면 경동맥에서는 세포 외  $K^+$  농도 변화에 의하여 수축력의 변화가 없었다(Fig. 1C). 그러므로 세포 외  $K^+$  농도가 수 mM 정도 변화하는 경우 경동맥 등과 같은 도관혈관의 수축성은 유의한 영향을 받지 않지만 저항혈관의 수축성은 크게 조절됨을 알 수 있었다.



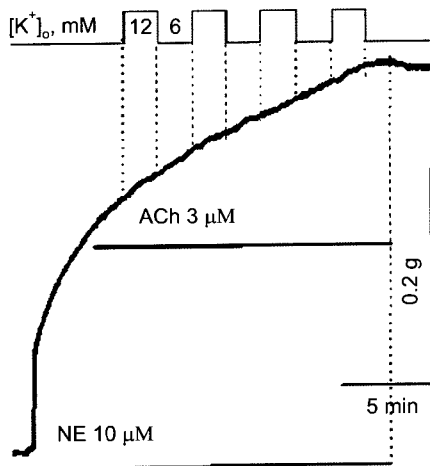
**Fig. 1.** Effects of extracellular  $K^+$  on the contractilities of various blood vessels. A, Note that the precontracted basilar artery relaxed on increasing  $[K^+]_o$  from 1 mM to 3 mM and the relaxation was not blocked by  $Ba^{2+}$ . B, in branches of superior mesenteric arteries, the maximal relaxation occurred by increasing  $[K^+]_o$  from 6 mM to 12 mM, which was  $Ba^{2+}$ -sensitive. C, on the other hand, carotid artery did not relax on increasing  $[K^+]_o$ .

쥐 대동맥도 세포 외  $K^+$  농도의 변화에 대하여 토끼 도관혈관과 동일한 반응을 보였다. 쥐 대동맥의 혈관내피세포를 제거하거나(Fig. 2A) L-NAME을 전처리하여 NO 분비를 억제시켜(Fig. 2B) 내피세포 의존성 이완을 억제하면, 세포 외  $K^+$  농도를 6에서 12 mM로 증가시켜도 혈관평활근 수축 정도는 변화가 없어 수 mM 정도의  $K^+$  농도 변화는 쥐 대동맥 혈관평활근 수축성에 영향을 주지 않음

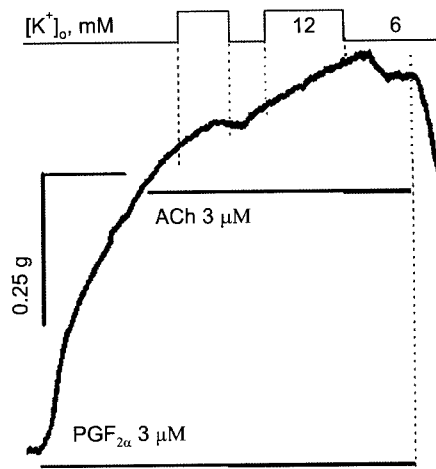
을 알 수 있었다.

한편 세포 외  $K^+$  농도를 수 mM 이상 증가시키면 혈관평활근이 수축하였다(Fig. 3). 쥐 대동맥에서 세포 외  $K^+$  농도를 12 mM 이하 증가시키는 경우에는 혈관평활근의 수축력에는 유의한 변화가 없었으나 18 mM로 증가하면 혈관평활근은 세포 외  $K^+$  농도가 156 mM일 때의 수축에 비해  $21.6 \pm 5.2\%$ , 30 mM로 증가하면  $59.8 \pm 3.5\%$ 로 증가하

A. Aorta without endothelium

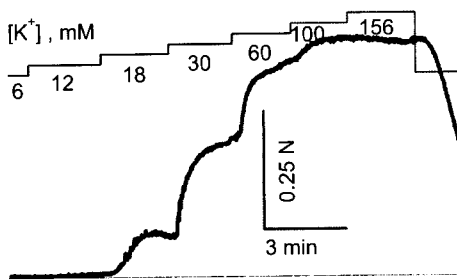


B. Treated with L-NAME for 30 min

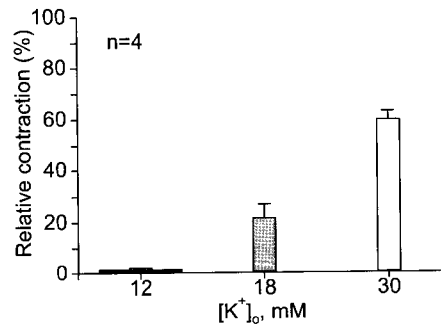


**Fig. 2.** Effect of extracellular  $K^+$  on contractility of mouse aortic smooth muscle. A: endothelium was removed by gentle rubbing with cotton ball. B: the aorta with endothelium was treated with L-NAME for 30 minutes to inhibit NO synthesis. In both cases, the magnitude of contraction was not changed with the increase of  $[K^+]_o$ .

