

쥐의 적출 대동맥에 자외선 조사로 유발된
photorelaxation 기작의 생리학적 특성*

마산대학 물리치료과
이한기 / 홍용근
서울보건대학 물리치료과
김 경

**Physiological characterization of mechanism on UV
light-induced photorelaxation in isolated rat aorta**

Lee, Han-Ki, Ph.D. / Hong, Yong-Geun, Ph.D

Department of Physical Therapy, Masan College

Kim, Kyung, P.T.

Department of Physical Therapy, Seoul Health College

ABSTRACT

Isolated rat thoracic aorta which is pharmacologically precontracted by phenylephrine induces photorelaxation when exposed to long wave length UV-light. The aim of the present study was to characterize the mechanism of UV-light induced by photorelaxation in the rat aorta.

1. UV light relaxed both endothelium-intact and -denuded rat aortic rings contracted by phenylephrine. The magnitude of relaxation on UV light was dependent on the exposure time and slightly greater in endothelium-denuded rings than in endothelium-intact preparations.
2. L-NAME (10 nM - 100 uM) but not D-NAME completely inhibited the photorelaxation in a concentration dependent manner.
3. The UV-induced relaxation was inhibited by methylene blue (1 - 100 uM), and verapamil (100 nM), and removal of extracellular Ca^{2+} . In contrast, UV-light induced photorelaxation was potentiated by N^w -nitro-L-arginine (L-NNA) treatment.

These results suggest that UV light-induced photorelaxation may be due to nitric oxide from exogenously administered L-arginine as well as endogenous nitric oxide donors such as amino acid and arginine derivatives

* 이 논문은 2002년도 마산대학 산학협동연구비의 지원에 의해 수행되었음

I. 서 론

Furchgott와 Zawadzki(1980)는 acetylcholine에 노출된 토끼의 적출대동맥이 이완하는 것을 발견함으로써 내피세포의 역할을 증명하였다. 이러한 초기의 관찰은 혈관 평활근 tone의 조절기작을 이해하는데 중요하게 작용하게 되었다. 이러한 그의 간단한 약물학적 실험은 혈관의 폭넓고 다양한 연구 영역을 가능하게 했으며, nitric oxide의 새로운 생물학적 역할을 이해할 수 있도록 하였다.

또한, nitric oxide는 심장 질환(failure)의 발병기작에 관련되어 있으며, nitric oxide가 심근의 기능을 조절하는 기능이 있다는 새로운 괄목할 만한 증거이다(Shulz 등, 1992 ; Balligand 등, 1993 ; Brady 등, 1992).

20여년 전, 여러 연구자들은 약물학적으로 전수축된 적출된 조직이 UV조사에 의해 이완됨을 보고했다(Jacob와 Tallarida, 1997 ; Dave 등, 1979 ; Karlsson 등, 1986 ; Steg 등, 1989 ; Matsunga와 Furchgott, 1989). 이러한 보고는, 조직내 Na^+ 와 Ca^{2+} 과 같은 이온의 환경변화가 photorelaxation의 실질적인 원인인 것으로 밝혔다(Dave 등, 1979). 최근 UV조사에 의한 혈관의 photorelaxation은 가설적으로 저장된 광활성물질로부터 유리된 NO로 인한 것으로 간주되고 있다(Goud 등, 1996).

또한, Chung과 Chang(1994)은 NO synthase(NOS) 억제제인 N^{W} -nitro-L-arginine (L-NNA)를 처리한 쥐로부터 분리된 대동맥의 photorelaxation이 증가되었다고 보고하였다. 아마도, 이렇게 증가된 photorelaxation은 L-NNA의 구성성분인 NO_2 의 UV조사에 의한 분해로부터 생성되는 NO에 의한 것으로 추정된다.

Nitrite는 nitric oxide 대사의 안정된 최종산물이다. 공복상태의 개체에서 순환하는 nitrite의 90% 정도가 L-arginine nitric oxide pathway에서 비롯되고, nitric oxide 생산의 유효한 표식자이다(Rhodes 등, 1995). 비록 nitric oxide가 혈관의 내피세포에 의해서 유리되는 주된 혈관이완 인자라 할지라도 어떠한 물질로부터 생성되는지, 그리고 그 역할에 대해서는 아직 완전히 알려져 있지 못하다(Furchgott와 Zawadzki, 1980 ; Furchgott, 1988 ; Moncada 등, 1991).

