

Lysophosphatidylcholine에 의한
혈관 평활근 세포의 Ca^{2+} 전류의
활성 조절 기전

연세대학교 대학원

의과학사업단

한 성 식

Lysophosphatidylcholine에 의한
혈관 평활근 세포의 Ca^{2+} 전류의
활성 조절 기전

지도 김 재 욱 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

한 성 식

한성식의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성함에 있어 처음부터 끝까지 아낌없는 지도와 편달로 고로를 베풀어주신 김재욱 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 연구 과정 중에 여러모로 지도와 격려를 아끼지 않아 주신 이홍균 교수님, 박용원 교수님, 안덕선 교수님, 권성춘 교수님께도 깊은 감사를 드리며 특히 실험 과정에 많은 도움을 주신 생리학교실 선생님들께도 감사를 드립니다.

아울러 오늘에 제가 있기까지 모든 것을 주신 하늘에 계신 어머니님과 저를 지켜보아 주고 계신 아버지님, 사랑하는 아내와 나의 딸 이제에게 논문을 드립니다

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 혈관의 수축력과 세포 내 Ca^{2+} 농도의 동시 측정	4
2. 단일 평활근 세포의 분리 및 Ca^{2+} 전류의 측정	5
3. 실험 용액 및 약물	6
III. 결 과	7
1. Lysophosphatidylcholine에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 및 수축력의 변화	7
2. Lysophosphatidylcholine에 의한 whole cell Ca^{2+} 전류의 변화	8
3. 세포 내 이차 전달계의 활성 변화와 lysophosphatidylcholine의 효과	11
IV. 고 찰	14
V. 결 론	17
참고문헌	17
영문요약	20

그림 차례

Figure 1. Block diagram of fluorescence spectrophotometer	5
Figure 2. Schematic diagram of patch clamp system setup	6
Figure 3. Effect of LPC on high K^+ -induced contraction and fura 2 Ca^{2+} ratio in endothelium denuded rabbit carotid artery	7
Figure 4. Enhancement of whole cell Ba^{2+} currents by LPC	8
Figure 5. Effect of nifedipine treatment on LPC-induced enhancement of I_{Ba}	9
Figure 6. Effect of LPC on current-voltage relations of I_{Ba}	10
Figure 7. Changes in steady-state activation and inactivation of I_{Ba}	10
Figure 8. Effect of forskolin pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba}	11
Figure 9. Effect of PMA pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba}	12
Figure 10. Effect of chelerythrine pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba}	13
Figure 11. Summary of the effect of changing PKC activity on LPC-induced enhancement of I_{Ba}	13

Lysophosphatidylcholine에 의한 혈관 평활근 세포의

Ca²⁺ 전류의 활성 조절 기전

평활근 세포의 수축력의 크기를 결정하는 주요 인자의 하나인 세포 내 Ca²⁺ 이온의 농도는 세포막을 통한 Ca²⁺ 이온의 유출량과 유입량의 차이, 그리고 세포 내 Ca²⁺ 저장소로부터의 Ca²⁺ 유리량과 재흡수량의 차이에 의해 결정된다. 특히 평활근 세포막의 막전압 의존성 Ca²⁺ 통로는 Ca²⁺ 이온이 세포 내로 유입되는 중요한 통로로 작용하고 있어서, 어떤 인자에 의해 이의 활성이 변화되는 경우 평활근 세포 내 Ca²⁺ 이온 농도의 변동과 수축력의 크기 변화를 초래하게 됨은 잘 알려져 있다. 실험적으로 고콜레스테롤증을 유발한 혈관 평활근 세포의 경우 Ca²⁺ 전류의 활성이 대조군에 비해 증가되고, 실험적으로 산화 LDL을 투여하였을 때 평활근 세포 내 Ca²⁺ 농도가 증가한다는 보고 등은 죽상동맥 경화증이 유발된 혈관의 평활근 세포막의 Ca²⁺ 통로의 활성이 증가되고, 이를 통해 비정상적 혈관 반응이 유발되었을 가능성을 시사하고 있으나 이의 자세한 기전에 대해선 아직 명확치 않다. 따라서 본 실험에서는 whole patch clamp 방법을 사용하여 죽상경화증 혈관에서 그 농도가 크게 증가한다고 알려진 lysophosphatidylcholine (LPC)이 평활근 세포의 막전압 의존성 Ca²⁺ 전류의 활성에 미치는 효과와 그 작용 기전을 규명함으로써 죽상경화증 혈관에서 관찰되는 비정상적인 혈관 수축 현상이 나타나는 기전을 규명하고자 하였다. 실험을 통해 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 평활근 절편의 긴장도 및 세포 내 Ca²⁺ 농도는 LPC에 의해 가역적으로 증가하였다.
2. 평활근 세포의 Ca²⁺ 전류의 활성은 LPC 투여 시 가역적으로 증가하였으며, 이같은 효과는 모든 막전압 값에서 동일하게 관찰되었다.
3. LPC 투여 시 Ca²⁺ 전류의 막전압 의존성 활성화 곡선이 오른쪽으로 일부 이동하였으나 막전압 의존성 비활성화 곡선에는 변화가 없었다.
4. LPC에 의한 Ca²⁺ 전류 증가 효과는 protein kinase A (PKA) 촉진제인 forskolin 전처치에 의해서는 영향을 받지 않았으나 protein kinase C (PKC) 촉진제인 phorbol myristic acid (PMA)를 전처치하는 경우 소실되었다.
5. PKC inhibitor인 staurosporine이나 chelerythrine을 전처치하는 경우 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류 증가 효과가 소실되었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류의 증가 효과는 세포 내 PKC 활성 변화를 매개로 하여 이루어지며, 이에 의한 평활근 세포 내 Ca²⁺ 농도 증가 효과는 죽상경화증 혈관에서 관찰되는 혈관운동 기능이상의 발생에 중요한 역할을 한다고 생각된다.

핵심되는 말: 막전압 의존성 Ca²⁺ 전류, 죽상경화증, lysophosphatidylcholine, 혈관 평활근 세포, protein kinase C

Lysophosphatidylcholine에 의한 혈관 평활근 세포의 Ca²⁺ 전류의 활성 조절 기전

<지도 김 재 욱 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

한 성 식

I. 서 론

최근의 급속한 경제 발전과 더불어 한국인의 생활 양식이 서구화됨에 따라 한국인의 사망원인에서 차지하는 질환의 종류가 크게 바뀌고 있다. 즉 1970년대 이전에는 주로 감염성 질환이 주요 사망원인이었으나, 최근 들어 심혈관계 질환이 사망원인의 수위를 차지하고 있으며,¹ 특히 식생활의 서구화에 따른 고콜레스테롤증과 밀접히 연관되어있는 허혈성 심질환에 의한 사망률은 최근 10여 년간 남, 여에서 모두 각각 6.3배 및 7.4배의 높은 증가율을 보이고 있다.²

고콜레스테롤증 환자의 경우, 혈액 내에 과도하게 증가되어 있는 low density lipoprotein (LDL)이 혈관내피세포를 경유해서 혈관벽 내(subendothelial space)로 이동한 후, 혈관내피세포, 평활근세포, 탐식세포 등에서 유리된 활성산소(oxygen free radical)의 작용에 의해 산화 LDL로 변형된다. 이 산화 LDL은 탐식세포의 acyl LDL receptor와 반응하여 세포 내로 흡입, 축적되어 foam cell을 형성하게 된다. 이같은 foam cell이 모여서 fatty streak와 같은 죽상경화증의 초기 병변을 형성하게 되며, 이 부위로 평활근 세포의 이동 및 증식이 일어나고, collagen 합성 등이 증가해서 병변 부위의 크기가 점차 증가하여 죽상동맥경화증의 특징적인 atheromatous plaque을 형성한다.³

최근 들어 죽상동맥경화증 환자에서 관찰되는 혈류량 감소 현상이 atheromatous plaque에 의한 혈관 내경 감소에 의한 것이 아니라 혈관 자체의 기능 이상(vasomotor dysfunction)에 의해서 나타난다고 많은 연구자들이 보고하고 있다. 즉 미세 혈관계와 같이 육안으로 관찰할 수 있는 atheromatous plaque가 형성되지 않은 부위의 혈관에서도 atheromatous plaque가 있는 부위의 혈관과 동일한 혈관운동이상(vasomotor dysfunction)이 관찰된다는 보고 등은 고콜레스테롤증 환자의 혈액 내에 혈관운동이상을 초래하는 물질이 존재함을 시사한다.⁴ 그런데 정상인에서 말초세포에 cholesterol을 공급해주는 운반체

