흰쥐의 장간막 동맥에서 성별에 따른 Myoendothelial Gap Junction의 분포와 혈관 긴장도에 대한 영향

서울대학교 의과대학 마취과학교실, *보라매병원 마취통증의학과

한 선 숙 · 박 재 현 · 허 진*

Influence of Sex on Gap Junctional Distribution and Vascular Dilatation in the Rat Mesenteric Arteries

Sun Sook Han, M.D., Jae Hyon Bahk, M.D., and Jin Huh, M.D.*

Department of Anesthesiology, Seoul National University College of Medicine; *Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Boramae Municipal Hospital, Seoul, Korea

Background: Besides prostacyclin and nitric oxide, the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), which is another distinct endothelium-dependent vasodilator, is involved in relaxing the vascular smooth muscle cells. The myoendothelial gap junction (MEGJ) and female sex hormone play important roles in the EDHF-mediated responses. Therefore, this study was designed to determine the influence of gender on the gap junctional distribution and endothelium-dependent vasodilation in the rat mesenteric arteries.

Methods: Male and female Sprague-Dawley rat were euthanized and the tertiary branch of the mesenteric artery was harvested. Immunohistochemistry and confocal microscopic examination of the arterial wall were performed after treating them with specific antibodies to delineate the distribution of connexin 43, a gap junctional protein. Segments of the mesenteric artery, 5 mm in length, were connected to two tungsten wires under isometric tension. The arterial segments were suspended in a modified Krebs solution (37°C) aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ in a vertical water-jacketed temperature-controlled tissue bath. The standard dose-response curve for acetylcholine (10⁻⁹-10⁻⁵ M) was drawn in the presence of the NO synthase inhibitor, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10⁻⁴ M) plus indomethacin (10⁻⁵ M) and/or gap junctional inhibitor, carbenoxolone (10⁻⁴ M).

Results: In the female rat mesenteric artery, the gap junctional plaques were more prevalent particularly along the endothelial layer. The inhibition of the relaxation response to acetylcholine was depressed in the presence of L-NAME plus indomethacin and augmented in the presence of carbenoxolone when compared with the male rat mesenteric arteries (P < 0.05).

Conclusions: Gender differences in the rat mesenteric arteries have an effect on the expression of connexin 43 and the release of EDHF through MEGJ may play a key role in controlling the female arterial tone. (Korean J Anesthesiol 2006; 51: 720~6)

Key Words: connexin, endothelium derived hyperpolarizing factor, myoendothelial gap junction sex hormone.

서 론

내피세포는 모든 혈관벽에 존재하는 한 겹의 세포층으로 처음에는 그 역할을 단지 항응집작용과 조직과 혈청 사이의 물질교환을 억제하는 장벽으로만 생각하였다. 그러나,

논문접수일 : 2006년 4월 24일

책임저자 : 박재현, 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교병원 마취통증의학과, 우편번호: 110-744

Tel: 02-2072-2818, Fax: 02-747-5639

E-mail: bahkjh@snu.ac.kr

이 논문은 2004년도 서울대학교병원 일반연구비(04-2004-070-0) 지원에 의한 것임.

석사학위 논문임.

1980년 내피세포가 혈관 평활근의 수축이나 이완을 조절한다는 것을 알게 되었고 Furchgott와 Zawadzki에¹⁾ 의해 내피세포로부터 유리된 이완인자(endothelium derived relaxing factor)가 nitric oxide (NO)라는 것이 밝혀진 이후 많은 연구가 이루어졌다. NO는 세포 안과 사이를 자유롭게 확산하여 이동할 수 있으며 수용성 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포 내 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)를 증가시켜 혈관 이완작용을 나타낸다.^{2,3)} 또 다른 혈관이완 인자인 prostacyclin (PGI₂)은 cyclooxygenase에 의해 합성되며 내피세포에서 방출되어 adenylylase를 활성화시키고 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)를 증가시켜 혈관이완작용을 나타낸다.⁴⁾

