

## 칼슘이 결장뉴 K-경축에 미치는 영향

중앙대학교 의과대학 생리학교실

조 성 일 · 엄 대 용 · 이 상 돈

= Abstract =

### Effect of Calcium Ion on K-contracture in Guinea Pig's Taenia Coli

Sung-Il Cho, Dae-Yong Uhm and Sang-Don Rhee

Department of Physiology, College of Medicine, Chung-ang University

The in vitro experiments for isometric contraction were done to investigate the different action mechanism of calcium ion on phasic and tonic components of K-contracture in guinea pig's taenia coli.

The results were as follows:

1) The degrees of K-contracture were increased gradually from 4mM to 15, 20, 40 & 100 mM of  $[K^+]_o$ . The maximal developed tension in tonic component was observed in 100 mM of  $[K^+]_o$ .

2) The phasic components were not so affected by 2, 4, 8 & 16 mM of  $[Ca^{++}]_o$  in 100 mM K-contracture, but the tonic components were gradually increased in a dose-responsive manner.

3) The K-contracture was not influenced by norepinephrine, 1 mg/l, but was completely abolished by verapamil, 2 mg/l.

4) The phasic component was little affected by verapamil, 0.01 mg/l, 0.1 mg/l, and 1 mg/l, but the tonic component was completely disappeared at the concentration of verapamil 1 mg/l.

The above results suggest that  $[Ca^{++}]_o$  primarily affected the tonic component than the phasic component of K-contracture in guinea pig's taenia coli.

### 서 론

홍분할 수 있는 세포에서의 전기적 활동이 근육과 같은 기계적 운동으로의 변환에 대해서는 알려진 바가 거의 없었으나 Sandow 에 의해 흥분수축 연결(Excitation Contraction coupling)이란 새로운 개념이 도입됨에 따라 골격근 수축기전의 설명에 많은 진전이 있었고, 1960년대 후반에 흥분 수축 연결의 단계를 조금 더 파악하게 되었다. 즉 근초(Sarcolemma)에 발생된 활동전압(Action Potential)이 T-System 을 따라 전도되고 T-System 막의 탈분극이 근장내 그물(Sarcoplasmic reticulum)의 terminal cisternae 에 저장되어 있던

$Ca^{++}$ 을 방출하고, 이것이 세포질에 유리되어 근수축 단백질의 일종인 troponin 에 부착하여 troponin-tropomyosin complex 의 변형을 일으키며 액틴-마이오신(Actin-Myosin)의 상호작용을 일으켜서 근육이 짧아지고,  $Ca^{++}$ 이 troponin 에서 제거되어 근장내 그물에 다시 모이게 되면 이완이 일어난다(Ebashi, 1976; Endo, 1977).

세포내의  $Ca^{++}$ 의 저장고인 근장내 그물의 발달 정도는 골격근, 심장근, 평활근 순으로 감소되어  $Ca^{++}$ 의 이동에 영향을 주는 조건하 또는 외부의 농도 변화에 따라서 골격근은 크게 영향을 받지 않으나 심장근이나 평활근은 민감하게 반응한다(Fleckenstein, 1977). 평활근에서는 T-System 이 불완전하고, 근초에 특징적인 세포내 함몰(inpocketing)이 존재하고, 미세포낭(microvesicles caveolae)가 중요한  $Ca^{++}$ 의 저장소로

