

기니 피크 장관 평활근에서 Sodium Nitroprusside가 장력에 미치는 영향

권성춘 · 김시연 · 김은주 · 강복순

연세대학교 의과대학 생리학교실

The Effect of Sodium Nitroprusside on Muscle Tension in Guinea-pig Ileum. Seong Chun Kwon, Si Yeon Kim, Eun Ju Kim, and Bok Soon Kang Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Nitric oxide (NO) has been known as a mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory neurotransmitter in intestinal smooth muscles. It has been suggested that NO donor such as sodium nitroprusside (SNP) produces relaxation of smooth muscle via activation of guanylate cyclase and elevation of cGMP levels. We have therefore investigated the effects of NO, using SNP, on muscle tension in the longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. The possible role of cGMP was also investigated as well as the involvement of K^+ channel on SNP-induced inhibitory effect. The results are summarized as follows; high KCl-or CCh-activated contractions were inhibited by SNP in a concentration-dependent manner. 8-Br-cGMP also showed a similar effect in that of SNP. TEA (1 mM) significantly reduced the SNP-induced inhibitory effect. SNP-induced effect was further reduced by the presence of 10 mM TEA. On the other hand, 4-AP (0.1 mM), glibenclamide (10 μ M) and apamin (0.1 μ M) showed little effects on SNP-induced relaxation. Zaprinast significantly potentiated the SNP-induced inhibitory effect in all ranges. ODQ also significantly decreased the SNP-induced inhibitory effect. Pretreatment with CPA (10 μ M) slightly reduced the SNP-induced inhibitory effect. From the above results, both effect mediated by NO and cGMP might be responsible for the activation of Ca^{2+} -activated K^+ channel by SNP in guinea-pig ileum. And this K^+ channel activation by SNP also contributes to the SNP-induced membrane hyperpolarization and relaxation.

Key Words: Guinea-pig ileum, Nitric oxide, Sodium nitroprusside, cGMP, Ca^{2+} -activated K^+ channel

서 론

위장관계에 분포하는 자율신경계는 아드레날린성 신경과 콜린성 신경외에 비아드레날린성, 비콜린성(non-adrenergic noncholinergic, NANC) 신경으로 구성된다. NANC 신경은 전 위장관계에 분포하며 장관 평활근에서 억제성 자율신경의 중요한 역할을 담당한다. 음식물 유입시에 하부식도 괄약근과 위 근위부의 이완을 일으켜 위용량을 크게하며, 장관의 연동운동시 항문축 원위부의

이완을 일으키는 등의 반사조절을 담당하고 있다. NANC 신경의 억제성 자율신경을 자극시 평활근 세포막의 과분극이 일어난다. 그러나 억제성 신경전달물질에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

최근에 위장관 평활근에서 NANC 신경자극시 nitric oxide(NO) 또는 NO가 함유된 화합물이 수축억제에 관여한다는 사실이 보고된 후(Bult et al, 1990), 기니 피크의 회장 종주근(Osthaus & Galligan, 1992), 맹장뉴(Shuttleworth et al, 1991), 소장 및 결장(Costa et al, 1986), 개의 십이지장(Toda et al, 1990), 근위부 결장(Thornbury et al, 1991; Sanders & Ward, 1992), opossum의 항문 괄약근(Rattan & Chakder, 1991) 등의 위장관 평활근에서도 NO가 NANC

책임저자: 강복순, ☎ 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134,
연세대학교 의과대학 생리학교실

신경의 억제성 신경전달물질로 작용하여 이완반응을 일으킨다는 것이 보고되었다. NO에 의한 장관이완작용이 이처럼 광범위한 이유는, NO가 위·장관 벽의 대부분을 억제성으로 지배하고 있는 NANC 신경으로부터 유리되기 때문이다(Smith et al, 1989; Thornbury et al, 1991). 장관 평활근의 운상근 및 myenteric plexus의 신경총에 NO synthase(NOS)가 풍부하게 존재한다는 사실이 보고되었으며(Bredt et al, 1990), 기니 픽 회장 평활근에도 NOS가 미주신경의 원심성 신경종말에 존재하며, NO가 myenteric plexus의 ganglia로부터 유리되는 사실이 면역화학적 방법으로 확인됨으로서(Grider & Jin, 1993) NO가 NANC 신경의 억제성 신경전달물질임이 증명되었다.

소화관 근층 조직의 이완은 부분적으로 신경 자극으로 나타나는 막의 과분극, 즉 inhibitory junction potential(IJP)에 의한다. 소화관 평활근에서 IJP는 막전압을 과분극시키고 또 자발성으로 발생하는 리듬성의 전기적 및 기계적 활동을 억제하거나 또는 감소시킨다. 개의 근위부 결장의 운상근에서 외부에서 투여한 NO 및 NO 공여물질은 전기적 자극에 의해 발생하는 IJP와 유사한 반응을 일으키며, 또 NO 생성을 저해하는 물질에 의해서 IJP의 발생이 억제된다(Dalziel et al, 1991; Thornbury et al, 1991). IJP의 진폭은 안정막 전압과 관련이 있으며 또한 IJP는 K^+ 전도도의 일시적 증가에 의해 일어난다는 보고가 있다(Smith et al, 1989). NO에 의해 일어나는 막과분극은 외향성 K^+ 전류의 증가, 내향성 Ca^{2+} 전류의 감소, 또는 양자가 부분적으로 관여할 때 일어나며, 이러한 막과분극 현상은 NO가 평활근 세포막에 직접 작용하여 일어난다. 장관 평활근에는 3 종류의 K^+ channel, 즉 1)ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channel, 2) Ca^{2+} -activated K^+ (K_{Ca}) channel 및 3)delayed rectifier K^+ (K_{DR}) channel이 존재한다. K^+ channel은 안정막 전압을 조절하여 평활근의 기능을 조절함으로써 생리적으로 대단히 중요하다. NO 공여물질 및 cyclic GMP(cGMP) analogue는 혈관 평활근에서 large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel(maxi K^+ channel)을 활성화하고(Fujino et al, 1991), 기관 평활근에서 maxi K^+ channel의 차단제로 알려진 charybdotoxin은 sodium nitroprusside(SNP) 및 다른 NO donor에 의한 이완 작용을 억제하며(Jones et al, 1990), 결장 평활근에서 maxi K^+ channel은 외향성 K^+ 전류의 약 50%를 차지하는 사실(Carl et al, 1990) 등이 보고되었다. 따라서 maxi K^+ channel이 소화관 평활근에서 NO에 의해 유발되는 막의 과분극 및 자발성 전기적 활동의 억제에 관여할 가능성이 있다. 한편, Garland 및 McPherson(1992)은 NO에 의한 막과분극 반응이 K_{ATP} channel의 억제제인 glibenclamide에 의해 억제됨을 보고하였다. Maxi K^+ channel은

small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel(SK channel)의 억제제인 apamin에 의해서 영향을 받지않지만(Blatz & Magleby, 1986), IJP는 apamin에 의해 억제된다는 사실이 보고되었다(Bauer & Kuriyama, 1982; Nakao et al, 1986). 또한 아직 알려져 있지않은 다른 K^+ channel에 의해서도 이러한 반응이 일어날 가능성이 있다.