1980년대 말과 1990년대 초반에 혈관 평활근을 이완시키

는 데 있어서 NO, PGI₂ 이외의 내피세포 의존성 반응이 존재한다는 증거가 제시되었고, 이 과정에서 혈관평활근세포의 과분극이 필수적이어서 이것을 endothelial derived hyperpolarizing factor (EDHF)라 하였으며⁵⁾ 그 본질과 기전이 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 지금까지의 연구에 따르면 EDHF는 arachidonic acid 대사산물, calcium-activated potassium channel을 통해 배출되는 K⁺ 또한 hydrogen peroxide라는 의견이 제시되고 있다.⁶⁻⁸⁾ 현재까지의 연구를 요약하면 NO나 PGI₂과 무관하게 혈관이완에 K⁺의 역할의 중요성에 있어서는 의견의 일치를 이루었으나 EDHF의 작용기전이나 본질(elusive nature)에 대해서는 특정 혈관마다 다른 화학물질이 제시되고 있으며 단일한 작용기전으로 설명하지 못하고 있다. 최근에는 다양한 틱세이움 억제제가 발견되거나 합성되면서 myoendothelial gap junction (MEGJ)를 통한 전기적 또는 화학적 결합으로 혈관평활근세포의 과분극이 이루어진다는 증거가 제시되고 있다.⁹⁾

한편 성별과 성호르몬의 유무에 따라 혈관 긴장도의 차이와 EDHF와 관련한 혈관 긴장도의 차이가 있다는 것이 밝혀졌다.^{10,11)} 남성호르몬도 주로 EDHF의 억제와 이로 인한 긴장도 증가를 이루는 것으로 생각되는데,¹²⁾ EDHF의 매개체로서 MEGJ를 가정할 때 MEGJ의 성별 간 차이가 존재한다면 EDHF의 분비에도 영향을 미쳐 혈관긴장도에 차이가 생기는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구의 목적은 암컷과 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)의 장간막 동맥에서 대표적인 틱세이움 단백질인 connexin 43에 대한 면역형광염색법을 이용하여 해부학적으로 틱세이움의 분포에 차이가 있는지를 살펴보고, 틱세이움 억제제인 18β-glycyrrhetic acid (18β-GA)의 수용형 유도체인 carbenoxolone을 이용하여 성별이 내피에 의존하는 acetylcholine에 의한 혈관이완에 미치는 영향을 알아보는 것이다.

대상 및 방법

조직 준비

체중 250-350 g, 주령 10-15의 흰쥐(Sprague-Dawley) 암컷과 수컷을 과량의 에테르를 사용하여 의식을 소실시킨 다음 경추 탈골법으로 안락사시켰다. 개복하여 후복막(retro-peritoneum)으로부터 대동맥과 하대정맥을 박리하여 상장간막 동정맥(superior mesenteric artery and vein)을 추적(trace)해 가며 분리하였다. 상장간막 동정맥을 적출한 다음 modified Krebs 용액이 담겨 있는 Petri dish에 담갔다. Petri dish는 잘게 부숴진 얼음으로 채워서 차갑게 유지하였다. 해부 현미경 하에서 장간막과 지방조직을 완전히 제거하여 장간막 동맥의 원위부(3차분지)를 분리해 내었다. 실험조작 과정에서 생길 수 있는 내피세포의 손상 여부를 알아보기 위해

acetylcholine 10μM을 투여하였을 때 phenylephrine 10μM에 의한 장력변화를 90% 이상 가역시키는 것을 내피세포가 온전한 것으로 간주하였다.

Modified Krebs 용액의 구성 성분

Modified Krebs 용액은 NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.17 mM, NaHCO₃ 22 mM, CaCl₂ 1.6 mM, HEPES 8 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, d-glucose 5 mM로 구성되었다.

