

## 내피세포를 제거한 흰쥐 대동맥에서 Phenylephrine이 일으킨 수축반응에 대한 $\alpha$ -수용체 길항제의 영향

홍승철 · 강맹희 · 박상일 · 박미선 · 최수경 · 정준기\* · 서석수

부산대학교 약학대학, \*수산대학교 수산해양대학

(Received September 26, 1991)

### Effects of $\alpha$ -Adrenoceptor Antagonists on Phenylephrine-induced Contraction in the Endothelium-denuded Rat Aorta

Sung Cheul Hong, Maeng Hee Kang, Sang Il Park, Mi Sun Park, Su Kyung Choi, Joon Ki Chung\* and Suk Soo Suh

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*College of fisheries and ocean, National fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

**Abstract**—The effects of an irreversible or a reversible  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist (dibenzamine or prazosin) on  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated vasoconstrictions were studied in the endothelium-denuded rat aorta. In these experiments, the mobilization of intracellular calcium and translocation of extracellular calcium were also studied. To exclude the modulation of endothelium releasing EDRF and EDCF, the endothelium was removed in all rat aortas. Contraction induced by phenylephrine (a full  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist) was separated into a fast phasic component of the response due to the release of intracellular calcium and a slow tonic one due to the influx of extracellular calcium. Pretreatments with increasing doses of reversible  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin, as well as irreversible  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist dibenzamine, inhibited the phasic component of phenylephrine-induced contraction more effectively than the tonic one. Pretreatment of dibenzamine (0.2  $\mu$ M) or prazosin (10 nM) to the rat aorta abolished phasic response but remained tonic one about 41% and 51%, respectively. These results suggest that as the efficiency of phenylephrine was progressively reduced by pretreatments with increasing doses of an irreversible or a reversible  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist (dibenzamine or prazosin), the contraction induced by phenylephrine became progressively more dependent on the influx of extracellular calcium.

**Keywords** □ Endothelium-denuded rat aorta, phenylephrine, phasic and tonic vasoconstriction,  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists, efficiency.

대부분의 혈관에서  $\alpha$ -수용체를 매개한 수축반응은 세포내의 calcium의 농도를 증가시켜 일어나는 반응으로 알려져 있다. 이러한 수축반응은 초기에 빨리 수축하는 phasic반응과 뒤이어 서서히 수축하는 tonic반응으로 이루어진 이상성반응(biphasic response)을 나타내고 있다.<sup>1)</sup> 빨리 수축하는 phasic반응은 세포내의 calcium을 이용한 수축반응이고, 서서히 수축하는 tonic반응은 세포외의 calcium을 이용한 수축반응임이 입증되었다.<sup>1)</sup> Bohr<sup>2)</sup>는 혈관평활근의 수

축반응과 calcium 이용과의 관계는 총 수축반응의 관점에서가 아니라 tonic반응과 phasic반응의 각각에서 분석되어야 한다고 주장하였고, Godfraind 등<sup>3)</sup>과 Scarborough와 Carrier<sup>4,5)</sup> 등의 많은 연구자들이  $\alpha$ -수용체 효능약의 혈관수축반응의 기전을 연구하는데 이와같은 방법을 사용하였다.

한편, Furchgott와 Zawadzki<sup>6)</sup> 등이 토끼 대동맥에서 acetylcholine에 의한 혈관이완반응에 대한 내피세포(endothelium)의 역할을 밝힌 이래, calcium io-

nophore A23187, ATP, bradykinin, substance P, thrombin, histamine, serotonin 및 norepinephrine 등의 많은 물질들이 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)라는 내피세포유래이완인자를 매개로 혈관이완반응을 일으킨다고 알려졌으며,<sup>7, 16)</sup>  $\alpha$ -수용체 효능약의 혈관수축반응이 내피세포가 없는 혈관에 비하여 내피세포가 있는 혈관에서 억제된다는 많은 보고가 있다.<sup>17, 22)</sup> 또한  $\alpha$ -수용체 효능약의 혈관수축반응을 억제하는데 관여하는 내피세포유래이완인자는 내피세포에서 저절로 유리되어 혈관의 긴장도를 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>14, 23, 25)</sup> 최근의 연구에 따르면 내피세포에서는 EDRF 이외에도 endothelin, thromboxane과 같은 내피세포유래수축인자(Endothelium-derived contracting factor; EDCF)가 유리된다는 보고도 있다.<sup>26, 30)</sup>

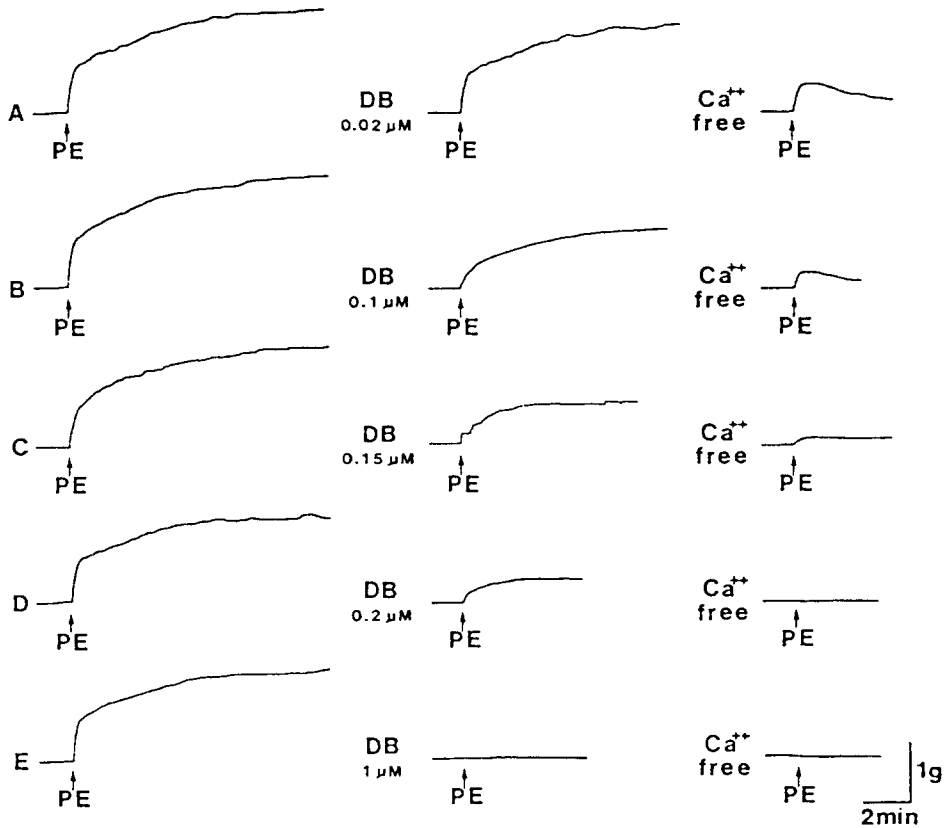
또한, 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 phenoxybenzamine이  $\alpha$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에 대하여 calcium 유입 차단제의 억제효과를 증가시킨다는 것이 보고되고 있다.<sup>31, 36)</sup> Ruffolo 등<sup>34)</sup>은 *in vivo* 실험에서 효능(efficacy)이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약이 일으킨 혈압상승반응이 소량의 calcium 유입 차단제에 의해 영향을 받지 않는다고 보고하였으며, 이는 calcium 유입 차단제의 억제반응을 완충하는 receptor reserve가 있기 때문이라고 주장하였다. 따라서 phenoxybenzamine을 전처치하면 receptor reserve가 줄거나 없어져 calcium 유입 차단제의 효과가 증가된다고 주장하였다. 이에 반하여 Timmermans 등<sup>32)</sup>은 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈관 수축반응에서 세포내의 calcium을 이용하는 수축반응이 phenoxybenzamine에 의해서 더 선택적으로 억제되므로  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈관수축반응의 calcium유입차단제에 의한 억제효과가 더 증가된다고 주장하였다.