A. Dose-response to  $[K^+]_o$ , without endothelium



B



**Fig. 3.**  $K^+$ -induced contraction in mouse aorta. A: Extracellular  $K^+$  can evoke vascular contraction at high concentration. On the other hand, there was no change of vascular tone at 12 mM  $[K^+]_o$ . B: averages of the magnitudes of the relative contractions at each concentration of  $[K^+]_o$ . The magnitude of contraction was expressed as percentage of the maximal contraction by 150 mM  $K^+$ .

였다.

## 2) 세포 외 $K^+$ 이 내피세포 의존성 이완에 미치는 영향

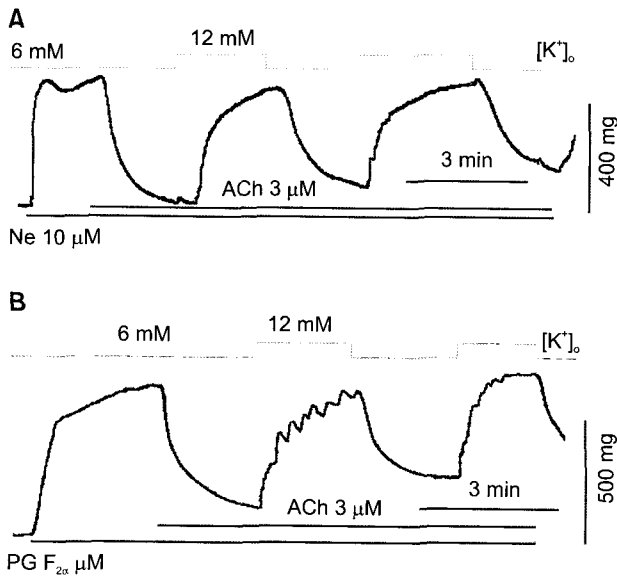
쥐 대동맥은 NE 혹은  $PGF_{2\alpha}$ 에 의하여 수축이 유발되며 수축이 안정상태에 이르렀을 때 ACh를 투여하면 혈관 내피세포가 있는 혈관에서는 이완을 하는 반면(Fig. 4) 혈관 내피세포를 제거하거나 L-NAME를 전처리한 혈관에서는 수축력의 변화가 거의 없어(Fig. 2) ACh에 의한 이완이 내피세포 의존성 이완임을 알 수 있었다. ACh에 의한 내피세포 의존성 이완이 최대로 유발되었을 때 세포 외  $K^+$  농도를 정상 6 mM에서 12 mM로 증가시키면 대동맥의 수축력이 다시 증가하였다(Fig. 4). 수 mM 범위에서의 세포 외  $K^+$  농도 증가는 혈관평활근 수축력에는 영향을 주지 않으므로(Fig. 2), 세포 외  $K^+$  농도 증가에 의한 수축력의 증가는 혈관내피세포 의존적인 현상으로 내피세포 의존성 이완이 세포 외  $K^+$  증가에 의하여 감소된 결과임을 알

수 있었다. 한편 이러한 세포 외  $K^+$  농도 증가 효과는  $PGF_{2\alpha}$ 와 NE에 의한 수축 모두에서 관찰되어 세포 외  $K^+$  농도 변화가 수축제의 효과를 변화시켜 일어났을 가능성을 배제할 수 있었다.