혈관 평활근에서 NO 공여물질은 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소 또는 수축 단백질에 대한 Ca^{2+} 감수성을 감소시킴으로써 이완반응이 나타난다고 밝혀졌다(Karaki et al, 1988). 평활근에서 세포내 Ca^{2+} 농도는 1)세포막을 통한 Ca^{2+} 유출과 sarcoplasmic reticulum(SR)로의 Ca^{2+} 격리, 2)효현제에 의한 Ca^{2+} 유리, 또는 3)전위-의존성 Ca^{2+} 유입 등의 여러 경로에 의해 조절된다. 혈관 평활근에서 NO에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도가 감소됨으로 장관 평활근에서도 NO가 이들 경로를 거쳐 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시킬 가능성이 있다.

cGMP는 혈관 평활근에서 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)에 의한 혈관 이완을 매개하는 세포내 2차 전령물질로 알려져 있으며(Kreye, 1984; Murad, 1986; Waldman & Murad, 1987), 그 기전은 NO 및 NO 공여물질이 soluble guanylate cyclase(SGC)의 활성화로 세포내 cGMP량을 증가시키기 때문이다(Ignarro, 1990). 개의 하부식도 괄약근에서 NO 및 NO 공여물질은 세포내 cGMP량을 증가시키며 또한 cGMP의 막 투과성 analogue인 8-Br-cGMP는 NO에 의한 막과분극 작용과 유사한 반응을 일으킨다는 것이 보고되었다(Carl et al, 1990). 따라서 혈관 평활근과 마찬가지로, 소화관 평활근에서도 억제성 NANC 신경자극으로 나타나는 이완 반응의 일부는 cGMP-의존성 기전에 의해 일어날 것으로 생각된다.

장관 평활근에서 NANC 신경자극에 의해 유리되는 억제성 신경전달물질인 NO가 어떠한 작용기전을 거쳐 수축 억제효과를 나타내는지 조사하기 위하여 SNP를 NO 공여물질로 사용하여 NO에 의한 이완반응에 2차 전령물질인 cGMP가 관여하는지 여부를 검토하였다. 따라서 본 연구에서는 기니 픽 회장으로 부터 분리한 중주근을 이용하여 1)각종 효현제에 의해 유발되는 수축에 대한 SNP의 K^+ 통로에 대한 영향을 조사하고, 2)세포내 cGMP량을 증가시켰을 때 일어나는 작용이 SNP에 의한 작용과 유사한지를 확인하여 cGMP가 2차 전령물질로서 작용하는지 여부를 조사하며, 3)세포내 SR의 Ca^{2+} -pump를 억제시켰을 때 SNP에 의한 수축 억제작용에 어떤 영향을 미치는지를 규명하고자 하였다.

방 법

실험재료 및 방법

회장 평활근의 제조: 실험동물로는 300~400 g의 기니 피크를 암수 구별없이 사용하였다. 기니 피크를 방혈, 실혈사 시킨후 회장을 절단하여 내용물을 제거한 다음 적출한 회장을 95% O₂+5% CO₂로 포화시킨 정상 Tyrode 용액에 담근 상태에서 종주근을 분리하였다. 이를 약 10 mm의 strip으로 가위를 이용하여 잘랐다.

장력의 측정: 상기의 방법으로 분리한 회장 종주근 strip의 양 끝단을 실로 묶은 다음에 온도가 37°C로 유지되는 20 ml 용량의 muscle chamber에 담근 상태에서 그 일단은 manipulator에 고정하여 근육에 안정장력을 가할 수 있게 하였으며, 다른 일단은 force transducer(Grass Model FT03; Quincy, Mass., USA)에 연결하여 장관의 등척성 장력을 polygraph(Grass Model 7PCB)에 기록하였다. 약물을 투여하기 전에 앞서 종주근 strip에 0.5 g의 기초장력을 가하여 약 2시간 동안 온도 및 흥분성이 일정해지도록 회복시켰다. 또한 이 기간 동안 70 mM KCl로 장관 수축을 3 내지 4회 유도하여, KCl로 유도되는 장관 수축의 크기가 일정해진 후에 본 실험을 실시하였다.

실험 용액: 실험에 사용한 정상 Tyrode 용액의 조성은 다음과 같다(mM): NaCl(136.9), KCl(5.4), CaCl₂(1.5), MgCl₂

(1), NaHCO₃(23.8), EDTA(0.01), Glucose(5.5), pH=7.4. 종주근 strip의 장력 유발에 사용한 고농도 K⁺ 용액은 정상 Tyrode 용액의 조성 중 Na⁺을 K⁺으로 대체하여 만들었다.

자료분석 및 통계처리: SNP가 장관 평활근의 장력에 미치는 실험결과는 각종 자극약으로 유도된 장관수축력에 대한 백분율(%)로 평균±표준오차로 나타내었다. 대조군과 실험군과의 차이는 unpaired t-test로 유의성을 검정하였고 p value가 0.05 이하시 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

고농도 KCl 및 carbachol(CCh)이 장력에 미치는 영향

KCl(A) 및 CCh(B)이 기니 피크 회장 평활근의 장력 변화에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 즉, KCl 및 CCh은 회장 평활근에서 농도-의존성으로 수축을 유발하며, KCl은 40 mM에서 CCh은 0.3 μM에서 최대 수축이 나타났다. 따라서 이하의 실험에서는 고농도 KCl을 사용할 때 25 mM 및 40 mM을, CCh로 유발할 경우는 submaximal 농도인 0.1 μM을 사용하여 수축을 각각 유발시키고 SNP를 적용하여 그 반응을 살펴보았다.

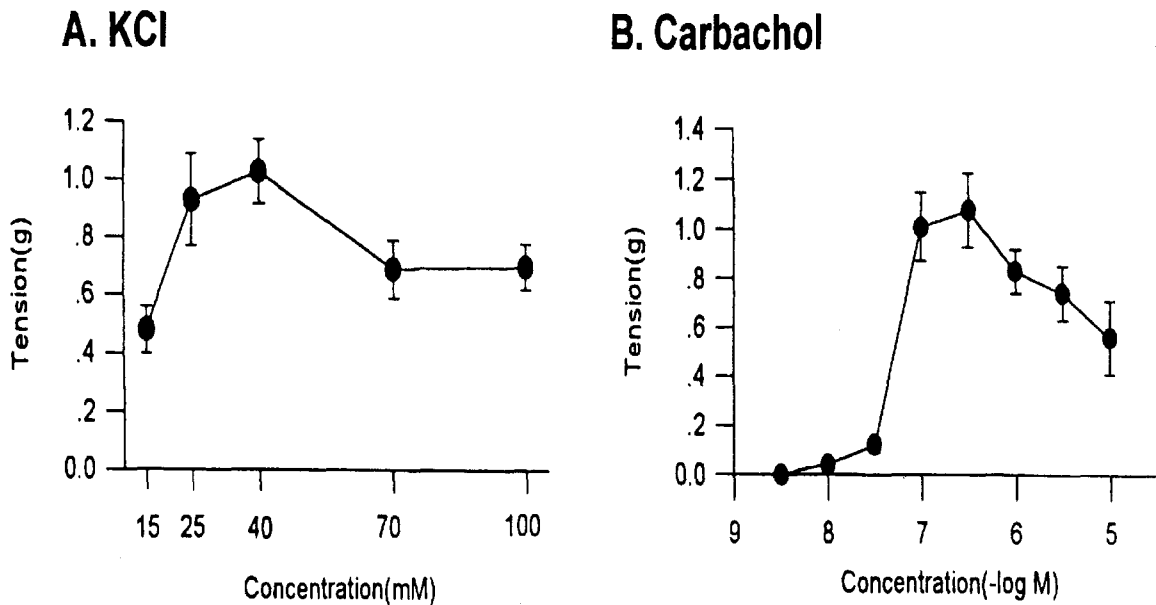


Fig. 1. Concentration-response curve for KCl(A) and carbachol(CCh, B) in guinea-pig ileum. Contractions were induced by cumulative application of each concentration of KCl or CCh. Each point represents mean of 9 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. Concentration of CCh is shown by $-\log M$.