실험 전날 NaCl 6.95 g/L, KCl 0.35 g/L, CaCl₂ 0.24 g/L, KH₂PO₄ 0.16 g/L, MgSO₄ 0.29 g/L, NaHCO₃ 1.85 g/L, HEPES 1.91 g/L, d-glucose 0.9 g/L를 3차 증류수에 섞은 후 최종 부피가 1 liter가 되도록 3차 증류수를 첨가하여 냉장 보관한다. 차가운 용액은 조직 박리와 결체 조직을 제거하는 등의 조직 준비에 사용하였고, 나머지 용액은 가온 수욕조(warming water bath)에 중탕하여, 조직욕 저장소(tissue bath reservoir)에서 용액이 37°C로 가온되는 시간을 줄였다. L-NAME, carbenoxolone은 증류수로 녹이고 indomethacin은 ethanol로 녹인 후 modified Krebs용액에 투여하였다.

전부하를 결정하는 방법

장력을 점차로 올리면서 세척 및 안정 후 매 단계마다 K⁺ 60 mM을 투여한다. K⁺ 60 mM에 대한 수축 반응성을 이용하여 최대 수축 반응을 일으키는 최소 장력을 구한다. 중요한 것은 증가율(increasing ratio)이 아니라 증가량(increasing amount)이다. 약을 투여하는 매 단계마다 최소한 3회의 세척 후 약 30분간의 휴식기를 갖는다.

등척 장력 기록

분리한 3차 분지를 약 5 mm 길이로 자른 다음 두 개의 삼각형 모양의 텅스텐 고리에 서리 얹히지 않게 거치한 다음 37°C의 modified Krebs 용액(physiologic salt solution, PSS)이 담겨있는 5 ml의 수재킷 온도조절 조직욕조(water-jacketed temperature-controlled tissue bath) (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)에 고정시키고 나머지 한 쪽 철사는 등척력 변환기(NP 72-4493, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)에 연결한 다음 95% 산소와 5% 이산화탄소를 지속적으로 관류시키며 30분간 부유(suspension)시켰다(pH: 7.38-7.42, PCO₂: 34-36 mmHg, PO₂: 60 mmHg 이상). 예비실험을 통해 얻어진 1.5-2 g 정도의 기저장력을 준 다음 안정화될 때까지 30분 정도 휴식기를 가졌다. 조직들은 각 실험 후 최소한 3회의 세척 후 1시간 정도의 휴식기를 갖도록 하였다. 등척장력을 A/D 변환기(PowerLab[®], ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA)를 이용하여 IBM 호환용 컴퓨터에 저장한 후 Chart for Window Software[®] (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA)를 이용하여 분석하였다.

Acetylcholine에 대한 이완 반응은 phenylephrine 10 μ M으로 전수축시킨 후 다음의 4가지 조건에서 시행하였다.

- (a) 아무런 약제나 처치를 하지 않은 상태(대조군)
- (b) L-NAME 100 μ M, indomethacin 10 μ M을 투여한 상태
- (c) Carbenoxolone 100 μ M을 투여한 상태
- (d) L-NAME 100 μ M, indomethacin 10 μ M, carbenoxolone 100 μ M을 투여한 상태

위의 4가지 조건을 동일하게 적용하여 암컷과 수컷의 장간막 동맥의 3차 분지에서 각각 시행하여 acetylcholine (10^{-9} - 10^{-5} M)에 대한 용량-반응곡선을 얻었다.

위의 각 조건들을 만들 때엔 각종 차단제들을 modified Krebs 용액에 녹이고 관류되는 기포들을 이용하여 침전 없이 완전히 용해되도록 한 다음 조직 욕조에 채웠다. 혈관 조직은 각각의 조건에서 30분 이상 노출시킨 다음 반응시켰다.

