

돼지 적출 신동맥에 대한 adenosine triphosphate의 영향과 Ca^{++} 의 동원

남 윤 정 · 김 주 현
경상대학교 수의과대학
(1991. 4. 2 접수)

Source of Ca^{++} and effect of adenosine triphosphate on the isolated renal artery of pig

Yun-jeong Nam, Joo-heon Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Apr. 2, 1991)

Abstract: The aims of this study were to investigate the effect of adenosine triphosphate (ATP), which has been known as the neurotransmitter of nonadrenergic, noncholinergic nerves, and the source of Ca^{++} in the effect of ATP on the isolated renal artery of pig.

The results of this study were summarized as follows:

1. ATP caused the contraction and the contractile responses were increased in a dose-dependent manner between the concentration of ATP $2 \times 10^{-3}M$ and $10^{-2}M$ on the isolated renal artery of pig.

2. The contractile responses induced by ATP ($5 \times 10^{-3}M$) were not blocked by pretreatment with cholinergic receptor blocker (atropine, $10^{-6}M$), α -adrenergic receptor blocker (phentolamine, $10^{-6}M$) or β -adrenergic receptor blocker (propranolol, $10^{-6}M$), and H_1 -receptor blocker (pyrilamine, $10^{-6}M$) or H_2 -receptor blocker (cimetidine, $10^{-6}M$) on the isolated renal artery of pig.

3. The contractile responses induced by ATP ($5 \times 10^{-3}M$) were not appeared in Ca^{++} -free medium. As the concentration of Ca^{++} in Ca^{++} -free medium was increased, the contractile responses induced by ATP ($5 \times 10^{-3}M$) were enhanced but were completely inhibited by pretreatment with Ca^{++} -channel blocker, papaverine ($5 \times 10^{-5}M$) or verapamil ($5 \times 10^{-6}M$) on the isolated renal artery of pig.

Key words: Adenosine triphosphate(ATP), receptor, pig renal artery.

서 론

1963년 Burnstock 등¹이 기니피그 결장에서 adrenergic receptor와 cholinergic receptor를 차단시킨 후 적출 결장 평활근을 자극했을 때, 그 자극에 대한 반응이 생긴다는 사실을 보고함에 따라 장기 평활근에서 자율 신경계의 전형적인 adrenergic, cholinergic 신경섬유가

아닌 제 3의 신경섬유의 존재가 시사되었다. 그들은 이 신경섬유를 nonadrenergic, noncholinergic(NANC) 신경섬유라 명명하였으며² 그후 여러 동물의 여러 장기에서 NANC 신경섬유의 존재가 보고되었다³⁻⁷. 이와 같은 NANC 신경섬유의 신경전달물질로는 serotonin⁸, histamine⁹, prostaglandin¹⁰, adenosine triphosphate (ATP)¹¹, 그의 polypeptide계 물질⁹ 등으로 추정되고 있으나, 이 중에서도 purine nucleotide계 물질인 adeno-

sine triphosphate(ATP)가 합성, 저장, 유리, 재흡수라는 신경전달 물질의 기본조건을 만족시키며¹¹, 전자현미경을 통한 형태학적 연구 보고¹², 또한 신경전도 작용에만 관계하는 tetrodotoxin 처리에 의해 ATP의 유리가 차단된다는 보고¹³ 등에 의해 제 3의 신경섬유의 신경전달 물질로 ATP가 가장 유력시 인정되고 있다^{13,14}. 그러나 신경전달물질로서의 ATP 작용은 아직 정확히 밝혀져 있지 않지만 일부 장기 평활근에서는 근수축^{4,7,13,15}을, 또 일부 평활근에서는 근이완^{16,17}을 일으킨다고 보고되었다.

그래서 본 논문은 NANC 신경섬유의 신경전달물질로 추정되고 있는 ATP가 돼지 적출 신동맥에서는 어떠한 영향을 나타내는지, 그 영향시 Ca^{2+} 의 동원이 어디로부터 이루어지는지를 밝히고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 80kg 내외의 임상적으로 건강하다고 인정되어지는 Landrace종 돼지 20두를 암수 구별없이 사용하였다.