이전에, 우리는 NANC 신경 전달 물질로 작용할 것으로 추정되는 nonadrenergic, noncholinergic(NANC) 신경 섬유 역할의 역할을 조사하였다. 추정의 NANC 신경 전달 물질들 중, purine nucleotides는 NANC 신경 전달 물질의 가장 중요한 후보자로서 간주되었다(Park 등, 1997 ; Kim 등, 1997 ; Jeon 등, 1998).

그러나, NO가 또한 NANC 요소 중의 한가지로 작용하는지는 밝혀지지 않고 있다. 따라서, 본 연구에서 쥐 적출 대동맥의 NOS 아형과 Ca^{2+} 이온의 역할을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

다음의 화학물질들을 본 실험에 이용하였다: Phenylephrine HCl (PE), acetylcholine chloride (Ach), N^{W} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^{W} -nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), methylene blue (MB), L-arginine (L-Arg), and verapamil. 이

이완의 크기는 내피세포가 제거된 혈관링에서 더 강하게 나타났다(그림 1의 Lower panel 그림 2).

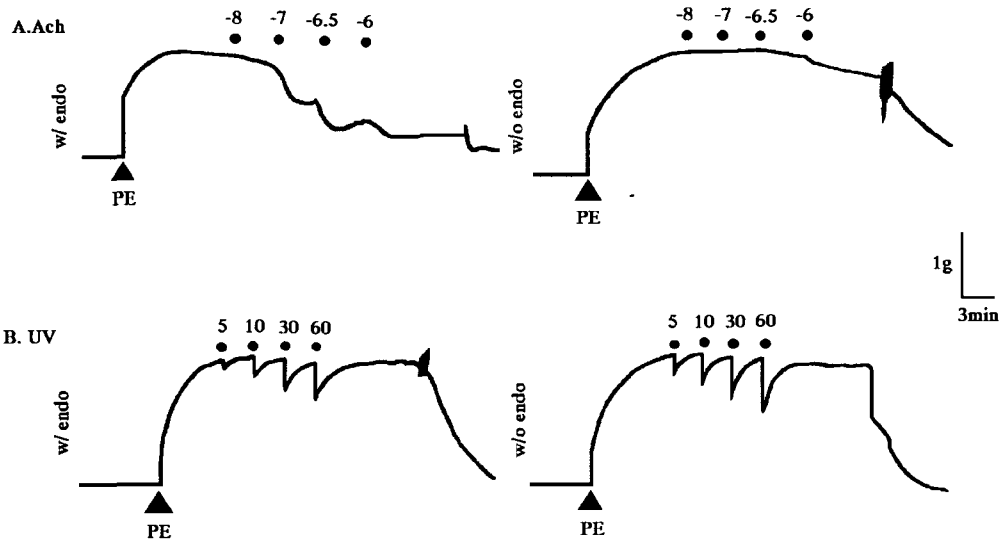


Figure 1. 쥐 대동맥의 혈관이완에 관한 UV 광선 조사의 효과

정상 Kreb's 용액에서 정상내피와 제거된 내피가 함께 배양된 쥐의 대동맥의 PE에 의해 유도된 전수축

A. acetylcholine의 결과(Ach, 수치는 log molar 농도를 가리킨다.)

-준비된 w/endo와 w/o endo의 이완이 유발된다.