\* 이 논문은 1981년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

여겨진다(Popescu, 1974; Kuriyama, 1977). 미세포낭의 9%만이 주변부에 위치한 근장내 그물과 밀착되고 1%는 미토콘드리아와 같이 있어(Kuriyama, 1977) 골격근과 다른 양상을 보인다. 평활근에서도 수축 단백질 활성을 시키는  $Ca^{++}$ 은 세포막 외면에 느슨히 부착된 것을 포함한 세포의  $Ca^{++}$ 과 세포 내면에 존재하는 것의 두가지로 나눌 수 있다(Kuriyama, 1977). 경축을 일으키는 물질들은 아세틸콜린(Acetylcholine), carbacol, histamine 노어에피네프린(Norepinephrine) (Kuriyama, 1977)등 이 외에도 K(Imai & Takeda, 1967)등이 있는데, K-경축을 일으켰을 때 평활근에서 처음 급격히 상승하는 위상성 수축(phasic contraction)과 10분 이상 지속적으로 수축하는 지속성 수축(tonic contraction)에 대한  $Ca^{++}$ 의 작용이 서로 다르다고 주장하고 있다(Urakawa & Holland, 1964). 이들은 세포내  $Ca^{++}$ 이 위상성 수축에 관여하고 지속성 수축은 세포외로부터 들어온  $Ca^{++}$ 이 작용한다고 한다(Andersson & Djärv 1977). 반면에 Imai와 Takeda(1967)등은 결장뉴에서 K-경축을 만든 상태에서 초기의 위상성 수축은  $Ca^{++}$   $10^{-7}M$  이하의 농도에서 완전히 없어지는 데 반해 지속성 수축은  $10^{-8}M$ 와 농도에서도 비록 크기가 감소하기는 하지만 존재한다고 주장하였다. 이에 K 경축을 일으켰을 때 위상성 수축과 지속성 수축에 있어서 노어에피네프린과 Ca 길항제인 베라파밀(Verapamil) (Flenckenstein, 1977)을 이용하여 평활근 표본으로 많이 사용 되는 Guinea pig의 결장뉴(Bülbring et al., 1962)를 실험대상으로 삼아  $Ca^{++}$ 의 효과를 살펴보고자 한다.

### 실 험 방 법

성숙한 guinea pig(500 gm 내외)를 자웅 구별없이 실험동물로 하여, 교감신경 흥분을 최소로 하기 위하여 후두부를 강타하여 실신시킨 후 즉시 좌우 내경동정맥을 절단하여 급격히 실험시켰다. 개복하여 대장을 적절한 뒤 내용물을 Tyrode 용액으로 세척하여 없앤후 100% 산소가 관류되는 Tris 완충 Tyrode 용액(표 1)이 들어 있는 준비용기(preparation chamber)내로 옮겨 결장뉴만 분리하여 5~8 mm의 길이로 잘라 근육 고정기에 양단을 실로 묶고 이완된 상태로 1시간 이상 회복시켰다. 항온순환기에 의하여 35°C로 내부온도가 유지되는 50 ml의 이중병으로 된 수축용기(contraction chamber)로 옮겨 20분마다 Tyrode 용액을 바꿔주면서 1시간 이상 회복 시켰다. 회복한 근육에 60 Hz의

Table 1. Composition of the Tyrode stock(10×) solution.

	gm/L	mM/L
NaCl	92.5	1,580
KCl	2.982	40
CaCl <sub>2</sub> : 2H <sub>2</sub> O	2.940	20
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.135	10.5
Tris	10.0	83.4

\* Make pH 7.35 titrating with conc. HCl.

\*\* The working Tyrode solution 1 L was made of 100 ml stock solution and 1 gm glucose diluting with distilled water.

교류로 3.5 V/cm의 크기로 매 1분마다 5초동안 장자극(Field stimulation)을 가하면서 자극과 자극 사이에 근육을 조금씩 신장시켜 위상성 수축 곡선을 그리면서 최대장력이 발생하는 길이 보다 조금 작은 최적길이(optimal length)를 결정하고, 이 길이에서 실험을 시행하였다. 먼저 K 경축을 보기 위해  $Ca^{++}$ 의 농도를 8 mM로 하고  $K^+$ 의 농도를 KCl로 4 mM, 15 mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM로 증가시켜 위상성 수축과 지속성 수축을 구분하고 지속성 수축이 가장 크게 나타나는 100 mM의 농도로 K-경축을 일으켰다. 이때 삼투질 농도를 맞춰 주기 위하여 첨가된 KCl만큼 NaCl을 감소시켰다. K-경축을 일으키고  $Ca^{++}$ 의 농도를  $CaCl_2$ 로 첨가시켜 2 mM로부터 배가하여 16 mM까지 하여 위상성 수축과 지속성 수축간에 용량에 따른 장력의 크기 변화를 관찰하고, 적당한 지속성 수축이 나오는 8 mM 농도로 용액을 결정하였다. 즉 NaCl을 적게 하고 KCl로  $K^+$ 의 농도를 100 mM로 하고  $Ca^{++}$ 의 8 mM 농도의 용액으로 K-경축을 만들어 노어에피네프린을 1 mg/l의 농도로 지속성 수축시에 투여하였고 Tyrode 용액으로 세척한후 다시 K-경축을 만들어 대조로 베라파밀을 투여하였다.  $Ca^{++}$ 의 농도가 2 mM이고  $K^+$  농도가 100 mM인 K-Tyrode 용액에 베라파밀을 0.01 mg/l, 0.1 mg/l, 1 mg/l로 증가 시켜서 위상성 수축과 지속성 수축의 변화를 관찰하였다. 근육고정기는 등장성 수축(isometric contraction)을 기록할 수 있도록 장력 변환기(Grass FT. 03)에 연결하여 Device 발생기록기에 기록하고 실험이 끝난후 수축에 참여한 부분만 절단하여 수분을 포함한 무게를 재었다.