본 연구에서는 혈관수축반응에 영향을 미치는 인자들을 유리하는 내피세포를 제거한 혈관에서 비가역적  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine과 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin을 각각 전처치 하였을 때  $\alpha$ -수용체 효능약인 phenylephrine에 의한 수축반응의 phasic반응과 tonic반응에 미치는 영향을 검토하고, 이때 수축반응에 이용되는 세포내·외의 calcium의 이용방법에 대하여 고찰하였다.

### 실험방법

**흰쥐 대동맥 혈관표본의 제조와 장력 측정**—체중 300~400g의 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley계)의 후두부를 강타하여 출혈사시시키고 개복한 후 대동맥궁과 횡경막 사이의 흉부대동맥을 적출하였다. 적출한 대동맥 혈관을, 주위 지방과 결합조직을 조심스럽게 제거한 뒤 길이 2.5 mm로 횡단하여 ring형태로 잘랐다. 혈관 내피세포의 제거는 등근 막대로 혈관 내벽을 부드럽게 문질러서 행하였으며, 내피세포의 존재유무는 acetylcholine에 의한 혈관이완반응의 유무로써 판정하였다.<sup>6)</sup> 혈관 표본은 두개의 L자 모양의 고리(30 gauge stainless-steel 주사바늘로써 만들었음)로 아래 위를 걸어 Kreb's solution이 담긴 20 ml 용적의 반응조(organ bath)에 장치하고, 37°C에서 1.5g의 기본 장력(resting tension)을 부하하였다. Kreb's solution의 조성(mM)은 NaCl, 118; KCl, 4.8; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 24; glucose, 11; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.03이었고, 이 영양액을 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합 gas로 포화시켰다. Calcium이 없는 영양액(calcium-free solution)은 Kreb's solution의 조성에서 calcium만을 제외시키고 0.5 mM EGTA를 첨가하여 만들었다.<sup>37)</sup> 수축반응은 physiograph 기록계(Narco MK IV)에 연결된 Myograph Force Transducer(Narco F-60)를 사용하여 isometric tension으로 측정하였다. 약물을 추가하기 전에 혈관 표본을 90분간 방치하여 평형을 유지시켰으며, 이때 15분 마다 영양액을 바꾸어 주었다.

**Dibenamine에 의한  $\alpha_1$ -수용체의 비가역적인 봉쇄와 calcium이 없는 영양액의 처치**—강한 효능약(full agonist)인 phenylephrine의 효력(efficiency)을 점차적으로 감소시키기 위하여 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine의 농도를 점차적으로 증가시켜 처치하여  $\alpha_1$ -수용체를 비가역적으로 봉쇄하였다.<sup>38-40)</sup> 각 실험에서는 하나의 대동맥에서 얻어진 네개의 혈관표본을 사용하여 phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻은 후, 각 혈관 표본을 세척하고 60분간 방치하여 평형을 유지시킨 뒤 각각 다른 농도의 dibenamine(0.02  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 0.15  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M 및 1  $\mu$ M)으로 12분간 처치하고 20분간 여러번 세척한 다음 phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻었다. 계속해서 dibenamine 처치 후의 반응에 대한 calcium이 없는 영양액의 영향을 고찰하기 위하여 혈관표본을 세척하고 60분간 평형을 유지시킨 후, cal-



**Fig. 1**—Typical recordings of contractile responses of endothelium-denuded rat aortas by phenylephrine( $10^{-6}$  M). The left panel illustrates responses in the absence of dibenamine (control) and the middle panel illustrates responses in the increasing concentrations of dibenamine: (A)  $0.02 \mu\text{M}$ , (B)  $0.1 \mu\text{M}$ , (C)  $0.15 \mu\text{M}$ , (D)  $0.2 \mu\text{M}$ . (E)  $1 \mu\text{M}$ . The right panel represents responses in  $\text{Ca}^{++}$ -free solution. PE, phenylephrine; DB, dibenamine.

cium이 없는 영양액으로 세번 연속 세척하고 5분 방치한 다음 phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻었다.

한편, calcium이 없는 영양액에서의 영향을 보기 전에 calcium이 없는 영양액에서의 방치시간에 따른 수축 반응의 변화를 고찰하기 위하여, phenylephrine ( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻은 후 각 혈관표본을 세척하고 60분간 평형을 유지한 뒤, calcium이 없는 영양액으로 세번 세척하고 2분, 5분 또는 10분간 방치한 후 phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 각각 얻었다.<sup>41)</sup>

**Prazosin에 의한  $\alpha_1$ -수용체의 가역적인 봉쇄와 calcium이 없는 영양액의 처치—Phenylephrine의 효력을 점차적으로 감소시키기 위하여 가역적인  $\alpha_1$ -수용체**

길항제인 prazosin의 농도를 점차적으로 증가시켜 처치하여  $\alpha_1$ -수용체를 가역적으로 봉쇄하였다. Dibenamine의 전처치 때처럼, phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축 반응을 얻은 후 각각 다른 농도의 prazosin (1 nM, 1.5 nM, 2 nM, 10 nM 및 20 nM)을 추가하고 15분간 방치한 다음, phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻었다. 계속해서 prazosin 존재하에서 calcium이 없는 영양액의 영향을 고찰하기 위하여 혈관표본을 세척하고 60분간 평형을 유지시켰다. 그 후 prazosin을 처치하고 10분 후 prazosin을 가한 calcium이 없는 영양액으로 세번 세척하여 5분 방치한 다음 phenylephrine( $10^{-6}$  M)에 의한 수축반응을 얻었다.