혈관 ring의 제작 : 실험동물을 타격에 의해 실신시킨 후 즉시 복강을 열어 복대동맥으로부터 신동맥의 기시부와 신문 입구를 전단하여 신동맥만을 적출하였다. 적출한 혈관을 95% O_2 와 5% CO_2 의 혼합가스가 공급되는 5°C의 정상 생리적 영양액속에서 주변의 결합조직을 제거한 후 5mm 길이의 혈관 ring을 제작하였다.

영양액의 조성 : 정상 생리적 영양액으로는 NaCl, 120mM; KCl, 4.25mM; $CaCl_2$, 1.7mM; $MgSO_4$, 1.2mM; $NaHCO_3$, 25mM; KH_2PO_4 , 1.2mM; Glucose, 6.4mM로 조성된 Krebs-Ringer용액 (pH7.4)을 사용하였으며, Ca^{2+} -free 영양액은 정상생리적 영양액에서 Ca^{2+} 만을 제거하고 1.0 mM ethyleneglycol tetraacetic acid(EGTA)를 첨가하여 사용하였다.

운동성의 기록 : 제작한 혈관 ring은 두 개의 L자형 고리에 끼워서 20 ml organ bath로 옮겨 한쪽은 organ bath 저부에 고정시키고, 다른 쪽은 근수축 변환기(Isometric force transducer, D-1, Bioscience)에 연결하여 Potentiometric recorder (PR200, Bioscience)를 통하여 혈관평활근의 등장성 수축(isometric contraction)을 기록하였다. 20 ml organ bath 내의 영양액은 $37 \pm 1^\circ C$ 로 유지하면서 계속 95% O_2 와 5% CO_2 의 혼합가스를 공급하였고, 혈관 ring에는 1.0 g의 기초장력을 부하하여 60분간 평형시킨 후 실험을 실시하였으며, 각 실험사이의 평형시간은 60분으로 하였다.

약물처리 방법과 사용한 약물 : 약물처리는 20 ml organ bath에 200 μ l의 약물을 가하여 100배 희석되게 하였고, 약물처리 후 정상 생리적 영양액으로 3번 이상 세척하여 60분간 평형시킨 후 다음 실험을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 약물은 ATP(disodium salt, sigma), atropine sulfate(sigma), phentolamine mesylate(ciba), propranolol(sigma), pyrilamine maleate(sigma), cimetidine(sigma), papaverine(sigma), verapamil(sigma)을 사용하였으며, 그외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

결 과

ATP 농도 변화에 따른 영향 : 돼지 적출 신동맥에 단일 농도의 ATP를 처리했을 때 처리 즉시 수축반응이 나타났으며, 그 수축반응은 대개 10분 이내에 기초장력으로 되돌아갔다. ATP 농도 변화에 따른 수축반응은 $ATP 2 \times 10^{-8}M$ 농도에서 부터 시작하여 ATP 농도가 증가함에 따라 수축반응도 증가하여 $ATP 10^{-2}M$ 농도에서 최대반응을 나타내었으며(Fig 1), ATP의 ED_{50} 치는 $5.5 \times 10^{-8}M$ 이었다.

ATP의 수축효과에 대한 여러 receptor 차단제의 영향 : 돼지 적출 신동맥에서 ATP의 수축효과가 cholinergic, adrenergic, histaminergic receptor와는 어떠한 관계가 있는지를 관찰하기 위해서, 각 receptor 차단제인 atropine ($10^{-6}M$), phentolamine ($10^{-6}M$), propranolol ($10^{-6}M$), pyrilamine($10^{-6}M$), cimetidine ($10^{-6}M$)을 각각 전처리하고 5분 뒤에 ATP ($5 \times 10^{-3}M$)를 첨가 처리한 결과 ATP에 의한 수축반응이 차단되지 않았다(Fig 2).

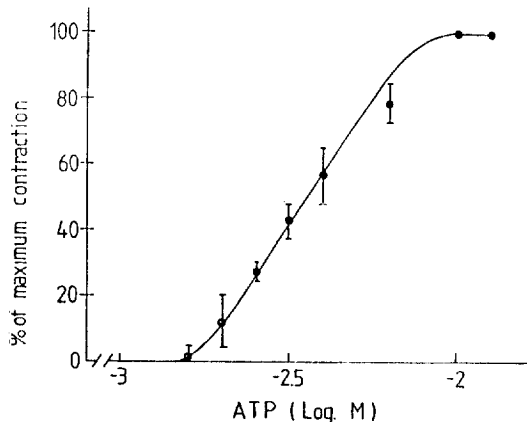


Fig 1. The contractile responses induced by ATP were increased in dose-dependent manner.

