

내피세포성 이완인자에 대한 세포외 Ca^{2+} 및 Ca^{2+} -길항제의 작용기전

진 성 훈* · 서 경 필** · 서 석 효*** · 김 기 환***

—Abstract—

Acting Mechanisms of Extracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} -antagonists on Endothelium-Derived Relaxing Factor in Rabbit Aorta.

Sung Hoon Jin, M.D.*, Kyung Phill Suh, M.D.**, Suk Hyo Suh, M.D.***, Ki Whan Kim, M.D.***

A bioassay technique and organ bath study were performed to analyze the effects of extracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} -antagonists on endothelium-derived relaxing factor(s) (EDRF) released from the endothelial cells of rabbit aorta. Transverse strips with intact endothelium or damaged endothelium were used for the mechanical contraction experiment using organ bath. Long segment including thoracic and abdominal aorta with endothelium (EDRF donor aorta) was perfused with Tyrode solution which was aerated with 95% O_2 -5% CO_2 mixed gas and kept at 35°C. The perfusate was bioassayed with a transverse strip of thoracic aorta with damaged endothelium. The test strip was contracted with norepinephrine and acetylcholine was used to stimulate the release of EDRF from endothelial cells.

The results obtained were as follows :

- 1) The endothelium-dependent relaxation (EDR) induced by acetylcholine was biphasic ; an initial rapid relaxation followed by a slow relaxation.
- 2) EDR induced by acetylcholine was reduced gradually with the decrease in the concentration of extracellular Ca^{2+} . The effect of extracellular Ca^{2+} on EDR was more prominent in the late slow relaxation phase.
- 3) EDR to acetylcholine was not altered by acute exposure to organic Ca^{2+} -antagonists. Pretreatment with verapamil to the EDRF donor aortic segment did not alter the magnitude of EDR.
- 4) Among the inorganic Ca^{2+} -antagonists Mn^{2+} and Cd^{2+} did not inhibit EDR, whereas Co^{2+} and La^{3+} inhibited EDR.
- 5) The inhibitory response of Co^{2+} to EDR developed when infused directly on the test

*인하대학교병원 흉부외과학교실

**Department of Thoracic and Cardiovasc Surgery, Inha Hospital

***서울대학교병원 흉부외과학교실

****서울대학교 의과대학 생리학과

*****Department of Physiology, College of Medicine, Seoul National University

1990년 12월 27일 접수

strip. That of La^{3+} , however, was evoked when added to solution perfusing the donor aortic segment.

The above results suggest that Ca^{2+} -antagonists do not affect EDR and the inhibitory effect of Co^{2+} results from influencing the action of EDRF on vascular smooth muscle, whereas that of La^{3+} results from its action on the release of EDRF from endothelial cells.

Key word : Rabbit aorta, EDRF, Ca^{2+} , Ca^{2+} -antagonists

1. 서 론

최근 10년 동안에 이루어진 여러가지 중요한 발견들에 의하여 혈관평활근 긴장도의 조절에는 혈관평활근에 분포하는 자율신경계의 기능 이외에도 내피세포 또한 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 즉, 자율신경은 교감신경의 α -receptor를 통하여 수축을 일으키고 β -receptor을 통하여는 이완을 일으키며, 혈관내피세포는 내피세포가 가지고 있는 여러가지 기능에 의하여 혈관평활근의 긴장도에 영향을 미치고 있다.

혈관내피세포는 다음과 같은 여러가지 기전에 의하여 평활근의 긴장도를 조절하고 있다. 1) 혈관평활근과 혈액을 서로 분리시켜 혈액 속에 있는 여러가지 호르몬 및 vasoactive substances(e.g. norepinephrine, serotonin, and kinins)가 직접 혈관평활근에 작용하는 것을 막는 physical barrier, 2) 혈액 속에 있는 여러가지 vasoactive substances를 대사시켜 이러한 substances의 혈관평활근에 대한 작용을 감소시키는 역할, 3) angiotension I을 angiotension II로 전환시키는 경우와 같이 전구물질을 vasoactive product로 전환시키거나, 4) 여러가지 vasoactive substances(prostacyclin, EDCF, and EDRF)를 분비하여 혈관평활근의 긴장도를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Vanhouette, 1986). 이중 여러가지 vasoactive substances를 분비하는 기능은 가장 직접적으로 혈관평활근의 긴장도를 조절하는 기전으로서 여러가지 환경의 변화 및 분비유발인자에 의하여 분비된다. 즉 prostacyclin은 bradykinin, thrombin 같은 물질들에 의하여 분비되며, 내피세포성 이완인자(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)는 아세틸콜린, 호르몬 외에도 substance P와 같은 신경전달물질, ADP, ATP, 여러가지 지방산 등 생체 내에 존재하는 많은 물질에 의하여 분비가 된다(Furchtgott, 1983). 또한 내피세포성 이완인자는 이러한 chemical stimuli 외에

도 관류액의 속도, shear stress등 physical stimuli에 의하여 분비가 된다(Bassenge et al, 1988). 한편 사람 내피세포를 모두 합하면, 그 크기가 간의 크기와 비슷한 것으로 알려져(Gerlach et al, 1985) 내피세포의 중요성을 짐작하게 한다.

1980년 Furchtgott와 Zawadzki에 의하여 알려진 내피세포의 존성 혈관이완(endothelium-dependent relaxation)은 이후 여러가지 혈관에서 그 현상이 증명되었으며, 내피세포의 손상 및 기능이상이 여러가지 혈관질환의 원인으로 추측되고 있다. 즉 coronary artery spasm에서는 그 부위 내피세포의 손상이 원인으로 추측이 되며(Brum et al 1984 ; Werns et al, 1989), Atherosclerosis를 실험적으로 유발시킨 토끼(Jayakody et al, 1987)나 spontaneously hypertensive rat(Mayhan et al, 1987)에서 내피세포의 존성 혈관이완이 감소하였다는 보고들은 고혈압 및 혈관질환과 내피세포의 기능 이상과의 관계를 강력히 암시하고 있다. 또한 digitalis는 내피세포의 존성 혈관이완을 억제하는 것으로 알려져 있는데, acute volume expansion과 low renin hypertension에서 digitalis like substances가 혈중에서 높아져 있다는 보고가 있어 고혈압과 내피세포 기능이상과의 관계를 더욱 강력히 암시하고 있다(Haddy, 1989).

Ca^{2+} 이 평활근의 수축-이완에 기본적인 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이며 내피세포성 이완인자에 의한 이완 역시 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소로 인하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 즉 내피세포성 이완인자는 세포내 c-GMP의 농도를 높이며(Fostermann et al, 1986 : Ignarro et al, 1988) c-GMP에 의하여 receptor-operated Ca^{2+} channel을 막거나 inositol triphosphate에 의한 세포내 Ca^{2+} 유리를 억제함으로써 혈관이완을 일으킨다(Griffith et al, 1988).

Furchtgott 등(1981)에 의하여 제시된 내피세포성 이완인자의 분비기전에 세포의 Ca^{2+} 이 관여하리라는 추측은 그뒤 여러 학자들의 연구를 통하여 입증이 되

었지만(Rapoport et al, 1984 : Kubota et al, 1985 : Millar et al, 1985), Verapamil과 같은 organic Ca^{2+} – 길항제가 내피세포 의존성 혈관이완 및 내피세포 성 이완인자의 생성과 분비기전에 미치는 영향은 아직 명확하게 규명되지 않았다. Jayakody 등(1987)과 Vanhoutte(1988)는 내피세포 의존성 혈관이완에 영향이 없다고 발표한 반면 Peach 등(1987)은 감소시킨다고 발표하였다. 실험자에 따른 이러한 차이점은 실험방법에 그 원인이 있다. 즉 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용에 미치는 여러가지 물질들에 대한 효과는 organ bath study로만은 그 평가를 내리기라 어려운데, 이는 내피세포성 이완인자를 분비하는 곳인 내피세포와 작용하는 곳인 혈관평활근이 같이 붙어 있어 내피세포나 평활근을 선택적으로 구분하여 실험할 수 없는 organ bath syudy로는 내피세포성 이완인자의 분비와 작용에 미치는 효과를 구분하여 관찰할 수가 없기 때문이다. 단지 bioassay 방법 만이 내피세포성 이완인자를 생성 분비하는 내피세포와 작용이 나타나는 평활근을 서로 분리하여 실험할 수 있으므로 여러 가지 실험조건의 변화에 따른 내피세포성 이완인자의 분비 및 이완작용의 변화양상을 관찰할 수 있어 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용기전에 미치는 영향을 추측할 수 있다. 한편 Ca^{2+} – 길항제가 내피세포 의존성 혈관이완과 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용기전에 미치는 영향을 보다 명확히 밝히는 것은 현재 organic Ca^{2+} – 길항제들이 심혈관질환에 광범위하게 쓰이고 있는 점을 고려할 때, 중요하고 상당히 그 필요성이 요구되는 일이라고 생각된다. 그러므로 저자는 organ bath study와 bioassay 방법을 이용하여 내피세포 의존성 혈관이완에 대한 세포외 Ca^{2+} 과 여러가지 Ca^{2+} – 길항제의 효과를 비교 분석하고 내피세포 의존성 혈관이완에 대한 여러가지 Ca^{2+} – 길항제들의 정확한 작용기전을 밝혀보고자 하였다.