로서의 역할을 하고 있는 low density lipoprotein (LDL)의 농도가 고콜레스테롤증 환자에서 크게 증가하며, 이같은 LDL의 농도 변화와 죽상동맥경화증의 발생이 밀접히 연관되어 있다는 보고나, 고콜레스테롤증 환자에서 활성산소의 생성이 증가하고, 항산화제를 장기간 사용하는 경우 죽상동맥경화증시에 관찰되는 혈관운동이상 억제된다는 보고 등은 활성산소에 의해 산화된 LDL (ox-LDL)이 혈관운동이상의 주요 유발인자임을 시사한다.⁵⁻⁷

LDL을 구성하는 여러 성분 중에서 cholesterol core를 둘러싸고 있는 phospholipid는 주로 phosphatidyl choline (PC)으로 구성되어 있는데, 이 PC가 산화되는 경우 phospholipase A₂ (PLA₂)의 작용에 의해 lysophosphatidylcholine (LPC)로 분해되며,⁵ 이에 의해 ox-LDL 내 LPC 농도가 약 5배 이상 증가된다.^{8,9} 또한 분리한 혈관 절편에서 관찰되는 ox-LDL에 의한 혈관이완 억제 현상이 LPC 투여에 의해서도 동일하게 관찰되는 것이 보고되었으며, 인위적으로 LPC를 제거한 ox-LDL에 의해서는 ox-LDL에 의해 유발되는 혈관운동기능이상 관찰되지 않는다는 보고 등은 ox-LDL에서 형성된 LPC가 ox-LDL에 의해 유발되는 혈관운동기능이상을 초래하는 주요인자임을 시사하나 그 자세한 기전에 대해서는 아직 명확치 않다.^{10,11}

그런데 혈관의 긴장도는 평활근 세포 내 Ca²⁺ 농도와 세포 내 수축단백질(contractile element)의 Ca²⁺ 감수성(Ca²⁺ sensitivity) 등의 2가지 요소에 의해 결정됨은 잘 알려져 있다. 따라서 LPC가 위의 2가지 인자 가운데 어느 하나 혹은 2가지 모두에 영향을 주어 평활근 수축력을 변화시킬 가능성이 있다. 그런데 고콜레스테롤증을 유발시킨 동물로부터 분리한 평활근 세포는 대조군에 비해 ⁴⁵Ca²⁺의 유출률(efflux rate)이 저하되어 있었으며, 세포 내 Ca²⁺ 농도는 높게 유지되는 것이 보고되었으며,^{12,13} 또한 배양액에 ox-LDL을 첨가 시 평활근 세포 내 Ca²⁺ 농도가 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것이 보고되었다.^{11,14} 반면에 고콜레스테롤증 동물에서 분리한 평활근 절편의 수축단백질의 Ca²⁺ 감수성은 대조군과 차이가 없다는 Miwa 등¹⁵의 보고는 LPC가 주로 평활근 세포 내 Ca²⁺ 농도를 증가시켜 평활근 세포의 수축력을 증가시킴을 시사한다.

그런데 EGTA를 투여하여 세포 외부의 Ca²⁺를 제거하거나, verapamil 같은 Ca²⁺ 통로 차단제를 투여하는 경우 ox-LDL이나 LPC에 의한 세포 내 Ca²⁺ 농도 증가가 억제된다는 보고는^{11,13,14} LPC에 의해 Ca²⁺ 통로 자체의 활성이 증가하거나, 또는 LPC가 안정막 전압을 탈분극시켜 이차적으로 Ca²⁺ 통로의 활성을 증가시켜 세포 내로의 Ca²⁺ 유입이 증가하였을 가능성을 시사하나 아직까지 LPC에 의한 Ca²⁺ 통로 활성 변화를 직접 관찰한 보고는 없는 실정이다. 다만 임상적으로 고콜레스테롤증과 유사한 실험 조건, 즉 고농도 cholesterol을 첨가한 배양액에서 배양된 평활근 세포는 대조군에 비해 Ca²⁺ 전류의 크기가 증가하는 것이 보고되었으나,¹³ 이같은 결과가 고콜레스테롤증 환자에서 관찰되는 LPC에 의한 세포 내 Ca²⁺ 농도 증가의 기전인지 아니면 단순히 고농도 cholesterol에 의한 세포막 유동성의 변화에 의해 이온 전류의 크기가 변화하는지의 여부는 아직 불확실하다.^{4,16} 따라서

죽상경화증 시 관찰되는 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가기전을 규명하기 위해선 세포막 Ca^{2+} 통로에 대한 LPC의 효과를 직접 관찰하는 것이 필수적이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 LDL의 주요 산화물인 LPC가 죽상경화증에서 관찰되는 혈관운동 기능 이상의 주요 유발인자인지를 규명하기 위해 1) 내피를 제거한 혈관 절편에서 혈관의 긴장도와 세포 내 Ca^{2+} 농도 변동에 미치는 LPC의 효과를 관찰한 후, 2) 분리한 혈관 평활근 세포를 이용하여 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 활성이 LPC에 의해 변화되는지의 여부를 확인하고자 하였다. 3) 만약 LPC에 의해 Ca^{2+} 전류의 활성이 증가한다면, 그와 같은 증가 효과가 세포 내 이차 전달계를 통해 이루어지는지를 확인하기 PKA 및 PKC 촉진제, 그리고 PKC 억제제 등을 사용한 상태에서 Ca^{2+} 전류의 활성에 미치는 LPC의 효과를 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 혈관의 수축력과 세포 내 Ca^{2+} 농도의 동시 측정

체중 1~1.5 Kg의 집토끼의 이 정맥에 pentobarbital sodium (60 mg/Kg)을 주사하여 마취시킨 후 하퇴 동맥을 절단하여 몸 속의 혈액을 제거한 다음 경동맥을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 혈관 주위의 결체 조직을 외과 현미경 하에서 제거한 후 사선으로 잘라 길이 10 mm 정도의 혈관 절편을 만들었다. 준비한 혈관 절편을 $10\mu\text{M}$ Fura-2/AM (acetoxymethyl ester)이 존재하는 정상 Tyrode 용액에서 3~4시간 동안 배양하여 Fura-2를 세포 내에 축적시켰다. 이때 Fura-2/AM의 용해도를 증가시키기 위해 noncytotoxic detergent인 cremophor EL (0.01%)를 배양 용액에 첨가하였으며, 배양이 끝난 혈관 절편은 정상 Tyrode 용액으로 30분간 관류시켜 혈관 절편 외부에 묻은 Fura-2를 세척한 후에 실험을 실시하였다.

Fura-2가 축적된 혈관 절편의 한쪽 끝은 strain gauge transducer (Harvard)에 고정하여 장력의 변화를 측정할 수 있도록 하였으며, 다른 한쪽 끝은 UV light가 통과할 수 있도록 측정 용기의 바닥에 고정하였다. 이후 혈관 절편에 0.4 g의 안정장력을 가한 상태에서 70 mM high K^+ 용액으로 혈관수축을 유도하는 과정을 3회 반복하여 혈관 절편의 반응이 일정하게 유지되도록 한 후 실험을 실시하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)의 변화를 측정하기 위해 340 nm와 380 nm 파장의 UV light를 혈관 절편에 번갈아 조사한 후, 이에 의해 유발되는 emission light (fluorescence)를 computer에 기록하였다. 340 nm 파장의 UV light에 의한 fluorescence와 380 nm 파장의 UV light에 의해 유발된 fluorescence의 ratio (F340/F380)를 계산하여 이를 세포 내 Ca^{2+} 농도의 변화로 간주하였다(Figure 1).

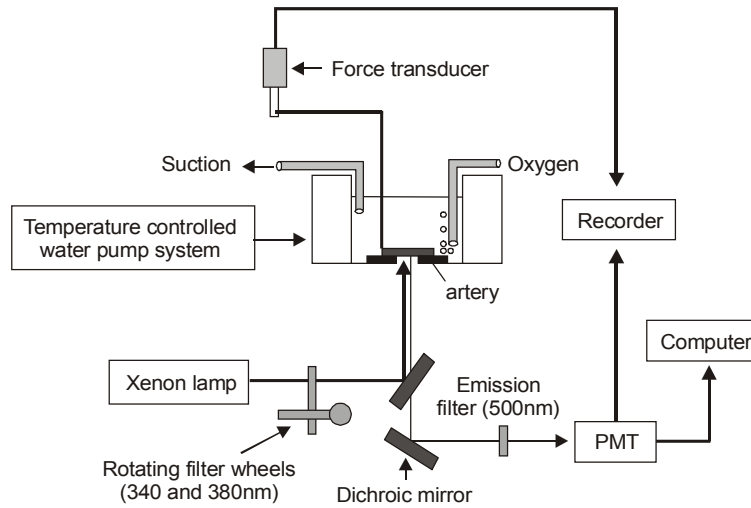


Figure 1. Block diagram of fluorescence spectrophotometer.