### 실 험 성 적

$K^+$ 농도를 10 mM, 15 mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM

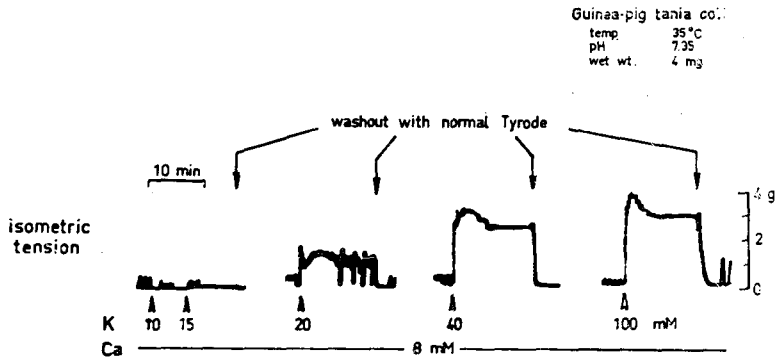


Fig. 1. Dose-dependent contracture induced by K in guinea-pig taenia coli.

로 증가시키면서 대표적인 K-경축을 그림 1에서 보여주며 K<sup>+</sup>가 많은 용액으로 바뀌자마자 나타나는 위상성 수축과 후에 지속성 수축이 위상성 수축보다 약간 떨어져 지속되며 10 mM 이하 K<sup>+</sup>농도에서는 일어나지 않았으나 정상 Tyrode 용액으로 바뀌면 곧 회복하는 가역성 반응을 보여준다. 그림 2는 대표적인 용량-반응 곡선을 보여주고 있다. K<sup>+</sup>의 농도가 20~40 mM 사이에서 크기가 급격히 커졌고 농도 100 mM 에서는 가장 큰 긴장성 수축을 보여준다. K<sup>+</sup> 100 mM 와 농도로 K-경축을 일으키고 외부 Ca<sup>++</sup>에 의한 영향은 위상성 수축의 크기는 영향이 없으나 지속성 수축은 점차 커졌다(그림 3, 4).

K-경축을 일으키고 Ca<sup>++</sup>을 8 mM의 농도로 유지하여 위상성 수축과 지속성 수축을 일으키고 지속성 수축시에 노에피네프린 1 mg/l의 농도로는 지속성 수축의 크기에 변화가 없었으나 Ca-길항제인 베라파밀

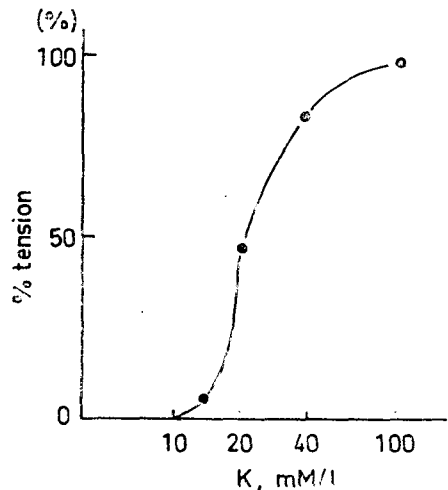


Fig. 2. Dose-dependency of K-contraction in taenia coli.