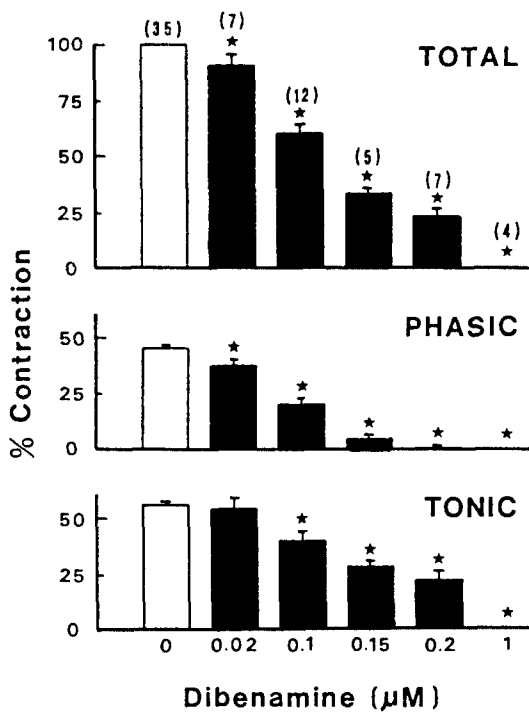


Fig. 2—Effects of increasing concentrations of dibenamine on the total(A), phasic(B), and tonic(C) components of phenylephrine( $10^{-6}$  M)-induced contractions. Columns represent mean values  $\pm$  S.E. and are expressed as percentages of the control value obtained in the absence of dibenamine. Number of experiments is shown in parenthesis. \* $P < 0.01$ . Significantly different from total, phasic and tonic contraction in the absence of dibenamine, respectively.

**Phenylephrine의 수축반응에서 phasic반응과 tonic 반응의 분리**—Phasic반응은 초기에 빨리 일어나는 반응으로 phenylephrine을 반응조에 주입한 후 약 20 초 내에 거의 직선으로 나타났고, tonic반응은 그 후 서서히 나타나는 반응으로 5분 경과하면 약 95%의 반응을 일으켰다. Phasic반응에서 tonic반응으로의 전이점은 각 성분의 직선 부분을 연장하였을 때 만나는 점으로 정하였다.<sup>1,4,5)</sup>

**Data의 분석**—수축반응은 최대수축반응에 대한 %로 나타내었다. 측정치는 평균값  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었고, 유의성 검정은 Student's *t* test로 하였다. P의 값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것

으로 하였다.

**실험 약물**—본 실험에 사용된 약물은 다음과 같다 : acetylcholine chloride, phenylephrine hydrochloride(Sigma Chemical Co.) ; prazosin hydrochloride (Pfizer Inc.) ; dibenamine hydrochloride(Tokyo kasei Chemical Co.).

**실험결과**

비가역적  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 **dibenamine** 처치 후 **phenylephrine**의 혈관수축반응—내피세포를 제거한 흰쥐 대동맥에서  $\alpha_1$ -수용체 효능약인 phenylephrine ( $10^{-6}$  M)은 초기에 빠른 phasic반응과 뒤이어 느리고 지속적인 tonic반응으로 이루어진 이상성 수축반응을 일으켰다(Fig. 1). Phasic반응은 총수축반응의  $44.67 \pm 0.64\%$ 이었으며, tonic반응은 총수축반응의  $55.33 \pm 0.64\%$ 에 해당하였다( $n=35$ )(Fig. 2).  $\alpha_1$ -수용체를 비가역적으로 불활성화시키는 dibenamine의 농도를 점차적으로 증가시키면서 처치하여 phenylephrine의 효력을 점차적으로 감소시켰을 때의 phenylephrine이 일으킨 혈관수축반응을 phasic반응과 tonic반응으로 분리하여 고찰하였다(Fig. 1과 2). 0.02  $\mu$ M의 dibenamine을 전처치하였을 때 phenylephrine이 일으킨 tonic반응은 거의 영향이 없었으나( $1.38 \pm 8.22\%$  감소되었으나 유의성이 없음) phasic반응은  $17.05 \pm 3.20\%$  감소되었다(Fig. 2). Dibenamine의 농도를 0.1  $\mu$ M 및 0.15  $\mu$ M로 각각 증가시켰을 때는 tonic반응과 phasic반응이 각각 농도 의존적으로 감소되었으나, tonic반응( $27.86 \pm 7.26\%$  및  $48.61 \pm 3.79\%$  감소)보다 phasic반응( $55.83 \pm 4.58\%$  및  $89.28 \pm 3.97\%$  감소)이 더욱 현저하게 감소되었다(Fig. 2). 그리고 0.2  $\mu$ M의 dibenamine을 전처치하였을 때는 phasic반응은 소실되었고( $98.78 \pm 1.13\%$ 의 감소로 남아 있는 phasic반응은 유의성이 없음), tonic반응은 약 41% 남아 있었다( $59.37 \pm 5.94\%$  감소)(Fig. 1과 2). Dibenamine의 농도를 더욱 증가시켜서 1  $\mu$ M을 전처치하였을 때는 tonic반응도 소실되어 수축반응이 나타나지 않았다(Fig. 1과 2).