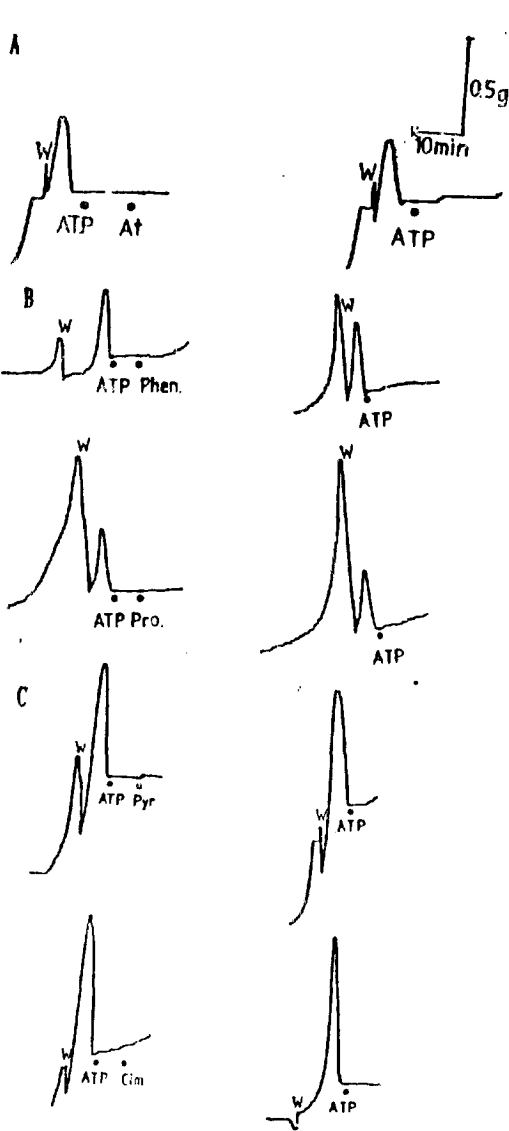


Fig 2. Effects of various receptor blockers on contractile response induced by ATP (5×10^{-3}) in isolated pig renal artery.

- A : The cholinergic receptor blocker, atropine (At. 10^{-6} M) does not block the contractile response induced by ATP (5×10^{-3} M).
- B : The adrenergic receptor blockers, phenolamine (Phen. 10^{-6} M), or propranolol (Pro. 10^{-6} M) do not block the contractile responses induced by ATP (5×10^{-3} M).
- C : The histaminergic receptor blockers, pyrilamine (Pyr. 10^{-6} M), or cimetidine (Cim. 10^{-6} M) do not block the contractile responses induced by ATP (5×10^{-3} M).

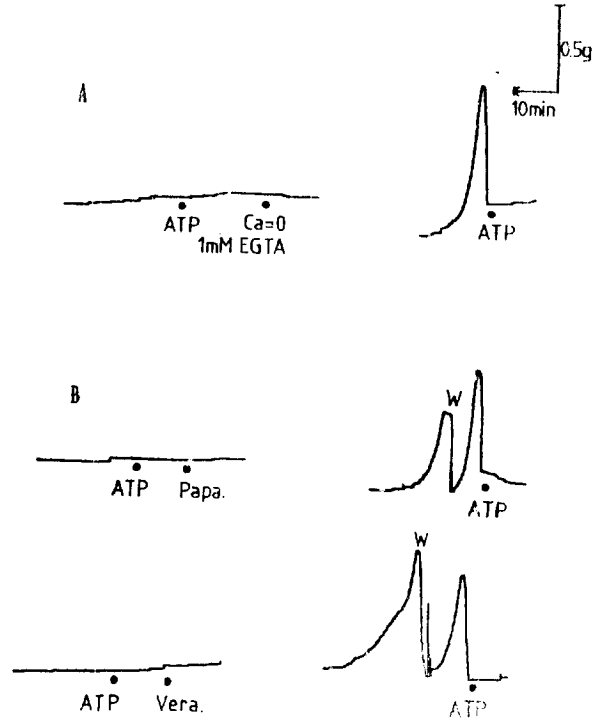


Fig 3. Effect of external Ca^{2+} on contractile response induced by ATP (5×10^{-3} M) in isolated pig renal artery.