면역조직화학법

Connexin 43에 대한 면역조직화학 염색: 수컷과 암컷 흰 쥐에서 장간막 동맥의 원위부(3차 분지) 혈관조직을 적출한 다음 쥐의 항connexin 43 단일클론 항체(Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 이용하여 혈관 내피세포와 평활근에 존재하는 틈새이음을 구성하는 단백질인 connexin 43에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 10% 포르말린에 고정 후 파라핀 포매한 다음 5 μ m 두께로 잘랐다. Xylene으로 탈파라핀 citrate완충액에 담근 후 전자레인지에서 5분간 열처리하여 항원에 노출시켰다. 염소 혈청을 이용하여 비특이적 단백질 반응을 차단하였다. 1 : 100으로 희석시킨 항connexin 43 단일클론 항체를 가한 후 4°C에서 하루를 둔 다음 내인성 과산화효소를 불활성화시키기 위해 3% H₂O₂를 함유한 인산화 완충액에 상온에서 20분간 두었다. 수세 후 바이오틴이 붙은 항마우스 IgG를 가지고 상온에서 60분간 반응시켰다. LSAB[®] large volume kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 DAB (3-3' diaminobenzidine)로 발색한 후 광학현미경을 이용하여 동시에 세 명의 관찰자가 독립적으로 connexin 43에 대한 면역 형광반응의 발현 여부와 발현 정도를 관찰하였다.

면역형광 염색 및 공초점 현미경 관찰: 5 μ m 두께로 동결 절편된 혈관 검체를 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 조직은 냉각된 아세톤에 고정하고 염소 혈청으로 비특이적 반응을 막은 후 일차 항체인 항connexin 43 단일클론 항체(Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 반응시켰다. 음성대조군으로는 같은 아형의 동일 농도의 무관한(irrelevant) 단일클론 항체를 처리하였다. 수세 후 FITC (fluorescein isothiocyanate)가 결합된 염소 항마우스 항체 (Serotec, Kidlington, Oxford, UK)에 반응시켰다. 수세 후 염

색된 조직은 공초점 현미경(Radiance 2000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

화학약품

NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, CaCl₂, HEPES, KH₂PO₄, d-glucose, acetylcholine, L-NAME, indomethacin, carbenoxolone, phenylephrine은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

통계

각종 처치와 약물에 대한 장간막 동맥의 반응은 장력의 백분율 증가 또는 감소로 표현하여(%) 초기 장력의 불일치를 보정하였다. 용량-반응 분석 프로그램(version 4.00, Prism[®], Graphpad, San Diego, CA, USA)을 이용하여 각 약물에 대한 혈관의 이완반응에 대해서 용량-반응곡선을 구하고 EC₅₀값과 R_{MAX} (%)를 구하고 이 값의 각 군 간 비교는 Kruskal-Wallis 검정법을 이용하여 비교하였다. EC₅₀은 phenylephrine에 의한 전수축을 50% 억제시키는 이완이 일어날 때의 acetylcholine 농도로 정의하였다. 유의수준은 5%로 하였으며 결과치는 평균 $\pm$ 표준오차로 표기하였다. 한 개체에서 오직 1-2개의 혈관이 얻어졌으며 따라서 모든 군에서 n은 혈관수이자 사용된 개체수이다.

결 과

면역조직화학법-틈새이음 단백질의 발현

3마리의 쥐 모두에서 틈새이음 단백질인 connexin 43에 대한 면역 형광반응은 암컷 혈관에서 더 강하게 나타났으며 중간보다 특히 내피세포에 인접하여 강한 염색 반응을 보였다(Fig. 1). 공초점 이미지에서도 암컷 혈관에서 connexin 43에 대한 면역표지 플라크(immunolabelled plaque)가 풍부하고 강하게 나타났다(Fig. 2).

Acetylcholine에 대한 혈관 이완반응

EC₅₀값과 R_{MAX} (%) 값의 비교를 통해 acetylcholine에 대한 이완 반응은 암컷과 수컷에서 차이가 없었다. Acetylcholine에 의한 이완반응은 L-NAME + indomethacin을 처리한 군에서 암컷에서 유의하게 크게 나타났고, carbenoxolone을 처리한 군에서는 암컷에서 유의하게 억제되었다(Table 1). 암컷과 수컷 모두에서 대조군에 비해 carbenoxolone을 처리한 군과 L-NAME + indomethacin + carbenoxolone을 처리한 군에서 acetylcholine에 의한 이완반응이 유의하게 억제되었으나 carbenoxolone을 처리한 군에서는 암컷에서 더 크게 억제되었다(P < 0.001, Fig. 3).