2. 단일 평활근 세포의 분리 및 Ca^{2+} 전류의 측정

토끼 문정맥(portal vein)으로부터 단일 평활근 세포를 얻는 방법은 Ahn 등¹⁷의 방법을 이용하였는데, 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 체중 1~1.5 Kg의 집토끼의 이 정맥에 pentobarbital sodium (60 mg/Kg)을 주사하여 마취시킨 후 하퇴 동맥을 절단하여 몸 속의 혈액을 제거한 후 문정맥을 적출한 후 외과 현미경하에서 혈관 주위의 결체 조직을 안과용 미세 가위를 이용하여 제거하였다. 결체 조직을 제거한 문정맥을 횡으로 길게 절개하여 내피면을 노출시킨 후 이를 37°C의 Ca^{2+} -free Tyrode 용액에서 10분간 배양한 후 배양액 내에 collagenase (1 mg/ml, Wako, Osaka, Japan)를 첨가하여 20분간 다시 배양하였다. 이후 collagenase가 없는 Ca^{2+} -free Tyrode 용액에서 혈관 절편을 여러 번 씻어주어 혈관 벽에 묻어 있는 collagenase를 제거한 다음 유리 대롱을 이용하여 혈관 절편을 흔들어주어서 단일 평활근 세포가 혈관절편에서 유리되도록 하였다. 충분한 양의 세포를 얻은 후 용액 내에 BSA (1 mg/ml; Sigma Co, St. Louis, MO, USA)와 $MgCl_2$ (1.2 mM)를 첨가한 다음 실험에 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

소량의 평활근 세포 부유액을 실험 용기에 떨어트린 후 약 5~10분 정도 기다려서 평활근 세포가 실험 용기 바닥에 부착하도록 한 후 실험을 실시하였다. 실험 용액은 중력에 의해 1 ml/min의 속도로 관류되도록 하였으며, 특별한 온도 조절 없이 상온(25°C)에서 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 microelectrode (Sutter Co. Novata, CA, USA)는 vertical puller (Narishige Co. Tokyo, Japan)를 이용하여, 전극 내액을 채웠을 때 전극 저항이 2~3 MΩ이 되도록 전극의 tip 크기를 조절하였다.

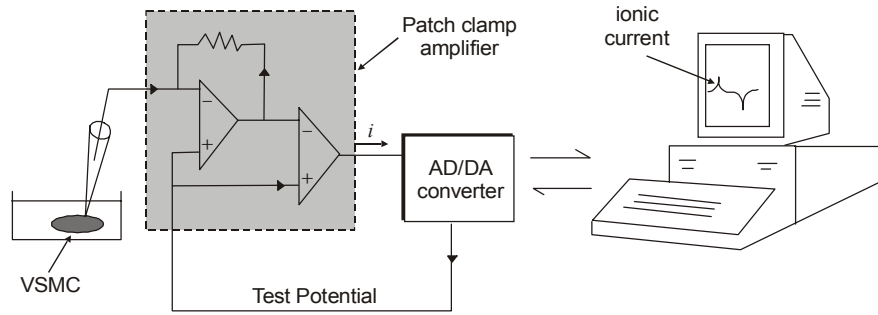


Figure 2. Schematic diagram of patch clamp system setup.

평활근 세포막의 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 LPC의 효과는 Hamil 등¹⁸의 방법을 이용하여 기록하였다. 즉 평활근 세포의 막전압을 patch clamp 증폭기(Axopatch 1-D, Axon Inc. Foster city, CA, USA)를 이용하여 다양하게 고정된 상태에서 test pulse를 가했을 때 발생하는 이온 전류를 analogue-digital converter (digidata 1200, Axon Inc. Foster city, CA, USA)를 이용해서 computer hard disk에 기록하였다(Figure 2). 이때 8 pole Bessel filter (5 KHz)를 이용하여 측정전류를 여과한 후, 25 KHz의 빈도로 digitization하여 signal의 변형을 최소화하였다. 각각의 경우에 따른 막전압 고정 방법은 그림 설명에 따로 기술하였다.

3. 실험 용액 및 약물

혈관 절편 및 세포 분리 시 사용한 정상 Tyrode 용액의 조성은 다음과 같다. (mM): NaCl 140, KCl 5.6, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, HEPES 10, Glucose 10, pH=7.4 with Tris. Ca^{2+} -free Tyrode 용액은 위의 조성에서 CaCl_2 및 MgCl_2 를 제거하여 작성하였다. 장력 측정 시 사용한 고농도 K^+ 용액은 정상 Tyrode 용액에서 K^+ 농도를 80 mM로 증가시킨 용액을 사용하였으며, 이때 삼투질 농도를 보정하기 위해 동량의 NaCl을 제거하였다. 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류 측정 시 관류액으로는 정상 Tyrode 용액에서 Ca_2Cl_2 를 BaCl_2 (10 mM)로 치환하였으며, K^+ 전류를 차단하기 위해 5 mM tetraethylammonium chloride (TEA)를 첨가하였으며, 이때 용액의 삼투질 농도를 보정하기 위해 동량의 NaCl을 제거하였다. 전극 내액으로는 아래와 같은 조성의 용액을 사용하였다. (mM): Cs aspartate 100, CsCl 30, MgSO_4 5.7, Na_2ATP 5, Na_2GTP 1, BAPTA 10, HEPES 10, pH=7.2 with CsOH. 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma 회사(Sigma Co, Mo, USA) 제품을 사용하였다.

III. 결 과

1. Lysophosphatidylcholine에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 및 수축력의 변화

죽상동맥 경화증이 유발된 혈관에서 관찰되는 비정상적인 수축력 증가 현상이 lysophosphatidylcholine (LPC)에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$) 증가에 의한 것인지를 확인하기 위해 분리한 혈관 절편의 장력과 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 LPC의 효과를 관찰하였다. Figure 3에서 볼 수 있듯이 Fura-2를 축적시킨 경동맥 절편에 고농도 K^+ Tyrode 용액을 처리한 경우 혈관 장력과 $[Ca^{2+}]_i$ 값이 안정 시에 매우 높은 상태로 유지되는 것을 볼 수 있으며, 이때 내피세포의 존재 여부를 확인하기 위해 $10\mu M$ 의 ACh을 첨가하였으나 혈관의 장력이나 $[Ca^{2+}]_i$ 값에 별다른 변화가 없는 것으로 보아 내피세포가 효과적으로 제거되었음을 확인할 수 있었다. 이후 정상 Tyrode 용액으로 교환하여 장력 및 $[Ca^{2+}]_i$ 의 크기가 다시 안정 상태로 회복되는 것을 관찰한 후 용액에 $10\mu M$ 의 LPC를 첨가한 경우 고농도 K^+ Tyrode 용액에 의해 유발되는 장력의 크기와 $[Ca^{2+}]_i$ 값이 대조군에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, LPC를 제거한 용액으로 재관류 시 장력의 크기와 $[Ca^{2+}]_i$ 값이 대조군 상태로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3).

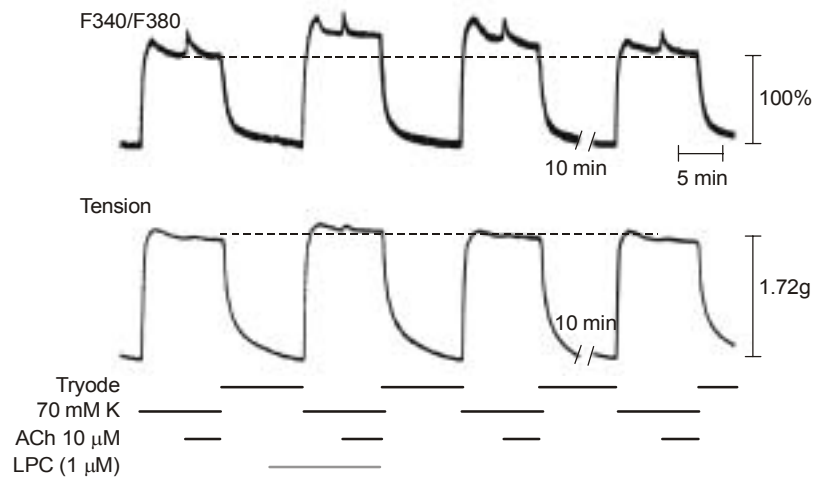


Figure 3. Effect of LPC on high K^+ -induced contraction and fura 2 Ca^{2+} ratio in endothelium denuded rabbit carotid artery. Application of LPC produced a reversible increase of high K^+ -induced contraction and intracellular Ca^{2+} concentration (F340/F380) in isolated, endothelium denuded rabbit carotid artery.