Guinea-pig taenia coli  
temp 35°C  
pH 7.35  
wet wt 10 mg

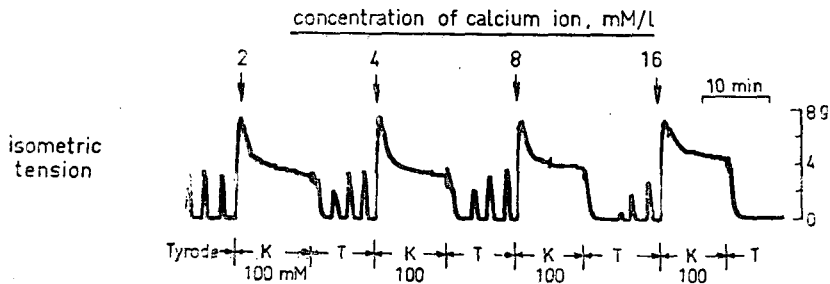


Fig. 3. Influence of extra Ca upon the K-contraction of taenia coli.

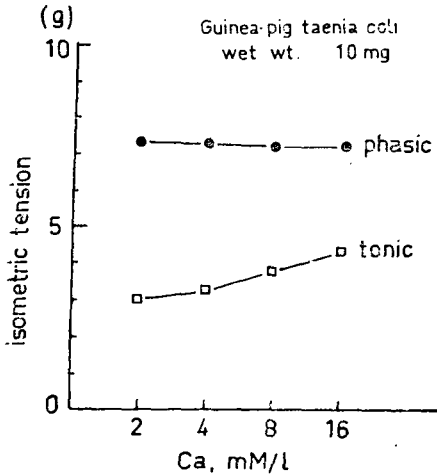


Fig. 4. Different responses of phasic and tonic components in K-contraction to changes in external Ca.

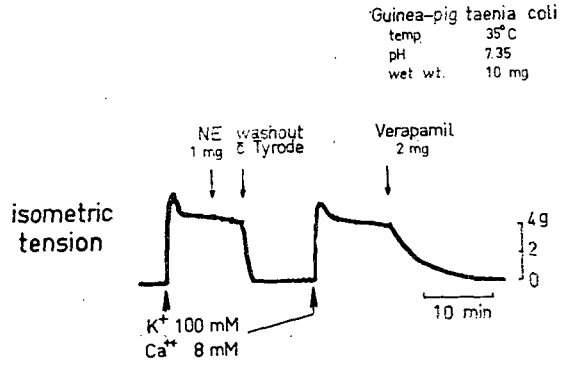


Fig. 5. Complete suppression of K-contraction by Ca-antagonist (verapamil), but no change by norepinephrine (NE).

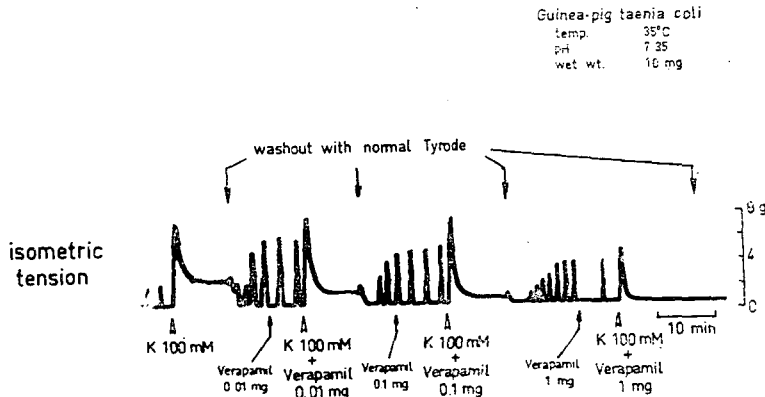


Fig. 6. Dose-dependent inhibition of tonic component and almost constant phasic component in K-contraction by verapamil.