2. 연구목적

토끼 흉부 대동맥을 이용하여 첫째, 내피세포가 혈관수축제에 의하여 유발된 수축에 미치는 영향을 관찰하고 둘째, 세포외 Ca^{2+} 및 Ca^{2+} – 길항제가 내피세포 의존성 혈관이완과 내피세포성 인자의 분비 및 작용과정에 미치는 효과를 관찰하여 내피세포성 인자의 분비와 작용과정에 미치는 Ca^{2+} – 길항제들의 정확한 기전

을 알아 보고자 하였다.

3. 연구재료 및 방법

체중 2kg 내외의 토끼를 암수 구별없이 사용하였다. Pentothal sodium(40mg /kg)으로 마취한 후 총 경동맥을 절단하여 실혈시켰으며 흉부대동맥을 적출하여, 실온에서 100% O_2 로 포화된 phosphate 완충 Tyrode 용액(NaCl 147, KCl 4, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.05, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.42, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.81, glucose 5.5 mM, pH 7.35)내에서 혈관 주위조직을 깨끗이 박리하였다. 내피세포는 Furc-hgott와 Zawadzki(1980 b)의 방법에 따라 작은 숨뭉치로 부드럽게 문질러 제거하였으며 scanning electron microscope으로 내피세포의 제거상태를 확인하였다(그림 1).

Organ bath study

실험용 절편으로 길이 10mm 너비 2mm 정도의 횡단 절편을 만든 다음, 이 절편 37°C에서 100% O_2 로 포화된 tris 완충 Tyrode 용액(NaCl 147, KCl 4, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.05, tris HCl 5, glucose 5.5 mM, pH 7.35)이 들어있는 실험용기에 옮겨 근육고정기와 근수축변환기(Grass FT-03 혹은 Gould J 968)를 연결하고 physiograph(Device 혹은 Gould RS 3200)에서 등장성수축을 기록하였다.

실험용기에서는 15분 간격으로 새로운 용액으로 갈아주었으며 1시간 정도 회복시킨 다음 괴동장력이 750mg이 되게 절편의 길이를 늘려 주었으며, 다시 1시간 정도 회복시킨 다음 실험을 시행하였다. 각 실험 사이의 간격은 1시간 정도로 충분히 회복시킨 다음 시행하였다.

실험 용기는 100ml 용기와 이것을 개량하여 동시에 2개의 절편을 걸 수 있게 만든 50ml 용기를 사용하였다(그림 2). 50ml형 수직형 용기는 내피세포가 있는 것과 없는 것을 동시에 걸어서, 동일한 실험조건에서 내피세포 유무에 따른 등장성 수축의 차이를 직접 비교할 수 있는 장점을 가지고 있었다.

Ca^{2+} 통로를 억제하기 위하여 무기 및 유기 차단제를 전처치한 다음 노에피네프린을 첨가하였는데, Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} 은 노에피네트린 처치 2분전에, verapamil, nifedipine은 30분전에 전처치 하였다.

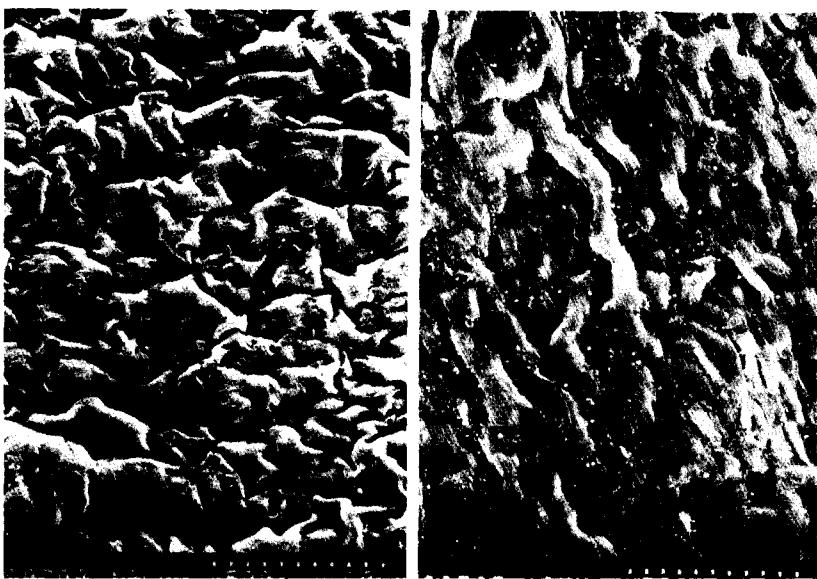


Fig. 1. Scanning electron micrographs of intimal surfaces of rabbit aortic strips with intact endothelium(left) and damaged endothelium(right). The strips were fixed and processed at the beginning of an experiment. In the strip with intact endothelium, it was observed that polygonal endothelial cells covered uniformly the intimal surface. In the strip with damaged ednethelium, fibers of smooth muscles and connective tissues were observed.

Bioassay of EDRF

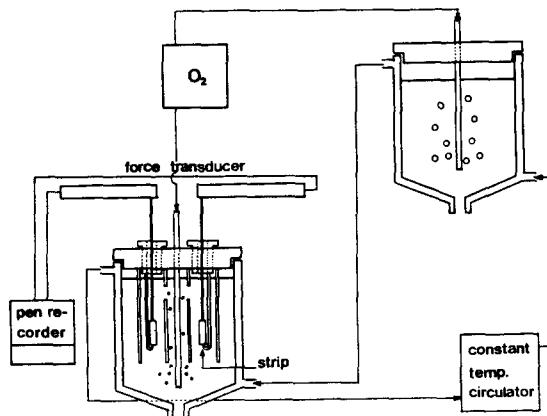


Fig. 2. A schematic representation of the 100cc vertical chamber and the isometric contraction recording system. Two aortic strips with intact endothelium and damaged endothelium were mounted in the same chamber and the difference between the response of the strip with intact endothelium and that of the strip with damaged endothelium could be studied at the same condition.

토끼 흉부 및 복부 대동맥(신동맥이 분지하는 곳까지, 약 6cm)을 적출하여 분지하는 혈관을 모두 끊은 다음, 유리관(I.D. 1.8mm)으로 삽관하고 organ chamber에 설치하였으며 혈관 안팎을 각각 peristaltic pump(Pharmacia Fine Chemicals)로 95% O₂/5% CO₂로 포화된 modified Krebs-Ringer 용액(NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ · 2H₂O 2.5, MgSO₄ · 6H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, calcium disodium ethylenediaminetetraacetic acid 0.026, glucose 11.1 mM)을 흘렸다. 혈관 속을 관류하는 용액과 밖을 흐르는 용액은 서로 혼합되지 않도록 하였으며, 혈관을 관류한 관류액을 내피세포를 제거한 시험절편에 떨어뜨렸다(그림 3). 혈관수축제인 노에피네프린과 내피세포성 이완인자의 분비 유발제인 아세틸콜린을 각각 infusion pump로 관류용액에 주입하며 내피세포성 이완인자의 분비 정도는 노에피네프린 10⁻⁷ M에 의하여 유발된 수축의 크기에 대한 이완 정도로 추정 비교하였다. 여러가지 Ca²⁺-길항제들은 실험의 목적에 맞추어 주입장소를 선정하여 주입하였으며, 어떤 물질이

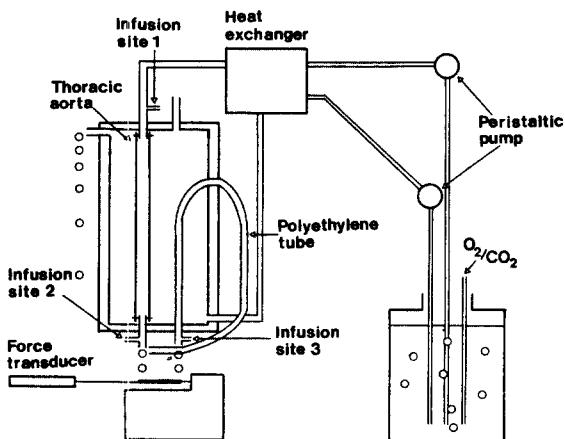


Fig. 3. A schematic representation of superfusion system for bioassay of EDRF(s) released from vascular endothelial cells. A aortic strip without endothelium(bioassay test strip) was mounted for isometric tension recording and superfused with Krebs-Ringer bicarbonate solution that had passed through thoracic aortic segment with endothelium(EDRF donor aorta). Polyethylene tubing was used to increase the transit time between the aortic segment and bioassay strip.

Infusion site(IS)1 : above donor aorta
 IS 2 : below donor aorta, long interaction time with EDRF and infused material when using polyethylene tubing.
 IS 3 : below donor aorta, short interaction time with EDRF and infused material when using polyethylene tubing.