A : Effect of ATP (5×10^{-3} M) on isolated pig renal artery in Ca^{2+} -free medium. The contractile response induced by ATP (5×10^{-3} M) dose not appear in Ca^{2+} -free medium.

B : Effects of papaverine (Papa. 5×10^{-5} M), or verapamil (Vera. 5×10^{-5} M) on contractile responses induced by ATP (5×10^{-3} M) in isolated pig renal artery. The contractile responses induced by ATP were completely blocked by Ca^{2+} -channel blockers.

ATP의 수축효과에 대한 외부 Ca^{2+} 의 영향 : 돼지 췌장 신동맥이 ATP에 의해 수축반응을 일으킬 때 Ca^{2+} 의 동원이 어디로부터 이루어지는지를 관찰하기 위하여, 췌장 신동맥을 1.0 mM EGTA가 첨가된 Ca^{2+} -free 영양액에서 60분간 평형시킨 후 ATP (5×10^{-3} M)를 처리한 결과 수축반응이 전혀 나타나지 않았으며, Ca^{2+} -channel 차단제인 papaverine (5×10^{-5} M), 또는 verapamil (5×10^{-5} M)를 각각 전처리한 후 ATP (5×10^{-3} M)를 첨가 처리했을 때도 전혀 수축반응이 나타나지 않았다(Fig 3). 그러나 Ca^{2+} -free 영양액에 Ca^{2+} 을 농도별로 각각 전처리하여 평형시킨 후 ATP (5×10^{-3} M)을 처리한 결과, 외부 Ca^{2+} 농도가 점점 증가함에 따라

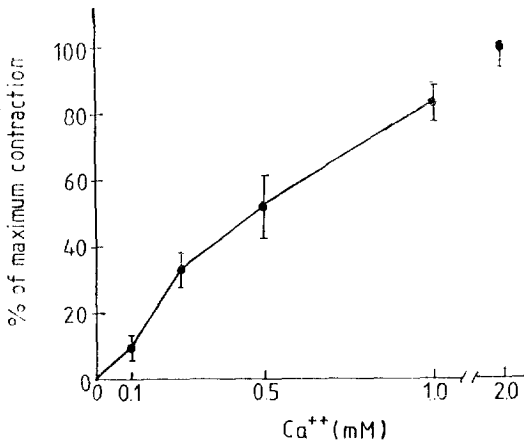


Fig 4. Ca²⁺ concentration-response relationship contractile responses induced by ATP (5 × 10⁻³M) in isolated pig renal artery.

ATP에 대한 수축반응도 증가하는 양상을 보였다(Fig 4).

고 찰

Nonadrenergic, noncholinergic(NANC) 신경섬유의 존재가 1963년 Burnstock 등에 의해 기니피의 결장에서 adrenergic receptor와 cholinergic receptor를 차단시킨 후 결장평활근을 자극했을 때 그 자극에 대한 반응이 생긴다는 보고¹에 의해 알려진 후 포유류의 위^{3,18} 토끼¹⁹, 기니피의 소장⁵, 기니피²⁰과 돼지의 자궁⁷ 그리고 개의 경동맥²¹ 등 여러 동물의 여러 장기에서 보고되었다.

본 실험에서도 cholinergic, adrenergic receptor 차단제로 각각의 receptor를 차단시킨 후 ATP를 처리해 본 결과, ATP에 대한 수축반응은 차단되지 않았으며, 또한 histaminergic receptor 차단제에 의해서도 ATP에 대한 수축반응이 차단되지 않았다(Fig 2). 이와같은 결과들로 보아 돼지 적출 신통맥에도 NANC 신경섬유의 receptor가 존재하고 있음을 추측할 수 있었다.