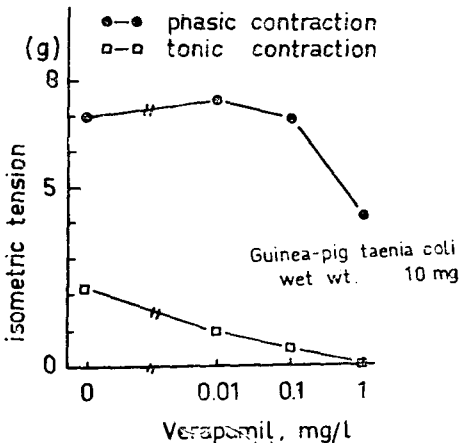


Fig. 7. Dose-dependent tonic contraction and relatively constant phasic contraction in K-contraction by Verapamil.

2 mg/l의 농도로 첨가했을 때는 20분 이내에 경축이 없어졌다(그림 5). K-tyrode로 경축을 일으킨 후 이것을 대조로 베라파밀을 0.01 mg/l, 0.1 mg/l, 1 mg/l의 농도로 각각 투여하였을 때 위상성 수축에는 크기에 차이가 별로 없었으나 지속성 수축에는 점차 영향을 크게 받았다. 베라파밀을 전혀 주지 않았을 때 큰 용량에서는 자동능(spontaneous activity)이 점점 소실되었다(그림 6, 7):

## 고 찰

Bozler에 의하면 평활근은 생리적인 기능에 따라 단단위성 평활근(unitary muscle)과 다단위성 평활근(multi-unit muscle)로 나눌 수 있는데, 내장관계와

자극, 수노관 등의 평활근이 자발성 수축(spontaneous activity)을 가지고 있다(Bülbring, 1957; Bozler cited from Marshall 1974). 그러나 평활근을 하나로 통합하기는 매우 힘들며 부위마다 다양한 변화를 보여주고 있어 예를 들면 노어에피네프린은 혈관의 평활근에서는 수축시키고 장관계 평활근에서는 이완시킨다(Marshall 1974).  $Ca^{++}$ 에 대한 반응에서도 서로 다른 견해를 보여 Urakawa와 Holland(1964)는  $Ca^{++}$ 의 유입이 지속성 수축에 관여한다고 하나, Imai와 Takeda(1967)은 상반되는 주장을 하고 있다.  $K^+$ 는 세포의  $Ca^{++}$ 의 유입을 초래 하며(Briggs, 1962; Hurwitz et al., 1967) K-경축시 일반적으로 평활근중 흥분성이 적은 기관(trachea), 폐동맥과 위저부 등은 작은 위상성 수축과 지속성 수축을 나타내고(Suzuki et al., 1976) 흥분성이 높은 조직은 큰 위상성과 작은 지속성 수축을 나타내서 위상성과 지속성 수축의 비율이 평활근의 부위에 따라 달라짐을 알 수 있다. 본 실험에서 K-경축을 일으켰을 때  $K^+$ 의 농도가 높을수록 크기가 커지며 20 mM 이상의 농도에서 위상성 수축과 지속성 수축을 구분할 수 있었다. 결장뉴는 큰 위상성 수축을 보여 주어 흥분성이 높은 평활근임을 알 수 있었다. Cyclic-GMP의 농도는  $Ca^{++}$ 에 의존성이 있으며 탈분극된 대장근육에서 발생된 장력과 Cyclic-GMP 간에 상호 관계가 있는데 이것은 아마도  $Ca^{++}$ 이라고 여겨지는 세포 내 인자에 영향을 받는다고 한다(Anderson & Djarv, 1977). 본 실험에서  $Ca^{++}$ 의 농도를 2, 4, 8, 16 mM로 증가시켰을 때 위상성 수축에는 크기엔 영향이 없었고 지속성 수축의 크기가 커진 것으로 보아 외부의  $Ca^{++}$  농도에 긴장성 수축이 영향 받음을 알 수 있었다. 외부의  $Ca^{++}$ 의 농도가 지속성 수축에만 작용하는 것이라면  $Ca^{++}$ 의 세포막 유입을 막는 Verapamil(Fleckenstein et al., 1977)과 막  $Ca^{++}$ 의 내향성 전류(inward current)를 증가시키는 노어에피네프린(cited from Fleckenstein, 1977)을 사용하여 위상성 수축과 지속성 수축의 변화를 보았을 때 위상성 수축에는 크게 변화가 없었으나 지속성 수축은 소실됨을 보여주었다.

