

쥐자궁근의 운동성에 대한 K⁺채널 개방제의 이완 작용

서울대학교 수의과 대학

김 희 정 · 이 문 한 · 류 판 동

= Abstract =

Inhibitory Effects of Potassium Channel Openers on the Oxytocin-induced Contraction of the Rat Uterus *in vitro*

Hee Jeong Kim, Mun Han Lee and Pan Dong Ryu

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

K⁺ channel openers (KCOs) are known to have a wide range of effects by opening the K⁺ channel in plasma membranes of various smooth muscles, cardiac muscle and pancreatic β -cell.

In the present study, we investigated the effects of 5 types of KCOs, cromakalim, RP49356, pinacidil, nicorandil and diazoxide on the contractility of isolated rat uterus. All KCOs tested inhibited the uterine contraction induced by 0.2 nM oxytocin in a dose-dependent manner. Individual KCO and its pD₂ values were cromakalim 6.5, RP49356 6.3, pinacidil 5.92, nicorandil 4.43 and diazoxide 4.18. The relaxant effects of KCO were inhibited by glibenclamide (0.3, 1 and 10 μ M) with pA₂ values of cromakalim 6.91, RP49356 6.59, pinacidil 6.55, nicorandil 5.97 and diazoxide 6.37. In addition, the relaxant effect of cromakalim or pinacidil was antagonised by TEA, a non-selective K⁺ channel blocker, but not by apamin. Contractions induced by low concentration of KCl (< 40 mM) were inhibited by cromakalim (100 μ M) and nicorandil (300 μ M), but those evoked by higher concentration (> 40 mM) of KCl were little affected. In ovariectomized rat uterus, cromakalim dose-dependently inhibited oxytocin-induced contraction and glibenclamide (10 μ M) inhibited the relaxant effect of cromakalim with pD₂ and K_B values of 7.48 and 1.26 $\times 10^{-7}$ M, respectively. In estrogen-primed rat uterus, these values were 6.51 and 1.57 $\times 10^{-7}$ M, respectively, indicating that the cromakalim is less effective on the estrogen-treated uterine smooth muscle.

Our results suggest that the KCO-sensitive K⁺ channels participate in the motility of uterine smooth muscle and such channels are, at least in part, under the control of estrogen. In addition, our data indicate that the type of K⁺ channels activated by KCO is ATP-sensitive K⁺ channel which is blocked by glibenclamide.

Key Words: Potassium channel opener, Cromakalim, Nicorandil, Rat uterus, Glibenclamide

서 론

K⁺ 채널 개방제는 원래 평활근의 K⁺ 채널을 개방하는 일련의 약물을 총칭하는 것이었으나, 지금은 이 약물이 평활근뿐만 아니라 췌장 세포, 심장, 신경, 골격근 등의 K⁺ 채널에도 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 각종조직에서 K⁺ 채널 개방제는 ATP-sensitive K⁺ 채널을 개방하여 그 약리작용을 가져오는 것으로 알려지고 있다 (Quast와 Cook, 1989; Edwards와 Weston, 1993). 즉, K⁺ 채널 개방제에 의하여 K⁺ 채널이 열리면 K⁺이 세포밖으로 유출되어, 세포막 전위를 K⁺ 평형 전압으로 이동시키고 세포막을 과분극 시킴으로써 세포의 흥분성을 감소시킨다 (Cook, 1988). 이러한 흥분성의 소실은 혈관 평활근 이완작용 및 혈압강하 작용을 나타내며 (Hamilton과 Weston, 1986; Newgreen, 1990), 심장에서는 심근의 활동전위 기간의 단축 (Osterrieder, 1988; Brill과 Man, 1990), 수축력의 감소 (Grossett과 Hicks, 1986) 및 항부정맥 효과도 나타낸다 (Spinelli등, 1991). 또한 혈관 평활근 이외 방광 배뇨근 (Foster등, 1989), 기관지 평활근 (Raeburn등, 1991; Taylor등, 1992) 등을 이완시킨다. 이러한 작용에 근거하여 임상적인 이용을 목적으로 다양한 종류의 K⁺ 채널 개방제가 개발되었는데, 구조별로 benzopyran계, pyridine계, pyrimidine계, benzothiadiazine계, butenoic acid계 등으로 구분할 수 있다 (Edwards와 Weston, 1993).

자궁평활근은 임신 및 비임신 기간에 성호르몬의 영향등으로 전기적 성질과 운동성이 다양하게 변화한다 (Kuriyama와 Suzuki, 1976). 1987년 Holingsworth등이 benzopyran계 K⁺ 채널개방제인 cromakalim이 자궁근을 이완시킨다고 보고한 이래, Piper등(1990)에 의하여 Cromakalim, RP49356, pinacidil과 minoxidil의 4종의 K⁺ 채널개방제의 이완작용에 대하여 보고 하였다. 현재 임신말기의 조산을 예방하기 위하여 Ca²⁺ 통로 차

단제, adrenergic agonist, prostaglandin합성 억제제등을 단독 또는 병용하고 있다. 그러나, 이들 약물의 부작용, 그리고 낮은 조직선택성을 개선할 필요성이 대두되고 있다 (Morrison등, 1993; Cheuk등, 1993). 따라서 자궁근을 포함한 여러 평활근과 심장근육에 대한 기존 약물의 단점을 보완하고 조직선택성이 높은 K⁺ 채널개방제의 개발 가능성에 많은 관심이 집중되고 있다 (Andersson, 1992; Atwal등, 1993).

본 연구에서는 앞서 Piper등(1990)에 의하여 보고된 cromakalim, RP49356, Pinacidil, 일본의 Chugai제약회사에서 개발하여 관상동맥의 혈류증가효과가 높다고 널리 알려진 nicorandil (Kinoshita와 Sakai, 1990)과 고혈압치료제로 쓰이며 췌장 세포의 ATP-sensitive K⁺ 통로에 작용하여 인슐린분비를 촉진하는 것으로 알려진 diazoxide (Ashcroft와 Ashcroft, 1990)의 적출 쥐자궁근의 운동성에 미치는 효과를 조사하여 비교하였다. 이 자료의 일부는 1992년 대한 약리학회에서 발표된 바 있다 (Kim과 Ryu, 1992).