혈관에 있어서 ATP의 작용에 관한 연구는 1930년대부터 시작되었지만, 최근 ATP가 NANC 신경섬유의 가장 유력한 신경전달 물질로 인정되면서 부터 많은 연구가 이루어졌다. 혈관에서 신경전달 물질로서의 ATP는 토끼 장간막 동맥²²과 개의 경동맥²³에서는 수축반응을 일으키며, 쥐의 대퇴동맥에서는 수축과 이완 반응 모두를 일으킨다고 하였다⁶. 본 실험에서 ATP는 돼지 적출 신통맥을 dose-dependent하게 수축시켰는데 이와같이 결과는 토끼의 장간막 동맥²², 개의 경동맥²³,

토끼의 중이동맥^{24,25} 등에서 나타난 것과 일치하였다. 이때 나타나는 수축현상은 ATP가 혈관평활근을 직접 자극하여 일으키는 것으로 추측하고 있다²⁵.

한편 모든 근육의 수축시에는 Ca²⁺이 필수적으로 사용되는데 특히 평활근에서는 근수축시 Ca²⁺ 동원이 막 접위에 민감한 ion channel을 통하든지, receptor에 조절되어지는 ion channel을 통하든지, 세포내 저장되어 있던 Ca²⁺을 어떠한 방법을 통해서든지 유리시킴으로써 일어날 것이라고 보고²⁶된 바 있지만, 아직까지도 평활근에서의 근수축시 Ca²⁺의 동원기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서 Ca²⁺-free 영양액에 ATP를 처리했을 때 수축현상이 전혀 나타나지 않았으며, Ca²⁺-channel 차단제인 verapamil (5 × 10⁻⁶M), 또는 papaverine (5 × 10⁻⁵M)을 처리하고 ATP를 첨가 처리하였을 때에도 수축반응이 전혀 생기지 않았다(Fig 3). 그러나 Ca²⁺-free 영양액에 Ca²⁺ 농도를 점차적으로 증가시키면서 ATP를 처리했을 때는 Ca²⁺의 농도가 증가함에 따라 ATP의 수축효과도 증가하였다(Fig 4).

이와같은 결과로써 ATP가 돼지 적출 신통맥에서 근수축을 유발할 때는 acetylcholine이나 histamine과는 달리 내부 Ca²⁺만으로는 수축을 일으킬 수 없고²⁷, 반드시 외부 Ca²⁺의 동원이 일어나야만 근수축을 일으킨다는 사실을 추측할 수 있었다.

결 론

돼지 적출 신통맥에서 adenosine triphosphate(ATP)의 영향과 그 영향시 Ca²⁺의 동원이 어디로부터 이루어지는지를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 돼지 적출 신통맥은 ATP 2 × 10⁻³M 농도에서 수축반응을 나타내기 시작하여 ATP 농도 증가에 따라 수축력이 증가되었으며, ATP 10⁻²M에서 최대 수축반응을 나타냈다.
2. ATP에 의한 수축현상은 cholinergic receptor 차단제인 atropine (10⁻⁶M)에 의해 차단되지 않았으며, α-adrenergic receptor 차단제인 phentolamine (10⁻⁶M), 또는 β-adrenergic receptor 차단제인 propranolol (10⁻⁶M)에 의해서도 차단되지 않았고, H₁-receptor 차단제인 pyrilamine (10⁻⁶M), 또는 H₂-receptor 차단제인 cimetidine (10⁻⁶M)에 의해서도 차단되지 않았다.
3. ATP에 의한 수축현상은 Ca²⁺-free 영양액에서는 전혀 수축반응이 나타나지 않았으며, Ca²⁺-channel 차단제인 papaverine (5 × 10⁻⁵M), 또는 verapamil (5 × 10⁻⁵M)에 의해서는 완전히 수축현상이 차단되었고,

외부 Ca^{2+} 농도에 비례하여 수축현상이 증가하였다.