B. UV광선에 유도된 photorelaxation 결과에서 수치는 w/endo와 w/o endo 표본에서 UV 광선 노출 시간을 가리킨다.

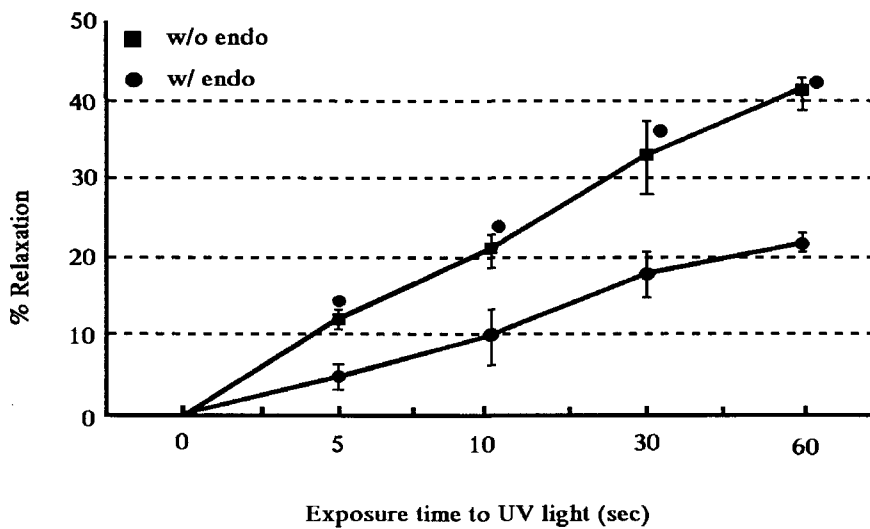


Figure 2. 제거된 쥐 대동맥 내피에서의 photorelaxation 상승작용

대동맥 링은 노출 시간에 따른 방법에 따라 이완되었다. 결과는 최고점의 넓이로서 측정되며 이것은 같은 조직들의 페닐에플린 적용시 수축의 퍼센트로서 표현된다. 수치는 3개로 분리되어 실시된 실험의 방법에 따라 표현한다. w/ endo는 쥐 대동맥의 손상되지 않은 내피를 말하며 w/o endo는 제거된 내피를 말한다.

2. UV조사에 의한 photorelaxation에 대한 L-arginine 및 NOS 억제제의 영향

1 μ M의 PE에 의해 전수축된 쥐의 대동맥링은 UV조사 시간에 의존적으로 이완이 증가 하였으며, 혈관링의 장력은 nitric oxide synthase 억제제인 L-NAME의 처리에 의해 강하게 감소하였으며(그림 3A), 이의 유도체인 D-NAME에 의해서는 같은 반응이 나타나지 않았으며 오히려 photorelaxation의 크기는 D-NAME의 처리에 의해 약간 증가하였다 (그림 3B).

더욱이, 증가된 혈관링의 장력은 L-arginine의 처리에 의해 점차적으로 감소하였으며, 또한 UV조사를 동시에 실시하였을 때 조사시간에 의존적으로 혈관의 이완은 증가되는 경향을 나타내었다(그림 3C).

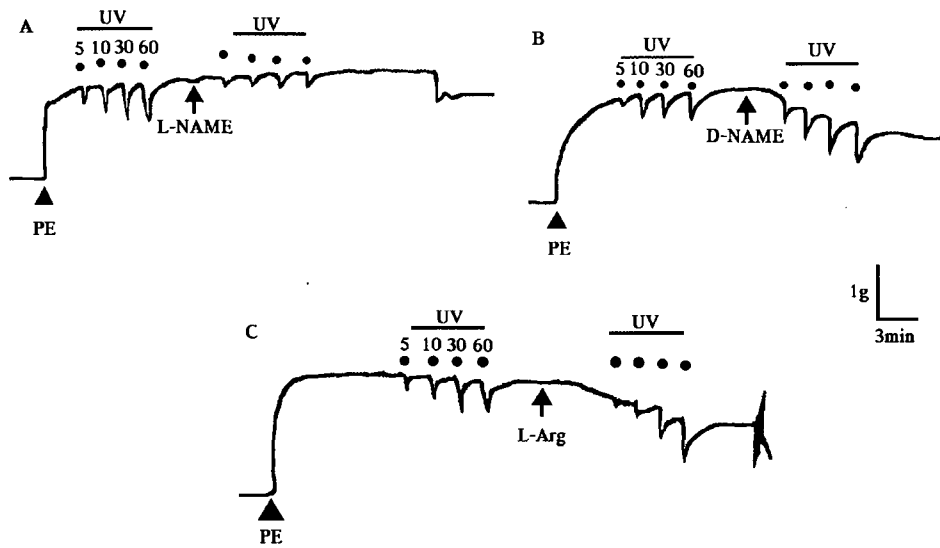


Figure 3. 쥐 대동맥에 UV 조사에 의한 photorelaxation에서 L-NAME(A. 100uM), D-NAME(B. 100uM) and L-Arg(C, 10uM)의 효과

3. UV조사에 의한 photorelaxation에 대한 methylene blue(MB)의 억제성 효과

cGMP와 UV조사에 의한 photorelaxation의 상호 관련성을 확인하기 위한 실험에서, soluble guanylyl cyclase의 억제제인 methylene blue를 쥐의 대동맥링에 처리하였다. 그림 4에서 보여주는 바와 같이, UV 조사에 의한 photorelaxation은 methylene blue에 의해 농도 의존적으로 증가되는 경향을 나타내었다.