재료 및 방법

1) 자궁근 표본제작

자궁 평활근의 활성 및 oxytocin에 대한 반응성을 높이기 위하여 미경산 흰쥐 (Sprague Dawley, 220~260 gm)에 estradiol 17- β (100 μ g/kg, S.C.)를 주사하고 24시간 후에 자궁각을 적출하였다. K⁺ 채널 개방제에 대한 estrogen의 효과를 관찰하기 위한 실험에서는 난소를 절제한 후 7일 이상 회복시킨 동물을 사용하였다. 분리한 자궁으로 부터 지방 및 혈액을 제거한 후 O₂/CO₂ (95%/5%) 혼합가스로 포화시킨 영양액이 담긴 용기에서 조직 표본을 만들었다. 제작한 조직표본 (2-5 × 10 mm)의 양끝을 실로 묶어 하단은 20 ml 용량의 장기 수조에 부착된 고리에 고정하고 상단은 isometric transducer (F60, Narco Biosystem)에 연결하였다. 적출 자궁근은 37°C에서 1g의 장력을 주어 1시간 평형시키고 polygraph (MK-IV, Narco

Biosystems)를 이용하여 등척성 기록을 하였다.

2) 자궁근 운동성 기록

(1) oxytocin으로 유도된 자궁근 수축에 대한 K⁺ 채널 개방제의 영향: 평형시킨 자궁조직에 0.2 nM oxytocin을 적용하여 수축을 유도한 후, 운동이 일정해지면 K⁺ 채널 개방제 cromakalim, pinacidil, RP49356, nicorandil 및 diazoxide와 Ca²⁺ 채널 차단제 nifedipine을 Van Rossum (1963)의 방법에 따라 누적적으로 10분 간격으로 장기수조에 적용하였다. 약물의 최대효과가 관찰되면 영양액(Krebs solution)으로 1회에 3번씩 10분 간격으로 2회 세척하였다. K⁺ 통로 차단제 glibenclamide, tetraethylammonium(TEA) 및 apamin은 K⁺ 채널 개방제의 누적용량반응을 먼저 기록하고 세척한 후 30분간 적용하였다. 차단제를 적용한 후 15분에 0.2 nM oxytocin을 적용하여 수축을 유도하고 반응이 일정해지면 15분 후에 K⁺ 채널 개방제를 누적적으로 적용하여 이완 효과를 관찰하였다. K⁺ 채널 개방제는 실제로 oxytocin으로 유도된 자궁근운동의 수축고와 수축빈도를 모두 감소시켰다. 그러나 수축 빈도는 K⁺ 채널 개방제가 없는 상태에서도 4~6시간의 실험 기간 동안에 저절로 감소하는 경향을 보였다. 따라서 운동성은 K⁺ 채널 개방제를 각 농도별로 적용한 후 10분 동안의 수축고를 평균한 값을 K⁺ 통로 개방제를 적용하기 전 10분 동안의 수축고 평균값의 백분율로 나타내었다. 일부의 결과는 10분 동안의 수축운동을 적분기(GPA-10, Narco Biosystems Inc)를 이용하여 적분하여 약물의 효과를 비교하였다. 난소를 절제한 쥐의 자궁조직에서도 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

(2) KC1로 유도된 자궁근 수축에 대한 K⁺ 채널 개방제의 영향: 평형시킨 자궁 조직에 KC1 농도를 증가시키면서 10분 간격으로 장기 수조에 누적적으로 적용하여 KC1에 대한 용량반응곡선을 얻은 다음 basal tone으로 떨어질 때까지 위와 같은 방법으로 영양액으로 세척하였다. Basal tone이 일정해지면 0.2 nM oxytocin에 의한 자궁근의

수축운동을 충분히 억제할 수 있는 농도의 K⁺ 채널 개방제 cromakalim(100 μ M), nicorandil(300 μ M)과 Ca²⁺ 채널 차단제 nifedipine(1 μ M)을 적용하고 10분 후부터 다시 KC1을 추가하며 KC1에 대한 용량-반응 자료를 얻었다. K⁺ 채널 개방제의 반응은 각 농도의 KC1을 적용한 후 10분 동안의 integrated tension을 image analyzer(Cambridge instruments)로 측정하여 K⁺ 채널 개방제를 첨가하기 전 KC1 각 농도에 의한 tension의 백분율로 나타냈다.

3) 사용약물

Cromakalim(Rhone Polunc), RP49356(Rhone Polunc), pinacidil(Lilly), nicorandil(Chugai)은 각각의 회사의 배려로 기증을 받았으며, 이들과 nifedipine(Sigma)은 70% ethanol에 녹여 보관용액을 만들었다가 필요시 영양액으로 희석하여 사용하였다. diazoxide(Sigma)는 100% DMSO, glibenclamide(Sigma)는 95% ethanol에 녹여 사용하였으며 TEA, apamin, oxytocin 및 KC1은 3차 증류수에 녹여 사용하였다. 영양액은 NaCl 118.4 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM, KC1 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, Glucose 11.7 mM 조성의 Krebs solution을 사용하였다.

4) 결과분석 및 통계처리

각 약물의 EC₅₀값은 약물에 대한 자궁근 운동성의 용량반응 관계의 자료를 $E/E_{max} = [D] / \{ [EC_{50}] + [D] \}$ 식에 fitting하여 구하였다. 여기서 E와 E_{max}는 %로 표시한 약물의 이완효과와 최대이완효과를, [D]는 약물의 농도를, EC₅₀은 50%이완효과를 낼때의 약물의 농도를 뜻한다. 얻어진 각각의 EC₅₀ 값으로 부터 $pD_2 (= -\log(EC_{50}))$ 값을 계산하였고, 길항제의 해리상수, K_B값은 $[A'] / [A] - 1 = [B] / K_B$ 식으로부터 구하였다. 여기서 [A']와 [A]는 glibenclamide 등의 차단제, [B]가 있을 때와 없을 때 동일한 효과를 나타내는데 필요한 KCO의 농도이다. pA₂값은 Arunlakshana-

Schild(1959)의 방법에 의해 PHARM/PCS(Tallarida와 Murray, 1987)의 Schild plot을 이용하여 구하였다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며 각농도에서 유의성 검정은 unpaired student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 이하인 것만을 유의성 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1) Oxytocin으로 유도된 수축에 대한 K⁺ 채널 개방제의 영향

본 실험에 사용된 5종의 K⁺ 채널 개방제(KCO)는 작용강도는 다르지만 모두 oxytocin(0.2 nM)으로 유도된 자궁근의 주기적인 수축을 억제하였다. Fig. 1은 cromakalim에 의하여 0.2 nM oxytocin으로 유도된 자궁근의 주기적인 수축운동의 수축고가 농도 의존적으로 감소되는 것을 보여주는 기록으로 cromakalim 0.1 μM에서부터 수축고의 감소가 관찰되었으며, 3 μM에서는 수축운동이 완전히 소실되었다. 이러한 실험을 반복하여 얻어진 cromakalim에 의한 자궁근 이완 효과의 용량 반응곡선에서 얻어진 pD₂값은 6.51(EC₅₀ = 3.10 ± 0.25 × 10⁻⁷, n=36)이었다(Fig. 2A). glibenclamide는 non-insulin dependent diabetes mellitus의 치료제로 쓰이는 sulfonylurea계 약물로서 췌장 β세포, 심장근 세포, 골격근 세포등에서 ATP-sensitive K⁺ 채널의 특이적인 차단제로 알려져 있다(Sturgess등, 1985; Ashcroft등, 1987; Belles등, 1987; Spruce등, 1987; Fosset등, 1988). Fig. 2A는 glibenclamide(0.3, 1, 10 μM)가 농도 의존적으로 cromakalim의 용량반응곡선을 오른쪽으로 이동시키는 것을 보여주고 있다. 특히 3, 10 μM의 glibenclamide에 의하여 유의성 있는 길항효과가 관찰되었다. Schild analysis에 의하여 얻어진 glibenclamide의 길항 작용에 대한 pA₂ 값은 6.91 이었고 이때의 직선의 기울기는 -0.97이었다(Fig. 2B). 한편 비특이적인 K⁺ 채널 차단제인 TEA(1, 3, 10 mM)도 cromakalim의 효과를 농도 의존적으로 길항하여 용량반응곡