이상의 결과에 따르면 dibenamine의 처치농도를 증가시키기에 따라 phenylephrine의 혈관수축반응은 tonic반응에 비하여 phasic반응이 더 많이 억제되는 경향을 나타내었으며, 0.2  $\mu$ M의 dibenamine을 전처

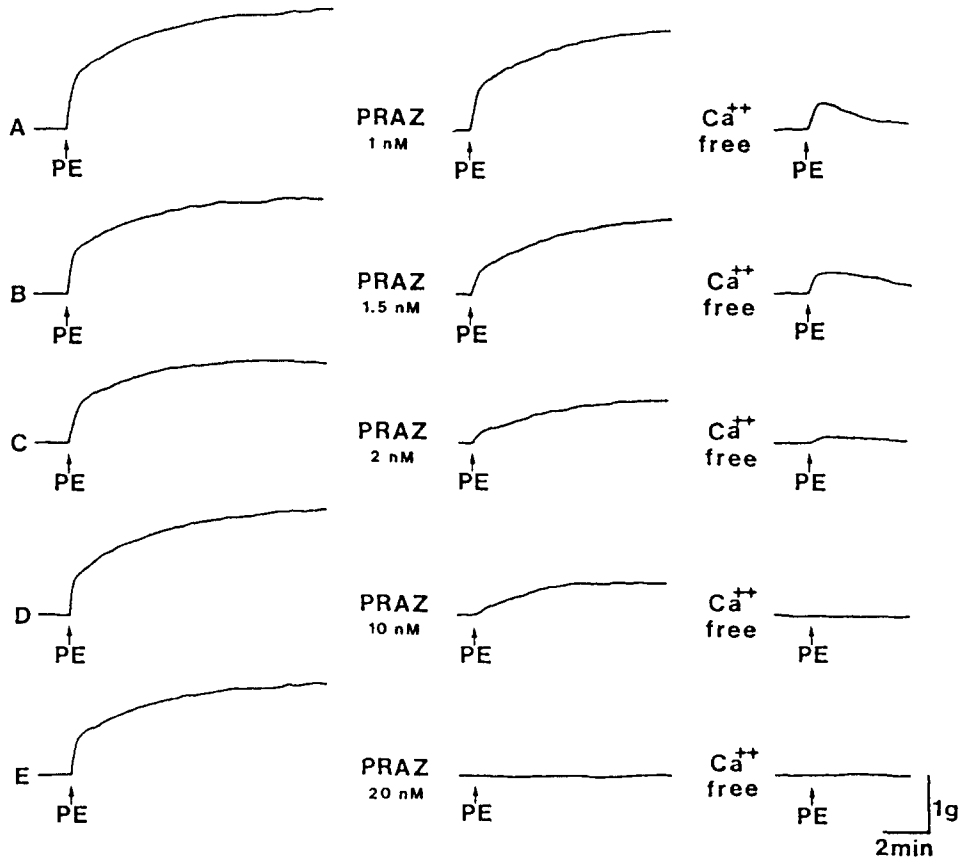


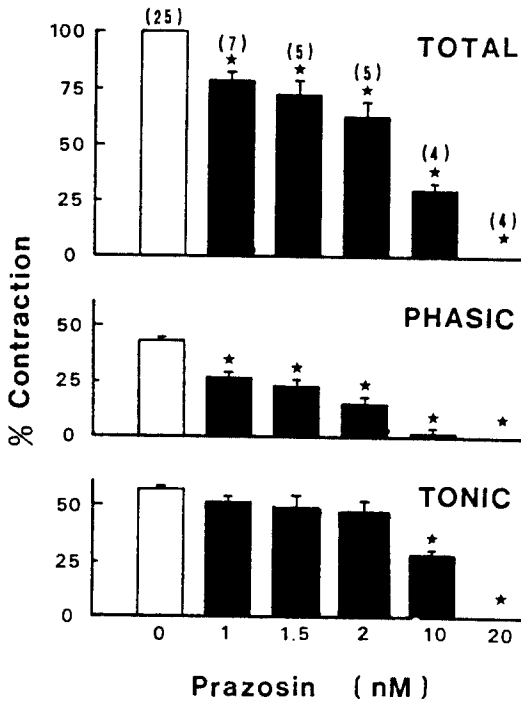
Fig. 3—Typical recordings of contractile responses of endothelium-denuded rat aortas by phenylephrine( $10^{-6}$  M). The left panel illustrates responses in the absence of prazosin (control) and the middle panel illustrates responses in the increasing concentrations of prazosin: (A) 1 nM, (B) 1.5 nM, (C) 2 nM, (D) 10 nM, (E) 20 nM. The right panel represents responses in  $\text{Ca}^{++}$ -free solution containing the same concentrations of prazosin of middle panel, respectively. PE, phenylephrine; PRAZ, prazosin

치하였을 때는, phenylephrine( $10^{-6}$  M)은 전적으로 세포외의 calcium을 이용하는 tonic반응만으로 된 수축반응을 일으켰다.

가역적  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin 처치 후 phenylephrine의 혈관수축반응—내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine( $10^{-6}$  M)의 phasic반응은 총수축반응의  $42.83 \pm 1.01\%$ 이었으며, tonic반응은 총수축반응의  $57.17 \pm 1.01\%$ 에 해당하였다( $n=25$ )(Fig. 4). 1 nM의 prazosin을 전처치하였을 때 phenylephrine이 일으킨 phasic반응은 prazosin을 처치하기 전에 비하여  $35.78 \pm 5.29\%$ 의 현저한 감소를 나타내었으며, tonic반응은  $11.59 \pm 3.55\%$  감소되었으나 유의성이 없었다(Fig. 4). Prazosin의 농도를 1.5 nM 및 2 nM로

각각 증가시켰을 때도 phasic반응은 각각  $45.65 \pm 5.58\%$  및  $63.03 \pm 7.14\%$ 의 현저한 감소를 나타내었으며, tonic반응은 각각  $14.43 \pm 8.60\%$  및  $19.70 \pm 8.24\%$  감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 4). 그리고 10 nM의 prazosin을 전처치하였을 때는 phasic반응은 소실되었고( $95.41 \pm 3.97\%$ 의 감소로 남아있는 phasic반응은 유의성이 없음) tonic반응은 약 51% 남아있었다( $49.04 \pm 2.75\%$  감소)(Fig. 3과 4). Prazosin의 농도를 더욱 증가시켜서 20 nM을 전처치하였을 때는 tonic반응도 소실되었다(Fig. 3과 4).

이상의 결과에 따르면 prazosin의 처치농도를 증가시키기에 따라 phenylephrine의 혈관수축반응은 dibenamine을 전처치하였을 때 처럼 tonic반응에 비하



**Fig. 4**—Effects of increasing contractions of prazosin on the total (A), phasic (B), and tonic (C) components of phenylephrine ( $10^{-6}$ M)-induced contractions. Columns represent mean values  $\pm$  S.E. and are expressed as percentages of the control value obtained in the absence of prazosin. Number of experiments is shown in parenthesis.  $\star P < 0.01$ . Significantly different from total, phasic and tonic contraction in the absence of prazosin, respectively.