위 실험 결과로 세포 외  $K^+$  농도가 수 mM 증가하면 혈관평활근 수축성에는 변화가 없이 농도 의존적으로 내피세포 의존성 이완을 억제함을 알 수 있었다. 내피세포 의존성 이완은 혈관내피세포 내  $Ca^{2+}$  증가에 의하여 분비된 내피세포 유리 이완인자들에 의하여 일어나므로 세포 외  $K^+$ 이 혈관내피세포에서 세포 내  $Ca^{2+}$  농도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 3) 혈관내피세포의 확인

배양한 세포들에는 vWF가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). vWF는 섬유모세포와 평활근세포에도 존재하므로 이러한 세포들과 혈관내피세포를 감별할 수 있는 가장



**Fig. 4.** Inhibition of endothelium-dependent relaxation (EDR) by the increase of  $[K^+]_o$ . Mouse aorta was contracted by NE (A) or PGF<sub>2α</sub> (B). When the contraction reached at a steady state, ACh was applied and aortic ring was relaxed with the application endothelium-dependently. When the EDR reached to a steady state,  $[K^+]_o$  was increased from 6 to 12 mM. With the increase, aortic ring was re-contracted again. The inhibitory effect of extracellular K<sup>+</sup> on EDR was reversible and independent on vasoconstricting agents.

민감한 검사 방법인 저밀도 지단백 침취 실험을 하였다 (Fig. 5B, C). 혈관내피세포들은 섬유모세포 등과는 달리 저밀도 단백질을 침취하는데 저밀도 단백질을 침취한 세포들은 형광하에서 노란 색 혹은 붉은 색 형광으로 관찰된다. 동일한 부위를 형광을 사용하거나 (Fig. 5C) 혹은 사용하지 않고 (Fig. 5B) 관찰하면, 형광을 사용하지 않았을 때 보이는 대부분의 세포들(95% 이상)에서 형광이 관찰되므로 분리된 세포들은 대부분 혈관내피세포임을 확인할 수 있었다.

#### 4) 배양한 혈관내피세포에서 세포 내 Ca<sup>2+</sup>에 미치는 세포 외 K<sup>+</sup>의 영향

배양한 혈관내피세포에서 세포 외 K<sup>+</sup> 농도 변화가 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 배양한 쥐 대동맥 내피세포에 ATP 혹은 ACh를 투여하면 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 증가하였다. 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가가 정점에 이른 다음 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 6 mM에서 12 mM로 증가시키면 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 감소하였으며 다시 6 mM로 감소시

키면 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 증가하였다 (Fig. 6A). 이러한 세포 외 K<sup>+</sup>에 의한 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 억제 효과는 인간 제대정맥 내피세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)에서도 관찰되었으며 농도 의존적으로 혈관내피세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 억제하였다. Fig. 6B에서 보는 바와 같이 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 6 mM에서 8, 10, 12 mM로 증가시키에 따라 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 더욱 감소하였다. 이 실험 결과로 미루어 증가된 세포 외 K<sup>+</sup>이 내피세포 의존성 이완을 억제하고 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 억제하는데 이러한 현상은 단지 쥐 대동맥에서만 관찰되는 현상이 아니라 HUVEC 등에서도 관찰되어 여러 혈관들에서 공통적으로 일어나는 현상일 가능성을 보여 준다.

#### 5) 세포 외 K<sup>+</sup>이 내피세포 의존성 이완을 억제하는 기전

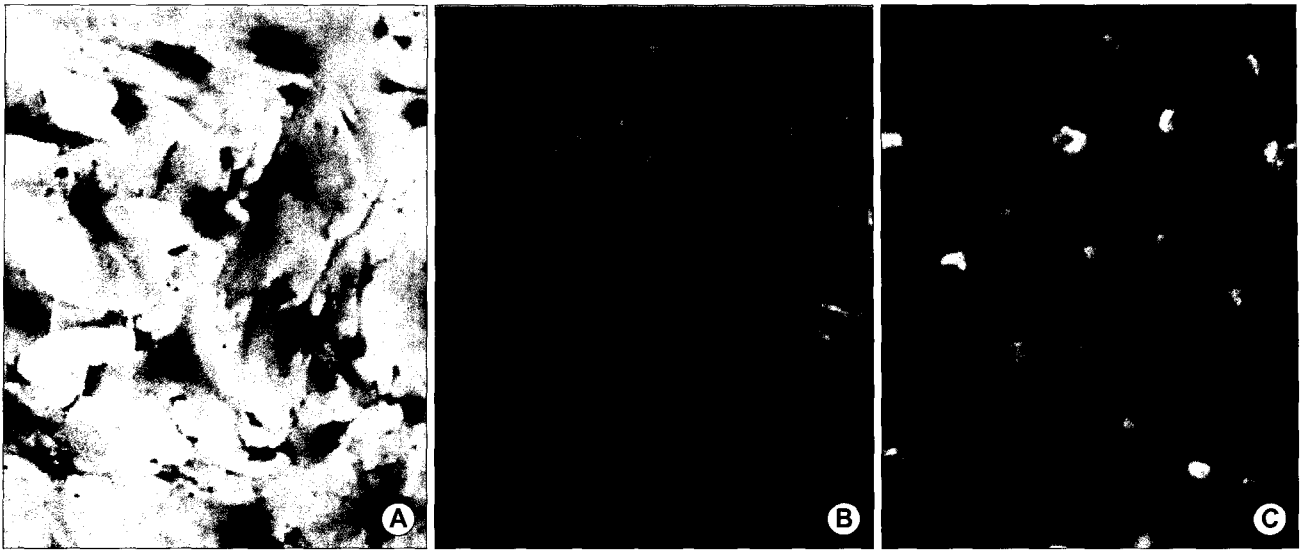
세포 외 K<sup>+</sup> 증가가 내피세포 의존성 이완을 억제하는 기전을 알아보려고 하였다. 세포 외 K<sup>+</sup> 농도의 증가는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump를 활성화한다. 그러므로 내피세포 의존성 이완을 억제하는 세포 외 K<sup>+</sup>의 효과가 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump를 억제한 결과인지를 알아보려고 하였다. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump 억제제인 ouabain을 투여하면 K<sup>+</sup>에 의하여 억제된 내피세포 의존성 이완은 다시 증가하여 세포 외 K<sup>+</sup>의 내피세포 의존성 이완 억제 효과가 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 7).