2. Lysophosphatidylcholine에 의한 whole cell Ca^{2+} 전류의 변화

평활근 세포를 이용하여 whole cell을 만든 후 세포의 막전압을 -80 mV 로 고정한 상태에서 0 mV 의 test pulse를 매 10초 간격으로 가하면서 얻은 내향 전류를 대조군으로 삼았다. 이후 관류액에 LPC ($0.5\mu\text{M}$)를 첨가하여 관류시키는 경우 내향 전류의 크기가 대조군에 비해 현저히 증가하였으며(% increase of I_{Ba} ; $142.6\pm 8.6\%$ of control, $n=19$, $p<0.01$), 관류액에서 LPC 제거 시 내향전류의 크기가 다시 대조군 상태로 돌아오는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 이때 관류액에 Ca^{2+} 통로 차단제로 알려진 nifedipine ($3\mu\text{M}$) 첨가 시 내향전류가 소실되는 것으로 보아 본 실험 조건에서 기록된 내향전류는 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류임을 확인하였다(Figure 5). 이후 test pulse의 크기를 -50 mV 에서 $+60\text{ mV}$ 까지 10 mV

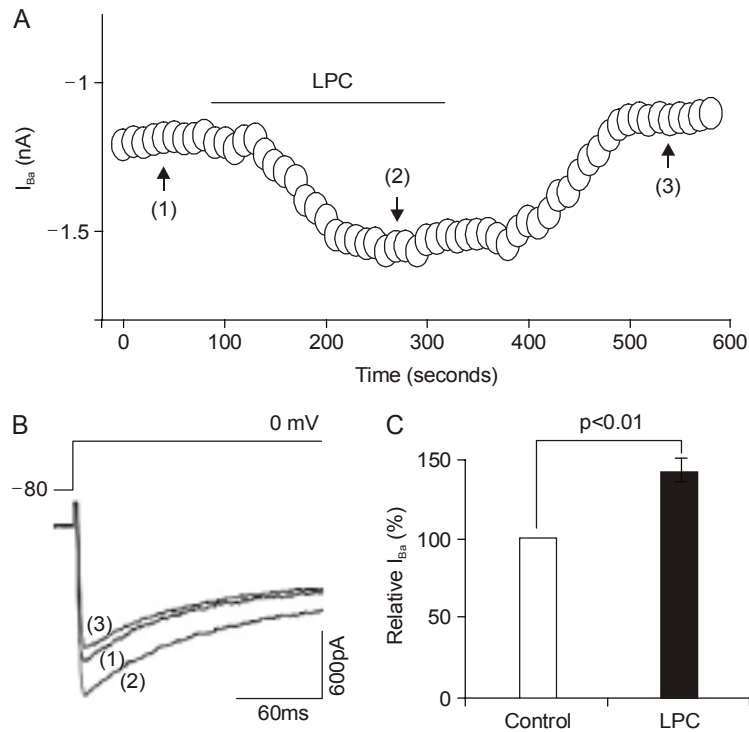


Figure 4. Enhancement of whole cell Ba^{2+} currents by LPC. A: time course of changes in I_{Ba} elicited by test pulses to 0 mV from a holding potential of -80 mV on LPC exposure. Horizontal bar indicates the time of LPC application in the bath solution. B: Superimposition of current sweeps from A where indicated. C: Summary of the effect of LPC on the peak current at 0 mV . Bath application of LPC increased the current amplitude to $142.6\pm 8.4\%$ ($n=19$).

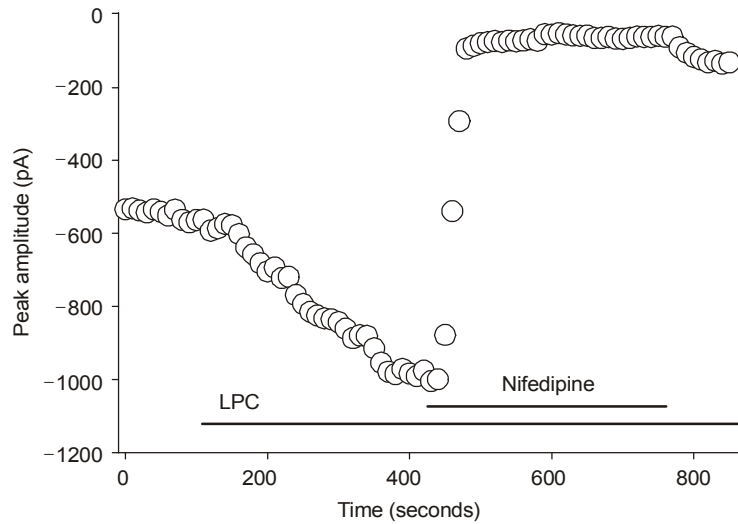


Figure 5. Effect of nifedipine treatment on LPC-induced enhancement of I_{Ba} . Time course of changes in I_{Ba} elicited by test pulses to 0 mV from a holding potential of -80 mV on LPC (0.5 μ M) and nifedipine (2 μ M) exposure. Horizontal bar indicates the time of LPC or nifedipine application in the bath solution.

간격으로 변화시켜가면서 Ca^{2+} 전류를 기록하여 대조군으로 삼은 후 관류액에 LPC를 첨가한 상태에서 동일한 방법으로 Ca^{2+} 전류를 기록하여 LPC가 전류-전압 곡선($I \sim V$ curve)에 미치는 효과를 관찰한 결과 모든 막전압 값에서 Ca^{2+} 전류의 크기가 LPC에 의해 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 6).

이같은 LPC의 효과가 Ca^{2+} 전류의 막전압 의존 성질에 영향을 끼쳐서 나타났는지를 확인하기 위해 Ca^{2+} 전류의 활성화 및 비활성화 성상(voltage dependence of steady state activation and steady state inactivation)에 미치는 LPC의 효과를 관찰하였다. Ca^{2+} 전류의 활성화 곡선은 test potential의 크기를 -50 mV에서 +20 mV까지 변화시켜가면서 Ca^{2+} 전류의 최대치(peak amplitude)를 아래 식에 대입하여 각각의 막전압 값에서의 전도도(conductance, G) 값을 계산하였다.

$$G = \frac{I_{Ca}}{E_m - E_{rev}}, \quad (E_m = \text{test pulse 크기}, E_{rev} = Ca^{2+} \text{ 전류의 역전전압})$$

이후 전도도의 상대적 비율 값[각각의 전도도 값을 최대 전도도(G_{max}) 값으로 나눈 값]을 Boltzman식으로 fitting하여 Ca^{2+} 전류의 활성화 곡선을 얻었다(Figure 6의 그림 설명 참조). LPC 처치군의 경우 대조군에 비해 활성화 곡선이 일부 오른 쪽으로 이동하는 것을 관찰할

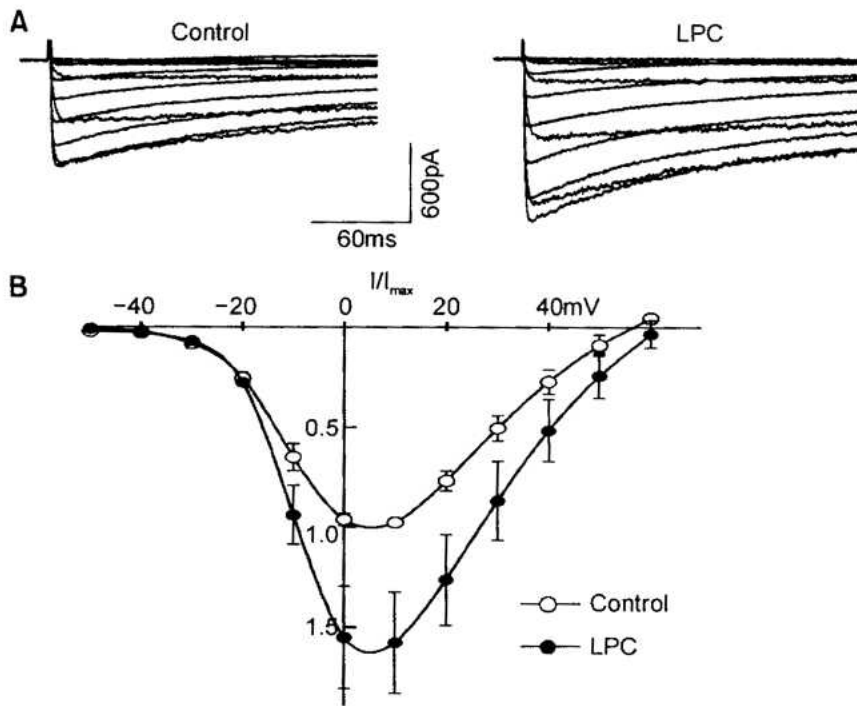


Figure 6. Effect of LPC on current-voltage relations of I_{Ba} . A: a raw traces of I_{Ba} recorded at 10 mV increments between -50 and +60 mV from a holding potential of -80 mV. B: Summary of voltage dependence of I_{Ba} for control (○) and $0.5 \mu\text{M}$ LPC (●). At each voltage steps, peak values of current were determined, and averaged ($n=8$).