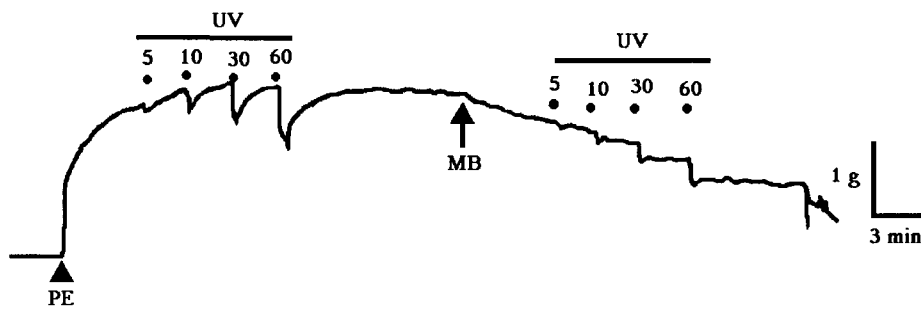


Figure 4. 쥐 대동맥의 UV 조사에 의한 photorelaxation에서 methylene blue(MB, 10uM)의 억제 효과

4. UV조사에 의한 photorelaxation에 대한 칼슘 및 칼슘채널 억제제인

verapamil의 효과

Nitric oxide (NO)가 혈관확장(Kitaxino 등, 1996), 신경전달(William과 Sean, 1996), 그리고 혈소판 응집(Daniela 등, 1996)과 같은 다양한 기능을 가진 2차 전령체라고 보고되었다. 그것은 NO 합성효소인 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline로 변환되는 반응에서 산소의존적인 반응에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다.

NO 합성을 조절하는 효소는 주로 3종류로 구분하는데, 이는 주로 혈관의 내피 (eNOS)와 신경세포 (nNOS)로 명명하며, 이들은 칼슘의존적으로 조절되는 것으로 알려져 있다. 그리고 마지막 하나는 쥐의 대식 세포에서 처음으로 보고된 칼슘에 비의존적인 NOS 아형 (iNOS)이다(Nathan과 Xia, 1994).

따라서, 이들 NOS 아형 중에서 무엇이 UV조사에 의한 photorelaxation에서 매개체로 작용하는가를 살펴보기 위해 칼슘의 유무와 칼슘채널 억제제의 처리 등으로 대동맥 링의 이완 정도를 관찰하였다. UV 조사에 의한 photorelaxation은 칼슘이 제거된 상태에서 강하게 억제 되었으며, 칼슘채널 억제제인 verapamil의 처리에 의해 완전히 억제 되었다 (그림 5).

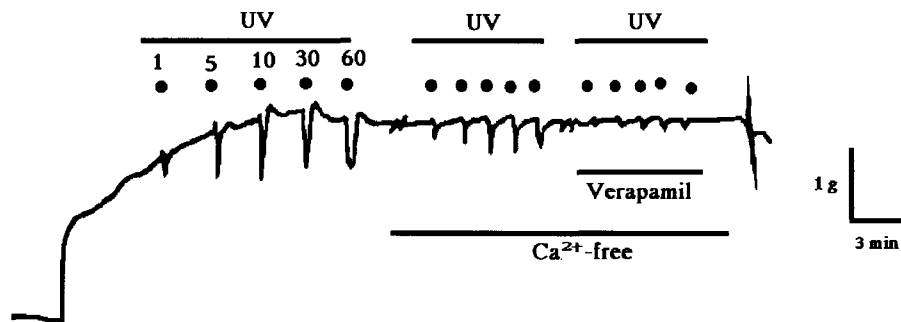


Figure 5. UV 조사에 의한 photorelaxation에서 Ca²⁺-free와 verapamil(0.1 uM)의 억제활동의 결과

IV. 고 찰

내피기능의 손상은 산화질소(NO)의 생산감소와 또는 그에 수반되는 NO의 효과를 약화시키는 내피수축 요소의 방출과 관련이 있다. 과긴장에서 관찰되는 내피조직의 기능이상으로 고혈압의 결과인 것으로 보여지는데 그 이유는 다양한 항고혈압성 치료가 이런 반응을 정상화시키기 때문이다. 그러나 내피조직의 기능이상으로 혈관저항이 증폭될 수도 있는데, 왜냐하면 NO 방출의 억제가 혈압을 높이기 때문이다.

현재의 연구로 UV 조사에 의한 photorelaxation이 UV에 의존적인 내피와 내피 자체의 독립적인 이완요소가 원인이 될 수도 있다는 걸 암시한다(그림 1). 그러나 혈관이완을 야기하는 아세틸콜린은 전적으로 내피에 의존하지만 UV 조사에 의한 photorelaxation은 그렇지 않다(그림 1).