내피세포성 이완인자와 직접 반응하는지의 여부는 polyethylene 관을 관류액 유출구에 연결하여 관류액이 내피세포성 이완인자의 공급혈관에서 시험절편에 떨어질때까지의 경과시간을 길게 한 상태에서, 이 물질을 주입장소 2에서 주입하였을 때와 3에서 주입하였을 때의 이완 정도의 차이 유무로 판단하였다(이때 노에피네프린은 노에피네프린과 내피세포성 이완인자와 직접 반응하여 일어날 수 있는 실험결과의 오류를 방지하기 위해 두 경우 모두 주입장소 3에서 주입하였다. 어떤 물질을 주입장소 2로 주입하는 경우 내피세포성 이완인자와 반응 가능한 시간이 10초로 주입장소 3으로 주입시 반응 가능시간인 2초에 비하여 8초 길다). 실험 용액은 peristaltic pumps로 2ml/min의 속도로 혈관 안팎으로 흘렸으며 infusion pumps(Sci-

entific & Research Instruments LTD)는 0.02 ml /min의 속도로 관류액에 주입하였다. Infusion pumps로 주입되는 용액의 양은 관류액의 2~3%로 5%를 넘지않게 하여 infusion pumps로 주입되는 용액에 의하여 발생할 수 있는 오류를 최소화 하였다.

시험절편은 길이 5mm 너비 2mm의 크기로 만들어 위와 같은 방법으로 내피세포를 제거하였다. 시험절편은 37°C에서 1시간 회복시킨 다음 괴동장력이 750mg 이 되게 길이를 늘여 주었으며 2시간 더 회복시킨 다음 실험을 시행하였다. 실험과 실험 사이는 1시간으로 충분히 회복시킨 다음 시행하였다.

Statistics

모든 통계자료는 평균과 표준편차로 표현하였으며 유의성 정도는 Paired T-test와 unpaired T-test로 하여 유의 수준 $p<0.05$ 로 검증하였다. 각 실험에서의 대표적인 결과를 본 논문에 제시하였다.

Drugs

Acetylcholine chloride, CdCl₂, CoCl₂, L-arterenol bitartrate, LaCl₃, MnCl₂(Sigma), Diltiazem(Tanade Seiyaku Co), Nifedipine(Bayer), Verapamil (Knoll AG)

4. 실험성적

노에피네프린과 아세티콜린 농도 증가에 따른 수축의 변화를 용량-반응 곡선(dose-response curve)으로 그림 4 및 그림 5에 표시하였다. 각 농도별 수축의 크기는 각각 10^{-5} M의 노에피네프린과 아세틸콜린에 의한 수축의 백분율로 표시하였다. 노에피네프린에 의한 용량-반응곡선(그림 4)은 내피세포가 있는 절편(closed circle)에 비하여 내피세포를 없앤 절편(open circle)에서 좌측 이동(left shift)된 양상을 보였는 바, 내피세포를 없앤 절편에서 내피세포가 있는 절편보다 노에피네프린에 예민하게 수축하여 ED₅₀가 감소하였음을 알 수 있었다. 내피세포 의존성 혈관이완을 연구하는 데에는 통상적으로 최대장력의 30~50%를 유발시키는 농도로 agonists를 사용하는 바 본 실험에서는 10^{-5} M 노에피네프린으로 발생된 장력을 100%로 하였을 때 이의 40%에 해당하는 장력을 유발시킨 10^{-7} M을 노에피네프린 농도로 선정하였다.

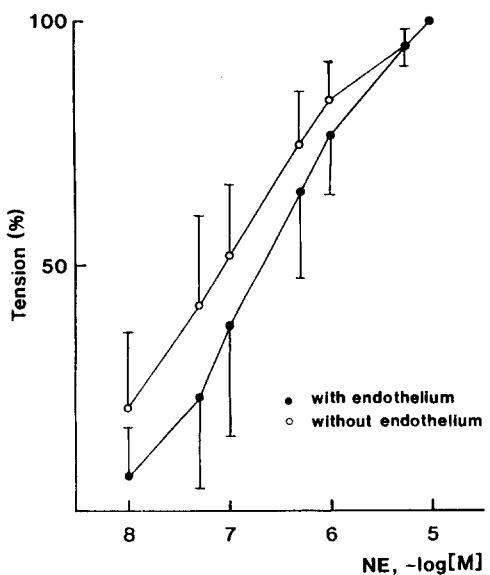


Fig. 4. Concentration-response curves of norepinephrine(NE) in the rabbit aortic strips with intact endothelium(closed circle ; n=12) or damaged endothelium(open circle ; n=9). Tension was expressed as the percentage of the contraction induced by 10^{-5} M NE. Each point and vertical bar represent mean \pm standard deviation(S.D.).

아세틸콜린에 대한 혈관평활근의 반응(그림 5, A)은 평활근의 직접수축 반응과 내피세포를 통한 이완반응이 동시에 합해져서 나타나는 바, 내피세포가 없는 절편은 아세틸콜린의 용량에 따라 수축정도가 점차 증가하는 반면에 내피세포가 있는 절편은 농도가 5×10^{-6} M 이상에서 수축력이 유의하게 증가하였다($p<0.05$, n=5). 10^{-7} M 노에피네프린으로 수축을 유지시킨 절편에 아세틸콜린의 농도를 단계적으로 높여 투여하였다(그림 5, B). 내피세포가 없는 절편에서는 아세틸콜린의 농도에 따라 수축정도가 점차 증가하는 반면 내피세포가 있는 절편에서는 수축정도가 점차 감소하여 10^{-6} M 아세틸콜린에서 최대이완 효과를 보였다. 위의 결과로 미루어 보아 아세틸콜린은 10^{-6} M에서 최대이완 효과를 가짐을 알 수 있으며 내피세포 의존성 혈관이완을 유발시키기 위한 아세틸콜린의 농도는 최대이완을 일으키는 10^{-6} M로 선정하였다.

1) 내피세포 의존성 혈관이완에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 효과

내피세포 의존성 혈관이완에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 효과를 관찰하였다(그림 6). 노에피네프린으로 수축

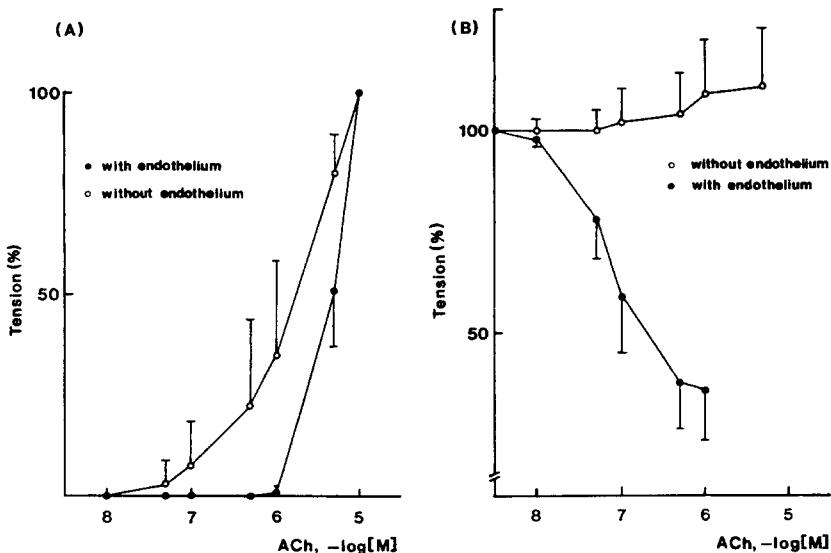


Fig. 5. (A) Concentration-response curves of ACh in the strips with intact endothelium (closed circle ; n=5) or damaged endothelium(open circle ; n=10). The tension was expressed as the percentage of the contraction induced by 10^{-5} M ACh. (B) Concentration-response curves of ACh in the precontracted strips with 10^{-7} M NE. The magnitudes of the responses were expressed as the percentage of the contraction induced 10^{-7} M NE.

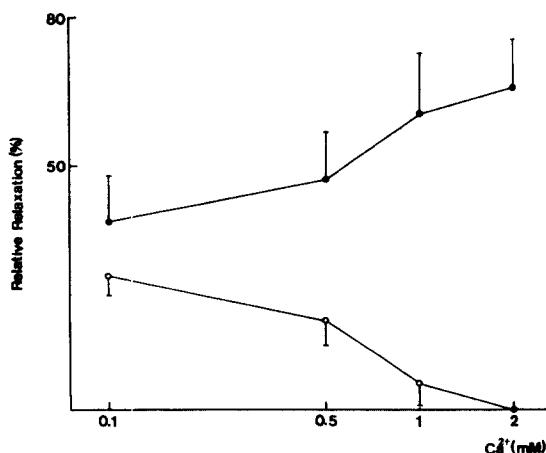


Fig. 6. Effect of extracellular Ca^{2+} on $\text{ACh}(10^{-6} \text{ M})$ -induced relaxation in the presence of endothelium. The magnitude of relaxation was expressed as the percentage of the contraction induced by $\text{NE}(10^{-7} \text{ M})$. With the decrease of extracellular Ca^{2+} , the magnitude of relaxation decreased significantly(closed circle; $p<0.05$, $n=9$). Open circles represent the differences between the magnitude of relaxation in extracellular Ca^{2+} concentration, 2 mM and those in the Ca^{2+} concentration, 1, 0.5 and 0.1 mM.

을 유발시킨 다음 아세틸콜린을 투여하여 내피세포의 존성 혈관이완을 유발시켰다. 아세틸콜린에 의한 이완의 크기는 노에피네프린에 의한 수축의 크기와 비교하여 백분율로 표시하였다. 세포외 Ca^{2+} 농도가 감소함에 따라 내피세포의 존성 혈관이완도 점차 감소하고 있다($p<0.05$, $n=9$).