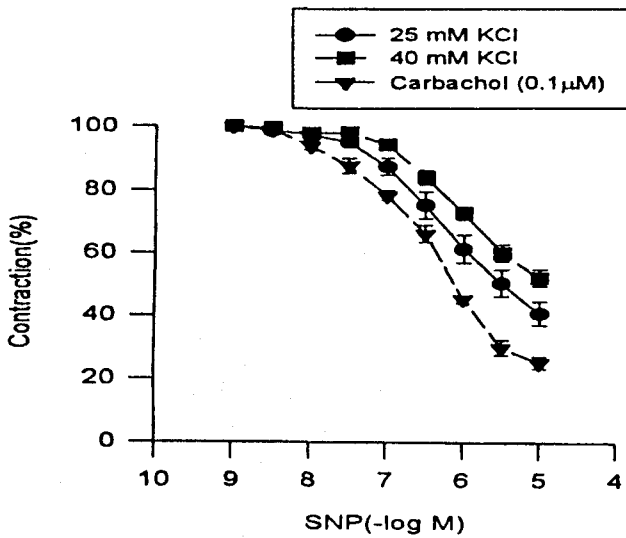


Fig. 2. Concentration-response curve for the inhibitory effect of SNP. SNP was added during sustained contraction induced by 25 mM KCl (●), 40 mM KCl (■) and CCh 0.1 μM (▼). SNP was added 10⁻⁹M to 10⁻⁵M when muscle tension reached a steady level at each step. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 7 to 11 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. Concentration of SNP is shown by -log M.

고농도 KCl 및 CCh 수축에 대한 SNP의 효과

고농도 KCl 및 CCh 0.1 μM로 수축을 유발시키고 SNP를 10⁻⁹ M부터 10⁻⁵ M까지 적용시켰을 때의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 25 mM, 40 mM KCl과 CCh 0.1 μM으로 각각 수축을 유발시키고 SNP를 투여시키기 전의 장력을 100%로 하여 상대적인 장력으로 나타내었다. SNP를 10⁻⁵ M까지 투여했으며, 적용 농도에 비례하여 수축이 억제되었다. 25 mM KCl의 경우 40 mM KCl에서보다 SNP 이완 효과가 크게 나타났다. CCh 0.1 μM에서는 SNP에 의한 이완 반응이 고농도 KCl에서보다 크게 나타났다.

K⁺ channel 차단제의 효과

SNP의 이완 작용이 장관 평활근 세포막의 K⁺ channel의 활성 변화와 연관이 있는지를 알아보기 위하여 각종 K⁺ channel 억제제가 SNP의 이완반응에 미치는 효과를 관찰하였다. 먼저 ATP-sensitive K⁺ channel의 특이적 억제제인 glibenclamide 10 μM로 전처리하고 고농도 KCl 및 CCh 0.1 μM로 유도된 장력이 평형에 도달한 후 SNP를 적용하여 얻은 반응곡선은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 즉, 회장 평활근에서 SNP에 의한 장관 이완반응에 ATP-sensitive K⁺ channel은 크게 관여하지 않을 것으로 생각된다.

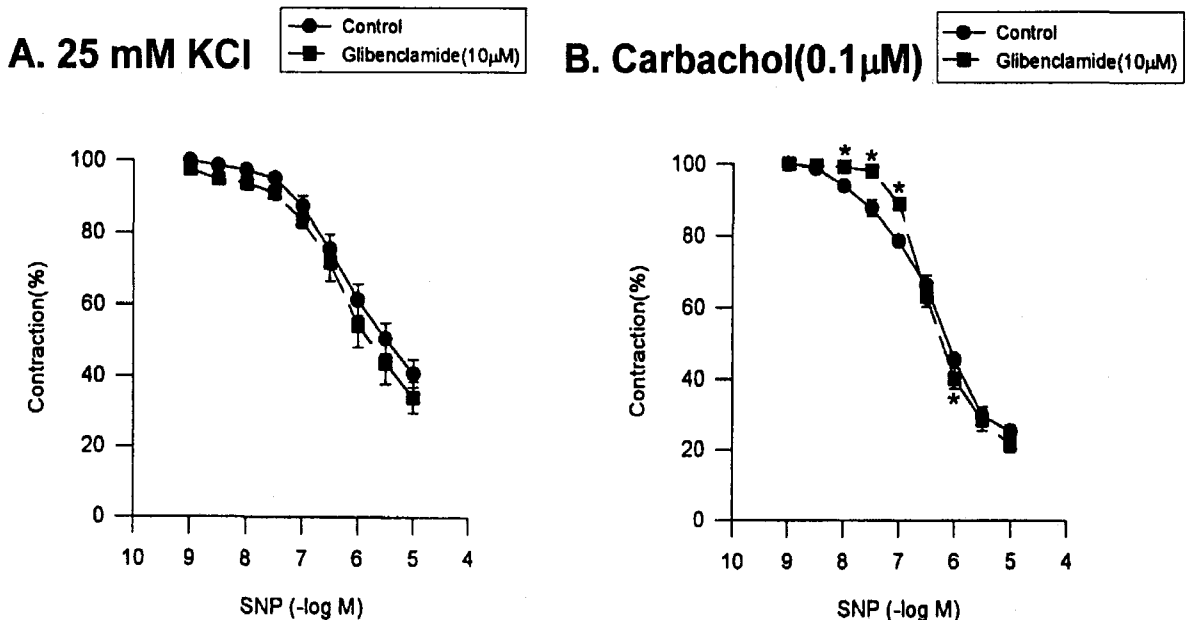


Fig. 3. The effect of glibenclamide on the inhibitory effect of SNP in the contractions induced by 25 mM KCl(A) and in 0.1 μM CCh(B). SNP was added under control condition (●), in the presence of glibenclamide 1.0 μM(■). Pretreatment with glibenclamide 10 μM for 30min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. * Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