여 phasic반응이 더욱 많이 억제되는 경향을 나타내었으며, 10 nM의 prazosin을 전처치하였을 때는, phenylephrine( $10^{-6}$ M)의 혈관수축반응은 전적으로 세포외의 calcium을 이용하는 tonic반응만으로 된 수축반응을 일으켰다.

**Phenylephrine의 혈관수축반응에 대한 calcium이 없는 영양액의 영향**—Phenylephrine이 일으킨 혈관수축반응의 세포외의 calcium에 대한 의존도를 고찰하기 위하여, 혈관표본을 calcium이 없는 영양액에 2분, 5분 또는 10분 동안 방치한 다음 phenylephrine을 가하여 수축반응을 관찰하였다(Fig. 5). 정상 영양액에서 phenylephrine이 일으킨 phasic반응은 총수축반응의  $42.41 \pm 0.81\%$ 에 해당하였으며(Fig. 6),

calcium이 없는 영양액에서 2분, 5분 또는 10분 동안 방치후 phenylephrine이 일으킨 수축반응은 모두 phasic반응으로, 총수축반응에 대하여 각각  $37.29 \pm 1.18\%$ ,  $32.77 \pm 1.06\%$  및  $27.73 \pm 1.30\%$ 의 수축반응을 나타내었고(Fig. 6), 이는 정상 영양액에서 phenylephrine이 일으킨 phasic반응을 100%로 하였을 때는 각각  $87.93 \pm 2.78\%$ ,  $77.26 \pm 2.56\%$  및  $65.39 \pm 3.06\%$ 에 해당하였다(Fig. 6). 이와같은 결과로 phasic반응은 세포내의 calcium을 이용하는 수축반응임을 보여 주었고, calcium이 없는 영양액에서 phasic반응도 어느 정도 감소되며, 감소되는 정도는 방치시간이 길어짐에 따라 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 5와 6).

한편, dibenamine 또는 prazosin 처치후에 나타나는 phenylephrine의 수축반응의 세포외의 calcium에 대한 의존도를 검토하기 위하여 dibenamine 전처치 또는 prazosin 존재하에서 calcium이 없는 영양액에 5분간 방치한 뒤 phenylephrine의 수축반응을 검토하였다(Fig. 1과 3). Dibenamine과 prazosin의 농도를 점차적으로 증가시키면서 각각 전처치한 후에, phenylephrine이 일으킨 수축반응은 calcium이 없는 영양액으로 바꾸었을 때 tonic반응은 소실되고 phasic반응만 남아 있었으며, dibenamine  $0.2 \mu\text{M}$ 과 prazosin  $10 \text{ nM}$ 을 각각 전처치하였을 때는, tonic반응만이 각각 약 41% 및 51%(dibenamine 또는 prazosin을 처치하기 전의 phenylephrine의 tonic반응을 100%로 하였을 때) 남아 있었고(Fig. 2와 4), 이러한 tonic반응은 calcium이 없는 영양액에서는 완전히 소실되었다(Fig. 1과 3).

**고 찰**

비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 phenoxybenzamine이  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에 대하여 calcium 유입차단제의 억제효과를 증가시킨다는 것이 보고되고 있다.<sup>31-36)</sup> 이에 대하여 Ruffolo 등<sup>34)</sup>은 in vivo 실험에서 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약이 일으킨 혈압상승반응이 소량의 calcium유입 차단제에 의해 영향을 받지 않는다고 하였으며, 이는 calcium유입 차단제의 억제반응을 완충하는 receptor reserve가 있기 때문에 비가역적  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 phenoxybenzamine을 전처치하면 receptor reserve가 줄거나 없어져 calcium유입 차단제의 효과가 증가된다고 주

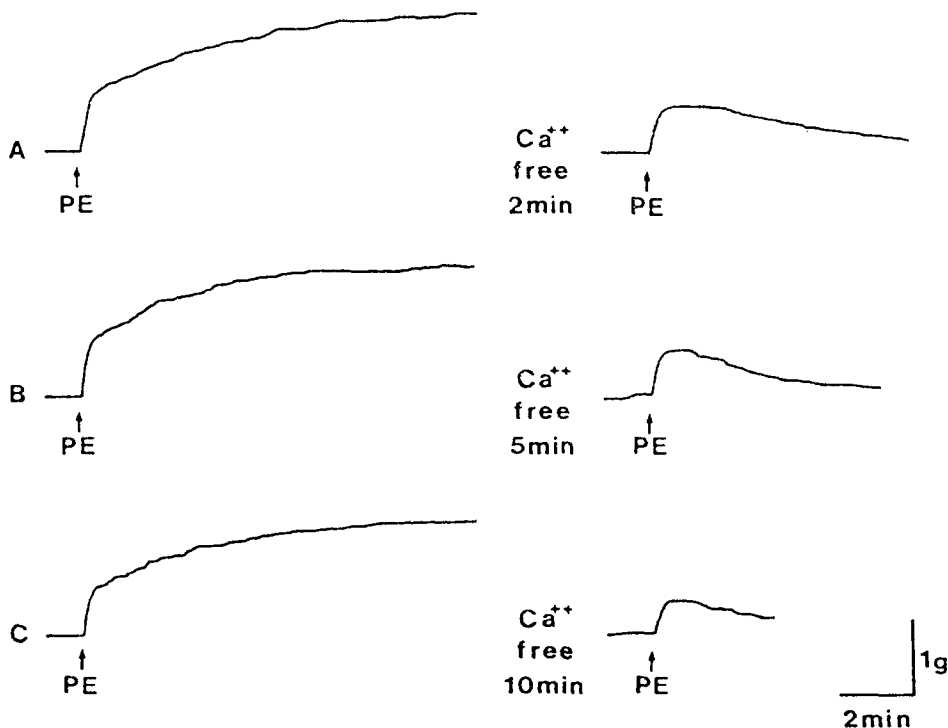


Fig. 5—Typical recordings of contractile responses of endothelium-denuded rat aortas by phenylephrine ( $10^{-6}$  M). The left panel illustrates responses in normal physiological saline solution (PSS) and the right panel illustrates responses after successive incubation in  $Ca^{++}$ -free solution for 2 min (A), 5 min (B) and 10 min (C), respectively. PE, phenylephrine.