그림 7은 세포외 Ca^{2+} 농도변화에 따른 노에피네프린과 아세틸콜린에 대한 반응을 나타내는 그림이다. 노에피네프린으로 수축을 유발시킨 다음 아세틸콜린을 투여하면 내피세포를 제거한 절편에서는 수축이 더욱 증가하는 양상을 보이는 반면 내피세포가 있는 절편에서는 노에피네프린에 의한 수축이 감소하였다. 아세틸콜린에 의한 이완과정은 두 시기(초기급속이완기와 후기완만이완기)로 나타나고 있으며, 세포외 Ca^{2+} 의 농도를 낮추어 갈에 따라 후기완만이완기가 먼저 감소하였으며 세포외 Ca^{2+} 0.1mM에서는 초기급속이완기도 감소하였다.

2) 내피세포의 존성 혈관이완에 대한 Ca^{2+} -길항제들의 효과

a) inorganic Ca^{2+} -길항제

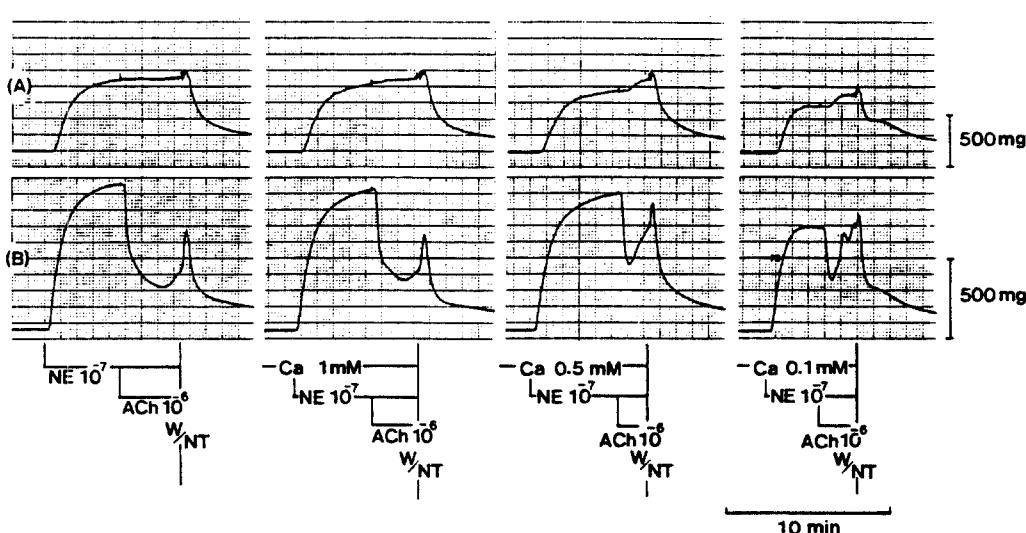


Fig. 7. Effects of low Ca^{2+} concentration on NE-induced contraction and ACh -induced relaxation. The contraction of the strip with damaged endothelium(A) decreased with the decrease of the Ca^{2+} concentration, while the contraction of the strip with intact endothelium(B) did not decrease in 1 and 0.5 mM Ca^{2+} and decreased in 0.1mM Ca^{2+} . The relaxation induced by ACh showed biphasic pattern; initial rapid relaxation phase followed by subsequent slow relaxation phase. At the concentration of extracellular Ca^{2+} , 0.5 and 0.1 mM, the late slow relaxation disappeared, but the early rapid relaxation was not decreased.

Co^{2+} 를 2분간 전처치하고 노에피네프린으로 수축을 유발시킨 다음 아세틸콜린을 투여하였다(그림 8). Co^{2+} 의 경우 내피세포가 없는 절편에서는 노에피네프린에 의한 수축의 크기가 Co^{2+} 농도에 관계없이 변화가 없었다. 내피세포가 있는 절편에서는 Co^{2+} 농도가 증가함에 따라 노에피네프린에 의한 수축이 증가하였으며 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완의

정도는 감소하였다.

Co^{2+} 가 내피세포 의존성 혈관이완을 억제하는 기전을 규명하기 위하여 bioassay를 시행하였다. 관류액이 polyethylene관을 통하지 않고 직접 시험절편에 떨어지게 한 상태에서 주입장소 2로 노에피네프린과 Co^{2+} 를 동시에 주입하여 수축을 유발시켰으며 주입장소 1에서 아세틸콜린을 주입하였다(그림 9). $\text{Co}^{2+} 10^{-6} \text{ M}$

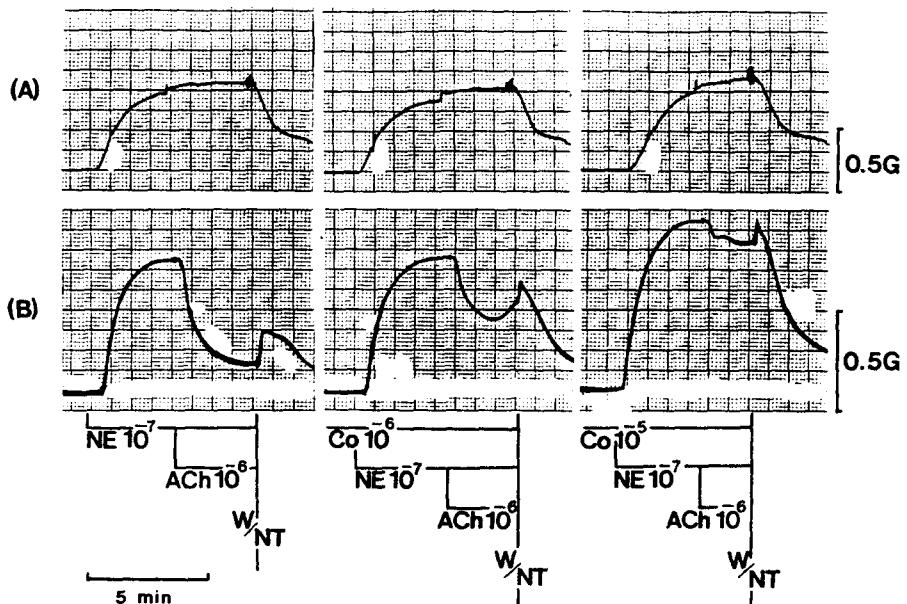


Fig. 8. Effects of Co^{2+} on NE-induced contractions and ACh-induced responses in the absence(A) or presence of endothelial cells(B) . In the strips with damaged endothelium, NE-induced contractions were not altered by application of Co^{2+} In the strips with intact endothelium, however, the magnitudes of the contractions were gradually increased with the increase of Co^{2+} concentration and ACh-induced relaxations were markedly reduced.

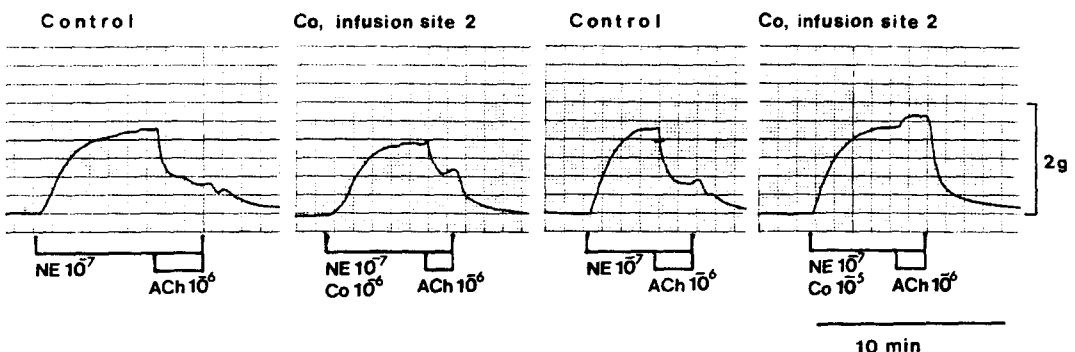


Fig. 9. Effect of Co^{2+} on endothelium-dependent relaxation(EDR) at different concentrations of Co^{2+} . Co^{2+} was given to a bioassay strip through infusion site(IS) 2. Note that EDR was completely blocked at the concentration of $10^{-5} \text{ M} \text{ Co}^{2+}$.

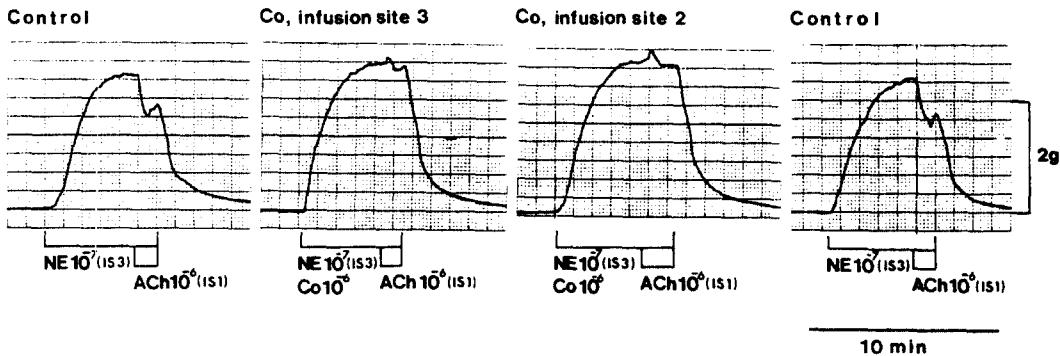


Fig. 10. Effect of Co^{2+} on EDR at different transit times. Co^{2+} was infused through IS 2(long transit time) or IS 3(short transit time). Note that there was no difference between the magnitudes of EDR.