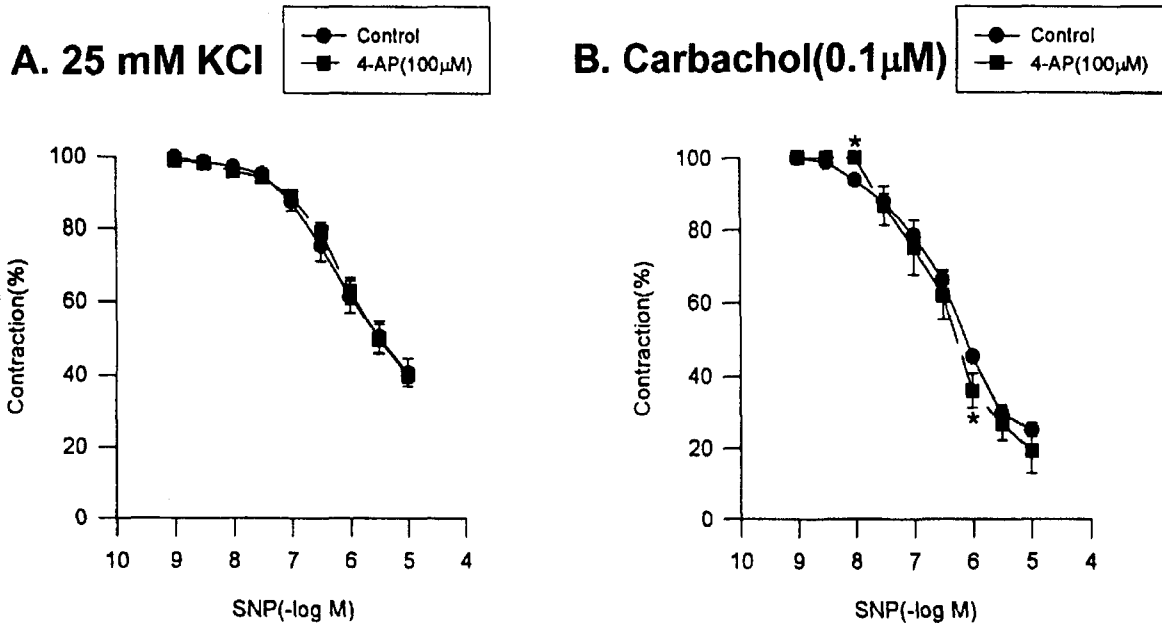


Fig. 4. The effect of 4-AP on the inhibitory effect of SNP. SNP was added under control condition (●), in the presence of 4-AP 100 μM(■). Pretreatment with 4-AP 100 μM for 30 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. * Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

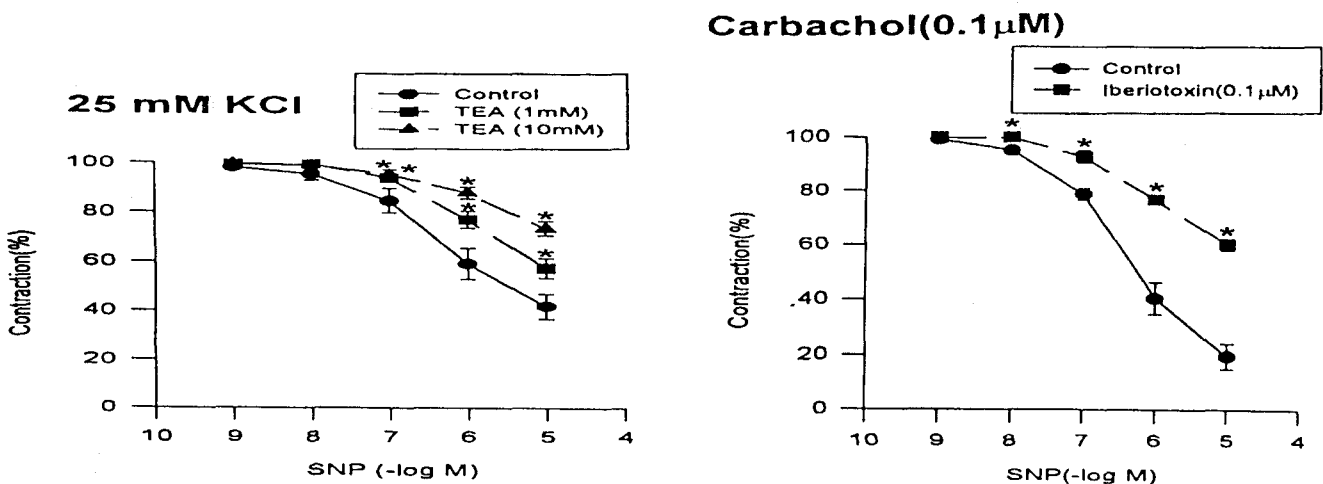


Fig. 5. The effect of TEA on the inhibitory effect of SNP. SNP was added under control condition (●), in the presence of TEA 1 mM(■), and in the presence of TEA 10mM(▲). Pretreatment with TEA for 10 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. *Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

Fig. 6. The effect of iberiotoxin on the inhibitory effect of SNP. SNP was added under control condition (●), in the presence of iberiotoxin 0.1 μM(■). Pretreatment with iberiotoxin 0.1 μM for 30 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. * Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

Delayed rectifier K^+ channel의 차단제로 알려진 4-aminopyridine(4-AP) 100 μ M로 전처리한 실험결과를 Fig. 4에 나타내었다. 4-AP를 전처리한 경우에도 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았으므로 SNP에 의한 수축억제 작용에 delayed rectifier K^+ channel은 크게 관여하지 않을 것으로 생각된다.

SNP에 의한 장관 이완 작용에 장관 평활근 세포막에 널리 분포하는 Ca^{2+} -activated K^+ channel이 관여하는지를 알아보하고자 Ca^{2+} -activated K^+ channel의 차단제로 알려진 tetraethylammonium(TEA, 1 mM)를 전처리한 상태에서 SNP의 효과를 비교해 보았다. TEA 전처리시 안정상태의 장력이 약간 증가하였으며, 25 mM KCl로 수축을 유발시킨 경우 SNP에 의한 이완 효과는 TEA 전처리에 의해 대조군에 비해 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 한편, 비특이적으로 K^+ channel을 차단한다고 알려진 10 mM TEA를 적용하였을 때 SNP에 의한 이완반응이 1mM TEA 적용시보다 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 SNP에 의한 장관 이완반응은 10 mM TEA 적용에 의해서도 일부분만 억제되었다. 따라서, 회장 평활근에서 SNP에 의한 이완반응에 K^+ channel의 활성화 이외의 기전도 일부 관여할 것이라 생각된다.

Fig. 6은 large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (maxi K^+ channel)의 차단제로 알려진 iberiotoxin으로 전처리한 실험 결과를 나타낸 것이다. CCh 수축에 대해 iberiotoxin 전처리는 SNP의 이완 반응을 일부 억제하였다. 이 사실로 보아 SNP의 이완 작용에 maxi K^+ channel이 부분적으로 관여할 것이라 여겨진다.

Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel의 차단제로 알려진 apamin으로 전처리한 실험결과를 Fig. 7에 나타내었다. Apamin 전처리는 안정상태의 장력에는 아무런 영향도 나타내지 않았으며, 또 SNP에 의한 이완 작용에도 아무런 영향도 나타내지 않았다. 따라서, 회장 평활근에서 SNP에 의한 이완반응에 small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel의 활성화 기전은 관여하지 않음을

Carbachol(0.1 μ M)

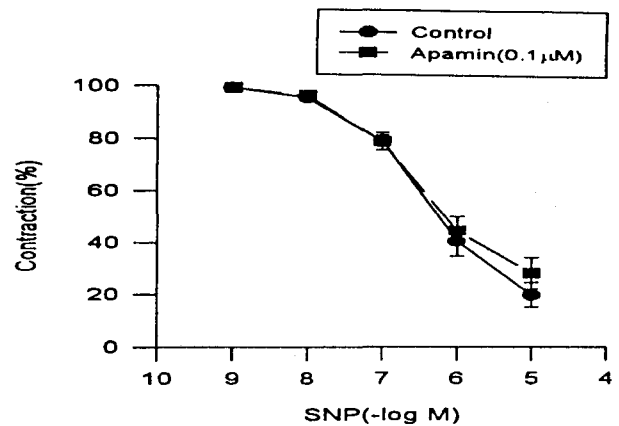


Fig. 7. The effect of apamin on the inhibitory effect of SNP. SNP was added under control condition (●), in the presence of apamin 0.1 μ M (■) Pretreatment with apamin 0.1 μ M for 30 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. Concentration of SNP is shown by $-\log M$.