세포 외 K<sup>+</sup>의 내피세포 의존성 이완 억제 효과는 ouabain 이외에도 Ni<sup>2+</sup>에 의하여 억제되었다. Ni<sup>2+</sup> 100 μM를 전처리하면 NE에 의한 수축력에는 큰 변화가 없는 반면 세포 외 K<sup>+</sup> 농도 증가에 의한 수축력 증가가 대조 실험 (Fig. 8A)에 비하여 감소하여, 세포 외 K<sup>+</sup>의 내피세포 의존성 이완 억제 효과는 Ni<sup>2+</sup>에 의하여 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 8B).

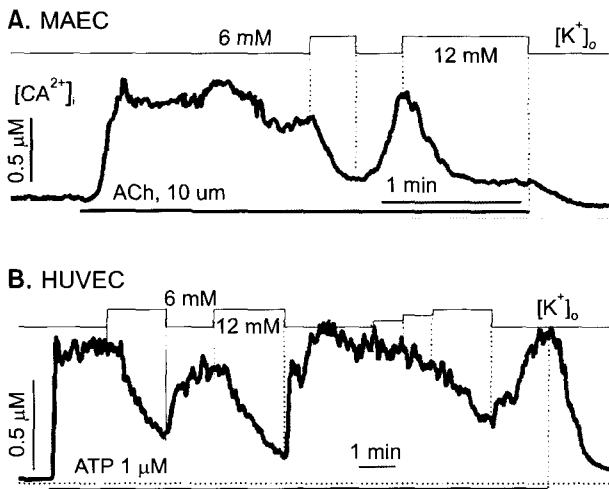
## 고 찰

#### 1) 혈관평활근의 K<sup>+</sup>-유발 이완(K<sup>+</sup>-induced relaxation)

혈관평활근의 K<sup>+</sup>-유발 이완은 저항혈관의 중요한 수축성 조절 기전으로 이미 잘 알려져 있다. 세포 외 K<sup>+</sup>이 수 mM 정도 증가하면 혈관평활근에 있는 inwardly rectifying K<sup>+</sup> 전류와 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump가 활성화되고 이로 인하여 막전압이 과분극된다. 혈관평활근은 막전압이 과분극되면 막전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로가 막히게 되어 혈관평활근 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 감소하고 이완한다. 본 실험에서도 K<sup>+</sup> 유발 이

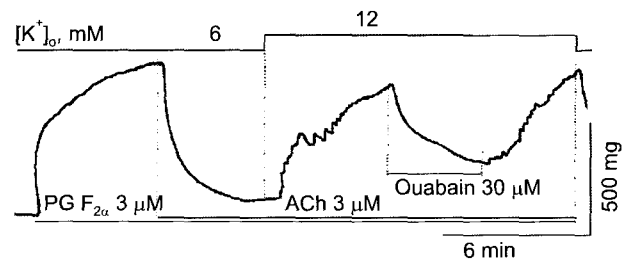


**Fig. 5.** Characterization of endothelial phenotype of the cells isolated from the inner layer of mouse aorta ( $\times 400$ ). A: Immunohistochemistry of the explanted cells and the representative staining of vWF. Almost all of isolated cells were well stained by anti-vWF antibody. It is well-known that common contaminants, fibroblast and smooth muscle, are also stained by anti-vWF antibody. B & C: LDL uptake test. All of isolated cells actively took up DiI acetylated-LDL into their cytoplasm (C), compared with the control (B).