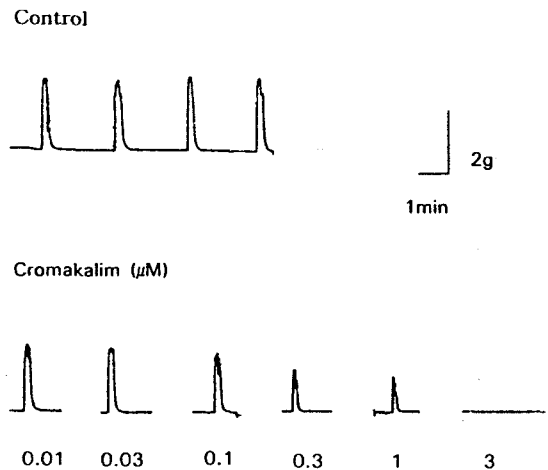


Fig. 1. Typical example of the inhibitory effect of cromakalim on the oxytocin (0.2 nM) induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat.

선을 오른쪽으로 이동시켰다. 이때 pA₂값은 3.32 ± 0.02(n=3), Schild plot의 기울기는 -0.95 ± 0.02 이었다(Fig. 2C). 그러나 small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ 채널의 특이적인 차단제로 알려진(Moczydlowski등, 1988) apamin(10⁻⁷ M)은 cromakalim의 이완 작용에 영향을 주지 않았다(Fig. 3D). thioforamide 유도체 RP49356, guanidine 유도체 pinacidil, pyridine 유도체로 NO를 가지고 있는 nicorandil 및 benzothiadiazine계 diazoxide(Edwards와 Weston, 1990)도 oxytocin으로 유도된 자궁근 운동성을 농도 의존적으로 이완시켰고 각각의 EC₅₀값은 5.05 ± 0.40 × 10⁻⁷ M (n=30), 1.20 ± 0.19 × 10⁻⁶ M(n=25), 3.76 ± 0.53 × 10⁻⁵ M(n=29), 6.64 ± 0.79 × 10⁻⁷ M(n=20)이며, 각각의 pD₂값은 6.30, 5.92, 4.43, 4.18이었다. 이들 다섯종류의 K⁺ 채널개방제의 이완 효과는 cromakalim > RP49356 > pinacidil > nicorandil > diazoxide 순이었다(Table 1). 이들 4종의 K⁺ 통로 개방제의 자궁근 운동성에 대한 용량반응곡선도 cromakalim의 경우와 마찬가지로 ATP-sensitive K⁺ 채널 차단제인 glibenclamide

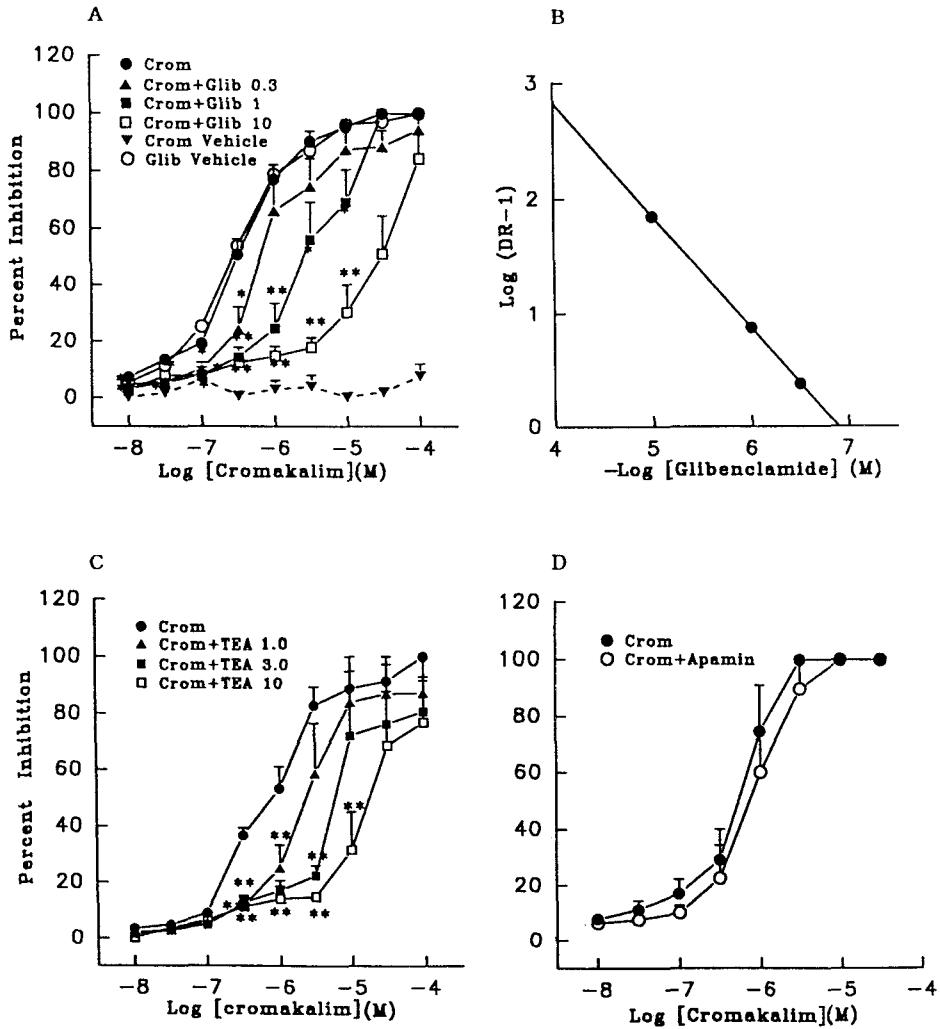


Fig. 2. Concentration-effect curves for the effects of cromakalim on the oxytocin-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. A. Relaxant effects of cromakalim in the absence (●) and in the presence of glibenclamide (0.3 μ M, ▲, n=5-13; 1 μ M, ■, n=5-11; 10 μ M, □, n=6-15). The effects of cromakalim vehicle (▼, n=5) and glibenclamide vehicle (○, n=10) are also shown. B. Schild plot for glibenclamide antagonism against cromakalim. pA_2 and slope are 6.91 and -0.97, respectively. C. Antagonism by TEA (1 mM, ▲, n=6; 3 mM, ■, n=8; 10 mM, □, n=5) of the relaxant effect of cromakalim. D. Relaxant effect of cromakalim in the presence and in the absence of apamin (0.1 μ M). The points and bars are the means and s.e.m., respectively. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