Fig. 1. Immunostaining for connexin 43 (arrows) in the male mesenteric artery (left), and female mesenteric artery (right) (magnification, $\times 400$). The immunointensity of connexin 43 was stronger in the female mesenteric artery, especially along the endothelial layer.

Fig. 2. Confocal image of 5µm thick cross section from the male (left) and female (right) mesenteric arteries stained with the antibody against connexin 43. In the female artery, the more abundant labeling of connexin 43 (arrows) was seen (magnification, $\times 400$).

고찰

폐경 전 여성에 비해 폐경 후 여성 또는 남성에서 고혈압이나 관상동맥질환의 유병률이 상대적으로 높은 것은¹³⁾ 여성 호르몬인 에스트로겐의 혈관 방어 효과(vascular protective effect)로 생각된다. Dahl salt-sensitive rats와¹⁴⁾ spontaneous hypertensive rats (SHR)을¹⁵⁾ 대상으로 한 연구에서 동맥압은 암컷보다 수컷에서 더 높고 난소를 제거한 암컷에서 고혈압의 발생이 빠르게 진행하였으며 이 쥐에 에스트로겐을 대체해 준 후 고혈압의 발생을 막았다는 결과를

얻었다. 그러나 폐경 후 여성의 혈압은 5-20년 후에 증가하고 이것은 여성 호르몬이 없는 것 하나만이 혈압을 상승시키는 유일한 인자(contributing factor)는 아니라는 것을 시사한다.¹³⁾ 이는 남성호르몬인 안드로겐의 증가가 혈압조절에 있어 성별의 차이에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있고 실제로 혈압상승에 영향을 미친다.¹⁶⁾

성호르몬의 혈관이완효과를 보면 노르아드레날린과 같은 혈관수축작용제(agonist)는 여자에서보다 남자에서 전완(fore-arm)의 혈관수축을 더 많이 시킨다.¹⁰⁾ 쥐의 장간막 동맥에서 성별에 대한 phenylephrine에 대한 수축 반응을 보는 이전 연구에서 혈관내피세포가 존재하는 경우에는 성별에 따

라 통계적으로 의미 있는 차이가 없으나 내피세포를 제거한 경우에는 수컷에서 수축이 의미 있게 증가하였다.¹⁷⁾ 또한 성별에 관계없이 최대 수축 반응을 보이는 phenylephrine 농도는 10 μ M로 본 연구에서는 전수축을 최대화할 수 있도록 이 농도를 사용하였다. 에스트로겐의 혈관이완 효과

Table 1. Characteristics of Acetylcholine Induced Vasodilation in the Male and Female Mesenteric Arteries of the Rat

Treatment	EC ₅₀ (-log M)	R _{MAX} (%)
Male		
Control	7.23 $\pm$ 0.20	99.03 $\pm$ 2.13
Indo + L-NAME	6.67 $\pm$ 0.17	89.02 $\pm$ 2.97*
Carbenoxolone	6.00 $\pm$ 0.14*	61.05 $\pm$ 8.21*
Indo + L-NAME + carbenoxolone	-	2.29 $\pm$ 1.70*
Female		
Control	7.23 $\pm$ 0.16	98.50 $\pm$ 1.16
Indo + L-NAME	6.85 $\pm$ 0.17	96.92 $\pm$ 1.29 [†]
Carbenoxolone	-	6.20 $\pm$ 6.70 [†]
Indo + L-NAME + carbenoxolone	-	2.09 $\pm$ 1.21*

Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 14 for male group, n = 12 for female group). EC₅₀: effective concentration causing 50% inhibition of the preconcentrations, R_{MAX} (%): maximal relaxation in percentage of the preconcentrations. Indo: Indomethacin (10⁻⁵ M), L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (10⁻⁴ M), carbenoxolone (10⁻⁴ M). *P < 0.05 vs. control, [†]P < 0.05 vs. male.