**Fig. 6.** Inhibition of agonists-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase on increasing  $[K^+]_o$  from 6 to 12 mM. A: In mouse aortic endothelial cell, ACh or ATP increased  $[Ca^{2+}]_i$ , while the increased  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced by the increase of  $[K^+]_o$ . B: in HUVEC, the inhibitory effect was dependent on  $[K^+]_o$ .

완이 경동맥과 같은 도관혈관에서는 일어나지 않으나 기저동맥과 상장간막동맥 분지는 저항혈관에서는 일어나 저항혈관 수축성 조절에 세포 외  $K^+$ 이 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.



**Fig. 7.** Effect of ouabain on the inhibitory effect of  $[K^+]_o$  on endothelium-dependent relaxation. Note that ouabain reversed the inhibited endothelium-dependent relaxation by extracellular  $K^+$ .

본 연구에서는  $K^+$  유발 이완의 기전이 저항혈관의 종류에 따라 다를 가능성을 발견하였다. 즉 기저동맥은 고농도보다는 저농도에서 상장간막동맥 분지는 저농도보다는 고농도에서의 세포 외  $K^+$  농도 변화에 민감하게 반응하였다. 한편 inwardly rectifying  $K^+$  전류를 억제하는  $Ba^{2+}$ 은 6에서 12 mM 증가에 의한 이완을 억제한 반면 1에서 3 mM 증가에 의한 이완은 억제하지 않아 저농도  $K^+$ 에서의 이완은  $Na^+-K^+$  pump에 의한 가능성을 보여 준다. 그러므로 혈관에 따른  $K^+$  효과 차이는 혈관종류에 따라 inwardly rectifying  $K^+$  전류와  $Na^+-K^+$  pump의 활동도가 다른 결과로 유발되었으리라 추정된다. 즉 기저동맥의 경

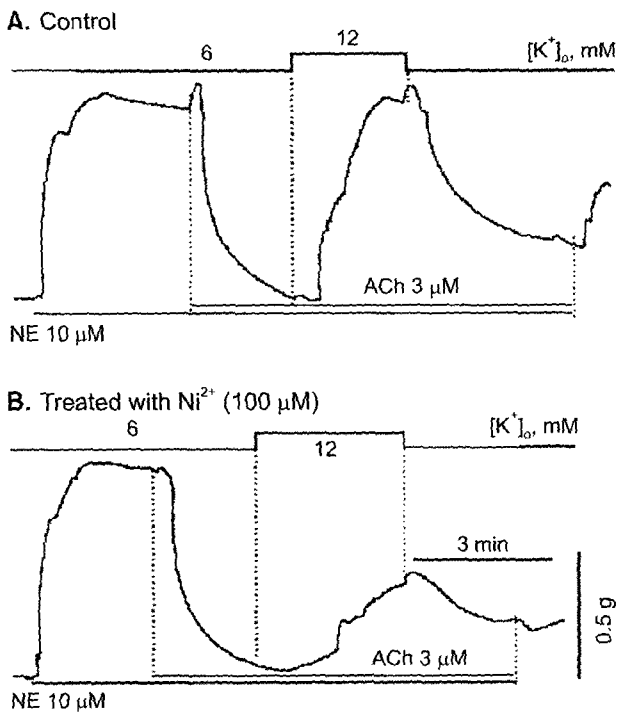


Fig. 8. Effect of Ni<sup>2+</sup> on the inhibitory effect of [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> on endothelium-dependent relaxation. Note that the increase of contraction was reduced by the pretreatment with Ni<sup>2+</sup> (B), compared with the control (A).

우 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump에 의하여 K<sup>+</sup> 유발 이완이 일어나며 상장간막동맥 분지의 경우 주로 inwardly rectifying K<sup>+</sup> 전류에 의하여 일어날 것으로 생각된다. 이는 혈관종류에 따라 K<sup>+</sup> 유발 이완 기전이 차이가 있음을 보여 주는데 그 생리학적 의의에 대해서는 추후 더 연구가 필요하다.