을 주입하였을 때에는 내피세포성 이완인자의 작용을 완전히 억제하지 못하였으며 $\text{Co}^{2+} 10^{-5} \text{ M}$ 을 주입하였을 때 내피세포성 이완인자의 작용이 완전히 억제되었다. Co^{2+} 와 내피세포성 이완인자가 직접 반응하는지를 알아보기 위해 polyethylene관을 연결한 뒤 주입장소 2로 Co^{2+} 를 주입하였을 때와 주입장소 3으로 주입하였을 때의 반응 차이를 관찰하였다(그림 10). 주입장소에 관계없이 Co^{2+} 가 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하는 양상은 동일하였다. 즉 주입장소에 관계없이 아세틸콜린을 주입하였을 때 처음에는 아세틸콜린에 의한 수축효과가 나타나다가 곧 이완을 하였으며 그 이완정도에는 차이가 없었다. Co^{2+} 가 내피세포성 이완인자의 효과를 막는 것이 평활근에서 내피세포성 이완인자가 작용하는 과정에서 그 효과를 억제하는지를 알아보기 위해 관류액이 polyethylene 관을 통하여 주입하였을 때와 동일하게 La^{3+} 도 내피세포성 이완인자와 직접 반응하지 않음을 알 수 있었는데, 주입장소에 관계없이 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하지 않아 La^{3+} 은 Co^{2+} 와는 달리 내피세포성 이완인자가 평활근에 미치는 효과도 억제하지 아니함을 알 수 있었다.

La^{3+} 을 투여하였을 때의 결과를 그림 12에 나타내었다. 내피세포가 있는 절편과 없는 절편 모두 노에피네프린에 의한 수축의 크기는 La^{3+} 농도가 증가함에 따라 점차 감소하였으며 아세틸콜린에 의한 내피세포의 의존성 혈관이완의 정도 역시 감소하여 세포외 Ca^{2+} 농도가 감소하였을 때와 유사한 양상을 보이고 있음을 알 수 있었다. 그러나 초기급속이완이 세포외 Ca^{2+} 을 낮추었을 때와 비교하여 더욱 감소하였다.

La^{3+} 이 내피세포의 의존성 혈관이완을 억제하는 기전

을 알아보기 위해 bioassay를 시행하였다. La^{3+} 과 내피세포성 이완인자가 직접 반응을 하는지를 알아보기 위해 관류액이 polyethylene관을 통해 시험절편에 떨어지도록 polyethylene관을 연결하고 La^{3+} 을 주입장소 2에서 주입하였을 때와 주입장소 3에서 주입하였을 때 와의 반응차이를 관찰하였다(그림 13). 이 경우에도 노에피네프린은 Co^{2+} 를 주입할 때와 마찬가지로 La^{3+} 의 주입장소에 관계없이 주입장소 3에서 주입하였다. Co^{2+} 를 주입하였을 때와 동일하게 La^{3+} 도 내피세포성 이완인자와 직접 반응하지 않음을 알 수 있었는데, 주입장소에 관계없이 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하지 않아 La^{3+} 은 Co^{2+} 와는 달리 내피세포성 이완인자가 평활근에 미치는 효과도 억제하지 아니함을 알 수 있었다.

내피세포의 의존성 혈관이완을 억제하는 La^{3+} 의 작용

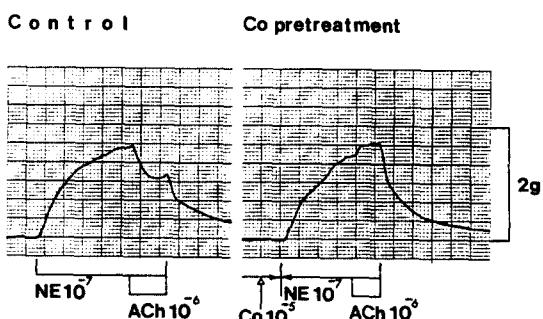


Fig. 11. Effect of Co^{2+} pretreated through IS 2 for 10 min prior to experiment on EDR. After 10 min direct preexposure of Co^{2+} to bioassay strip, EDR was completely inhibited.

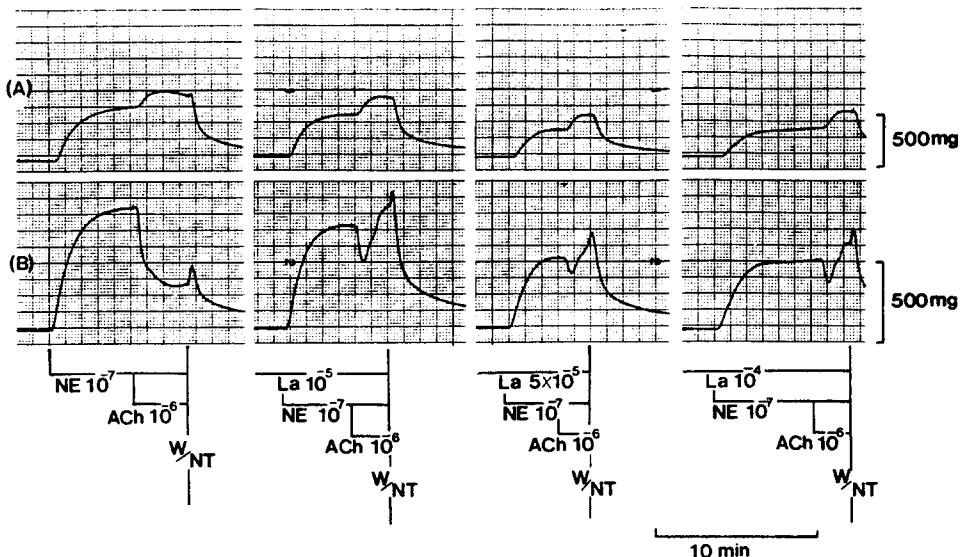


Fig. 12. Effect of La^{3+} on the contraction by $\text{NE}(10^{-7}\text{M})$ and relaxation by $\text{ACh}(10^{-6}\text{M})$ in the absence (A) or presence of endothelial cells(B). NE-induced contractions of both strips were decreased significantly in the presence of La^{3+} ($p<0.05$, $n=4$). In the presence La^{3+} , ACh-induced relaxations were greatly reduced : the late slow relaxations were abolished and the early rapid relaxations were decreased.

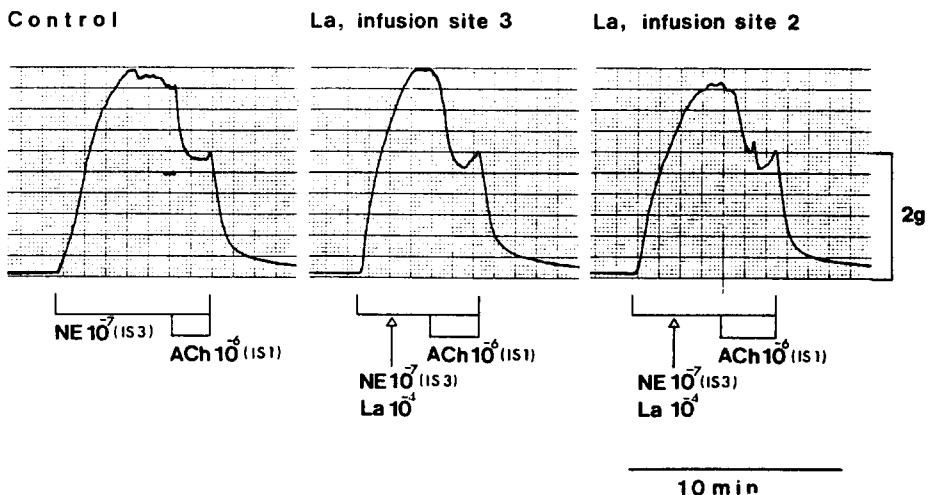


Fig. 13. Effect of La^{3+} on EDR at different transit times. La^{3+} was infused through Is 2 or IS 3. Note that EDR was not inhibited in the two cases.

이 내피세포에서의 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 관류액이 polyethylene관을 통하지 않고 직접 시험절편에 떨어지게한 다음 주입장소 1에서 La^{3+} 를, 주입장소 2에서 노에피네프린을 주입하면서 아세틸콜린의 효과를 관찰하였다(그림 14). 대조실험에 비하여 시험절편의 이완정도가 감소

하였다.