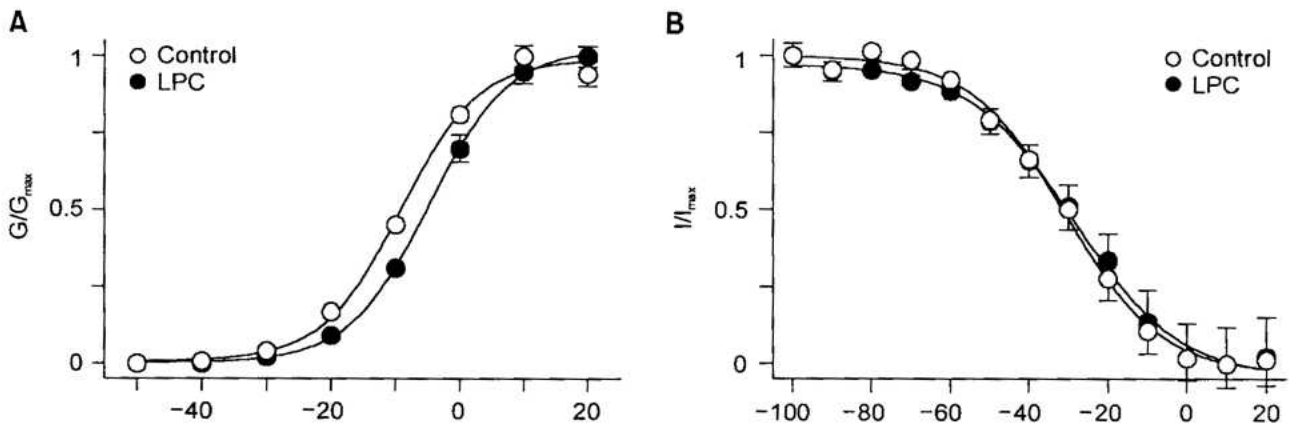


Figure 7. Changes in steady-state activation and inactivation of I_{Ba} . A: steady state activation of I_{Ba} in control and LPC. Slope conductance (G) were measured at different membrane potentials and were normalized to the maximal slope conductance (G_{max}). Each data points were the mean of 8 experiments and fitted using a following form of Boltzman equation; $Y = \{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]\}^{-1}$, where $V_{1/2}$ represents half maximal activation potential and k is slope factor. $V_{1/2}$ was -9.2 ± 0.8 mV and -4.9 ± 0.3 mV in control and LPC, respectively. B: steady state inactivation of I_{Ba} in control and LPC. Current amplitudes (I) of test potential to 0 mV from a different holding potential were normalized to the maximal current (I_{max}); $n = 6$ experiments. Curves were obtained from following form of Boltzman equation; $Y = \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}^{-1}$, where $V_{1/2}$ represents half maximal inactivation potential and k is slope factor. $V_{1/2}$ was -31.4 ± 1.2 mV and -30.2 ± 1.6 mV in control and LPC, respectively.

수 있었다(대조군 및 LPC 처치군의 half maximal activation potential; -9.2 ± 0.8 mV 및 -4.9 ± 0.3 mV, $p < 0.05$, $n=8$, Figure 7A).

Ca^{2+} 전류의 비활성화 곡선은 다음과 같은 방법을 이용하여 구하였다. 즉 평활근 세포의 막전압을 -100 mV부터 $+20$ mV까지 10 mV 간격으로 장기간(10 sec) 유지한 후 다시 일정 크기의 탈분극 자극(0 mV)을 가하여 얻은 각각의 전류 크기의 상대적 비[각각의 전류(I)를 최대 전류(I_{max})로 나눈 값]를 Boltzman 식으로 fitting 하여 Ca^{2+} 전류의 비활성화 곡선을 얻었다. 대조군과 LPC 처치군 사이에는 비활성화 곡선의 특성에 차이가 없었다(대조군 및 LPC 처치군의 half maximal inactivation potential; -31.4 ± 1.2 mV 및 -30.2 ± 1.6 mV, $p > 0.05$, $n=6$, Figure 7B).

3. 세포 내 이차 전달계의 활성 변화와 lysophosphatidylcholine의 효과

LPC 투여 시 관찰되는 Ca^{2+} 전류의 활성 증가 효과가 LPC에 의한 세포 내 이차 전달계의 활성 변화를 통해 이루어지는 지 확인하기 위해 protein kinase A (PKA)의 activator인 forskolin, protein kinase C (PKC)의 activator인 phorbol myristic acid (PMA), 그리고 PKC의 inhibitor인 staurosporine과 chelerythrine을 각각 전처치한 상태에서 LPC의 효과를 관찰하였다.

평활근 세포의 막전압을 -80 mV로 고정된 상태에서 0 mV의 탈분극 자극에 의해 유발되는 Ca^{2+} 전류의 크기가 LPC에 의해 가역적으로 변화되는 것을 확인한 후에 PKA acti-

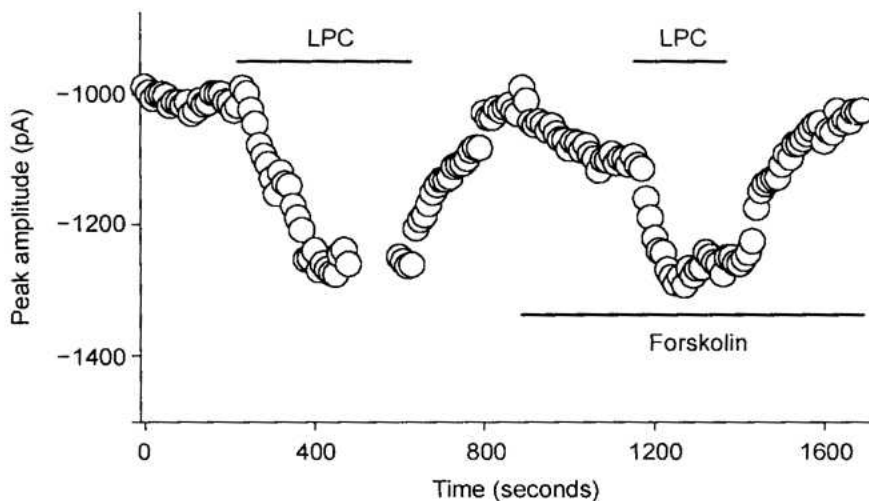


Figure 8. Effect of forskolin pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba} . Time course of change of I_{Ba} during treatment of LPC ($0.5 \mu M$) alone and LPC ($0.5 \mu M$) with pretreatment of forskolin ($1 \mu M$). I_{Ba} was evoked by repetitive step depolarizations from 80 mV to 0 mV at every 10 seconds. Horizontal bars indicate the time of drug application.

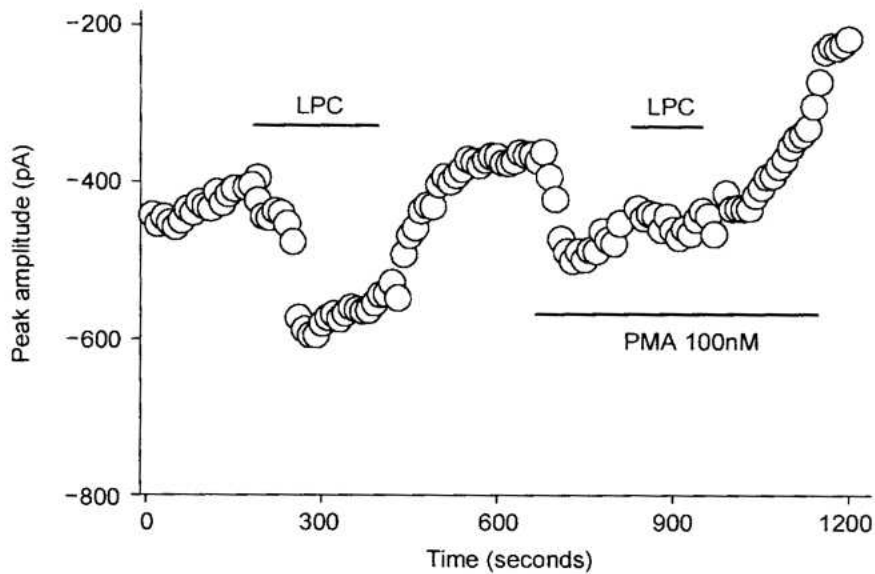


Figure 9. Effect of PMA pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba} . Time course of change of I_{Ba} during treatment of LPC ($0.5 \mu\text{M}$) alone and LPC ($0.5 \mu\text{M}$) with pretreatment of PMA (100 nM). Horizontal bars indicate the time of drug application.

vator인 forskolin ($1 \mu\text{M}$)을 관류액에 첨가하는 경우 Ca^{2+} 전류의 크기가 대조군에 비해 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이 상태에서 LPC 투여 시 Ca^{2+} 전류의 더욱 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 8). 반면에 PKC activator인 PMA (100 nM)을 전처리 한 경우 Ca^{2+} 전류의 크기가 대조군에 비해 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, 이같이 PMA가 계속 존재하는 상태에서 관류액에 LPC를 투여하는 경우에는 더 이상의 Ca^{2+} 전류 크기 증가 효과는 관찰할 수 없었다(Figure 9).