## 2) 내피세포 의존성 이완에 대한 세포 외 K<sup>+</sup>의 억제효과와 그 기전

(1) 혈관내피세포 배양: 소 대동맥, 인간제대정맥과 같이 큰 혈관들은 아교질분해효소(collagenase)와 같은 효소를 처리하여 혈관내피세포를 분리 배양할 수 있다. 그러나 쥐 대동맥과 같이 작은 혈관의 경우 동일한 방법을 사용하기 어려우며 분리과정 중에 다른 세포들에 오염될 확률이 높다. 본 실험에 사용된 일차 배양 기법으로 배양한 혈관내피세포들은 vWF를 가지고 있으며 저밀도 지단백 섭취 실험에 양성 반응을 보여 혈관내피세포임을 확인할 수 있었다. 특히 혈관내피세포에 가장 민감한 검출 방법인 저밀도 지단백 섭취 실험의 경우 계대 1에서 3까지는 양성 반응이 유지되었으며 그 이후에는 점차 양성 반응이

감소하였다. 이는 계대 배양을 거듭함에 따라 혈관내피세포 이외의 다른 세포들의 더 많이 자란 결과이거나 아니면 혈관내피세포의 성격이 변화한 결과로 생각된다. 그러나 본 실험과 같이 계대 1 혹은 2 정도까지만 실험에 사용하면 타 세포 오염의 위험성은 없을 것이다. 그러므로 일차 배양 기법은 쥐 대동맥과 같은 작은 혈관에서 혈관내피세포를 분리해 낼 수 있는 좋은 방법으로 생각된다.

(2) 내피세포 의존성 이완을 억제하는 세포 외 K<sup>+</sup>의 기전: 혈관내피세포에서 EDRFs 분비는 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의하여 유발되는데 NO가 EDRFs 중의 하나로 잘 알려져 있다[3]. 본 실험에서는 세포 외 K<sup>+</sup> 농도의 증가는 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 억제하고 내피세포 의존성 이완을 억제함을 관찰하였다. 즉 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 수 mM 범위 내에서 증가시키면 혈관평활근의 수축이 유발되지 않았으며 혈관수축제의 혈관평활근에 대한 민감도도 증가시키지 않았다. 반면 혈관내피세포가 있는 경우에는 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 수 mM 정도 증가하면 ACh에 의한 이완은 억제되어 세포 외 K<sup>+</sup> 농도의 증가는 내피세포 의존성 이완을 억제하는데 이는 EDRFs의 생성이 억제된 결과임을 추정할 수 있었다. 그리고 배양한 쥐 대동맥 혈관내피세포와 HUVEC에서 ATP에 의하여 증가된 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 세포 외 K<sup>+</sup> 농도를 수 mM 증가하는 경우 농도 의존적으로 억제된 결과로 미루어 세포 외 K<sup>+</sup> 증가에 의한 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 감소가 EDRFs 생성을 억제하고 그로 인하여 내피세포 의존성 이완이 억제되었을 것으로 추정할 수 있다.

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump의 활동도는 세포 외 K<sup>+</sup> 농도에 의존적이므로 세포 외 K<sup>+</sup> 농도 증가는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump의 활동도를 증가시킨다. Ouabain에 의하여 내피세포 의존성 이완에 대한 세포 외 K<sup>+</sup>의 효과가 억제되어 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump가 이 기전에 중요한 역할을 함을 추측할 수 있다. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump가 세포의 기능에 여러 가지로 영향을 미친다. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump가 억제되면 막전압이 저분극되고 세포 내 Na<sup>+</sup> 농도가 증가하여 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange (reverse mode)가 활성화되어 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 증가하게 된다. 그러므로 ouabain에 의하여 막전압이 저분극이 되면 혈관내피세포에서는 오히려 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 감소하게 되므로 Fig. 7에서 보는 바와 같은 ouabain의 효과는 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange (reverse mode)가 활성화되어 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 증가한 결과로 추측된다.

이러한 가정은 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger의 억제제인 Ni<sup>2+</sup>을 이용하여 확인할 수 있었다. Fig. 8과 같이 내피세포 의존성 이완을 억제하는 세포 외 K<sup>+</sup>의 효과는 Ni<sup>2+</sup>에 의하여



억제되어  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump와 함께  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchange가 중요한 역할을 하리라 추정된다. 즉 세포 외  $\text{K}^+$  농도 증가에 의하여  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump가 활성화되면 세포 내  $\text{Na}^+$  농도가 감소하고 이로 인하여  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchange (forward mode)가 활성화되면 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 감소하여 내피세포의 의존성 이완이 억제되었으리라 생각된다.