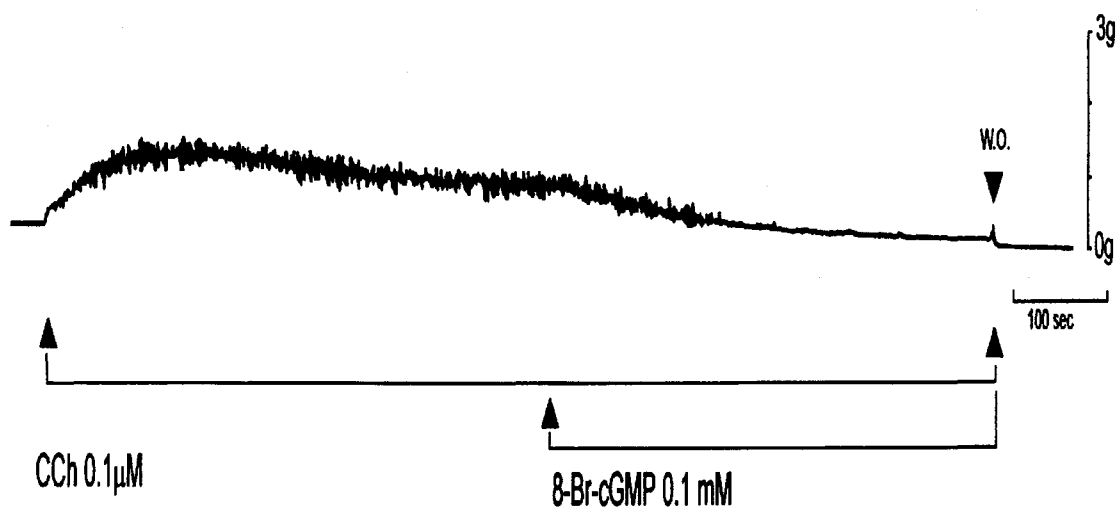


Fig. 8. Representative traces showing the effect of 8-Br-cGMP on CCh-induced contraction. Note considerable attenuation of tension by 8-Br-cGMP(0.1mM)

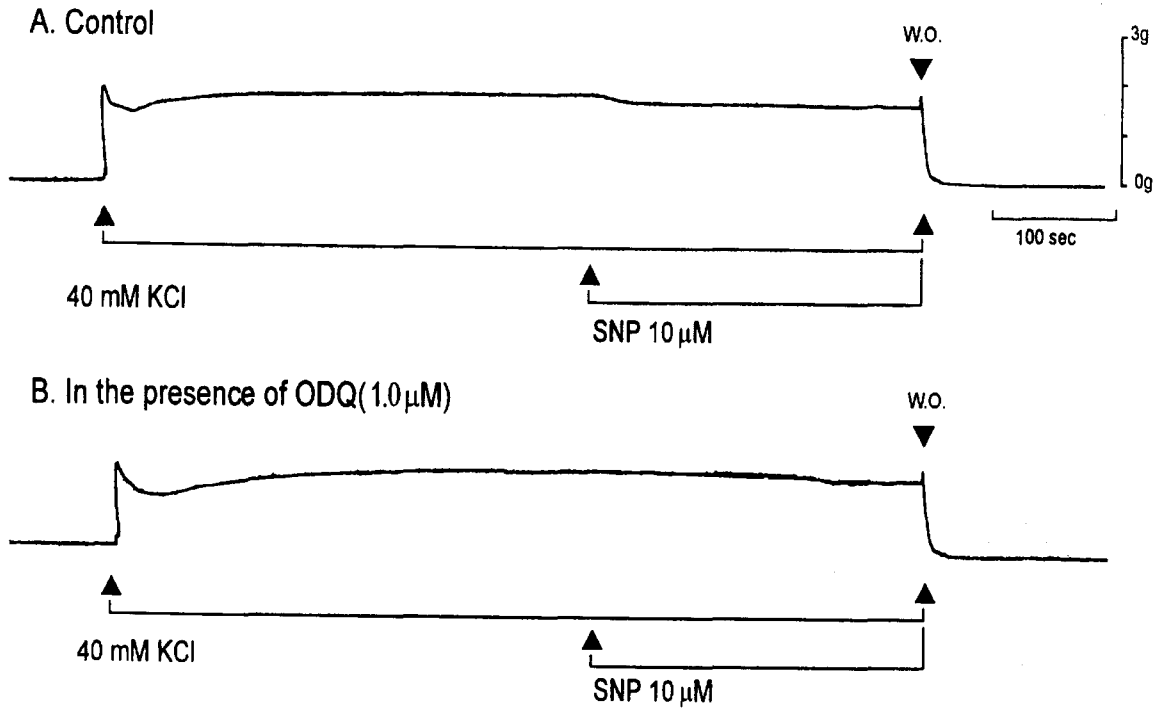


Fig. 9. The effect of 1 μM ODQ on the contraction evoked by 40 mM KCl. Note considerable attenuation of tension by ODQ.

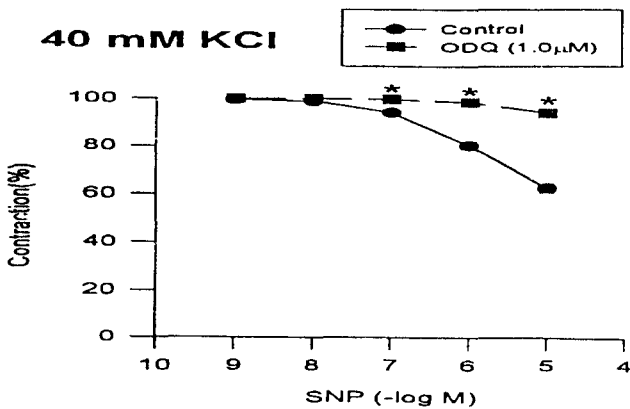


Fig. 10. The effect of ODQ on the inhibitory effect of SNP. SNP was added under control condition (●), in the presence of ODQ 1.0 μM (■). Pretreatment with ODQ for 10min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. * Significantly different from the control with $P < 0.05$. Concentration of SNP is shown by $-\log \text{M}$.

알수 있다.

8-Br-cGMP의 효과

대부분의 평활근에서 NO에 의한 막과분극 작용이 세포내 cGMP량을 증가시켜 일어난다고 생각되고 있다. 그러므로 cGMP의 막투과성 analogue인 8-Br-cGMP를 이용하여 세포내 cGMP량을 증가시키고 이때의 반응이 SNP에 의한 수축억제 작용과 유사한지 확인하였다. Fig. 8에 나타난 것처럼 CCh 0.1 μM 로 수축을 유발시키고 0.1 mM 8-Br-cGMP를 적용한 결과 수축이 약 75% 억제되었다.