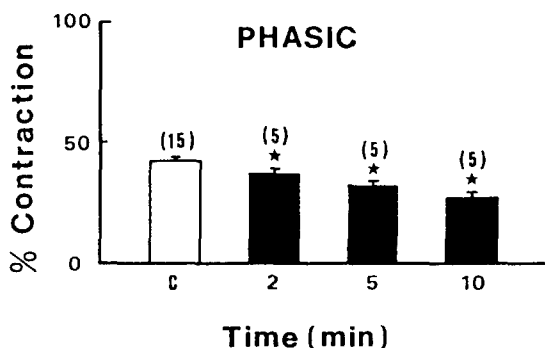


Fig. 6—Effect of incubation time of  $Ca^{++}$ -free solution on phasic component of phenylephrine ( $10^{-6}$  M)-induced contraction. Columns represent mean values  $\pm$  S.E. and expressed as percentages of the total contraction obtained in normal physiological saline solution ( $Ca^{++}$  PSS). Number of experiments is shown in parenthesis. \* $P < 0.01$ . Significantly different from phasic contraction in the normal PSS (control).

장하였다.<sup>42-44)</sup> 이에 반하여 Timmermans 등<sup>32)</sup>은 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에서 calcium유입 차단제의 억제효과가 phenoxybenzamine에 의하여 증가되었으나, 다른 비가역적인  $\alpha$ -수용체 길항제인 benextramine에 의해서는 증가되지 않으므로 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에 대한 phenoxybenzamine에 의한 calcium유입 차단제의 억제작용의 증가효과는 phenoxybenzamine이 세포내의 calcium을 이용하는 혈압상승반응을 선택적으로 억제하기 때문이라고 제의하였다.<sup>32,45)</sup> 그러나 그 후 benextramine에 의해서도 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에 대한 calcium유입 차단제의 억제작용이 증가되므로, phenoxybenzamine에 의한  $\alpha_1$ -수용체 효능약의 혈압상승반응에 대한 calcium유입 차단제의 억제작용의 증가효과가 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 차단작용과 무관한 약물 자체의 특성에 의한 것은 아니라고 제의하였다.<sup>36,44)</sup>

본 연구에서는 phenylephrine의 혈관수축반응에 대한 내피세포의 영향을 배제하기 위하여 내피세포 유래인자들(EDRF, EDCF 등)을 유리하는 내피세포를 제거한 혈관을 사용하여, 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약인 phenylephrine의 수축반응을 세포내의 calcium을 이용하는 phasic반응과 세포외의 calcium을 이용하는 tonic반응으로 분리하여,<sup>1,2)</sup> 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine과 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin의 영향을 검토하였다. 내피세포를 제거한 흰쥐 대동맥에서 phenylephrine은 초기에 빠른 phasic반응과 뒤이어 느리고 지속적인 tonic반응으로 이루어진 이상성반응을 일으켰다(Fig. 1, 2, 3과 4). 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine의 농도를 증가시키면서 처치하였을 때 phenylephrine이 일으킨 혈관수축반응에 대한 영향을 phasic반응과 tonic반응으로 분리하여 관찰한 결과, 0.02  $\mu$ M의 dibenamine을 전처치하였을 때 phenylephrine이 일으킨 tonic반응에는 영향이 없었으나 phasic반응은 약 17% 감소되었으며, dibenamine 농도를 0.1  $\mu$ M 및 0.15  $\mu$ M로 각각 증가시켜 전처치하였을 때는 tonic반응(약 28% 및 49% 감소)에 비하여 phasic반응(약 56% 및 89% 감소)이 더욱 현저하게 감소되었고, 0.2  $\mu$ M의 dibenamine을 전처치하였을 때는 phasic반응은 소실되고 tonic반응만 약 41% 남게 되었다(Fig. 1과 2). Martin 등<sup>24)</sup>은 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine 0.2  $\mu$ M을 전처치하여  $\alpha_1$ -수용체의 약 98%를 봉쇄하였을 때 효능이 큰 효능약인 phenylephrine의 혈관수축반응이 부분효능약인 clonidine의 혈관수축반응과 비슷한 농도반응곡선을 나타낸다고 하였다. 저자 등은 전보에서 단일농도의 dibenamine(0.2  $\mu$ M)을 전처치하였을 때 phenylephrine의 혈관수축반응이 tonic반응만을 일으켰으며, 이 반응은 영양액을 calcium이 없는 영양액으로 바꾸거나, 정상 영양액에 calcium유입 차단제인 verapamil을 전처치 하였을 때는 소실됨을 관찰한 바 있다.<sup>25)</sup> 이상의 결과로서  $\alpha_1$ -수용체를 점차적으로 비가역적으로 불활성화시켜 효능이 큰 효능약의 효력을 점차적으로 낮추었을 때 phenylephrine의 수축반응은 세포외의 calcium의 이용에 더욱 의존하며, phenylephrine의 효력을 더욱 낮추었을 때에는 전적으로 세포외액의 calcium만을 이용하여 혈관수축반응을 일으키는 것으로 사료된다. 이와같은 현상에 대하여 Nichols와 Ruffolo<sup>44)</sup>는 세포내

의 calcium을 이용하는 반응은 생물학적 자극(biological stimulus)과 반응 사이의 연결효율(efficiency of coupling)이 낮아 receptor reserve가 없는 반면 세포외의 calcium을 이용하는 반응은 연결효율이 높아 receptor reserve를 가지기 때문이라고 주장하였다. 한편, Timmermans 등은 phenoxybenzamine이 저농도에서 세포내의 calcium을 이용하는 반응을 선택적으로 억제하는 특성이 있어,<sup>31-33,45)</sup> 세포내의 calcium을 이용하는 혈관상승반응을 선택적으로 억제한다고 주장하였으므로,<sup>32,46)</sup> 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine의 실험 결과(Fig. 1과 2)가 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 phenoxybenzamine처럼 dibenamine의 약물특성에 의한 것인지 검토하기 위하여, phenylephrine의 혈관수축반응에 대하여 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin의 영향을 검토하였다. Prazosin의 농도를 1 nM, 1.5 nM 및 2 nM로 증가시키면서 처치하였을 때 phenylephrine이 일으킨 phasic반응은 prazosin을 처치하기 전에 비하여 현저하게 감소되었으나(각각 약 36%, 46%, 및 63% 감소), tonic반응은 유의성있는 변화를 나타내지 않았다. 그리고 10 nM의 prazosin을 전처치하였을 때는 phasic반응은 소실되었으나 tonic반응은 약 51% 남아 있었으며, 이 반응은 calcium이 없는 영양액으로 바꾸었을 때 소실되었다(Fig. 3과 4). 이와 같은 결과로  $\alpha_1$ -수용체를 가역적으로 불활성화시켜 효능이 큰 효능약의 효력을 점차적으로 낮추었을 때에는 phenylephrine의 수축반응은 세포외의 calcium의 이용에 더욱 의존하는 경향을 나타내며, phenylephrine의 효력을 어느정도(prazosin 10 nM을 전처치했을 때의 phenylephrine의 효력)까지 낮추었을 때에는 전적으로 세포외의 calcium만을 이용하여 수축반응을 일으킨다고 사료된다. 따라서 dibenamine을 전처치하였을 때 phenylephrine의 혈관수축반응이 세포외의 calcium에 더 의존하는 것은 dibenamine의 약물특성에 의한 것이 아니라  $\alpha_1$ -수용체를 감소시킴으로써 효력을 감소시키기 때문이라 사료된다.