(3) 생리학적 중요성: 한편 세포 외  $\text{K}^+$  농도 증가는 여러 가지 경우에 관찰될 수 있다. 이는 세포 내에는 많은 양의  $\text{K}^+$ 이 있으므로 세포가 활성화되거나 혹은 세포가 죽는 경우 세포 내  $\text{K}^+$ 이 유출되어 세포 외  $\text{K}^+$  농도는 증가할 수 있으며 특히 국소 부위나 혈행 장애가 있는 부위에는 쉽게 증가할 수 있을 것으로 기대된다. 그러므로 정상적인 상황에서는 세포가 자극을 받아 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 증가하게 되면 대부분의 세포에서는  $\text{K}^+$  통로가 활성화되고 이  $\text{K}^+$  통로에 의하여  $\text{K}^+$ 의 유출이 일어나 세포 외  $\text{K}^+$  농도가 국소적으로 증가할 수 있다. 특히 혈관을 구성하는 평활근세포와 혈관내피세포에는  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel이 발달되어 있는데 본 연구에서처럼 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도가 증가되면 이러한  $\text{K}^+$  channel이 활성화되어  $\text{K}^+$  유출이 일어난다. 이렇게  $\text{K}^+$ 이 유출되어 세포 외  $\text{K}^+$  농도가 국소적으로 증가하면 혈관내피세포의  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 감소시키고 EDRFs의 분비를 감소시킬 것으로 생각된다. 즉 증가된  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의하여 유출된  $\text{K}^+$ 에 의하여 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 저하되고 EDRFs의 분비가 감소되는 음성 되먹임(negative feedback)으로 작용하게 될 것으로 생각된다.

## 결 론

수 mM 범위에서의 세포 외  $\text{K}^+$  농도 변화는 저항혈관에서는 혈관평활근의 수축성을 저하하고 혈관내피세포에서는 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$ 을 감소시켜 내피세포 의존성 이완을 감소시켜 혈관평활근의 수축성을 조절하는데 정상적 혹은 병적인 상황에서 수 mM 범위에서의 세포 외  $\text{K}^+$  농도 변화는 쉽게 동반되므로 이 기전을 혈관의 수축성을 조절하는 매우 중요한 기전으로 생각된다. 한편 혈관 종류에 따른 혈관평활근에 대한  $\text{K}^+$  작용 기전과 그 차이, 그리고 혈관내피세포에 대한 작용 기전은 더 연구가 필요하다고 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. *The obligatory role of endo-*

- thelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature 1980;288:373-6.
2. Feletou M, Vanhoutte PM. *Endothelin-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. Furchgott RF, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived relaxing and contracting factors.* Faseb J 1989;3:2007-18.
6. Vanhoutte PM. *Endothelium-dependent contractions in arteries and veins.* Blood Vessels 1987;24:141-4.
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. Inagami T, Naruse M, Hoover R. *Endothelium as an endocrine organ.* Annu Rev Physiol 1995;57:171-89.
9. Lansmen JB, Hallam TJ, Rink TJ. *Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers?* Nature 1987;325:811-3.
10. Nilius B, Viana F, Droogmans G. *Ion channels in vascular endothelium.* Annu Rev Physiol 1997;59:145-70.
11. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH.  *$\text{K}^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.* Nature 1998;396:269-72.
12. Jensen BS, Strøbæk D, Christophersen P, et al. *Characterization of the cloned human intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel.* Am J Physiol 1998;275:C848-56.
13. Jow F, Sullivan K, Sokol P, Numann R. *Induction of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current and transient outward currents in human capillary endothelial cells.* J Membr Biol 1999; 167:53-64.
14. Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, Thurau K. *Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats.* Circ Res 1972;31:240-7.
15. McCarron JG, Halpern W. *Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanism.* Am J Physiol 1990;259:H902-8.
16. Furchgott RF, Zawadzki JV. *ATP relaxes rabbit aortic smooth muscle by both an indirect action via endothelial cells and a direct action.* Pharmacologist 1980;22:271 (abstr).
17. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures.* J Cell Biol 1988;107:1589-98.
18. McGuire PG, Orkin RW. *Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation defined by substrata.* Lab Invest 1987;57:94-105.
19. McGuire PG, Seeds NW. *The interaction of plasminogen*

activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. J Cell Biochem 1989;40:215-27.