존재하에서 농도 의존적으로 유의성 있게 오른쪽으로 이동되었다(Fig. 3). RP49356, pinacidil, nicoradil, diazoxide의 자궁근 운동성에 대한

glibenclamide의 길항작용으로 부터 얻어진 pA_2 값은 6.57 ± 0.06 , 6.55 ± 0.05 , 5.97 ± 0.26 , 및 6.37 ± 0.37 (각각n=3)이었고, 각각의 기울기는 $0.71 \pm$

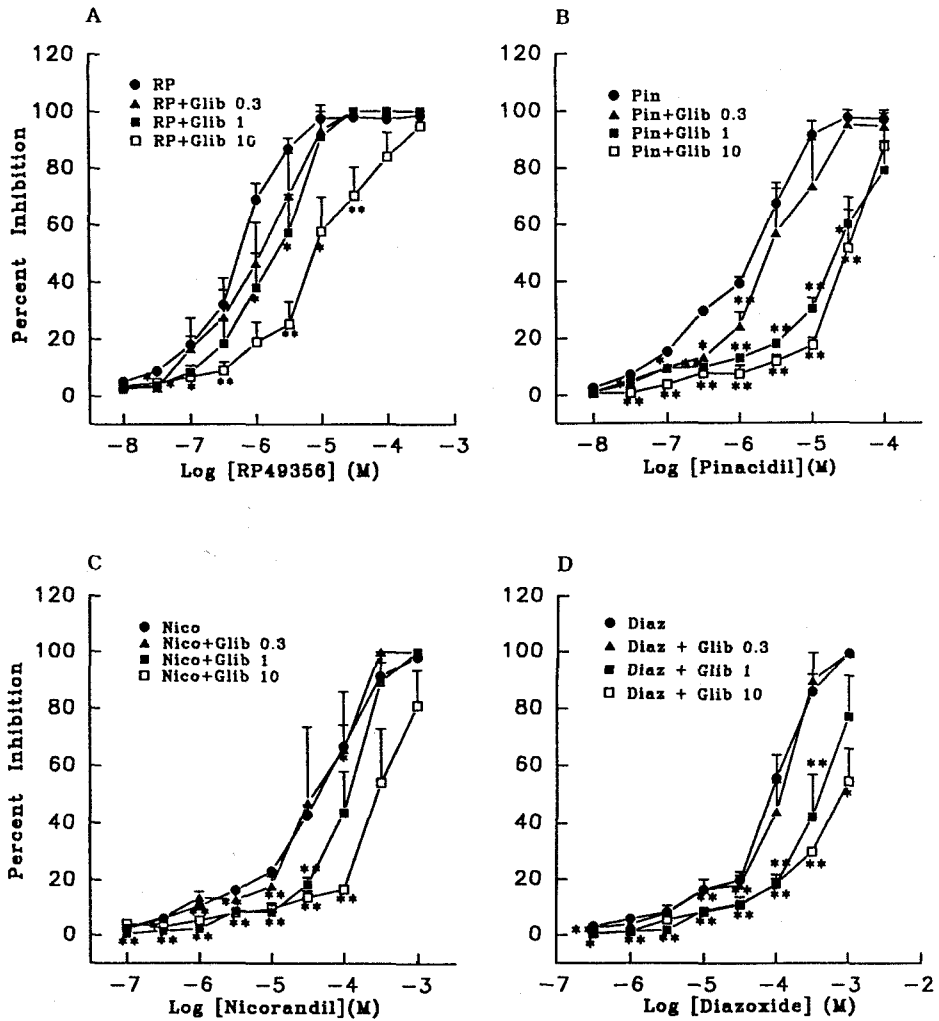


Fig. 3. Concentration-effect curves for the effects of RP49356 (A, n=30), pinacidil (B, n=25), nicorandil (C, n=29) and diazoxide (D, n=20) and antagonism by glibenclamide on the oxytocin-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. Effects of K^+ channel openers are shown in the absence (●) and in the presence of glibenclamide (0.3 μ M, ▲, n=5-13; 1 μ M, ■, n=5-11; 10 μ M, □, n=6-15). The points and bars are the means and s.e.m., respectively. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

0.04, 0.95 ± 0.52 , 0.96 ± 0.39 , -0.8 ± 0.36 이었다 (Table 1). Ca^{2+} 채널 차단제인 nifedipine은 oxytocin으로 유도된 자궁 수축을 농도 의존적으로 억제시켰으나 그 이완효과는 glibenclamide 10 μ M 이나 TEA 3 mM에 의해서 길항되지 않았다(자료 제시하지 않음).

2) KCl 로 유도된 자궁근 수축에 대한 K^+ 채널 개방제의 영향

Fig. 4는 10, 20, 40, 80 mM의 KCl 에 의하여 유도된 자궁근의 수축과 이에 대한 cromakalim의 이완 효과를 관찰한 것으로, 10, 20 mM의 KCl 에

Table 1. Comparison of the pD_2 values of several K^+ channel openers (KCO), pA_2 values and slopes of Schild plot for antagonism by glibenclamide in isolated uterus of non-pregnant rat

| KCO | pD_2 | pA_2 | Slope |
|------------|--------|-----------------|------------------|
| Cromakalim | 6.51 | 6.91 ± 0.00 | -0.97 ± 0.00 |
| RP49356 | 6.30 | 6.57 ± 0.06 | -0.71 ± 0.04 |
| Pinacidil | 5.92 | 6.55 ± 0.05 | -0.95 ± 0.52 |
| Nicorandil | 4.43 | 5.97 ± 0.26 | -0.96 ± 0.39 |
| Diazoxide | 4.18 | 6.37 ± 0.37 | -0.80 ± 0.36 |