Mn^{2+} 을 투여한 후 아세틸콜린에 의한 내피세포의 존성 혈관이완을 관찰하였다(그림 15). 노에피네프린에 의한 수축의 크기는 내피세포가 있는 절편과 없는 절편에서 모두 감소하였으나 아세틸콜린에 의한 이완의 크기에는 변화가 없었다. Cd^{2+} 를 투여하였을 때도

Mn^{2+} 를 투여하였을 때와 동일한 결과를 얻었다.

b) organic Ca^{2+} -길항제

Verapamil을 30분간 전처치하고 내피세포 의존성 혈관이완의 변화를 보았다(그림 16). Verapamil을 10^{-7} M에서 10^{-6} , 10^{-5} M로 그 농도를 점차 높여감에 따라 노에피네프린에 의한 수축의 크기는 점차 감소하는 반면에, 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완은 초기 급속이완에는 영향이 없었으나 후기완만이완은 오히려 증가하였다. Nifedipine, diltiazem을 사용하였

을 때에도 verapamil과 동일한 결과를 보였다. 이 결과는 Mn^{2+} , Cd^{2+} 를 사용하였을 때와도 동일한 결과이다. Verapamil의 경우 아세틸콜린에 의한 이완정도는 verapamil을 10분간 전처치를 하였을 때와 30분간 전처치하였을 때가 차이가 없었다. 후기완만이완이 증가한 것은 노에피네프린에 의한 수축의 감소 특히 긴장성수축이 감소된 결과로 후기완만이완이 증가하였을 것으로 사료된다. Verapamil을 30분 전처치를 하여도 내피세포 의존성 혈관이완이 감소하지 않았지만 이러

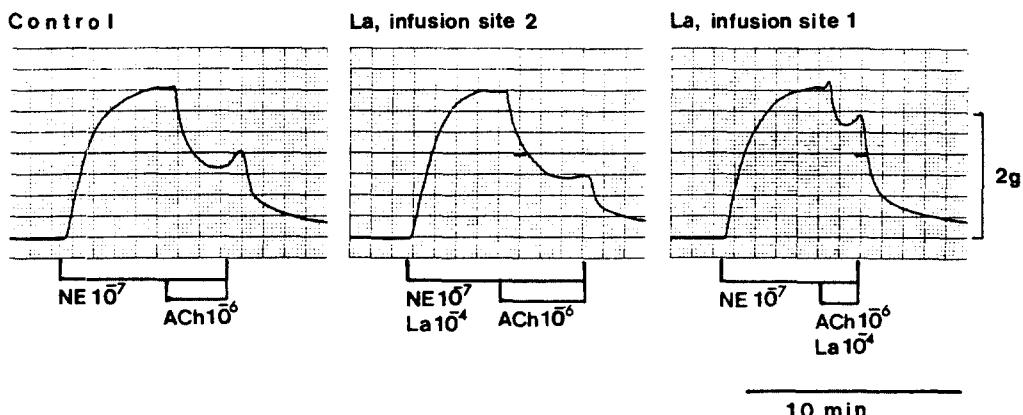


Fig. 14. Comparison of the effect of La^{3+} infused through IS 2 with that infused through IS 1 in EDR. Note that the inhibitory effect of La^{3+} on EDR was developed when infusing through IS 1.

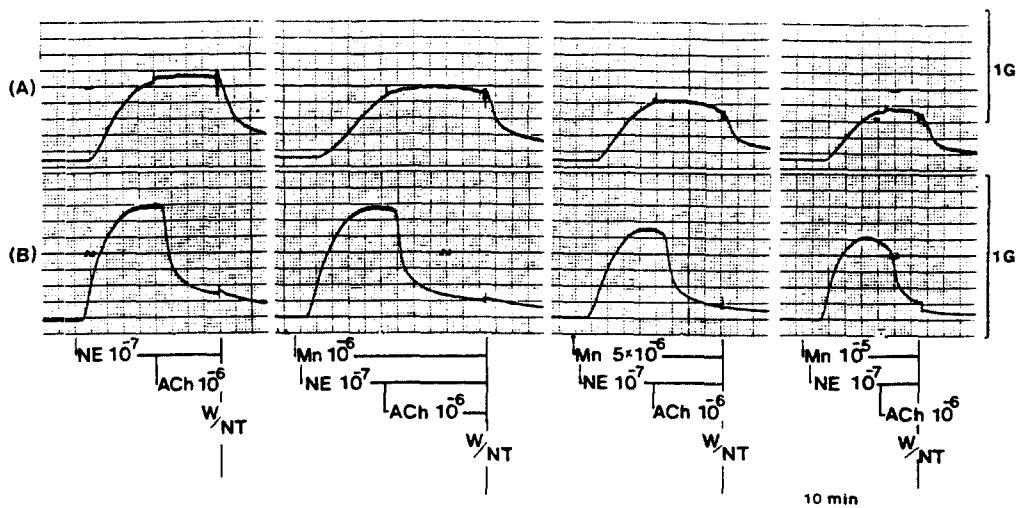


Fig. 15. Effect of Mn^{2+} on NE-induced contractions and ACh-induced relaxations in the absence (A) or presence of endothelial cells(B). In both groups, Mn^{2+} suppressed NE-induced contractions. ACh-induced relaxation in the strip with intact endothelium, however, were not changed by Mn^{2+} .

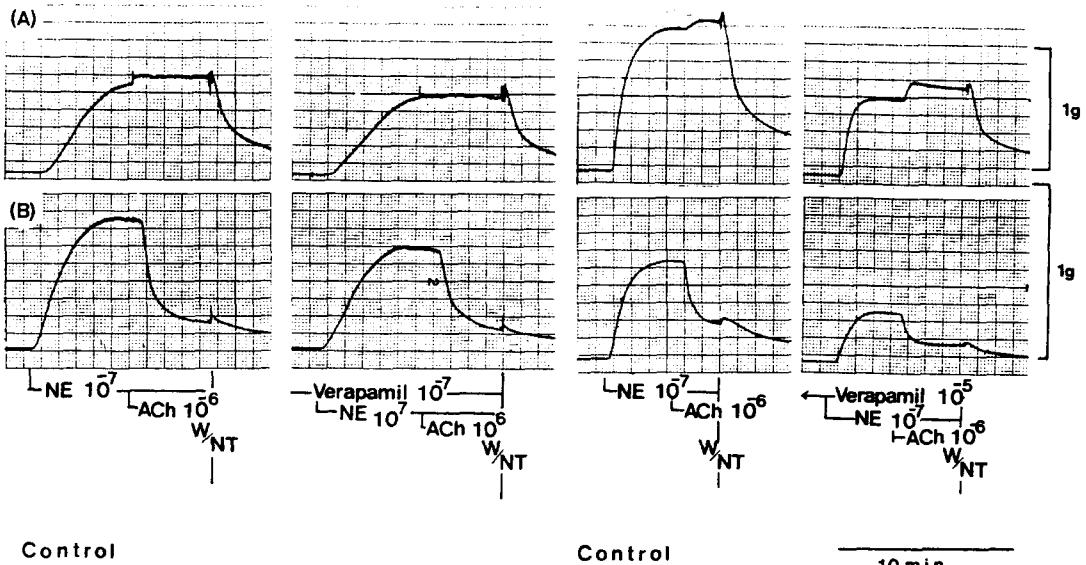


Fig. 16. Effect of verapamil on NE-induced contractions and ACh-induced responses in the absence(A) or presence of endothelial cells(B). The effect of verapamil was similar to that of Mn^{2+} .

한 결과가 verapamil이 내피세포 뿐만이 아니라 혈관 평활근에도 작용 노에피네프린에 의한 수축, 특히 긴 장성 수축을 감소시켜 내피세포 의존성 혈관이완의 정도를 실제보다 과장되게 나타나게 하였을 가능성을 배제할 수 없다. 이를 확인하기 위해 bioassay를 시행하였다.

Verapamil이 내피세포에서 내피세포성 이완인자가 분비되는 과정을 억제하는지를 알아보기 위해 관류액이 polyethylene관을 통하지 않는 상태에서, 관류액이 시험절편에 떨어지지않게 하고 시험절편에는 EDRF 공급혈관을 거치지아니한 용액이 떨어지게 한 다음 주입장소 1에서 30분 동안 verapamil을 주입하였다. 그런 다음 verapamil의 주입을 멈추고 관류액이 시험절편에 떨어지게 한 다음 노에피네프린을 주입장소 2에서 주입하여 수축을 유발시켰으며 아세틸콜린은 주입장소 1에서 주입하였다(그림 17). Verapamil을 30분 간 내피세포성 이완인자의 공급혈관에 전처치한 실험과 대조실험이 verapamil의 전처치 유무와 관계없이 아세틸콜린에 의한 이완정도는 유사함을 알 수 있었다.

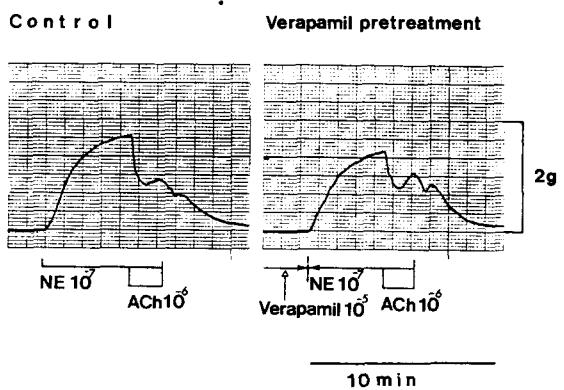


Fig. 17. Effect of verapamil infused through IS 1 for 30 min on EDR. During this period the test strip was dripped with the solution which was not perfused through the donor segment. Note that verapamil did not inhibit EDR.