이상의 결과로서  $\alpha_1$ -수용체를  $\alpha_1$ -수용체 길항제(비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine 또는 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin)로써 점차적으로 불활성화하였을 때는 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약인 phenylephrine의 혈관수축반응이 세포내의 calcium에 비하여 세포외의 calcium의 이용에 더욱 의존하는



경향을 나타내고,  $\alpha_1$ -수용체를 어느정도까지 불활성화하였을 때는 세포외의 calcium만을 이용하여 혈관 수축반응을 일으킨다고 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 내피세포를 제거한 흰쥐 대동맥 혈관에서  $\alpha_1$ -수용체 효능약인 phenylephrine의 혈관수축반응에 대한 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제와 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제의 영향과 이때 수축반응에 이용된 세포내·외의 calcium의 이용방법에 대하여 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine이 일으킨 수축반응은 세포내의 calcium을 이용하는 phasic반응과 세포외의 calcium을 이용하는 tonic반응으로 이루어진 이상성반응을 일으켰다.

2. 비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine의 농도를 점차로 증가시키면서 전치치하였을 때는 phenylephrine이 일으킨 수축반응은 phasic반응이 tonic반응보다 더 현저하게 억제되었다.

3. Dibenamine의 농도를 어느 정도(0.2  $\mu$ M) 증가시켰을 때는 phenylephrine( $10^{-6}$  M)이 일으킨 수축반응은 전적으로 세포외의 calcium의 유입에 의존하는 tonic반응만을 나타내었다.

4. 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin의 농도를 점차로 증가시키면서 전치치하였을 때도 phenylephrine이 일으킨 수축반응은 phasic반응이 tonic반응보다 더 현저하게 억제되었다.

5. Prazosin의 농도를 어느정도(10 nM)로 증가시켰을 때도 phenylephrine( $10^{-6}$  M)이 일으킨 수축반응은 전적으로 세포외의 calcium의 유입에 의존하는 tonic반응만을 나타내었다.

이상의 결과로서  $\alpha_1$ -수용체를  $\alpha_1$ -수용체 길항제(비가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 dibenamine 또는 가역적인  $\alpha_1$ -수용체 길항제인 prazosin)로써 점차적으로 불활성화하였을 때는 효능이 큰  $\alpha_1$ -수용체 효능약인 phenylephrine의 혈관수축반응이 세포내의 calcium에 비하여 세포외의 calcium의 이용에 더욱 의존하는 경향을 나타내고,  $\alpha_1$ -수용체를 어느 정도까지 불활성화하였을 때는 세포외의 calcium만을 이용하여 혈관 수축반응을 일으킨다고 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1990년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구구성비의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- 1) Deth, R. and Van Breeman, C.: Relative contributions of  $Ca^{2+}$  influx and cellular  $Ca^{2+}$  release during drug induced activation of rabbit aorta. *Pflügers Arch. Pharmacol.* **348**, 13(1974).
- 2) Bohr, D.F.: Vascular smooth muscle: Dual effects of calcium. *Science(Wash. DC)* **139**, 597(1963).
- 3) Godfraind, T., Miller, R.C. and Lima, J.S.: Selective  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist-induced contractions and  $^{45}Ca$  fluxes in the rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **77**, 597(1982).
- 4) Scarborough, N.L. and Carrier, G.O.: Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. I. Role of extracellular calcium in alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**, 597(1984a).
- 5) Scarborough, N.L. and Carrier, G.O.: Nifedipine and alpha adrenoceptors in rat aorta. II. Role of extracellular calcium in enhanced alpha-2 adrenoceptor-mediated contraction in diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**, 603(1984b).
- 6) Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)* **288**, 373(1980).
- 7) De Mey, J.G. and Vanhoutte, P.M.: Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol. (Lond.)* **316**, 347(1981).
- 8) Cherry, P.D., Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.: The endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2106(1982).
- 9) Cocks, T.M. and Angus, J.A.: Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature (Lond.)* **305**, 627(1983).