20. Voets T, Wei L, De Smet P, et al. Downregulation of volume-activated  $Cl^-$  currents during muscle differentiation. Am J Physiol 1997;272:C667-74.

=국문 초록=

배경: 외부 자극에 의하여 세포 내  $Ca^{2+}$ 이 증가하면 세포 내  $K^+$ 이 유출되어 세포 외  $K^+$  농도는 수 mM 범위에서 증가할 수 있다. 이러한 세포 외  $K^+$ 의 증가가 혈관 수축성에 미치는 영향을 규명하고자, 세포 외  $K^+$ 가 혈관평활근 수축성, 내피세포 의존성 이완과 혈관내피세포  $Ca^{2+}$  농도에 미치는 영향을 알아보려 하였다. 대상 및 방법: 토끼에서 분리한 경동맥, 상장간막동맥 분지, 기저동맥과 쥐의 대동맥에서 등장성 수축을 기록하였으며 배양한 쥐의 대동맥 혈관내피세포와 인간 제대정맥 내피세포에서 세포 내  $Ca^{2+}$  변화를 측정하였다. 결과: 세포 외  $K^+$  농도를 6에서 12 mM로 증가하는 경우 도관동맥인 토끼 경동맥은 수축성에 변화가 없는 반면 저항혈관인 기저동맥과 상장간막동맥분지는 이완하였다. 이러한  $K^+$  유발 이완은 혈관 종류에 따라 차이가 있었는데 기저동맥에서는 세포 외  $K^+$  농도를 6에서 12 mM로 증가하였을 때보다 세포 외  $K^+$  농도를 1에서 3 mM로 증가하였을 때 더 크게 이완하였으며 상장간막동맥의 분지에서는 반대로 세포 외  $K^+$  농도를 6에서 12 mM로 증가하였을 때 더 크게 이완하였다. 그리고 세포 외  $K^+$  농도를 6에서 12 mM로 증가하였을 때의 이완은  $Ba^{2+}$ 에 의하여 억제되는 반면 1에서 3 mM로 증가에 의한 이완은 억제되지 않았다. 쥐 대동맥에서도 토끼 경동맥과 동일한 효과가 관찰되었는데 세포 외  $K^+$  농도를 6 mM에서 12 mM로 변화시켜도 norepinephrine 혹은 prostaglandin  $F_{2\alpha}$ 에 의한 수축력은 유의한 변화가 없었다. 또한 세포 외  $K^+$  농도를 점차 증가시키는 경우 12 mM 이상 증가가 되면 혈관평활근이 수축하기 시작하였지만 12 mM 이하의 증가에 의해서는 혈관평활근의 수축력은 증가하지 않았다. 한편 쥐 대동맥에서 acetylcholine에 의하여 유발된 내피세포 의존성 이완은 세포 외  $K^+$  농도를 정상 6 mM에서 12 mM로 증가시키면 억제되었다. 한편 배양한 쥐 대동맥 내피세포에서는 acetylcholine 혹은 ATP에 의하여 세포 내  $Ca^{2+}$ 이 증가하였다. 증가한 세포 내  $Ca^{2+}$ 은 세포 외  $K^+$  농도를 6 mM에서 12 mM로 증가시키면 가역적 및 농도 의존적으로 감소하였다. 세포 외  $K^+$  증가에 의한 세포 내  $Ca^{2+}$  억제 효과는 인간 제대정맥 내피세포에서도 관찰되었다. 그리고 세포 외  $K^+$  증가에 의한 내피세포 의존성 이완의 억제효과는  $Na^+-K^+$  pump 억제제인 ouabain과  $Na^+-Ca^{2+}$  exchanger 억제제인  $Ni^{2+}$ 에 의하여 억제되었다. 결론: 이러한 실험 결과로 미루어 세포 외  $K^+$ 의 증가는 저항혈관 평활근을 이완시키는데 그 기전은 혈관 종류에 따라 차이가 있었다. 그리고 세포 외  $K^+$ 의 증가는 혈관내피세포  $Ca^{2+}$ 을 감소시켜 내피세포 의존성 이완을 억제하는데 이는  $Na^+-K^+$  pump를 활성화시켜 일어나는 것으로 생각된다.

- 중심 단어 : 1. 칼륨  
2. 혈관이완  
3. 내피세포 의존성 이완인자  
4. 칼슘