5. 고 칠

Vasoactive agonists에 대한 혈관평활근의 sensitivity가 내피세포 유무에 따라 어떠한 차이가 있는지 그리고 왜 그러한 차이가 나타나는지에 대하여 알려진 바가 아직 없다. Furchtgott와 Zawadzki(1980 a)는

노에피네프린과 같은 vasoactive agonists에 대한 토끼 대동맥의 sensitivity가 내피세포 유무와 관계없이 일정하며 내피세포 유무에 따라 이러한 agonists에 대한 sensitivity가 달라진 것은 내피세포를 제거할 때에 혈관평활근에 가해진 손상때문일 것이라는 가능성을 제시하였다. 반면 Cocks와 Angus(1983)는 내피세포가 없는 절편에서 내피세포가 있는 절편에 비하여 노에피네프린에 의한 용량-반응 곡선이 좌방이동(left-shift) 되는데 이는 노에피네프린이 내피세포성 이완인자의 분비를 유발하기 때문이라고 보고하였다. 한편 본 실험실에서 시행한 돼지 관동맥에서의 PG F_{2α}에 대한 용량-반응 곡선은 좌방이동되지 않아 vasoactive agonists가 내피세포성 이완인자의 분비 유발 여부에 따라 내피세포 유무에 따른 용량-반응 곡선의 좌방이동여부가 생길것을 짐작하게 한다. 그러나 저자가 시행한 실험에서는 세로토닌으로 수축을 유발시킨 절편에서 노에피네프린이 내피세포 의존성 혈관이완을 유발시키지 않아 노에피네프린이 내피세포성 이완인자를 분비시킨다는 Cocks와 Angus(1983)의 실험결과를 확인할 수 없었다. 그러나 내피세포가 내피세포성 이완인자를 분비하여 혈관평활근의 긴장도를 조절하므로 혈관평활근 긴장도 변화에 따라 내피세포성 이완인자의 분비가 변하고 그 결과 노에피네프린에 의한 용량-반응 곡선이 달라졌을 가능성을 배제 할 수 없다.

내피세포성 이완인자의 분비에 세포외 Ca²⁺이 필요하다는 것은 세포외 Ca²⁺을 제거하거나 낮추었을 때 내피세포 의존성 혈관이완이 감소하며(Furchtgott, 1983 ; Miller et al, 1985 ; Long & Stone 1985), Ca²⁺ ionophore A23187이 내피세포 의존성 혈관이완을 일으키는 실험결과로 미루어 짐작할 수 있다. 본 실험 결과도 이와 마찬가지로 내피세포 의존성 혈관이 이완 세포의 Ca²⁺을 점차 감소함에 따라 그 크기가 점차 감소하여 내피세포성 이완인자의 분비에는 세포외 Ca²⁺이 필요하다는 것을 추측할 수 있다(그림 6). 한편 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완은 두 시기로 나타났는 바(그림 7), 즉 초기급속이완기(initial fast relaxation phase)와 후기완만이완기(late slow relaxation phase)로 구분되었다. 세포외 Ca²⁺를 낮추어 감에 따라 후기완만이완기가 먼저 감소하여 세포외 Ca²⁺을 0.1mM 낮추는 경우 2mM에서의 이완정도에 비하여 60%정도 이완을 하였는데 이것을 후기완만이완과 이

완상태를 지속하는 데에 세포외 Ca²⁺이 필요하며 이는 곧 지속적인 내피세포성 이완인자의 생산에 세포외 Ca²⁺이 필요함을 나타내는 결과로 판단된다.

Ca²⁺-길항제들이 내피세포 의존성 혈관이완에 미치는 효과는 Co²⁺와 La³⁺처럼 억제하는 경우와 verapamil을 비롯한 organic Ca²⁺-길항제들이나 Mn²⁺, Cd²⁺처럼 영향을 미치지 않는 경우, 즉 두가지의 서로 다른 반응을 보였다(그림 8, 12, 15, 16). 그러나 내피세포 의존성 혈관이완을 억제하지 않은 경우에도 그림에서처럼 대조실험에 비하여 노에피네프린에 대한 수축력이 감소하였으며 후기완만이완은 오히려 증가하여 Ca²⁺-길항제들이 평활근의 수축력을 감소시킴으로써 내피세포 의존성 혈관이완에 변화가 없거나 오히려 증가하였을 가능성을 배제할 수 없다. Peach등(1987)은 verapamil이 내피세포성 이완인자의 생산을 억제하기 위해서는 전처치 시간이 충분해야 한다(30분 이상)고 보고하였으나, verapamil을 10분간 전처치한 경우와 30분간 전처치한 경우가 차이가 없이 동일한 결과를 보였다. Peach등의 실험에서는 Ca²⁺-길항제를 전처치 함으로써 일어나는 노에피네프린에 대한 수축력의 감소를 agonist의 농도를 높임으로써 대조실험의 수축 정도만큼 유발시켰는데 이 역시 agonist의 농도를 높임에 따라 아세틸콜린의 이완정도가 감소하는 것으로 미루어 verapamil에 의한 내피세포 의존성 혈관이완의 감소가 agonist의 농도의 증가에 의한 영향을 배제할 수 없다. Verapamil이 내피세포성 이완인자의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여서는 내피세포만 선택적으로 verapamil을 투여하여야 함으로, 내피세포만 선택적으로 투여할 수 있는 bioassay를 시행하였다.

Verapamil이 내피세포에서 내피세포성 이완인자가 분비되는 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 내피세포에만 30분 전처치를 하고 실험하였을 때 아세틸콜린에 의한 이완정도는 차이가 없어(그림 17) verapamil은 내피세포성 이완인자가 분비되는 과정에는 아무런 영향이 없으리라고 판단된다. 이 실험상태에서는 verapamil을 30분 전처치를 하였지만 verapamil이 들어가지 않는 상태가 5분 정도 지난 다음 아세틸콜린에 대한 반응을 관찰하여 어느정도 verapamil의 효과가 없어졌을 가능성과 내피세포성 이완인자의 공급 혈관에 남아있던 verapamil이 시험절편에 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 이러한 영향들이

실험결과에 영향을 미칠 정도로 클 가능성은 없을 것으로 사료된다.

그럼 10은 노에피네프린의 주입장소는 변화시키지 않은 상태에서 Co^{2+} 의 주입장소만 달리한 경우이다. Co^{2+} 의 주입장소에 따라 아세틸콜린에 의한 효과가 차이가 없는 점으로 보아 Co^{2+} 는 내피세포성 이완인자와 직접 반응함으로써 내피세포 의존성 혈관이완을 감소시키지 않았으리라 생각된다. $\text{Co}^{2+} 10^{-5} \text{ M}$ 을 10분간 전처치하고 Co^{2+} 는 주입을 하지 않는 상태에서 시행한 실험에서는 내피세포성 이완인자의 효과가 완전히 억제되어 Co^{2+} 는 내피세포성 이완인자가 평활근에서 그 효과를 나타내는 과정을 억제하였음을 알 수 있다(그림 11). 한편 내피세포가 없는 절편에서 노이피네프린에 의한 수축이 Co^{2+} 를 전처치하여도 영향을 받지 않아 10^{-5} M 이하의 농도에서는 Ca^{2+} -길항제의 효과는 없는 것으로 사료된다(그림 8).

La^{3+} 은 Co^{2+} 와는 다른 반응 양상을 보이고 있다. 주입장소를 달리 하였을 때(그림 13) 주입장소에 관계없이 같은 결과를 보여 내피세포성 이완인자와 직접 반응할 가능성은 없는 것으로 생각된다. 그러나 주입장소 1에서 La^{3+} 을 주입하였을 때에는 대조실험이나 주입장소 2로 주입하였을 때와 비교하여 시험절편의 이완정도가 감소하여 La^{3+} 은 내피세포에서 내피세포성 이완인자가 분비되는 과정을 억제시키는 것으로 사료된다(그림 14).

여러가지 Ca^{2+} -길항제들 중에서 La^{3+} 과 Co^{2+} 가 다른 Ca^{2+} -길항제들에 비하여 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용에 미치는 효과가 다른 이유에 대해서는 앞으로 더 연구가 진행되어야 할 것이다. 단지 La^{3+} 과 Co^{2+} 의 이러한 효과에 대한 가능성을 다음과 같이 추측할 수 있다. 내피세포성 이완인자의 분비를 유발하는 물질을 투여하면 내피세포는 내피세포성 이완인자를 분비할 뿐 만아니라 과분극되는데 이러한 과분극은 Rb -sensitive K^+ 통로로의 K^+ 의 유출에 기인하는 것으로 알려져 있다(Chen et al, 1988). 이러한 과분극이 내피세포 의존성 이완이나 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용에 미치는 영향에 대하여서는 아직 알려진 바가 없다. 한편 Gordon과 Martin(1982, 1983)들은 내피세포에서 La^{3+} 이 내피세포성 이완인자의 분비 유발 물질에 의한 ^{86}Rb 의 유출을 억제하는 반면 verapamil은 억제하지 않았으며, 내피세포에서 ^{86}Rb 의 유출을 억제하지 않는 verapamil이 혈관 평활근에서의

^{86}Rb 유출은 억제한다고 보고하였다. 이러한 사실로 미루어 내피세포와 혈관 평활근의 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로로 일어날 가능성이 제시되고 있음(Gordon & Martin, 1983)을 고려하면 내피세포에서 La^{3+} 은 verapamil과는 달리 Ca^{2+} 의 유입을 억제하여 내피세포성 이완인자의 분비를 억제하였으리라 생각된다. 또한 Co^{2+} 의 효과는 soluble guanylate cyclase를 억제함으로써 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하는 것으로 알려진 methylene blue의 억제 양상과 동일하다(그림 18, 19). 등장성 수축실험(그림 18)의 결과와 methylene blue를 10분간 전처치한 후 시행한 bioassay 실험 결과(그림 19)가 Co^{2+} 의 실험결과와 동일한 결과를 보였다. Co^{2+} 와 methylene blue가 내피세포성 이완인자의 작용기전에 미치는 영향에 대하여 직접 비교할 수 있는 실험방법 즉 soluble guanylate cyclase에 의한 c-GMP의 생성에 미치는 영향을 c-GMP의 정량적인 측정을 통하여 밝힐 수 있을 것이다. 그러나 본 실험 결과로 미루어 보아 Co^{2+} 는 methylene blue와 동일한 기전 즉 soluble guanylate cyclase를 억제함으로써 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하였을 가능성을 추측할 수 있다.