이상의 결과들로서 돼지 적출 신통맥에 대한 ATP의 효과는 수축현상을 유발하며, 이는 외부 Ca^{2+} 의 동원에 의하여 생기는 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

1. Burnstock G, Campbell G, Bennett M, et al. Inhibition of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *Nature*(London) 1963;200:581~582.
2. Burnstock G, Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmacol Rev* 1969;21:247~324.
3. Campbell G. The inhibitory nerve fibers in the vagal supply to the guinea-pig stomach. *J Physiol*(London) 1966;185:600~612.
4. Burnstock G, Costa M. Inhibitory innervation of gut. *Gastroenterol* 1973;64:581~582.
5. Wood JD, Mayer CJ. Serotonergic activation of tonic-type enteric neurons in guinea-pig small bowel. *J Neurophysiol* 1979;42:582-593.
6. Kennedy C, Delbro D, Burnstock G. P_2 -purinoceptors mediate both vasodilation and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur J Pharmacol* 1985;107:106~168.
7. 김주현, 권중국, 김용근. 미성숙 돼지 자궁 평활근의 운동성에 대한 Adenosine Triphosphate의 작용에 있어서 수종의 receptor 차단제의 영향. 대한수의학회지 1987;27(2):201~206.
8. Furness JB, Costa M. Type of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci* 1980;5:1~20.
9. Satchell DG, Burnstock G, Dann P. Autogenism of the effect of purinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on the guinea-pig taenia coli by 2-substitute imidazolines and related compounds. *Eur J Pharmacol* 1973;23:264~269.
10. Bennett T. Innervation of nerve-mediated excitation and inhibition of single smooth muscle cell of the avian gizzard. *J Physiol* (London) 1970;240:619~686.
11. Burnstock G. Neural nomenclature. *Nature*(London) 1971;229:282~283.
12. Cook RD, Burnstock G. The ultra-structure of Auerbach's plexus in guinea-pig. I Neural elements *J Neurocytol* 1976;5:171~194.
13. Peter Wiklund N, Gustafsson LE. Indication for P_2 -purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1988;148:361~370.
14. Burnstock G. Purinergic transmitters and receptor. *Cephalic suppl* 1985;2:25~33.
15. Fedan JS, Lampion SJ. Two dissociable phases in the contractile responses of the guinea pig isolated vas deferens to adenosine triphosphate. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253(3):993~1001.
16. Burnstock G, Campbell G, Satchell DG, et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is transmitter substance released by non-adrenergic nerve in gut. *Brit J Pharmacol* 1970;40:660~688.
17. Satchell DG, Maguire MH. Inhibitory effects of adenine nucleotides analogues on the isolated guinea-pig taenia coli. *J Pharmacol Exp Ther* 1975;195:540~546.
18. Jansson G. Vago-vagal reflex relaxation of the stomach in the cat. *Acta Physiol Scand* 1969;75:245~252.
19. Gonella J. Modifications of the electrical activity of the longitudinal muscle of the rabbit duodenum following contraction of the circular muscle. *Rend Romani Gastroenterol* 1971;3:127~131.
20. Moritoki H, Takei M, Kasai T, et al. Possible involvement of prostaglandins in the action of ATP on guinea-pig uterus. *J Pharmacol Exp Ther* 1979;211:104~111.
21. Houston DA, Burnstock G, Vanhoutte PM. Different P_2 -purinergic receptor of endothelium and smooth muscle in canine blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:501~506.
22. Mathieson JLL, Burnstock G. Purine-mediated relaxation and contraction of isolated rabbit mesenteric artery are not endothelium-dependent. *Eur J Pharmacol* 1985;118:221~220.
23. Kawai Y, Ohhashi, Azuma T. The ATP-induced vasoconstriction in the canine internal carotid artery. *Blood vessels* 1984;21, 98.
24. Kennedy C, Saville VL, Burnstock G. The

- contribution of noradrenaline and ATP to the responses of rabbit central ear artery to sympathetic nerve stimulation depend on the parameter of stimulation. *Eur J Pharmacol* 1986;122:292.
25. Burnstock G. Review Lectuer, neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol* 1982;313:1~35.
26. Bolton TB. Mechanisms of action transmitters and other substances smooth muscle. *Physiol Rev* 1979;59(3):607~718.
27. Zavecz JH, Yellin TO. Histamine receptors in the myenteric plexus longitudinal muscle of the guinea-pig ileum: H₁ and H₂-receptor mediated potentiation of the contractile responses to electrical stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;223:177~181.