한편 관류액에 PKC inhibitor인 chelerythrine ($3 \mu\text{M}$)을 첨가한 경우 Ca^{2+} 전류의 크기가 대조군에 비해 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이같이 PKC inhibitor가 계속 존재하는 상태에서 관류액에 LPC를 첨가하는 경우 대조군에서 관찰되었던 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가 효과는 소실되었다. 이후 관류액에서 chelerythrine을 제거하는 경우 Ca^{2+} 전류의 크기가 일부 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 10).

이같은 PKC inhibitor 및 activator의 전처리가 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가에 미치는 효과를 Figure 11에 정리하였다. PMA 전처리 시 Ca^{2+} 전류의 크기는 대조군의 $123.5 \pm 3.1\%$ 로 증가하였으며, 이때 PMA가 있는 상태에서 LPC를 투여하는 경우 Ca^{2+} 전류의 크기는 대조군의 $121.4 \pm 4.0\%$ 로 이 둘 사이에 통계적인 차이는 없었다($p > 0.05$, $n=3$). Staurosporine (100 nM) 전처리 시 Ca^{2+} 전류의 크기는 대조군의 $54.5 \pm 6.4\%$ 로 감소하였으며, 이때 staurosporine이 있는 상태에서 LPC를 투여하는 경우 Ca^{2+} 전류의 크기는 대조군의 $57.6 \pm 7.5\%$ 로 이 두 군 사이에 통계적인 차이는 없었다($p > 0.05$, $n=6$). Chelerythrine ($3 \mu\text{M}$)을 전처리한 경

우에도 staurosporine과 유사한 결과를 얻을 수 있었다(% change of Ca^{2+} current in staurosporine and staurosporine +LPC; $47.4 \pm 5.5\%$ vs $45.6 \pm 4.0\%$, $n=5$, $p>0.05$).

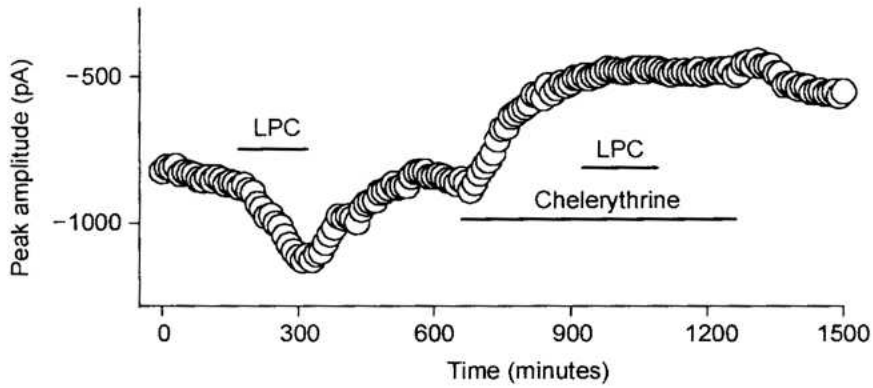


Figure 10. Effect of chelerythrine pretreatment on LPC-induced change of I_{Ba} . Time course of change of I_{Ba} during treatment of LPC ($0.5 \mu\text{M}$) alone and LPC ($0.5 \mu\text{M}$) with pretreatment of chelerythrine ($3 \mu\text{M}$). Horizontal bars indicate the time of drug application.

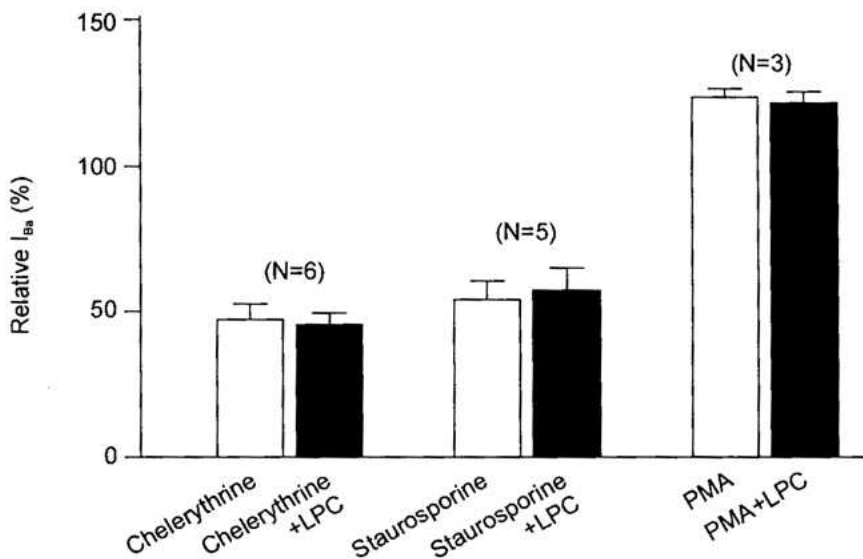


Figure 11. Summary of the effect of changing PKC activity on LPC-induced enhancement of I_{Ba} . Averaged results of pretreatment of PKC inhibitors ($3 \mu\text{M}$ chelerythrine and 100 nM staurosporine) or PKC activators (100 nM PMA) on LPC-induced change of I_{Ba} . Data are expressed as the percentage of peak amplitude of control I_{Ba} . Number of cells is indicated in parenthesis.

IV. 고 찰

평활근 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 및 막전압 의존성 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 lysophosphatidylcholine (LPC)의 효과를 조사한 본 실험을 통해 얻은 주요한 결과는 다음과 같다. 즉 1) 안정 상태에서 평활근 절편의 긴장도와 $[Ca^{2+}]_i$ 농도는 LPC를 투여 하더라도 별다른 변화가 나타나지 않았으나 고농도 K^+ 용액으로 혈관 수축을 유도한 경우에는 혈관의 긴장도와 $[Ca^{2+}]_i$ 농도가 대조군에 비해 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었으며, 2) Ca^{2+} 전류의 크기가 LPC에 의해 모든 막전압 값에서 증가하는 것이 관찰되었으며, 이때 Ca^{2+} 통로의 막전압 의존성질(steady state voltage dependent property)에는 유의한 변화가 없었다. 그리고 3) PKA 촉진제를 전처리한 경우와는 달리 PKC 억제제나 촉진제를 전처리한 경우에는 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가 효과가 소실되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가 효과가 죽상 경화증 혈관에서 관찰되는 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가 현상 및 비정상적인 수축 반응에 기여함을 의미한다.

1. 관상동맥 평활근 세포의 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 LPC의 효과

고농도 K^+ 용액에 의한 혈관의 수축력 증가 현상은 주로 평활근 세포막의 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로의 활성이 증가되어 나타나며, Ca^{2+} 통로 차단제 등을 사용하여 Ca^{2+} 통로의 활성을 억제하는 경우 그에 비례하여 혈관의 수축력이 감소함은 잘 알려져 있다.¹⁹ 본 실험에서도 고농도 K^+ 용액으로 혈관 절편을 관류 시 혈관의 수축력과 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이때 LPC를 관류액에 전처리한 경우 혈관의 수축력과 세포 내 Ca^{2+} 농도가 대조군에 비해 현저히 증가되는 결과 (Figure 3)를 얻을 수 있었는데, 이는 LPC가 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로의 활성을 증가시켜 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도와 수축력의 크기를 증가되었을 가능성을 시사하고 있다.