Photorelaxation의 약효강화의 크기는 내피가 유지된 쥐의 대동맥보다 내피가 제거된 쥐

에서 오히려 더 크다(그림 1, 2). 비록 이것이 EDRF(endothelium derived relaxing factor) 이외의 다른 요인이 있다는 것은 명백하게 나타나 있지는 않지만 적어도 평활근이 UV 조사에 의한 photorelaxation과 관련이 있다는 것은 알 수 있다.

아세틸콜린(Ach)은 내피의존적인 메카니즘을 통해 혈관의 이완을 생성한다(1). Nitric Oxide (NO)는 이러한 반응에 포함되는 중요한 인자이며 이것은 Ach와 결합하는 내피 부수물에서부터 muscarinic 수용기에 이르기까지 방출된다(Dauphin과 Hamel, 1990). NO는 근접해 있는 평활근 세포까지 퍼지게 되는데 그 곳에서 NO는 증대된 cGMP 수준에 의하여 가용성 guanylyl cyclase 활동을 촉진시키는 역할을 한다(Moncada 등, 1991).

UV 조사에 의한 photorelaxation의 특성을 논증하기 위한, NOS반응 억제제인 L-NAME과 그것의 유도체인 D-NAME 그리고 NO제공자인 L-arginine의 투약에서 L-NAME로는 감소되진 않았다. 그러나 D-NAME에서 photorelaxation은 조금 증대되었다(그림 3). 또한 L-arginine을 이용한 실험에서는 photorelaxation 강화크기를 눈에 띄게 증대시켰다. 이러한 결과는 Brady 등(1992), Dave 등(1979), Karlsson 등(1986)의 보고와 일치하였다.

현재의 연구는 UV 조사에 의한 photorelaxation에 대한 methylene blue(MB)의 상당한 억제효과를 보여 주고 있다(그림 4). 이런 조사 결과로 UV 조사에 의한 photorelaxation은 NOS와 cGMP 경로의 상호작용에 의해 기인되었음을 알 수 있다. 이러한 조사 결과는 자외선을 혈관의 평활근에 조사함으로써 변화의 가능성이 많은 PIRF(photo-induced relaxing factor)를 생산한다는 Furchgott 등(1984)의 보고와도 일치하였다.

그리고 이것은 EDRF(endothelium derived relaxing factor)와 비슷하게도 cGMP 수준을 높여 이완을 유도한다. 혈관의 평활근은 방혈가능한 산화질소(NO)의 저장소를 지니고 있는데 이것은 빛에 의해 활성화되며 NO유발인자에 의해 회복되어 진다(Venturini 등, 1993)

NO는 NO 합성효소인 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline로 변환되는 반응에서 산소의존적인 반응에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다. NO 합성을 조절하는 효소는 주로 3종류로 구분하는데, 이는 주로 혈관의 내피 (eNOS)와 신경세포 (nNOS)로 명명하며, 이들은 칼슘의존적으로 조절되는 것으로 알려져 있다. 그리고 마지막 하나는 쥐의 대식 세포에서 처음으로 보고된 칼슘에 비의존적인 NOS 아형(iNOS)이다(Nathan과 Xia, 1994).

따라서, 이들 NOS 아형 중에서 무엇이 UV조사에 의한 photorelaxation에서 매개체로 작용하는가를 살펴보기 위해 칼슘의 유무와 칼슘채널 억제제의 처리 등으로 대동맥 링의 이완 정도를 관찰하였다. UV 조사에 의한 photorelaxation은 칼슘이 제거된 상태에서 강하게 억제되었으며, 칼슘채널 억제제인 verapamil의 처리에 의해 완전히 억제 되었다(그림 5). 이 결과는 UV 조사에 의한 photorelaxation의 대부분이 Ca^{2+} 에 의존된 이완요인 때문인 것을 의미한다.

V. 결 론

Phenylephrine(PE)에 의해 전수축된 쥐의 적출 흉대동맥을 자외선에 조사시켰을 때 Potorelaxation이 유도된다. 본 연구의 목적은 쥐 대동맥의 자외선 조사에 의해 유도된 Photorelaxation 기작의 특성을 알고자 연구를 수행하였다.

1. 자외선의 조사로 인해 PE에 의해 전수축된 쥐의 대동맥이 이완되는 효과를 나타내었다. 이러한 이완효과는 내피세포 비의존적으로 나타났으며, UV조사에 의한 혈관의 이완은 UV조사 시간에 의존적으로 나타났으며, 내피세포가 제거된 혈관에서 더 강하게 나타났다.