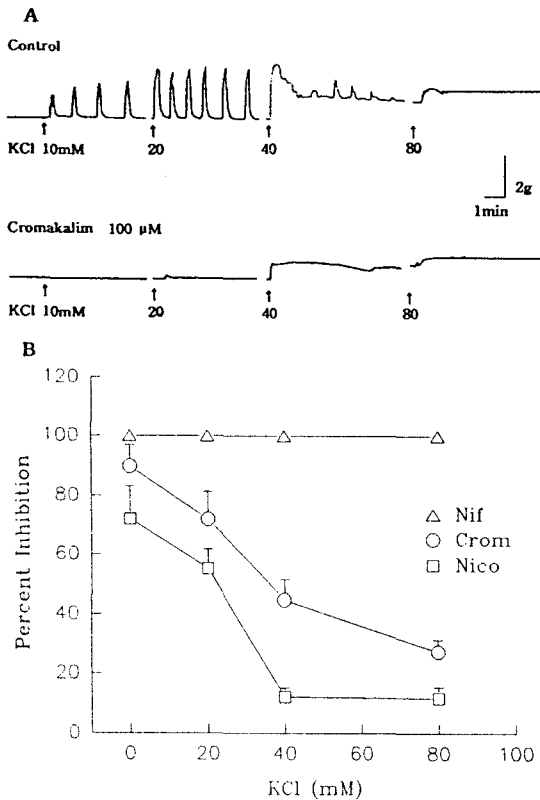


Fig. 4. Effect of K^+ channel openers on KCl-evoked contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. A. Typical example of the effects of cromakalim on oxytocin-induced contraction of the non-pregnant rat uterus. B. Relaxant effects of cromakalim ($100 \mu M$, \circ , $n=9$), nicorandil ($300 \mu M$, \square , $n=9$) and nifedipine ($1 \mu M$, \triangle , $n=3$). The points and bars are the means and s.e.m., respectively.

의하여 유도된 수축은 cromakalim에 의하여 80~90% 억제되었다. 그러나 고농도 40, 80 mM KCl에 의해 유도된 수축은 cromakalim에 의하여 각각 44% 및 25% 정도만 억제되었다. 즉 저농도의 KCl에 의해 유도된 자궁수축이 cromakalim에 의해 보다 유효하게 억제됨을 보여주고 있다. $300 \mu M$ nicorandil도 KCl로 유도된 수축반응에 대하여 cromakalim과 마찬가지로, 저농도 KCl 10, 20 mM에서는 각각 65 및 57%의 유의성 있는 억제효과를 보였으나 고농도 KCl 40, 80 mM의 수축에 대하여는 각각 11 및 10%의 억제효과만을 나타냈다(Fig. 4B). 그러나 nifedipine $1 \mu M$ 은 KCl로 유도된 수축을 완전히 억제하였다.

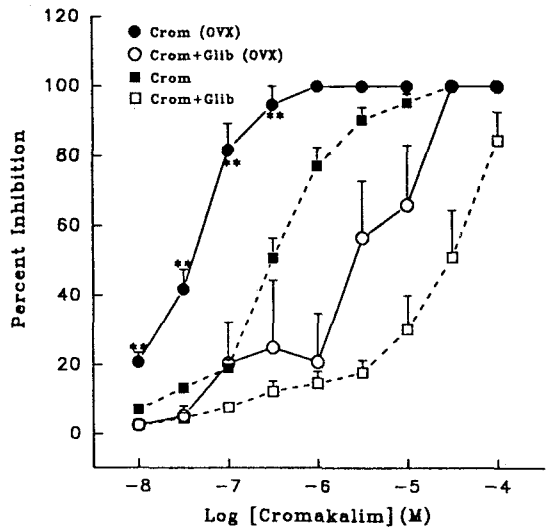


Fig. 5. Effect of cromakalim on the contraction of isolated uterus of normal and ovariectomized rat. Glibenclamide ($10 \mu M$, open symbols) effectively antagonized the relaxant effect of cromakalim (filled symbols) on the uterus of both normal and ovariectomized rat ($n=14$). The points and bars are the means and s.e.m., respectively. **, $p < 0.01$

3) Cromakalim의 이완 작용에 대한 estrogen의 영향

자궁근의 운동성에 대한 K⁺ 채널 개방제의 억제 효과에 대한 estrogen의 영향을 조사하기 위하여 난소를 절제하여 estrogen의 영향을 감소시킨 조직과 절제하지 않고 estrogen을 처치한 조직의 cromakalim에 대한 반응성을 조사하였다. 난소절제군에서도 estrogen 처치군과 마찬가지로 cromakalim(10⁻⁸-10⁻⁴M)은 0.2nM oxytocin으로 일으킨 수축을 농도의존적으로 억제시켰으며 이런 억제 효과는 glibenclamide 10 μM에 의해 유의성있게 길항되었다(Fig. 5). estrogen 처치군의 cromakalim 용량반응곡선에 대하여 난소절제군의 cromakalim 용량반응곡선은 10⁻⁸-3×10⁻⁷M 농도에서 유의성 있게(p<0.01) 왼쪽으로 이동하였으며, 이때 pD₂ 및 K_B 값은 각각 7.48, 1.26×10⁻⁷M 이었다. estrogen 처치군으로부터 얻은 pD₂ 및 K_B 값인 6.51과 1.57×10⁻⁷M을 비교해 볼 때 K_B 값은 별다른 차이를 보이지 않았으나, pD₂ 값은 cromakalim 효력에 있어 estrogen 처치군에 비해 10배 정도 높게 나타나 난소를 절제한 쥐 자궁조직의 수축이 cromakalim에 의하여 더욱 민감하게 억제됨을 관찰하였다.

고 찰

본 연구에서는 5종의 K⁺ 채널 개방제가 적출자궁근의 운동성에 미치는 영향을 조사하여 이들이 작용강도는 다르지만 모두 자궁근육을 이완시켰으며, 이 약물들의 이완작용은 glibenclamide에 의하여 차단되는 K⁺ 채널의 개방에 의한 것이며 특히 estrogen의 처치에 의하여 K⁺ 채널 개방제에 대한 반응성이 감소함을 관찰하였다.

Oxytocin으로 유도된 적출자궁근의 운동성에 대한 K⁺ 채널 개방제의 이완효과는 cromakalim과 RP49356이 pD₂값이 각각 6.51과 6.30으로 가장 높았고, 다음이 pinacidil(pD₂=5.92), 그리고 nicorandil(pD₂=4.43)과 diazoxide(pD₂=4.18)가

가장 낮았다. 이 결과는 쥐자궁근의 이완에 대한 cromakalim, pinacidil, RP49356의 pD₂값 6.4, 6.2, 6.0과 거의 일치하였다. benzopyran계 cromakalim이나 lemakalim은 기관지 평활근(Longmore등, 1991), 간문맥과 방광평활근(Edwards등, 1991), 대장평활근(Weir와 Weston, 1986)등의 조직에서 RP49356, pinacidil 혹은 nicorandil보다도 강력한 이완효과를 나타냈다. 그러나 췌장 세포의 경우, 인슐린분비 억제작용 혹은 ATP-sensitive K⁺ 채널의 개방작용은 benzothiadiazine계 diazoxide가 cromakalim, pinacidil, nicorandil 보다도 강력한 것으로 알려져 있다(Garrino등, 1989; Dunn등, 1990). 또, diazoxide는 기관지 평활근(Longmore등, 1991), 자궁근(본 연구), 골격근(Weik와 Neumcke, 1990)에서 근육의 이완이나 ATP-sensitive K⁺ 채널의 개방에 있어서 cromakalim보다 월등히 미약한 효과를 보이고 있다.