이같은 가능성을 보다 직접적으로 확인하기 위해 분리한 평활근 세포에서 Ca^{2+} 전류의 활성을 기록하고, 이같은 Ca^{2+} 전류의 크기에 LPC가 미치는 효과를 살펴보고자 하였다. 그런데 혈관 평활근 세포막에는 Ca^{2+} 전류 이외에도 여러 가지 종류의 이온 전류들이 존재하고 있으므로 이중에서 Ca^{2+} 전류만을 분리한 후에 LPC의 효과를 측정하는 것은 실험 결과의 해석에 매우 필수적이다. 본 실험에선 평활근 세포막에 높은 밀도로 분포하고 있는 K 전류를 제거하기 위해 전극 내액 및 관류액의 K^+ 이온을 Cs^+ 및 TEA^+ 이온으로 치환한 용액을 사용하였으며, Ca^{2+} 의존성 Cl⁻ 전류가 기록되는 것을 방지하기 위해 세포 내 Ca^{2+} 농도를 고농도 BAPTA를 이용하여 낮게 유지하였다.^{20,21} 이같은 조건에서 평활근 세포에서 기록된 전류는 Ca^{2+} 통로를 통한 이온 전류가 대부분을 차지하게 되므로 Figure 4에서 나타난 바와 같이 관류액에 LPC를 첨가하였을 때 내향전류의 크기가 증가하는 것은 Ca^{2+} 통로의 활성이 LPC에 의해 증가된 것을 시사한다.

그런데 심근 세포나 평활근 세포에 고농도 LPC (10 μ M)를 처리하는 경우 대조군에선 관찰되지 않았던 비특이성 양이온 통로(nonselective cation channel)의 활성이 발견되고, 이를 통해서 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 등과 같은 양이온이 투과한다는 연구자들의 보고는^{22,23} LPC를 투여하였을 때 관찰되는 내향성 전류의 크기 증가가 Ca^{2+} 전류의 활성이 증가되어 나타난 것이 아니라 비특이성 양이온 전류가 활성화되어 나타났을 가능성을 시사한다. 다만 LPC에 의한 내향 전류의 증가 현상이 비특이성 양이온 전류의 역전압과 유사한 0 mV로 한 경우에서도 뚜렷하게 관찰되었고(Figure 4), 막전압의 크기를 -50 mV에서 +60 mV까지 다양하게 변화시킨 경우에서도 모두 관찰되었으며(Figure 6),

Ca²⁺ 통로 차단제인 nifedipine에 의해 내향전류가 거의 소실되는 결과(Figure 5)로 볼 때 본 실험에서 관찰되는 LPC에 의한 내향전류의 증가 현상은 Ca²⁺ 통로의 활성이 LPC에 의해 증가되어서 나타난 결과라고 생각된다.

2. 막전압 의존성 Ca²⁺ 전류의 활성화에 미치는 LPC의 작용 기전

평활근 세포의 Ca 통로의 활성화는 여러 가지 인자에 의해 영향을 받고 있는데, 이 중에서 protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), protein kinase G (PKG) 등에 의해 Ca²⁺ 통로가 인산화되면 그의 활성이 현저하게 변화된다.^{24,25} 이들 kinases들은 Ca²⁺ 통로의 서로 다른 부위를 인산화시키는 작용을 갖고 있는데, 예를 들어 PKA는 Ca²⁺ 통로의 C-terminal 부위의 1,928번째에 위치한 serine을 인산화시켜주고, PKC의 경우에는 N-terminal 부위의 27번 및 31번째 threonine을 인산화시켜주는데, 이들 부위가 인산화되는 경우 Ca²⁺ 통로의 평균 열려 있는 시간(mean open time)이 증가되고, 막전압에 반응하여 열릴 수 있는 Ca²⁺ 통로(functional Ca channel)의 숫자가 증가되므로 세포 전체에서 기록되는 Ca²⁺ 전류의 양이 증가하게 된다.^{24,26}

본 실험에서 관찰된 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류 증가 효과 역시 LPC에 의해 활성화된 세포 내 이차 전달계에 의해 Ca²⁺ 통로가 인산화되어 나타났을 가능성이 있다. 즉 staurosporine이나 chelerythrine과 같은 PKC 억제제²⁷를 전처리한 상태에서 관류액에 LPC를 첨가한 경우, 대조군에서 관찰되었던 Ca²⁺ 전류의 증가 효과가 소실되는 결과(Figure 10, 11)나 PMA와 같은 PKC 촉진제를 전처리하여 평활근 세포 내 PKC의 활성을 충분히 증가시킨 상태에선 LPC를 관류액에 첨가하더라도 Ca²⁺ 전류의 크기가 더 이상 증가하지 않는 결과(Figure 9, 11), 그리고 심근 세포나 평활근 세포, 혈관 내피세포 등에 LPC를 투여하는 경우, 이들 세포에서 protein kinase C의 활성이 증가된다는 다른 연구자들의 보고는²⁸⁻³⁰ 본 실험에서 관찰된 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류의 크기 증가 효과가 PKC의 활성 증가를 매개로 하여 일어남을 시사하고 있다. 반면에 PKA를 활성화시키는 forskolin을 전처리하더라도 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류 증가 효과가 유지되는 실험 결과(Figure 8)는 LPC에 의한 Ca²⁺ 전류 증가 효과가 PKA의 활성 변화와는 무관함을 시사하고 있다.²⁵

이상의 실험 결과는 LPC에 의한 PKC 활성 증가가 Ca²⁺ 전류의 활성을 증가시키는 주요한 기전임을 시사하고 있으나 어떤 과정을 통해 LPC가 PKC의 활성을 증가시키는 지에 대해선 아직 명확치 않다. 일반적으로 agonist에 의한 PKC 활성 변화 증가는 G-protein coupled receptor에 agonist가 결합한 후 활성화되는 일련의 반응에 의해 이루어짐은 여러 연구자들에 의해 잘 알려져 있는데,^{31,32} LPC의 경우 그 분자구조가 platelet activating factor (PAF)와 매우 유사하며, LPC에 의한 세포 내 Ca²⁺ 농도 증가 현상이 PAF 수용체 차단제인 WEB 2086에 의해 억제된다는 macrophage에서의 실험 결과는³³ LPC에 의한 PKC의 활성 증가가 PAF 수용체를 경유하여 나타날 가능성을 시사하고 있다. 반면에 LPC는 amphiphilic한 속성을 갖고 있으므로 세포막을 통해 세포질 내로 이동한 소량의 LPC가 직접 PKC에 결합하여 그의 활성을 조절할 가능성 역시 배제할 수는 없다.^{10,30} 다만 세포막을 통과하여 세포질 내로 이동할 수 있는 LPC의 양은 그의 amphiphilic한 속성의 결과로 세포 외에 첨가한 LPC 농도에 비해 매우 적다(약 1/1,000 정도). 따라서 이와 같은 적은 농도의 LPC (nM 농도)에 의해 PKC의 활성이 변화하는 지의 여부에 대해선 아직까지 직접적으로 확인한 보고는 없으나 nano mole 농도의 LPC를 patch pipette을 이용하여 직접 세포 내에 주입하였을 때 관찰되는 효과가 micro mole 농도의 LPC를 세포 외부에 투입하였을 때 관찰되는 효과와 유사하다는 보고는^{30,34} 세포막을 통해 세포질 내로 유입되는 적은 양의 LPC에 의해서 PKC의 활성이 변화될 가능성을 시사하고 있다.

한편 관류액에 LPC를 투여하더라도 Ca^{2+} 전류의 비활성화 곡선에는 별다른 영향이 없었으나 활성화곡선(steady state activation curve)이 오른쪽으로 약간 치우치는 결과를 얻을 수 있었는데, 이는 PKC에 의한 Ca^{2+} 통로의 인산화와는 무관하게 LPC가 직접 Ca^{2+} 통로 단백질과 결합하거나 혹은 이의 활성 조절에 중요한 β subunit 등에 결합하여 Ca^{2+} 전류의 막전압 의존 성질에 영향을 주어 나타났을 가능성이 있다.¹⁰ 또한 관류액에 LPC를 첨가하는 경우 LPC는 주로 세포막의 outer layer에 존재하게 되는데, 이같이 LPC가 세포막에 축적되는 경우 막의 유동성을 변화시켜 이온 통로의 활성화에 영향을 끼칠 수 있다.¹⁶ 즉 세포를 높은 농도의 LPC에($>10\mu\text{M}$) 노출시키는 경우 세포막의 outer layer에 과도히 축적된 LPC에 의해 이온 통로를 둘러싸고 있는 phospholipid의 배열이나 세포막 구조 등이 변화되어 이온 통로의 활성 변화를 초래할 가능성이 있다.³⁵ 다만 본 실험에서 사용한 LPC의 농도가 막 유동성의 변화를 초래한다고 알려진 LPC의 용량에 비해서는 매우 적은 농도를 사용하였으며, Ca^{2+} 전류의 활성화는 막 유동성이 저하되었을 때 증가한다는 Sen 등³⁶의 보고로 미루어볼 때 본 실험에서 관찰되었던 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류의 증가현상은 주로 PKC의 활성화 증가를 매개로 하여 이루어짐을 알 수 있었다.