는 내피세포 의존성 혈관이완 반응을 통해¹¹⁾ 또는 혈관 평활근에의 직접 작용에 의해 나타난다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 에스트로겐은 NO-cGMP와 prostacycline-cAMP 그리고 EDHF를 활성화시켜 내피세포 의존성 혈관이완반응을 일으키며, 주로 EDHF의 작용에 영향을 미쳐 혈관 긴장도 조절에 관여한다고 한다.¹⁹⁾ Sakuma 등은²⁰⁾ 44주령의 쥐의 장간막 동맥을 가지고 한 실험에서 암컷과 수컷, 그리고 난소를 제거한 암컷(ovariectomized female)의 eNOS 단백질의 발현과 acetylcholine에 의한 이완반응에 차이가 없었으나 L-NAME과 indomethacin으로 처리 시 acetylcholine에 대한 이완반응이 난소가 있는 암컷에서 더 강하게 나타났다. 난소를 제거한 암컷에게 에스트로겐으로 치료하였을 때 난소제거 시 보였던 혈관이완반응의 감소가 보이지 않았다. 이것은 노화에 따라 순환하는(circulating) 에스트로겐의 감소가 EDHF를 통한 혈관작용에 영향을 미칠 것이라는 점을 시사한다. 또한 Lui 등은²¹⁾ 쥐의 장간막 동맥을 가지고 한 실험에서 acetylcholine 유도 내피 의존 과분극과 이완반응이 수컷과 비교해서 난소를 제거한 암컷에서 더 감소되었고 이러한 차이는 calcium-activated potassium channel blocker인 apamin이나 charybdotoxin으로 처리했을 때 없어지는 것을 관찰하였다. 게다가 난소를 제거한 암컷에서 보인 acetylcholine에 대한 과분극 반응은 17 β -estradiol로 치료한 후 향상되었다. 이러한 연구 결과들은 에스트로겐 부족 시 보이는 혈관이완 반응의 저하가 EDHF에 의해 매개된다는 것을 강력하게 시사한다.

Fig. 3. Acetylcholine induced vasodilation in the male (A) and female (B) arteries of the rat mesentery. Vessels were preincubated in the modified Krebs solution and precontracted with phenylephrine (10 μ M). The combination of indomethacin plus L-NAME, as well as carbenoxolone, attenuated acetylcholine-induced relaxation in male and female mesenteric artery. The combined pretreatment with indomethacin, L-NAME and carbenoxolone nearly abolished acetylcholine-induced relaxation in male and female mesenteric artery. The degree of relaxation is expressed as a percentage of the precontraction level with phenylephrine. Indo: Indomethacin (10⁻⁵ M), L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (10⁻⁴ M), carbenoxolone (10⁻⁴ M). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 14 for male group, n = 12 for female group). Changes due to blocker pretreatment are indicated by *P < 0.01 and [†]P < 0.001.

남성호르몬인 테스토스테론은 내피세포 의존성 이완반응을 억제하고 혈관수축을 증가시킨다고 한다. Quan 등은²²⁾ 돼지의 관상동맥에 생리적 용량의 테스토스테론을 전처치하였을 때 bradykinin과 A23187 유도 내피세포 의존성 이완반응이 억제되었다는 것을 알아냈고 Schror 등은²³⁾ 기니피그의 관상동맥을 가지고 한 실험에서 thromboxane A₂에 의한 혈관수축 반응이 증강된 것을 알아냈다. 그러나 토끼의 관상동맥과 대동맥, 쥐의 대동맥, 개와 돼지의 관상동맥을 가지고 한 실험에서는 테스토스테론이 내피세포 의존성 또는 비의존성 혈관이완반응을 유도하였다는 결과를 보였다.²⁴⁻²⁶⁾ 틱세이움을 통한 내피세포의 과분극의 전기적 전달은 내피세포 의존성 과분극을 설명할 수 있는 가능한 기전의 하나이다. 틱세이움은 1,000 Da 이하의 작은 수용성 물질을 통과시키는 세포간 채널로서 세포와 세포 사이 단백질을 제외한 cAMP, cGMP, 무기 이온의 이동을 가능하게 한다.²⁷⁾ 틱세이움은 4개의 막통과 도메인(transmembrane-spanning domains)을 가진 단백질 아단위인 connexin으로 구성되어 있고 6개의 connexin 아단위가 모여 connexon 또는 반채널(hemichannel)을 형성하고 인접한 두 세포의 connexon이 결합하여 틱세이움을 구성한다. 현재 12종 이상의 connexin이 밝혀졌고 이중 connexin 37, 40, 43, 45가 혈관에 존재하는 것으로 알려졌다.²⁸⁾ 틱세이움은 내피세포간 또는 혈관평활근세포 사이 외에도 내피세포와 혈관평활근세포 사이에도 존재하며(MEGJ)²⁹⁾ 이것이 내피세포와 혈관평활근세포 사이에 이완 신호를 전달함으로써 EDHF 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