5종의 채널개방제는 작용강도에 있어서 차이가 있었지만 ATP-sensitive K⁺ 채널의 차단제인 glibenclamide(1, 3, 10 μM)에 의하여 모두 농도의존적으로 길항이 되었다. Shild regression에 의해서 얻어진 pA₂값들은, nicorandil을 제외한 4종의 K⁺ 채널 개방제에서 6.37~6.91로 서로 비슷하였으나, nicorandil의 경우 다소 낮은 5.97이었다. Shild regression에서 얻은 직선의 기울기는 cromakalim, pinacidil, diazoxide, nicorandil등의 경우 기울기가 -1에 근접하고 있으나, RP49356의 경우 -1과 다르게 나타났다. 일반적으로 Shild regression으로 부터 얻어진 직선의 기울기가 -1과 다를때, ㉠ 경쟁적인 길항작용이 일어나지 않는 경우, ㉡ 약물이 조직의 작용부위에 고루 분포하지 않았거나, 어떤 이유로 약물의 작용이 평형상태에서 관찰되지 못한 경우, ㉢ 작용하는 약물의 수용체의 종류가 단일하지 않을 경우, ㉣ 약물이 한가지 이상의 약물작용을 갖는 경우 등의 원인이 있을 수 있다(Kenakin, 1987). 그러나 Piper등(1990)의 경우 RP49356과 glibenclamide를 이용한 실험결과를 Shild 분석하여 직선의 기

울기가 -1임을 보고하고 있어 본 연구에서 직선의 기울기가 -1과 다르게 나온 이유는 위의 두번째 원인에 의한 것일 가능성이 높다고 여겨진다.

일반적으로 K⁺ 채널 개방제의 작용은 ATP-sensitive K⁺ 채널을 개방하여 나타난다고 여겨지고 있으며 본 연구의 결과도 이를 증명하고 있다. 즉 glibenclamide뿐만 아니라 비특이적으로 K⁺ 통로를 차단하는 TEA는 glibenclamide보다는 약하지만 cromakalim의 이완작용을 효과적으로 차단하였으나, apamin은 이를 억제하지 못했다. 한편 10, 20 mM 저농도 KC1에 의해 유도된 주기적 수축은 cromakalim에 의해 80~90% 억제되었으나 40, 80 mM 고농도 KC1에 의한 tonic성 수축은 고농도 100 μM cromakalim에 의해서도 각각 44% 와 25% 정도만 억제되었다. Nernst식에 의해 사람의 임신 자궁조직에서 세포안과 밖의 K⁺ 농도와 예상되는 세포막 전위를 구하면(Morrison 등, 1993) 영양액에 첨가된 K⁺ 만 고려할 때 정상상태의 세포의 K⁺ 농도는 약 4.7 mM로 K⁺ 채널 개방제를 적용할 경우 안정막전위가 -50 mV에서 -89 mV로 이동된다. 장기수조에 10, 20 mM의 K⁺을 추가하면 영양액의 전체 K⁺의 농도는 각각 14.7, 24.7 mM이 되고 평형전압은 각각 -59, -46 mV가 된다. 세포의 K⁺ 농도가 4.7, 14.7 mM일때 K⁺ 통로 개방제는 과분극과 이완 작용을 일으킬 수 있으나, 20 mM KC1을 추가하여 세포의 K⁺ 농도가 24.7 mM이 되면 탈분극을 상쇄시키는 강한전류의 흐름이 유도되고, 40 mM KC1을 장기수조에 적용할 경우 세포외액의 K⁺ 농도는 44.7 mM 평형전압은 -31 mV로 세포의 탈분극 역치를 넘게되어 K⁺ 통로개방제의 이완효과는 기대하기 어려워진다. 본 실험에서 cromakalim이 40, 80 mM 고농도 KC1에 의해 유도된 수축을 완전히 억제시키지 못한 결과는 위의 이유로 설명할 수 있다. 그러나 Ca²⁺ 통로 차단제 nifedipine은 10, 20 mM KC1로 유도된 자궁근수축은 물론 고농도 40, 80 mM KC1로 유도된 수축을 완전히 억제시켰다. 이런 결과는 cromakalim이 K⁺ 통로를 개방하여 작용한다는 직접적 증거

가 된다.

NO를 갖고 있는 pyridine계 nicorandil은 K⁺ 통로 개방작용외에도 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP 농도를 증가시킴으로써 혈관 이완 작용을 나타낸다고 알려져 있다(Holzman, 1983; Greenberg 등, 1991). 혈관에서 40 mM이상의 고농도 KC1에 의해 유도된 수축을 nicorandil이 세포막을 과분극시키지 않은 상태에서 억제시킬 수 있다는 보고(Inoue 등, 1983)는 nicorandil의 작용이 K⁺ 통로 개방이외 다른 작용기전을 통하여 이루어짐을 강력히 시사한다. 그러나 본 실험에서 nicorandil은 40, 80 mM KC1로 유도된 수축을 거의 억제시키지 못하였고 억제의 정도도 각각 11%, 10%로 cromakalim에 비해 미약하였다. 이로 미루어보아 자궁근에서는 혈관에서의 달리 nicorandil의 guanylate cyclase경로는 잘 발달되지 않은 것으로 생각된다. K⁺ 채널개방제는 K⁺ channel opener site에 작용하여 최종적으로 모두 ATP-sensitive K⁺ 통로를 개방하여 자궁근의 이완효과를 가져오는 것으로 여겨지고 있다(Edwards와 Weston, 1993). 그러나 이들이 서로 다른 부위에 작용하거나 혹은 다른 경로를 통하여 작용할 것이라는 몇몇 증거들이 혈관평활근(Lawson 등, 1992), 자궁근(Piper 등, 1992), 골격근(Weik와 Neumcke, 1990) 기관지 평활근(Longmore 등, 1991)을 이용한 실험에서 제시되고 있다. 최근에는 또 K⁺ 채널 개방제는 delayed rectifier K⁺ 채널의 여단이 성질이 바뀌게 하여 ATP-sensitive K⁺ 채널로 되게 한다고 하는 Dr. Weston을 중심으로 한 일련의 보고가 있다(Ibbotson 등, 1993a,b; Edwards 등, 1993). 이는 K⁺ 채널개방제가 여는 이온통로의 성상에 대한 새로운 설명이 필요함을 제시하고 있으며 또한 이들이 이용한 조직(portal vein)이 아닌 다른 조직에서도 이러한 사실이 확인할 수 있는지가 관심이 되고 있다.