V. 결 론

토끼 평활근 절편의 긴장도 및 Ca^{2+} 전류의 활성화에 미치는 lysophosphatidylcholine의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 평활근 절편의 긴장도 및 세포 내 Ca^{2+} 농도는 LPC에 의해 가역적으로 증가하였다.

2. 평활근 세포의 Ca^{2+} 전류의 활성화는 LPC 투여 시 가역적으로 증가하였으며, 이같은 효과는 모든 막전압 값에서 동일하게 관찰되었다.

3. LPC 투여 시 Ca^{2+} 전류의 막전압 의존성 활성화 곡선이 오른쪽으로 이동하였으나 막전압 의존성 비활성화 곡선에는 유의한 변화가 없었다.

4. LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가 효과는 protein kinase A (PKA) 촉진제인 forskolin 전처치에 의해서는 영향을 받지 않았으나 protein kinase C (PKC) 촉진제인 phorbol myristic acid (PMA)를 전처치하는 경우 소실되었다.

5. PKC inhibitor인 staurosporine이나 chelerythrine을 전처치하는 경우 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류 증가 효과가 소실되었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 LPC에 의한 Ca^{2+} 전류의 증가 효과는 세포 내 PKC 활성화 변화를 매개로 하여 이루어지며, 이에 의한 평활근 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가 효과는 죽상경화증 혈관에서 관찰되는 혈관운동 기능이상의 발생에 중요한 역할을 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. 서 일, 지선하, 김일순. 한국에서의 심혈관계 질환의 변천양상. 한국역학회지 1993;15:40-6.
2. 김일순. 한국인 5대 사망원인 질환의 현황과 추이. 대한의학협회지 1995;38:132-45.
3. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. Am J Cardiol 1993;71:9B-14B.
4. Cox DA, Cohen ML. Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. Pharmacol Rev 1996; 48:3-19.
5. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc Natl Acad Sci 1984;81:3883-7.
6. Keaney JF, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. J Clin Invest 1995;95:2520-9.
7. Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. Circulation 1995;92:898-903.
8. Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Essential role of phospholipase A₂ activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:3000-4.
9. Deckert V, Persegol L, Veins L, Lizard G, Athias A, Lallemand C, et al. Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins: cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. Circulation 1997;95:723-31.

10. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. LPC in oxidized LDL elicits vasoconstriction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994; 267:H2441-9.
11. Suenaga H, Kamata K. Lysophosphatidylcholine potentiates vascular contractile responses by enhancing vasoconstrictor-induced increase in cytosolic free Ca^{2+} in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1998;361:217-26.
12. Strickberger SA, Russek LN, Phair RD. Evidence for increased aortic plasma membrane calcium transport caused by experimental atherosclerosis in rabbits. *Circ Res* 1988;62:75-80.
13. Bialecki RA, Tulenko TN, Colucci WS. Cholesterol enrichment increases basal and agonist-stimulated calcium influx in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;88:1894-900.
14. Auge N, Fitoussi G, Bascand JL, Pieraggi M, Junquero D, Valet P, et al. Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca^{2+} -dependent retraction of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996;79:871-80.
15. Miwa Y, Hirata K, Matsuda Y, Suematsu M, Kawashima S, Yokoyama M. Augmented receptor-mediated Ca^{2+} mobilization causes supersensitivity of contractile response to serotonin in atherosclerotic arteries. *Circ Res* 1994;75:1096-1102.
16. Bolotina V, Omelyanenko V, Heyes B, Ryan U, Bregestovski P. Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca^{2+} -dependent K^+ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflu Arch* 1989;415:262-8.
17. Ahn DS, Jeong YK, Lee YH, Kang BS. Activation of Ca^{2+} -activated K^+ channels by beta agonist in rabbit coronary smooth muscle cells. *Yonsei Med J* 1995;36:232-42.
18. Hamil OP, Marty A, Neher El, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflu Arch* 1981;391:85-100.
19. Shimoda L, Sham JSK, Shimoda TH, Sylvester JT. L-type Ca^{2+} channels, resting $[Ca^{2+}]_i$, and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes. *Am J Physiol* 2000;279: L884-94.
20. Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissue. *Pharmacol Rev* 1995;47:387-573.
21. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990;259:C3-18.
22. Magishi K, Kimura J, Kubo Y, Abiko Y. Exogenous lysophosphatidylcholine increases non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflu Arch* 1996;432:345-50.
23. Jabr RI, Yamazaki J, Hume J. Lysophosphatidylcholine triggers intracellular calcium release and activation of non-selective cation channels in renal arterial smooth muscle cells. *Pflu Arch Eur J Physiol* 2000;439:495-500.
24. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 2000;87:1095-102.
25. Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume JR, Keef KD. Modulation of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res* 1998;82:557-65.
26. Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca channels (Cav1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol* 2001;281:C1743-56.
27. Gordge PC, Ryves WJ. Inhibitors of protein kinase C. *Cellular Signalling* 1994;6:871-82.
28. Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Murohara T, Fukunaga K, Myamoto E, et al.

- Lysophosphatidylcholine inhibits surface receptor-mediated intracellular signals in endothelial cells by a pathway involving protein kinase C activation. *Circ Res* 1992;71:1422-8.
29. Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1007-13.
 30. Watson CL, Gold MR. Lysophosphatidylcholine modulates cardiac I_{Na} via multiple protein kinase pathways. *Circ Res* 1997;81:387-95.
 31. Aiello EA, Cingolani HE. Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca^{2+} current by a Ca^{2+} - and protein kinase C-dependent mechanism. *Am J Physiol* 2001;280:H1528-36.
 32. Zhong J, Dessauer CW, Keef KD, Hume JR. Retention of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein by G protein α_s and $\beta\gamma$ subunits. *J Physiol* 1999;517:109-20.
 33. Ogita T, Tanaka Y, Nakaoka T, Matsuoka R, Kira Y, Nakamura M, et al. Lysophosphatidylcholine transduces Ca^{2+} signaling via the platelet-activating factor receptor in macrophages. *Am J Physiol* 1997;272:H17-24.
 34. Yeon DS, Kwon SC, Nam TS, Ahn DS. Lysophosphatidylcholine decreases delayed rectifier K^+ current in rabbit coronary smooth muscle cells. *J Vet Med Sci* 2001;63:395-9.
 35. Man RYK, Kinnaird AAA, Bihler I, Choy PC. The association of lysophosphatidylcholine with isolated cardiac myocytes. *Lipids* 1990;25:450-4.
 36. Sen L, Bialecki RA, Smith E, Smith TW, Colucci WS. Cholesterol increases the L-type voltage-sensitive calcium channel current in arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;71:1008-14.

Abstract

Lysophosphatidylcholine increased Ca^{2+} current via activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells

Sung-Shik Han

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School Yonsei University*

(Directed by Professor Jae-Wook Kim)

Impairment of relaxing response and augmentation of contractile response to vasoactive substances have been reported in atherosclerotic arteries. These alterations in vascular reactivity are considered as an underlying mechanism for the development of acute vasospasm in atherosclerotic artery. Recently, it has been reported that lysophosphatidylcholine (LPC), an oxidative metabolite of low density lipoprotein causes this functional abnormality. However, the precise mechanism of LPC induced change of vascular reactivity is still uncertain. In this study, to elucidate the underlying mechanisms of abnormal vascular reactivity in atherosclerotic artery, we directly examined the effect of LPC on whole cell Ca^{2+} current using patch clamping technique.

Application of LPC ($1\mu\text{M}$) induced a significant increase in I_{Ca} ($142\pm 9\%$, $p < 0.01$), which was readily reversed by washout of LPC. Steady state voltage dependency of activation or inactivation properties of I_{Ca} was not significantly changed by LPC. The PKC inhibitor, staurosporine (10 nM) or chelerythrine ($3\mu\text{M}$) inhibited I_{Ca} by $54\pm 6\%$ ($p < 0.01$), $47\pm 6\%$ ($p < 0.01$), respectively. After inhibition of I_{Ca} by PKC inhibitors, application of LPC had no significant change in the amplitude of I_{Ca} . The PKC activator, phorbol myristic acid (PMA, 100 nM) stimulated I_{Ca} by $124\pm 3\%$ ($p < 0.01$). After stimulation of I_{Ca} by PMA, application of LPC had no significant change in the amplitude of I_{Ca} . These findings suggest that LPC increase I_{Ca} by a pathway that involves endogenous PKC in vascular smooth muscle cells, and LPC-induced increase of I_{Ca} might be, at least in part, responsible for development of abnormal vascular reactivity in atherosclerosis.

Key Words: lysophosphatidylcholine, voltage dependent Ca^{2+} current, atherosclerosis, protein kinase C, vascular smooth muscle cell