- 10) Cohen, R.A., Shepherd, J.T. and Vanhoutte, P.M.: 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am. J. Physiol.* **245**, H1077(1983).
- 11) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **53**, 557(1983).
- 12) Angus, J.A., Cocks, T.M. and Satoh, K.:  $\alpha_2$ -adrenoceptors and endothelium-dependent relaxation in canine large arteries. *Br. J. Pharmacol.* **88**, 767(1986a).
- 13) Angus, J.A., Cocks, T.M. and Satoh, K.: The  $\alpha$ -adrenoceptors on endothelial cells. *Federation Proc.* **45**, 2355(1986b).
- 14) Cohen, R.A., Zitnay, K.M., Weisbrod, R.M. and Fesfamariam, B.: Influence of the endothelium on tone and response of isolated pig coronary artery to norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 550(1988).
- 15) Molderings, G.J., Engel, G., Roth, E. and Gothert, M.: Characterization of an endothelial 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor mediating relaxation on the porcine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **340**, 300(1989).
- 16) Schoeffter, P. and Hoyer, D.: 5-Hydroxytryptamine (5-HT)-induced endothelium-dependent relaxation of pig coronary arteries is mediated by 5-HT receptors similar to the 5-HT<sub>1D</sub> receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**, 387(1990).
- 17) Allan, G., Brook, C.D., Cambridge, D. and Hladkivskyi, J.: Enhanced responsiveness of vascular smooth muscle to vasoconstrictor agents after removal of endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **79**(suppl.), 334p(1983).
- 18) Egleme, C., Godfraind, T. and Miller, R.C.: enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **81**, 16(1984a).
- 19) Egleme, C., Godfraind, T. and Miller, R.C.: Role of endothelium in the rat aorta response to vasoconstrictors. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **268**, 116(1984b).
- 20) Lues, I. and Schümann, H.H.: Effect of removing the endothelial cells on the reactivity of rat aortic segments of different  $\alpha$ -adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **328**, 160(1984).
- 21) Carrier, G.O. and White, R.E.: Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 682(1985).
- 22) Godfraind, T., Egleme, C. and Osachie, I.A.: Role of endothelium in the contractile response of rat aorta to  $\alpha$ -adrenoceptor agonists. *Clinical Science (Lond.)* **68** (suppl. 10), 65s(1985).
- 23) Malta, E., Schini, V. and Miller, R.C.: Role of efficacy in the assessment of the actions of  $\alpha$ -adrenoceptor agonists in rat aorta with endothelium. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 209(1986).
- 24) Martin, W., Furchgott, R.F., Villani, G.M. and Jothianandan, D.: Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 529(1986).
- 25) 정준기, 홍승철, 최수경, 강맹희, 구미경, 박상일, 윤 일: 흰쥐 적출 대동맥에서  $\alpha_1$ -수용체 효능약과  $\alpha_2$ -수용체 효능약의 혈관 수축반응에 대한 내피세포의 영향. *藥學會誌*, **34**, 180(1990).
- 26) Coleman, R.A., Humphrey, P.P.A., Kennedy, I., Levy, G.P. and Lumley, P.: Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H<sub>2</sub>-analogue, with those of prostaglandin H<sub>2</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> on some isolated smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.* **73**, 773(1981).
- 27) Rubanyi, G.M.: Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am. J. Physiol.* **255**, H783(1988).
- 28) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411(1988).
- 29) Saito, A., Shiba, R., Kimura, S., Yanagisawa, M., Goto, K. and Masaki, T.: Vasoconstrictor response of large cerebral arteries of cats to endothelin, an endothelium-derived vasoactive peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **162**, 353(1989).
- 30) Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Molecular biology

- and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 374(1989).
- 31) Timmermans, P.B.M.W.M., Mathy, M.J., Korstanje, C., Thoolen, M.J.M.C., Wilffert, B., De Jonge, A. and Van Zwieten, P.A.: Phenoxybenzamine identifies calcium influx dependent and independent mechanisms of vasoconstriction in vivo to cirazoline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **324**, suppl., R 54(1983).
  - 32) Timmermans, P.B.M.W.M., Thoolen, M.J.M.C., Mathy, M.J., Wilffert, B., De Jonge, A. and Van Zwieten, P.A.: Effects of the irreversible  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists phenoxybenzamine and benextramine on the effectiveness of nifedipine in inhibiting  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptor mediated vasoconstriction in pithed rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **329**, 404(1985).
  - 33) De Jonge, A., Mathy, M.J., Thoolen, M.J.M.C., Timmermans, P.B.M.W.M., Wilffert, B., and Van Zwieten, P.A.: Inhibition of vasoconstriction to cirazoline in pithed rats by nifedipine after phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.* **81**, 80p(1984).
  - 34) Ruffolo, R.R., Jr., Morgan, E.L. and Messick, K.: Possible relationship between receptor reserve and the differential antagonism of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium channel antagonists in the pithed rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**, 587(1984).
  - 35) Jim, K.F., Macia, R.A. and Matthews W.D.: Role of receptor reserve in the inhibition of alpha-1 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium antagonists in the pithed rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**, 89(1986).
  - 36) Nichols, A.J. and Ruffolo, R.R., Jr.: The relationship between alterations in  $\alpha_1$ -adrenoceptor reserve by phenoxybenzamine and benextramine and the sensitivity of cirazoline induced pressor responses to inhibition by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* **126**, 297(1986).
  - 37) Marriott, J.F.: A comparison of the effects of the calcium entry blockers, verapamil, diltiazem and flunarizine against contractions of the rat isolated aorta and portal vein. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 145 (1988).
  - 38) Furchgott, R.F. and Burszty, P.: Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selective agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 882(1967).
  - 39) Besse, J.C. and Furchgott, R.F.: Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on  $\alpha$ -adrenergic receptors in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **197**, 66(1976).
  - 40) Ruffolo, R.R., Jr., Rosing, E.L. and Waddel, J.E.: Receptor interactions of imidazolines. I. Affinity and efficacy for alpha adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **209**, 429(1979).
  - 41) Cauvin, C. and Malik, S.: Induction of  $Ca^{++}$  influx and intracellular  $Ca^{++}$  release in isolated rat aorta and mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of alpha-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**, 413(1984).
  - 42) Hamilton, C.A., Reid, J.L. and Sumner, D.J.: Acute effects of phenoxybenzamine on  $\alpha$ -adrenoceptor responses in vivo and in vitro: Relation of in vivo pressor responses to the number of specific adrenoceptor binding sites. *J. Cardiovas. Pharmacol.* **5**, 868(1983).
  - 43) Ruffolo, R.R., Jr. and Yaden, E.L.: The existence of spare  $\alpha_1$ -adrenoceptors, but not  $\alpha_2$ -adrenoceptors, for the respective vasopressor effects of cirazoline and B-HT 933 in pithed rat. *J. Cardiovas. Pharmacol.* **6**, 1011(1984).
  - 44) Nichols, A.J. and Ruffolo, R.R., Jr.: The relationship of  $\alpha$ -adrenoceptor reserve and agonist intrinsic efficacy to calcium utilization in the vasculature. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 236(1988).
  - 45) Timmermans, P.B.M.W.M., Beckeringh, J.J., Van Zwieten, P.A. and Thoolen, M.J.M.C.: Sensitivity of alpha-1 adrenoceptor mediated pressor responses to inhibition by  $Ca^{++}$  blockers in the pithed rats: Arguments against the role of receptor reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 864(1987).
  - 46) Chiu, A.T., Wong, P.S. and Timmermans, P.B.M.W.M.: Alpha-1 adrenoceptor-induced  $Ca^{++}$  movements in rat aorta: Antagonism by phenoxybenzamine and N-Ethoxycarbonyl-2-Ethoxy-1,2-Dihydroquinoline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243**, 577(1987).