한편 본 실험의 결과와 임신 및 비임신 쥐자궁근의 자발적 운동성을 K⁺ 통로 개방제가 억제한다는 보고(Hollingsworth 등, 1987), 임신 자궁에

서 Ca^{2+} activated K^+ 통로가 존재하며 분만에 의해 그 생리적 작용과 약리적 특성이 변화된다는 보고(Morrison 등, 1993) 및 분만 개시 전후로 자궁의 K^+ 통로의 발현과 기능에 변화가 일어나며 이는 변화된 내분비환경에 의해 조절된다는 보고(Khan 등, 1993)는 자궁의 운동성과 K^+ 통로가 밀접하게 관련되어 있음과, K^+ 통로가 호르몬의 영향을 받음을 시사하고 있다. Estrogen은 자궁의 내막을 증식시키고 oxytocin 수용체를 증가시켜 막의 흥분성을 높여 수축을 증가시키는 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있다(Fuchs 등, 1983; Kuriyama 와 Suzuki, 1976). 난소를 절제한 쥐의 자궁에 대한 cromakalim의 pD_2 값은 7.48로 난소를 절제하지 않은 군으로 부터 얻어진 6.51에 비해 cromakalim에 대한 감수성이 10배 정도 증가된 결과를 얻었다. 이는 K^+ 통로 개방제가 사람의 임신후 자궁근 보다 임신전 자궁근에 대해 더 강력한 효력을 가진다고 보고한 Cheuk(1993) 등의 결과와도 일치하며, 호르몬 환경의 변화에 따라 K^+ 통로 개방제가 작용하는 K^+ 통로의 성질의 변화 가능성을 시사하고 있다. 앞으로 K^+ 통로 개방제의 작용기전에 대한 연구와 더불어 성주기, 임신 및 분만등의 자궁환경변화에 따른 자궁운동성 조절에 대한 호르몬과 K^+ 통로의 발현 및 성질과의 상호관련성에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

K^+ 채널 개방제로 알려진 cromakalim, RP49356, pinacidil, nicorandil 및 diazoxide가 oxytocin으로 유도된 적출 자궁근의 운동성에 미치는 영향을 조사하고, 이들의 작용기전 및 자궁근 운동성에 대한 K^+ 채널의 관련성을 알아보기 위한 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) oxytocin(0.2 nM)으로 유도된 수축에 대해 cromakalim, RP49356, pinacidil, nicorandil 및 diazoxide는 모두 농도의존적으로 억제효과를 나

타냈으며 이때 pD_2 값은 각각 6.5, 6.30, 5.92, 4.43 및 4.18이었다. 이들의 억제효과는 glibenclamide(0.3, 1, 10 μ M)에 의해 길항되었으며 이때 pA_2 값은 각각 6.91 ± 0.00 , 6.55 ± 0.05 , 6.57 ± 0.06 , 5.97 ± 0.26 및 6.37 ± 0.37 이었다.

2) Cromakalim의 농도 의존적 억제효과는 TEA에 의해서도 길항되어졌으나 apamin에 의해서는 길항되지 않았다. pinacidil의 자궁근 운동성에 대한 억제효과도 apamin에는 길항되지 않았다.

3) KCl로 유도된 자궁의 수축은 cromakalim과 nicorandil에 의해 저농도의 KCl(10, 20 mM)에서는 억제효과가 관찰되었으나 40 mM이상 KCl에 의한 수축에 대하여는 억제효과가 관찰되지 않았다. 그러나 nifedipine은 KCl에 의해 유도된 자궁 수축을 완전히 억제시켰다.

4) 난소 절제군에서도 oxytocin으로 유도된 자궁 수축은 cromakalim에 의하여 농도 의존적으로 억제되었고, 이런 이완효과는 glibenclamide 10 μ M에 의해 길항되었다. 이때 pD_2 와 K_B 값은 각각 7.48과 1.26×10^{-7} M이었다. Estrogen 처치군의 6.51 및 1.57×10^{-7} M값과 비교해볼때 K_B 값은 비슷하지만 pD_2 값은 10배 정도 높게 나타나 cromakalim에 대한 반응성이 estrogen 처치군에 비해 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼때 5종류의 K^+ 통로 개방제는 K^+ 채널을 통하여 자궁근의 운동성에 이완효과를 나타내었으며, 관련된 K^+ 채널은 K^+ 채널 개방제에 의해 활성화되며, glibenclamide에 의해 억제되는 ATP-sensitive K^+ 채널인 것으로 보인다. 한편, estrogen은 자궁근에 대한 K^+ 채널 개방제의 이완효과를 감소시키는 것으로 여겨진다.

감 사 말 씀

이 연구를 수행하는데 도움을 주신 홍기환, 김중수, 홍성근 선생님께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Anderson KE: *Clinical Pharmacology of Potassium Channel Openers. Pharmacology & Toxicology* 70: 244-254, 1992
- Arunlakshana O and Schild HO: *Some quantitative uses of drug antagonists. Br J Pharmacol* 14: 48-58, 1959
- Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP and Sutton B: *ATP-sensitive K⁺ channels in human isolated pancreatic β -cells. FEBS Lett* 215: 9-12, 1987
- Ashcroft SJH and Ashcroft FM: *Properties and functions of ATP-sensitive K⁺ channels. Cellular Signalling* 2: 197-204, 1990
- Atwal KS, Grover GJ, Ahmed SZ, Ferarra FN, Harper TW, Kim KS, Sleph PG, Dzwonczyk S, Russell AD, Moreland S, McCullough JR and Normandin DE: *Cardioselective Anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel openers. J Medicin Chem* 36: 3971-3974, 1993
- Belles B, Hescheler J and Trube G: *Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole cell recordings and tolbutamide. Fluegers Arch* 409: 582-588, 1987
- Bril A and Man RYK: *Effect of the potassium channel activator, BRL34915, on the action potential characteristics of canine cardiac Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Therap* 253: 1090-1096, 1990
- Cheuk JMS, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT, Maresh MJA: *Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. Am J Obstet Gynecol* 168(3): 953-960, 1993
- Cook NS: *The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. Trends in Pharmacol Sci* 9: 21-28, 1988
- Dunne MJ, Yule DI, Gallacher DV and Peterson OH: *Comparative study of the effects of cromakalim(BRL 34915) and diazoxide on membrane potential, [Ca²⁺]_i and ATP-sensitive potassium currents in insulin-secreting cells. J Membrane Biol* 114: 53-60, 1990
- Edwards G and Weston AH: *Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. Trends Pharmacol Sci* 11: 417-422, 1990
- Edwards G and Weston AH: *The Pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 597-637, 1993
- Edwards G, Henshaw M, Miller M and Weston AH: *Comparison of the effects of several potassium-channel openers on rat bladder and rat portal vein in vitro. Br J Pharmacol* 102: 679-686, 1991
- Edwards G, Ibbotson T and Weston AH: *Levcromakalim may induce a voltage-independent K-current in rat portal veins by modifying the gating properties of the delayed rectifier. Br J Pharmacol* 110: 1037-1048, 1993
- Fosset M, de Weille JR, Green RD, Schmid-Antomarchi H and Lazdunski M: *Antidiabetic sulphonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. J Biol Chem* 263: 7933-7936, 1988
- Foster CD, Speakman MJ, Fujii K and Brading AF: *The effect of cromakalim on the detrusor muscle of human and pig urinary bladder. Br J Urol* 63: 284-294, 1989
- Fuchs AR, Periyasamy S, Alezardrova M and Soloff MS: *Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. Endocrinology* 113: 742-749, 1983
- Garrino MG, Plant TD and Henquin JC: *Effects of putative activators of K⁺ channels in mouse pancreatic -cells. Br J Pharmacol* 98: 957-965, 1989
- Greenberg SS, Cartor E, Ho E and Walega M: *Comparison of nicorandil induced relaxation, elevation of cyclic guanosine mono phosphate and stimulation of guanylate cyclase with organic nitrate esters. J Pharmacol Exp Therap* 258: 1061-1071, 1991
- Grossett A and Hicks PE: *Evidence for blood*