### 결 론

평활근에서 K-경축을 일으키고 위상성 수축과 긴장성 수축에의  $Ca^{++}$ 의 작용이 다른 것을 밝히고자 Guinea pig의 결장뉴에서 체외 수축 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1)  $K^+$ 의 농도 4, 15, 20, 40, 100 mM로 바꿔 주었

을때 위상성 수축과 지속성 수축은  $K^+$ 의 농도에 따라 커져 100 mM에서는 크기가 최대에 도달하였다.

2) K-경축을 100 mM 농도로 일으키고 외부의  $Ca^{++}$  농도를 2, 4, 8, 16 mM로 바꿔 주었을때 위상성 수축의 크기에는 영향이 없었으나 지속성 수축은 용량에 비례하여 점차 커졌다.

3) 노어에피네프린 1 mg/l로는 K-경축이 영향을 받지 않았으나 베라파밀 2 mg/l로는 K-경축이 완전히 소실되었다.

4) 베라파밀의 양을 0.01 mg, 0.1 mg, 1 mg/l로 증가시켰을 때 위상성 수축은 영향을 적게 받았으나 지속성 수축은 1 mg의 농도에서 완전히 소실되었다.

이상의 결과로 보아 외부의  $Ca^{++}$ 은 K-경축의 위상성 성분에 보다는 지속성 수축성분에 주로 작용함을 알 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Anderson, R.R.G. and L. Djarv: *Tension and cyclic GMP changes in potassium depolarized rabbit colon muscle. Acta Physiol. Scand.* 102, 410-419, 1978.
- 2) Briggs, A.H.: *Calcium movement during potassium contracture in isolated rabbit aortic strip. Amer. J. Physiol.* 203:849-852, 1962.
- 3) Bülbring, E., Burnstock, G. and Hollman, M.E.: *Excitation and conduction in smooth muscle of isolated taenia coli in the guinea pig. J. Physiol.* 142:420-437, 1958.
- 4) Bülbring, E.: *Electrical activity in intestinal smooth muscle. Physiol. Rev.* 42(suppl. 5)160, 1962.
- 5) Chujo, N. and Holland, W.C.: *Potassium-induced contracture and calcium exchange in guinea pig's teania coli. Amer. J. Physiol.* 205:94-100, 1963.
- 6) Ebashi, S.: *Excitation contraction coupling. Ann. Rev. Physiol.* 38:293-313, 1976.
- 7) Endo, M.: *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev.* 57; 71-108, 1977.
- 8) Fleckenstein, A.: *Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. Ann. Rev. Pharmacol.*

- Toxicol.* 17; 149-166, 1977.
- 9) Hurwitz L., S. Von Hagen and P.D. Joiner: *Acetylcholine and calcium on membrane permeability and contraction of intestinal smooth muscle.* *J. Gen. Physiol.* 50; 1157-1172, 1967.
- 10) Imai, S. and K. Takeda: *Actions of calcium and certain multivalent cations on potassium contracture of guinea pig's teania coli.* *J. Physiol.* 207; 873-876, 1964.
- 11) Kuriyama, H., Ito, Y. and Suzuki, H.: *Effects of membrane potential on activation of contraction in various smooth muscle.* In *Excitation coupling in smooth muscle.* R. Casteels, et al. eds. p 25-35, Elsevier/North-Holland Biomedical press, 1977.
- 12) Marshall, J.M.: *Vertebrate smooth muscle.* In *medical physiology.* Mountacastle, V.B. ed., p 121-148, Saint Louis/C.V. Mosby Co. 1974, 13 ed.
- 13) Popescu, L.M.: *Cytochemical study of the intracellular calcium distribution.* In *Excitation-contraction coupling in smooth muscle.* R. Casteels, et al. eds. p 12-23, Elsevier/North Holland Biochemical Press. 1977
- 14) Suzuki, H., K. Morita and H. Kuriyama: *Innervation and properties of smooth muscle of the dog trachea.* *Jap. J. Physiol.* 26; 303-320, 1976.
- 15) Urakawa, N. and Holland. W.C.: *Ca<sup>45</sup> uptake and tissue calcium in K-induced phasic and tonic contracture in teania coli.* *Amer. J. Physiol.* 207; 873-876, 1964.