SNP에 의한 이완 반응이 soluble guanylate cyclase (SGC)의 활성화의 결과로 나타나는 세포내 cGMP 농도의 증가를 거쳐 일어나는지 알아보기 위하여 SGC의 특이적 억제제로 알려진 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4, 3, -a] quinoxalin-1-one(ODQ)를 투여하여 SNP의 이완반응을 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. SNP의 이완반응이 ODQ 전처치에 의해 현저하게 소실됨을 알수 있었다. 그러므로 SNP에 의한 이완반응은 SGC의 활성화를 거치는 세포내 cGMP의 증가에 의해 일어남을 알수 있었다.

Fig. 10에 나타난 것처럼 40 mM KCl 수축에 대해 SNP는 농도 의존성으로 이완반응을 유발하였다. ODQ(1 μM)로 전처치한 경우 SNP의 이완 작용이 현저하게 억제되

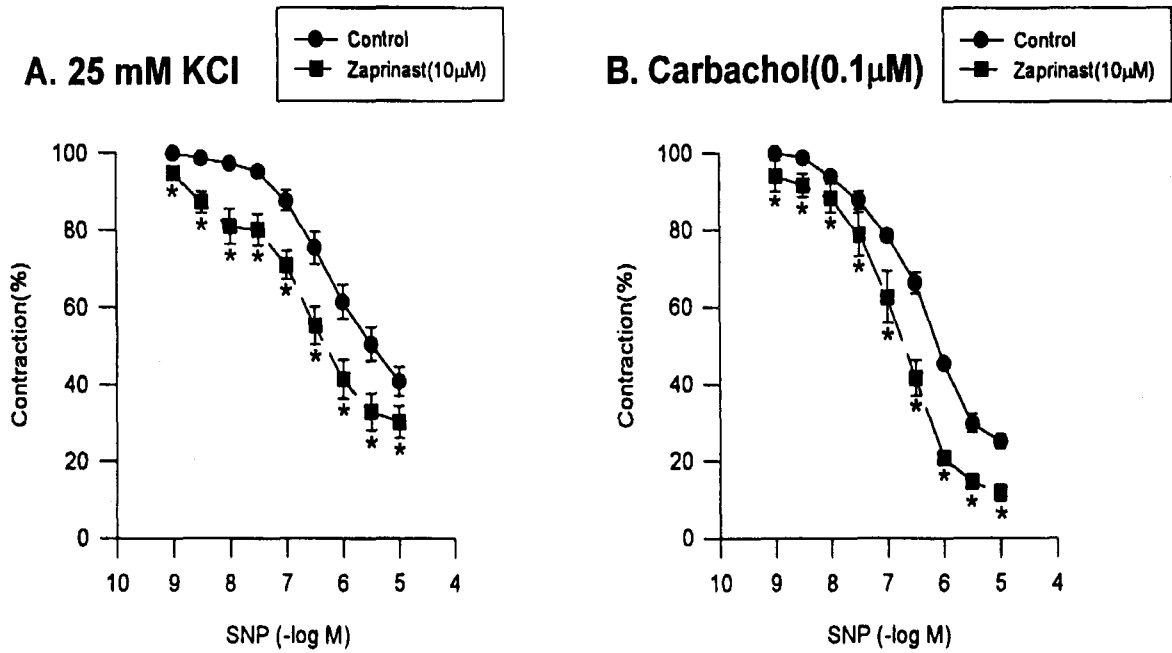


Fig. 11. The effect of zaprinast on the inhibitory effect of SNP in the contractions induced by 25 mM KCl(A) and in 0.1 μM CCh(B). SNP was added under control condition (●), in the presence of zaprinast 10 μM(■). Pretreatment with zaprinast 10 μM for 30 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. *Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

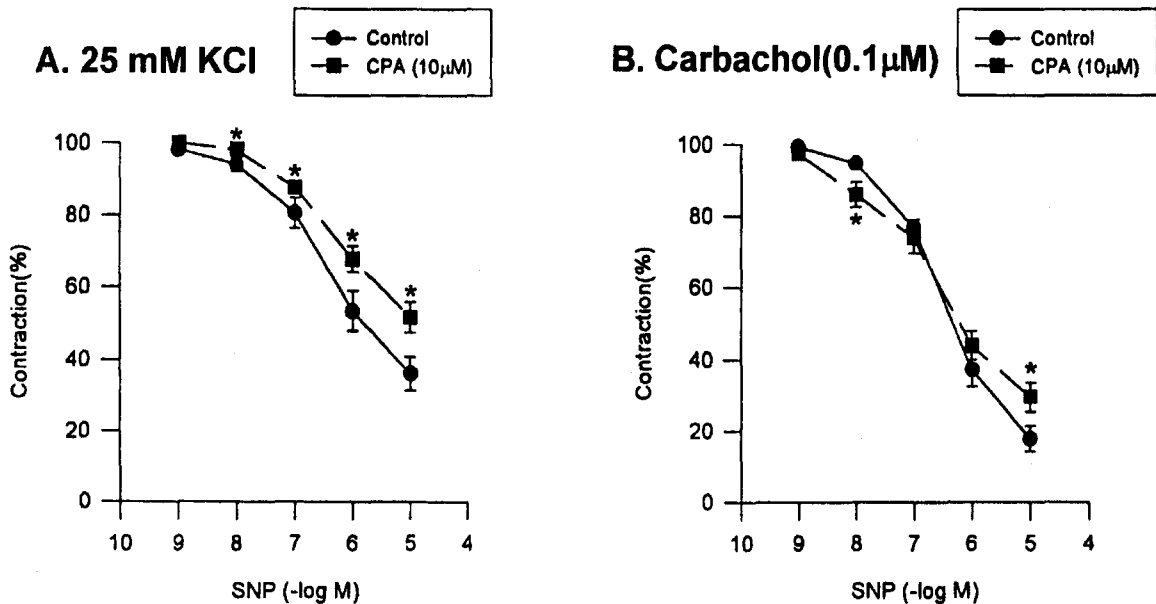


Fig. 12. The effect of CPA on the inhibitory effect of SNP in the contractions induced by 25 mM KCl(A) and in 0.1 μM CCh(B). SNP was added under control condition (●), in the presence of CPA 10 μM(■). Pretreatment with CPA 10 μM for 30 min. 100% represents muscle tension before addition of SNP. Each point represents mean of 8 experiments, and SE of mean is shown by vertical bar when it is greater than symbol. *Significantly different from the control with P<0.05. Concentration of SNP is shown by -log M.

었다.

cGMP-PDE의 선택적 억제제인 zaprinast가 SNP의 수축 억제작용에 미치는 영향을 조사한 실험결과는 Fig. 11에 나타내었다. Zaprinast로 전처리한 경우 SNP에 의한 수축 억제작용이 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 유의하게 증강되었다 따라서, SNP에 의한 이완반응은 세포내 cGMP량의 증가를 거쳐 일어날 가능성이 있음을 알 수 있었다.