- vessel selectivity of BRL34915. *Br J Pharmacol* 89: 500P, 1986
- Hamilton TC, Weir SW and Weston AH: Comparison of the effect of BRL34951 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol* 88: 109-111, 1986
- Hollingsworth M, Amédée T, Edwards D, Mironneau J, Savineau JP, Small RC and Weston AH: The relaxant action BRL34915 in rat uterus. *Br J Pharmacol* 91: 803-813, 1987
- Holzman S: Cyclic GMP on possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil (SG-75). *J Cardiocasc Pharmacol* 5: 364-370, 1983
- Ibbotson T, Edwards G and Weston AH: Antagonism of levocromakalim by imidazoline- and guanidine-derivatives in rat portal vein: involvement of the delayed rectifier. *Br J Pharmacol* 110: 1556-1564, 1993a
- Ibbotson T, Edwards G, Noack Th and Weston AH: Effects of P1060 and aprikalim on whole-cell currents in rat portal vein; inhibition by glibenclamide and phentolamine. *Br J Pharmacol* 108: 991-998, 1993b
- Inoue T, Ito Y and Takeda T: The effects of 2-nicotinamidoethyl nitrate on smooth muscle cells of the dog mesenteric artery and trachea. *Br J Pharmacol* 80: 459-470, 1983
- Kenakin TP: *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. Raven Press, New York, 216-226, 1987
- Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, Ashford MLJ: The effect of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after of labor: Potential for tocolysis. *Am J Obstet Gynecol* 169(5):1277-1285, 1993
- Kim HJ and Ryu PD: Relaxant effect of K⁺ channel openers on the contractility of isolated rat uterus. *Kor J Pharmacol* 28, Suppl.: A25, 1992
- Kinoshita M and Sakai K: *Pharmacology and therapeutic effects of nicorandil*. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 4: 1075-1088, 1990
- Kuriyama H and Suzuki H: Changes in electrical properties of rat myometrium during gestation and following hormonal treatments. *J Physiol* 260: 315-333, 1976
- Lawson K, Barras M, Zazzi-Sudriez E, Martin DJ, Armstrong JM and Hicks PE: Differential effects of endothelin-1 on the vasorelaxant properties of benzopyran and nonbenzopyran potassium channel openers. *Br J Pharmacol* 107: 58-65, 1992
- Longmore J, Bray KM and Weston AH: The contribution of Rb-permeable potassium channels to the relaxant and membrane hyperpolarizing actions of cromakalim, RP49356 and diazoxide in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 102: 979-985, 1991
- Moczydlowski E, Lucchesi K and Ravindran A: *An Emerging Pharmacology of Peptide Toxins Targeted Against Potassium Channels*. *J Membrane Biol* 105: 95-111, 1988
- Morrison JJ, Ashford MLJ, Khan RIV, Smith SK: Modification of Large-conductance Ca²⁺-activated and K⁺ channel properties of human myometrium during pregnancy and labor. *Proc R Soc Lond[Biol]* 251: 9-15, 1993
- Neugreen DT, Bray KM, McHarg AD, Weston AH, Dut4y S, Brown PS, Kay PB, Edwards G, Longmore J and Southerton S: The action of diazoxide and minoxidil sulfate on rat blood vessels: a comparison with cromakalim. *Br J Pharmacol* 100: 605-613, 1990
- Osterrieder W: Modification of K⁺ conductance of heart cell membrane by BRL 34915. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 93-97, 1988
- Piper I, Downing SJ and Hollingsworth M: Cross tolerance between cromakalim and RP49356 in the uterus of the rat in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 219: 347-353, 1992
- Piper I, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M and Sadraei H: Effect of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol* 101: 901-

907, 1990

- Quast U and Cook NS: *In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim and their inhibition by glibenclamide.* *J Pharmacol Exp Therap* 250: 261-271, 1989
- Raeburn D and Brown JJ: *RP49356 and cromakalim relax airway smooth muscle in vitro by opening a sulphonylurea-sensitive K⁺ channel: a comparison with nifedipine.* *J Pharmacol Exp Therap* 256: 480-485, 1991
- Spinelli WS, Sorota MS and Hoffman BF: *Antiarrhythmic actions of the ATP-sensitive K⁺ current activated by pinacidil.* *Circ Res* 68: 1127-1137, 1991
- Spruce AE, Standen NB and Stanfield PR: *Studies of the unitary properties of adenosine-5'-phosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle.* *J Physiol* 382:213-236, 1987
- Sturgess NC, Ashford MJL, Cook DL and Hales CN: *The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel.* *Lancet* 2: 474-475, 1985
- Tallarida RJ, Murray RB: *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs.* Springer-Verlag, 2nd ed., 1987
- Taylor SG, Arch JRS, Buckle DR, Shaw DJ, Taylor JH and Ward JS: *The inhibitory effects of cromakalim and its active enantiomer BRL38227 agonist various agonists in guinea pig and human airways: comparison with pinacidil and verapamil.* *J Pharmacol Exp Therap* 261: 429-437, 1992
- Van Rossum JM: *Cumulative dose-response curves, Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameter.* *Arch Int Pharmacodyn* 143: 299-330, 1963
- Weik R and Neumcke B: *Effects of potassium channel openers on single potassium channels in mouse skeletal muscle.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 258-263, 1990
- Weir S and Weston AH: *Effect of apamin on responses to BRL 34915, nicorandil and other relaxants in the guinea-pig taenia caeci.* *Br J Pharmacol* 88: 113-120, 1986