2. L-NAME(10nM-100nM)는 농도 의존적으로 UV조사에 의한 이완을 억제시켰으나 D-NAME은 그렇지 못하였다.

3. UV조사에 의한 혈관의 이완은 methylene blue(1-100uM), Verapamil(100nM), 그리고 세포밖의 Ca^{2+} 의 제거에 의해 억제되었다. 그러나 UV조사에 의한 혈관의 이완은 N^w -nitro-L-arginine(L-NOARG) 처리에 의해 효력이 증가되었다.

이 같은 UV조사에 의한 혈관의 이완은 아마도 amino acid와 arginine유도체와 같은 내적인 nitric oxide 제공자 뿐만 아니라 외부에서 제공해 준 L-arginine으로 부터의 nitric oxided에 의한 이완인 것으로 사료된다.

< 참 고 문 헌 >

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 299, 373-76.
2. Shulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a calcium independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*, 1992, 105, 575-80.
3. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90, 347-51.
4. Brady AJB, Pool Wilson PA, Hardin SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol*, 1992, 263, H1963-H66.
5. Jacob LS, Tallarida RJ. Further studies on the action of ultraviolet light on vascular smooth muscle: effect of partial irreversible receptor blockade. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, 225(1), 166-76.
6. Dave KC, Jindal MN, Kelkar VV, Trivedi HD. Characterization of ultraviolet light-induced relaxation of the isolated duodenum of the rat. *Br J Pharmacol*, 1979, 66(2), 197-201.
7. Karlsson JO, Axelsson KL, Elwing H, Andersson RG. Action spectra of photoactivated cyclic GMP metabolism and relaxation in bovine mesentric artery. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, 1986, 11(3), 155-66.
8. Steg PG, Rongione AJ, Gal D, Dejesus ST, Lsner JM. Effect of pulsed excimer laser on arterial smooth muscle. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1989, 82(2), 269-274.
9. Matsunaga K, Furchgott RF. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 248(2), 687-95.
10. Goud C, Watts SW, Webb RC. Photorelaxation is not attenuated by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway. *J Vasc Res*, 1996, 33(4), 299-307.
11. Chung BH, Chang KC. Photo-induced adequate nitric oxide (PIANO)-mediated relaxation in isolated rabbit corpus cavernosum. *Gen Pharmacol*, 1994, 25(5), 893-898.
12. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209, 590-96.
13. Furchgott RF. Studies on the relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In Vanhoutte PM (ed). *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*, New York: Raven Press, 1988, 401-14.
14. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, 43, 109-42.
15. Park SE, Hong YG, Shim CS, Jeon SC, Kim JH. Action of P2X-purinoceptor on urinary bladder smooth muscle of pig. *Kor J Vet Res*, 1997, 37(1), 103-10.
16. Kim JH, Shim CS, Jeon SC. Effect of purinergic nerve on relaxation of pig coronary

- artery. *Kor J Vet Res*, 1997, 37(3), 535-40.
17. Jeon SC, Shim CS, Kim JH. Effect of purinoceptor to perivascular nerve stimulation on isolated coronary artery of pig. *Kor J Vet Res*, 1998, 38(4), 730-36.
18. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 1991, 138, 867-73.
19. Hong SH, Ondrey FG, Avis IM, Chen Z, Loukinova E, Cavanaugh PF Jr, Waes C, Mulshine JL. Cyclooxygenase regulates human oropharyngeal carcinomas via the proinflammatory cytokine IL-6: a general role for inflammation? *FASEB J*. 2000, 14, 1499-507.
20. Kitazono T, Faraci FM, Heistad DD. L-arginine restores dilator responses of the basilar artery to acetylcholine during chronic hypertension. *Hypertension*, 1996, 27(4), 893-96.
21. William GM, Sean PD. Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. *Stroke*, 1996, 27, 965-70.
22. Daniela S, Mark GC, Vincenzo M. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. *J Clin Invest*, 1996, 97, 2562-568.
23. Nathan C, Xia QW. Nitric oxide synthases: roles, tolle, and controls. *Cell*, 1994, 78(6), 915-18.
24. Dauphin F, Hamel E. Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. *Eur J Pharmacol*, 1990, 178(2), 203-13.
25. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc Pharmacol*, 1984, 6(2), S336-43.
26. Venturini CM, Palmer RM, Moncada S. Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 266(3), 1497-500.