Ca²⁺ store

세포내 Ca²⁺ 저장 부위가 SNP의 이완 작용에 관여하는지 여부를 알아보기 위하여 SR의 Ca²⁺-ATPase 억제제로 알려진 cyclopiazonic acid(CPA)를 사용한 경우를 Fig. 12에 나타내었다. 25mM KCl(A) 및 0.1 μM CCh(B)에 의한 수축에서 SNP의 이완 반응이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 따라서 SNP에 의한 회장 평활근의 수축억제 작용에 세포내 Ca²⁺ 저장소로의 Ca²⁺의 reuptake가 일부 관여한다고 생각된다.

고 찰

장관 평활근에서 억제성 NANC 신경자극에 의해 신경 종말로부터 유리되는 NO는 자발성의 리듬성 수축 및 각종 자극약에 의한 수축에 대해 억제효과를 나타낸다. 또 SNP가 막과분극 반응을 일으켜 장관 평활근의 수축을 억제한다는 보고(Osthaus & Galligan, 1992) 및 SNP가 자발적으로 NO를 방출하며 이때 방출된 NO가 SGC를 활성화시킨다는 보고(Martin et al, 1985) 등은 NO에 의한 수축억제효과가 세포내 cGMP량의 증가를 거쳐 일어날 가능성이 높다. 따라서 본 실험에서는 SNP가 수축장력에 미치는 영향을 조사하여 NO에 의한 수축 억제기전을 알아보려고 하였다.

장관 평활근에서 acetylcholine 및 CCh는 muscarinic M₂ 수용체와 결합한다(Hammer & Giachetti, 1992). M₂ 수용체가 자극되면 phosphatidylinositol turnover가 촉진되어 inositol 1, 4, 5-trisphosphate(IP₃) 및 diacylglycerol이 만들어진다(Gardner et al, 1988). IP₃는 SR로부터 신경전달물질에 의한 Ca²⁺ 유리에 관여하는 2차 전령물질이다. M₂ 수용체를 자극하면 활동전위의 발생이 촉진되며 평활근막은 탈분극하게 된다. 그결과 Ca²⁺ 통로가 열리게 되어 세포외부로부터의 Ca²⁺ 유입이 증가하게 됨으로 지속성 수축을 일으킨다(Brading & Sneddon, 1980).

고농도 KCl 또는 CCh를 적용하여 수축장력의 크기가 일정해진 후 관류액에 SNP를 첨가하여 그 효과를 살펴

본 결과 수축장력이 SNP에 의해 농도 의존성으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, SNP는 KCl 수축보다 CCh에 의한 수축에 대해 현저한 억제효과를 나타내었다. KCl 농도가 높아지면 SNP의 수축 억제효과는 감소되었다. 즉, 수축을 유발시킨 탈분극 정도가 작은 경우 SNP의 억제효과가 더 크게 나타났다. 따라서 NO는 회장 평활근에서 전위-의존성 Ca²⁺ 통로(VDC) 보다는 효현제-작동성 Ca²⁺ 통로(ROC)를 현저하게 억제함을 시사해준다.

세포 외부의 K⁺ 농도를 증가시키면 SNP의 이완 효과가 감소되었으며, 이러한 사실은 장관 평활근 세포막에 존재하는 K⁺ channel의 활성 변화가 SNP의 이완반응에 관여할 가능성을 시사해 준다. ATP-sensitive K⁺ channel의 억제제인 glibenclamide는 안정장력에 대해 아무런 영향도 주지않았으며, 25 mM KCl 및 CCh 수축반응시 glibenclamide 전처치는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. CCh 수축의 경우에서 저농도의 SNP에 의한 이완반응이 glibenclamide 전처치에 의해 유의하게 억제되었지만 ATP-sensitive K⁺ channel의 활성화가 SNP에 의한 이완 반응에 크게 관여하지는 않을 것으로 생각된다.

SNP에 의한 장관 이완반응은 TEA에 의해 농도 의존성으로 억제되었다. 고농도의 TEA(10mM)는 비특이적으로 평활근 세포막에 분포하는 K⁺ channel을 차단한다고 알려져 있으며, 1mM TEA는 large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel(maxi K⁺ channel)을 차단하는 사실이 알려져 있다. 관류액에 TEA를 적용하면 TEA는 농도에 의존하여 안정 장력을 증가시키는 사실로부터 K⁺ channel이 안정 장력의 유지에 관여함을 알 수 있다. 또, TEA 전처치에 의해 SNP의 이완반응이 대조군에 비해 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, iberiotoxin은 SNP 작용을 부분적으로 억제하였다. 따라서 SNP가 고농도 KCl 및 CCh에 의한 수축을 억제하는 기전에는, 부분적으로 maxi K⁺ channel의 활성화를 통한 막과분극 작용이 포함되어 있을 것이라고 보인다. 그러나 SNP에 의한 장관 이완반응은 10mM TEA 전처치에 의해서도 일부분만 억제되는 사실로부터 회장 평활근에서 SNP에 의한 이완반응의 일부는 K⁺ channel의 활성화 이외의 기전을 통해 일어날 가능성이 시사되었다. 한편, delayed rectifier K⁺ channel의 차단약인 4-AP, small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel의 차단제인 apamin으로 각각 전처리한 경우는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서, delayed rectifier K⁺ channel 및 small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel은 SNP에 의한 수축 억제 작용에 크게 관여하지 않을 것으로 생각된다.

NO 및 NO 공여물질이 soluble guanylate cyclase를 활성화시켜서 세포내 cGMP 농도의 증가를 일으키며, 이때

증가된 cGMP는 외향성 K^+ 전류를 활성화시켜 혈관 이완 효과를 나타낸다는 보고(Robertson et al, 1993)는, NO 공여물질에 의한 K^+ channel의 증가 기전에 cGMP가 관여함을 시사한다. 관류액에 8-Br-cGMP 투여시 CCh 적용에 의해 유발되는 수축장력이 8-Br-cGMP에 의해 현저하게 억제되었다. 이같은 현상은 SNP를 사용한 경우에도 동일하게 관찰되었다. 본 실험에서 SNP 및 8-Br-cGMP가 고농도 KCl 또는 CCh 수축을 유사하게 억제하는 사실로부터 장관 평활근에서 NO의 주된 작용기전은 guanylate cyclase의 활성화를 거쳐 일어날 것으로 사료된다. 또한 NO에 의한 막과분극 반응은 세포내 cGMP 농도의 증가에 기인하리라 생각된다.

본 실험에서 ODQ 전처치는 SNP에 의한 이완반응을 현저하게 억제하였다. ODQ는 쥐의 대뇌 slice에서 NO에 의한 세포내 cGMP 농도의 증가를 억제한다고 보고되었으며(Garthwaite et al, 1995), 혈관 평활근 및 혈소판에서 ODQ는 NO에 의한 세포내 cGMP량의 증가를 농도 의존성 및 비경합적으로 억제시키지만 8-Br-cGMP의 이완효과에는 전혀 영향을 미치지 않는다고 보고되었다(Moro et al, 1996). 또 ODQ는 혈관 이완제에 의한 세포내 cGMP 농도의 증가를 억제시켜서 이완반응을 억제하는 사실이 보고되었다(Brunner et al, 1996). 따라서 SNP에 의한 수축 억제기전에 세포내 cGMP 농도의 증가를 거쳐서 일어나는 과정이 포함되어 있으리라 생각된다.