면역조직화학법을 이용한 본 연구의 결과에서 Sprague-Dawley 쥐의 장간막 동맥에서 수컷에서보다 암컷 쥐에서 connexin의 분포가 증가하는 점에서 MEGJ 분포의 성별 차이를 가진다고 할 수 있다. Liu 등은³⁰⁾ 난소를 제거한 암컷 쥐의 장간막 동맥에서 제거하지 않은 암컷 쥐(intact female)와 난소를 제거한 쥐에 에스트로젠으로 처리한 쥐의 장간막 동맥에서보다 훨씬 감소된 connexin 43의 분포를 보였고 이는 본 연구의 결과와 일치한다. 이러한 결과는 connexin 43의 발현이 감소된 것은 MEGJ의 밀도와 분포에 변화를 가져왔고 이것은 성별에 따른 장간막 동맥의 EDHF-매개성 혈관반응의 차이를 나타내는데 기여할 것이라는 점을 시사한다. 그러나 혈관조직에서 기능적인 세포-세포 사이의 반응이 하나 이상의 connexin 아단위에 의해 나타나므로 connexin 37, connexin 40과 같은 다른 주요한 connexin 도 성호르몬에 영향을 받는지에 대해 추가적인 연구가 필요하다.

틱세이움 억제제로는 특이적인 억제제로 알려진 18 α -GA, 18 β -GA, 18 β -GA의 수용형 유도체인 carbenoxolone, 그리고 connexin의 세포 외 분역과 형태화학적으로 유사한 구조를 갖는 gap 26, gap 27 등의 gap peptide가 알려져 있다. GA

계열의 억제제들은 EDHF를 매개로 한 과분극과 이완을 종과 혈관계에 따라 다양한 정도로 억제한다.³¹⁾ Edwards 등은³¹⁾ carbenoxolone (100 μ M)이 acetylcholine에 의한 과분극에 미치는 영향을 기니피그의 관상동맥과 쥐의 간, 장간막 동맥에서 비교하여, 기니피그의 관상동맥에선 틱세이움 억제제가 acetylcholine에 의한 과분극을 크게 억제하지만 쥐의 동맥에서 효과가 미미하다고 하였다. Goto 등은²⁸⁾ 쥐의 장간막 동맥에서 18 α -GA (100 μ M)가 acetylcholine에 의한 과분극과 이완반응을 억제하지만 carbenoxolone (300 μ M)보다 그 효과는 작다고 하였다. 틱세이움 억제제로 carbenoxolone (100 μ M)을 사용한 본 연구에서 수컷 쥐의 장간막 동맥에서 acetylcholine에 의한 혈관이완반응을 억제하는 데 효과가 미미하였으나 암컷 쥐에서는 크게 억제하였다. 이는 이전 연구에서 수컷 쥐를 사용했다는 점에서 본 연구와 일치하는 결과를 보였다.