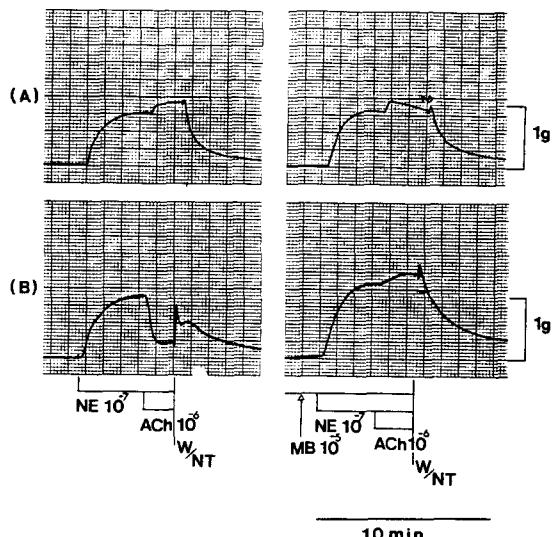
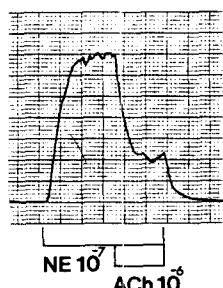


Fig. 18. Effect of methylene blue(MB) on NE-induced contractions and ACh-induced relaxations in the absence(A) or presence of endothelium(B). The effect was similiar to that of Co^{2+} .

Control



Methylene blue pretreatment

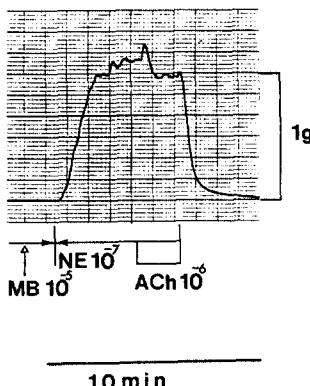


Fig. 19. Effect of pretreatment of methylene blue (MB) infused through IS 2 for 10 min on EDR. EDR was completely inhibited by the direct preexposure of MB to a bioassay strip. This result was similar to that of Co^{2+} (Fig. 11).

6. 결 론

Organ bath study와 bioassay 방법을 이용하여 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용에 세포외 Ca^{2+} 및 Ca^{2+} -길항제의 효과를 밝혀 보고자 하였다. 토끼 흉부 및 대동맥을 분리 적출하여, 흉부 대동맥으로는 횡단절편을 만들어 수축실험 및 bioassay 시험절편으로 사용하였으며 나머지 흉부 및 복부 대동맥으로는 내피세포성 이완인자를 공급하는 혈관으로 사용하였다. 노에피네프린으로 수축을 시켰고 아세틸콜린으로 내피세포성 이완인자의 분비를 유발시켰으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완은 두 시기, 즉 초기급속이완기와 후기완만이완기로 뚜렷이 구분되어 나타났다.

2) 아세틸콜린에 의한 이완정도는 세포외 Ca^{2+} 를 낮추어 감에 따라 점차 감소하였으며 주로 후기완만이완기가 감소하였다.

3) Organic Ca^{2+} -antagonists는 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완을 억제하지 못하였고, verapamil은 내피세포성 이완인자의 분비도 억제하지 못하였다.

4) Inorganic Ca^{2+} -antagonists 중에서 Mn^{2+} 및 Cd^{2+} 은 아세틸콜린에 의한 내피세포 의존성 혈관이완

을 억제하지 못한 반면에 Co^{2+} 와 La^{3+} 은 억제하였다.

5) Co^{2+} 는 분비된 내피세포성 이완인자가 혈관평활근에 작용하는 과정에서 내피세포성 이완인자의 효과를 억제하였고, La^{3+} 은 내피세포에서 내피세포성 이완인자가 분비되는 과정을 억제하였다.

이상의 결과로 부터 Ca^{2+} -길항제는 내피세포성 이완인자의 분비 및 작용에 영향을 끼치나 La^{3+} 은 분비과정에, Co^{2+} 는 혈관평활근에 대한 내피세포성 이완인자의 작용에 억제적 영향을 주는 것으로 결론지을 수 있었다.

REFERENCES

- Bassenge E, Busse R, Pohl U. : *Release of endothelium-derived relaxing factor(s) by physicochemical stimuli*. In *Relaxing and Contracting Factors*. ed. Vanhoutte PM. 1988 : 189 - 210
- Brum JM, Sufan Q, Lane G, et al. : *Increased vasoconstrictor activity of proximal coronary arteries with endothelial damage in intact dogs*. *Circulation*. 1984, 70 : 1066 - 1073
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. : *Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*. *Br. J. Pharmacol.* 1988, 95 : 1165 - 1174
- Cocks TM, Angus JA. : *Endothelium-dependent relaxation of coronary artery by noradrenaline and serotonin*. *Nature*. 1983, 305 : 627 - 630
- Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, et al. : *Stimulation of soluble guanylate cyclase by acetylcholine induced endothelium-derived relaxing factor from rabbit and canine arteries*. *Circ Res*. 1986, 58 : 531 - 538
- Furchtgott RF. : *Role of Endothelium in Response of Vascular smooth muscle*. *Circ Res*. 1983, 557 - 573
- Furchtgott RF, Cherry PD, and Zawadzki JV. : *Endothelium-dependent relaxation of arteries by acetylcholine, bradykinin, and other agents*. In *Vanhoutte PM and Leusen I (eds) : Vasodilation*, New York, Raven press, 1981 : p49 - 66
- Furchtgott RF, Zawadzki JV. : *The obligatory role of endothelial cells in the relaxaion of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*. 1980a, 288 : 373 - 376

9. Furchtgott RF, Zawadzki JV. : *Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substances from endothelial cells(abstr).* Fed Proc. 1980b, 39 : 581
10. Gerlach E, Nees S, Becker BF. : *The vascular endothelium : A survey of some newly evolving biochemical and physiological features.* Basic Res Cardiol. 1985, 80 : 459–474
11. Gordon JL, Martin W. : *The involvement of calcium in norepinephrine-induced potassium efflux from the rabbit aorta.* J Physiol. 1982a, 324 : 44–52
12. Gordon JL, Martin W. : *Responses of porcine aortic endothelial cells to vasodilator agents.* J Physiol. 1982b, 332 : 45–54
13. Gordon JL, Martin W. : *Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta : relationship to stimulation of ^{86}Rb efflux from isolated endothelial cells.* Br J Pharmac. 1983, 79 : 531–541
14. Griffith TM, Lewis MJ, Newby AC, et al. : *Endothelium-derived relaxing factor.* J Am Coll Cardiol. 1988, 12 : 797–806
15. Haddy FJ. : *Humoral factors in hypertension.* NIPS. 1989, 4 : 202–205
16. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, et al. : *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein : stimulation by acetylcholine bradykinin and arachidonic acid.* J Pharmacol Exp Ther. 1986, 237 : 893–900
17. Jayakody RL, Kappagoda CT, Senaratne MPJ, et al. : *Absence of effect of calcium antagonists on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta.* Br J Pharmacol. 1987, 91 : 155–164
18. Jayakody L, Senaratne M, Thomson A, et al. : *Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit* Circ Res. 1987, 60 : 251–264
19. Kubota M, Moseley JM, Butera L. : *Calcitonin gene-related peptide stimulate cyclic AMP formation in rat aortic smooth muscle cells.* Biochem Biophys Res Commun. 1985, 132 : 88–94
20. Long CJ, Stone TW. : *The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium-dependent.* Blood vessels. 1985, 22 : 205–208
21. Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. : *Impairment of endothelium-dependent responses of cerebral arterioles in chronic hypertension.* Am J Physiol. 1987, 253 : H1435–H1440
22. Miller RC, Schoeffter P, Stoclet JC. : *Inensitivity of calcium-dependent endothelial stimulation in rat isolated aorta to calcium entry blocker flunarizine.* Br J Pharmacol. 1985, 85 : 481–487
23. Peach MJ, Singer HA, Izzo NJ, et al. : *Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle(G).* Am J Cardiol. 1987, 59 : 35A–45A
24. Rappoport PM, Draznin MB, Murad F. : *Mechanisms of adenosin triphosphate-, thrombin-, and trypsin-induced relaxation of rat thoracic aorta* Circ Res. 1984, 55 : 468–479
25. Vanhoutte PM. : *Vascular Endothelium and Ca^{2+} antagonist.* J Cardiovascular Pharmacol. 1988, 12 (suppl. 6) : 521–28
26. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, et al. : *Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelial cells.* Ann Rev Physiol. 1986, 48 : 307–20
27. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, et al. : *Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease.* Circulation. 1989, 79 : 287–291