Cyclic nucleotides는 cyclic nucleotide phosphodiesterases(PDE)에 의해 분해되는데, 평활근에서는 5종류가 존재하는 것이 알려져 있다(Beavo & Reifsnnyder, 1990). PDE는 세포내에 존재하는 cyclic nucleotides의 양을 조절하고 있으며 따라서 NANC 신경으로부터 유리되거나 또는 NO 공여물질에 의해 유리되는 NO에 의해 만들어지는 cyclic nucleotide에 의한 반응에 영향을 주게된다. 고양이의 위 기저부 평활근 세포에 존재하는 PDE의 억제제를 외부로부터 투여하면 세포내부의 cAMP 또는 cGMP의 농도를 증가시켜서 이완반응을 일으키며, 또 NANC 신경자극에 의해 나타나는 이완반응도 증강시킨다(Rhoden & Barnes, 1990). 본 실험에서 zaprinast, cGMP specific type V PDE inhibitor는 SNP에 의한 이완반응을 현저하게 증강시켰다. SNP에 의한 이완반응은 세포내 cGMP 농도의 증가를 거쳐 일어난다고 생각되고 있으며, 또 쥐의 위 기저부에서 zaprinast는 SNP의 이완효과를 증강시키는 사실이 보고되었다(Barbier & Lefebvre, 1992). 기관 평활근에서 zaprinast는 전기자극에 의해 나타나는 NANC 이완반응을 증강시켰다(Rhoden & Barnes, 1990). 이러한 사실로부터 NANC 신경자극시 또는 NO 공여물질로부터 유리되는 NO는 세포내 cGMP 농도를 증가시켜 이완반응

을 유발하며 또 NO에 의해 평활근 세포내에서 합성되는 cGMP는 type V PDE에 의해 분해됨을 알수 있으며 따라서 type V PDE가 cGMP의 대사에서 중요한 역할을 할 것이라 추측된다.

본 실험에서 SR의 Ca^{2+} -ATPase 억제제로 알려진 CPA를 전처치하면 SNP에 의한 이완 반응이 유의하게 억제되었다. CPA는 IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores의 Ca^{2+} pump를 억제시켜서 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 사실이 알려져 있다(Seidler et al, 1989). 혈관 평활근에서 NO는 세포내 Ca^{2+} 저장부위의 세포내 Ca^{2+} sequestration을 촉진시켜 이완반응을 일으킨다(Yuan et al, 1997). 또 cGMP는 Ca^{2+} pump를 활성화시켜 SR로의 Ca^{2+} reuptake를 촉진시켜서 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시킨다고 보고되었다(Rashatwar et al, 1987). 이와같은 사실로 보아 SNP가 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시켜 이완 작용을 일으키는데 이 중 일부로 SR로의 Ca^{2+} uptake에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소 기전도 관여할 것이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 연세대학교 의과대학 과별 Project 연구비에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Barbier AJ, Lefebvre RA. Effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine and zaprinast on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 210: 315-320, 1992
- Bauer V, Kuriyama H. Evidence for non-cholinergic, non-adrenergic transmission in the guinea-pig ileum. *J Physiol* 330: 95-110, 1982
- Beavo JA, Reifsnnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 11: 150-152, 1990
- Blatz AL, Magleby KL. Single apamin-blocked Ca -activated K^+ channels of small conductance in rat cultured skeletal muscle. *Nature* 323: 718-720, 1986
- Brading AF, Sneddon P. Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig taenia coli on stimulation with carbachol. *Br J Pharmacol* 70: 229-240, 1980
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*

- 347: 768–779, 1990
- Brunner F, Schmidt K, Nielsen EB, Mayer B. Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 48–53, 1996
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346–347, 1990
- Carl A, Garcia ML, Keynon JL, Sanders KM. Block of Ca^{2+} -activated K channels in smooth muscle from canine GI-tract by charybdotoxin. *Biophys J* 57: 507a, 1990
- Costa M, Furness JB, Humphreys CMS. Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol* 332: 79–88, 1986
- Dalziel HH, Thornbury KD, Ward SM, Sanders KM. Involvement of nitric oxide synthetic pathway in inhibitory junction potentials in canine proximal colon. *Am J Physiol* 260: G789–G792, 1991
- Fujino K, Nakaya S, Wakatsuki T, Miyoshi Y, Nakaya Y, Mori M, Inoue I. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca^{2+} -mobilization, Ca^{2+} -activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 371–377, 1991
- Gardner AL, Choo LK, Mitchelson F. Comparison of the effects of some muscarinic agonists on smooth muscle function and phosphatidylinositol turnover in the guinea-pig taenia caeci. *Br J Pharmacol* 94: 199–211, 1988
- Garland CJ, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 99: 194–196, 1992
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4, 3-a] quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48: 184–188, 1995
- Grider JR, Jin JG. Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience* 54: 521–526, 1993
- Hammer R, Giachetti A. Muscarinic receptor subtypes: M_1 and M_2 biochemical and functional characterization. *Life Sci* 31: 2991–2998, 1992
- Ignarro LJ. Nitric oxide. a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477–483, 1990
- Jones TR, Chartee L, Garcia ML, Kaczorowski GJ. Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca^{2+} -activated K^+ channel inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 697–706, 1990
- Karaki H, Sato K, Ozaki H, Murakami K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 156: 259–266, 1988
- Kreye VAW. Direct vasodilators with unknown modes of action: the nitro-compounds and hydralazine. *J Cardiovasc Pharmacol(Suppl 6)* 4: S646–S655, 1984
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 708–716, 1985
- Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1480–1485, 1996
- Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 78: 1–5, 1986
- Nakao K, Inoue R, Yamanaka K, Kitamura K. Actions of quinidine and apamin on after-hyperpolarization of the spike in circular smooth muscle cells of the ileum. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol* 334: 508–513, 1986
- Osthaus LE, Galligan JJ. Antagonists of nitric oxide synthesis inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 140–145, 1992
- Rashatwar SS, Cornwell TL, Lincoln TM. Effects of 8-Br-cGMP on Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca^{2+} -ATPase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 809–814, 1987
- Rattan S, Chakder S. Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 100: A485, 1991
- Rhoden KJ, Barnes PJ. Potentiation of nonadrenergic neural relaxation in guinea pig airways by a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 396–402, 1990
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca^{2+} -activated K^+ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265: C299–C303, 1993
- Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J*

- Physiol* 262: G379–G392, 1992
- Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264: 17816–17823, 1989
- Shuttleworth CWR, Murphy R, Furness JB. Evidence that nitric oxide participates in non-adrenergic inhibitory transmission to intestinal muscle in the guinea-pig. *Neurosci Lett* 130: 77–80, 1991
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM. Electrical pacemakers of canine proximal colon are functionally innervated by inhibitory neurons. *Am J Physiol* 256: C466–C477, 1989
- Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM. Nitric oxide mimics non-adrenergic, non-cholinergic hyperpolarization in gastrointestinal muscles. *Am J Physiol* 261: G553–G557, 1991
- Toda N, Baba H, Okamura T. Role of nitric oxide in non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol* 53: 281–284, 1990
- Yuan X J, Bright RT, Aldinger AM, Rubin LJ. Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272: L44–L50, 1997
- Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39: 163–196, 1987
-