EDHF에 의한 이완반응에 MEGJ의 역할을 밝히는 연구에 있어서 틱세이움 억제제는 매우 중요한 역할을 차지한다. 그러나 이러한 억제제에는 두 가지 한계점이 있다.³²⁾ 첫째는 반채널인 connexon이 틱세이움의 반을 이루며 세포포어(cellular pore)로 작용하고, 이것을 gap peptide가 막는 것으로 알려져 있다. 그러므로 gap peptide에 의해 차단되지 않은 나머지 하나의 반채널이 EDHF-매개성 이완반응에 참여할 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 세포조절과 EDHF-매개성 이완반응에 있어 이 반채널의 역할을 밝혀낼 추가적인 연구가 필요하다. 둘째는 gap peptide와 GA 계열의 억제제가 내피세포와 혈관평활근세포간에 존재하는 틱세이움만을 선택적으로 차단하지 않는다는 것이다. 이러한 억제제는 내피세포간 또는 혈관평활근세포간의 틱세이움도 억제한다. 따라서 MEGJ에만 선택적으로 작용하는 억제제를 찾아내는 연구를 통해서 문제점을 풀어내야 할 것이다.

결론적으로 저자들은 수컷에 비하여 암컷 쥐의 장간막 동맥에서 carbenoxolone 처치가 acetylcholine에 의한 이완반응을 심하게 억제하고 이는 틱세이움을 이루는 단백질 분자인 connexin 43의 발현이 암컷에서 상대적으로 더 많은 것과 관련된 점을 본 연구를 통해서 알아내었다.

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; 288: 373-6.
2. 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.
3. Sun CW, Falck JR, Okamoto H, Harder DR, Roman RJ: Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide

- in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H339-50.
4. Boulanger CM, Vanhoutte PM: The Endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. Courbevoie, France, Servier International, 1994, pp 11-20.
5. Chen G, Suzuki H, Weston AH: Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1165-74.
6. Fulton D, McGiff JC, Quilley J: Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 518-26.
7. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH: K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396: 269-72.
8. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirano K, Mukai Y, Kanaide H, et al: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 1521-30.
9. Yamamoto Y, Imaeda K, Suzuki H: Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol* 1999; 514: 505-13.
10. Xu HL, Santizo RA, Koenig HM, Pelligrino DA: Chronic estrogen depletion alters adenosine diphosphate-induced pial arteriolar dilation in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2105-12.
11. Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR: Differential mechanisms of endothelium-dependent vasodilator responses in human myometrial small arteries in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103: 67-73.
12. Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP: Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H552-60.
13. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al: Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995; 25: 305-13.
14. Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR: Role of female sex hormones in the development and reversal of Dahl hypertension. *Hypertension* 2000; 35: 484-9.
15. Packer CS, Pelaez NJ, Kramer JA: Estrogen protects against hypertension in the spontaneously hypertensive rat, but its protective mechanism is unrelated to impaired arterial muscle relaxation. *J Gend Specif Med* 2001; 4: 20-7.
16. Reckelhoff JF: Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001; 37: 1199-208.
17. McKee AP, Van Riper DA, Davison CA, Singer HA: Gender-dependent modulation of alpha 1-adrenergic responses in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1737-43.
18. Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR: Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1939-42.
19. McCulloch AI, Randall MD: Sex differences in the relative contributions of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium-dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1700-6.
20. Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, et al: Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 48-54.
21. Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M: Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1035-46.
22. Quan A, Teoh H, Man RY: Acute exposure to a low level of testosterone impairs relaxation in porcine coronary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 830-2.
23. Schror K, Morinelli TA, Masuda A, Matsuda K, Mathur RS, Halushka PV: Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur J Clin Invest* 1994; 24(Suppl 1): 50-2.
24. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P: Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995; 91: 1154-60.
25. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, et al: Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 1996; 94: 2614-9.
26. Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW, Whittier FC: Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 34-9.
27. Little TL, Xia J, Duling BR: Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res* 1995; 76: 498-504.
28. Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, Idia M: Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 595-602.
29. Sandow SL, Hill CE: Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 2000; 86: 341-6.
30. Liu MY, Hattori Y, Sato A, Ichikawa R, Zhang XH, Sakuma I: Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 938-48.
31. Edwards G, Feletou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, Weston AH: Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1788-94.
32. Leybaert L, Braet K, Vandamme W, Cabooter L, Martin PE, Evans WH: Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release. *Cell Commun Adhes* 2003; 10: 251-7.