

토끼 음경해면체의 비-아드레날린 비-콜린성 이완반응에서 산화질소의 역할

박미선 · 김진보 · 홍은주 · 홍승철*

부산대학교 약학대학

(Received March 10, 1997)

The Role of Nitric Oxide in Non-adrenergic Non-cholinergic Relaxation in the Rabbit Penile Corpus Cavernosum

Mi Sun Park, Jin Bo Kim, Eun Ju Hong and Sung Cheul Hong*

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

Abstract—The role of nitric oxide (NO) on the non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxations induced by the short and prolonged electrical field stimulation (EFS) has been studied in the rabbit corpus cavernosum. In the presence of atropine and guanethidine the prolonged EFS (2~16 Hz) of corpus cavernosal strips precontracted with phenylephrine produced frequency-dependent relaxations, which were abolished by tetrodotoxin as shown in the relaxations induced by the short EFS, indicating that their origin is NANC nerve stimulation. N^G-nitro-L-arginine (L-NNA), inhibitor of nitric oxide synthase, caused a concentration-dependent inhibition to the NANC relaxation, and at 100 M L-NNA the relaxation were virtually abolished. The inhibitory effect of L-NNA was reversed by L-arginine. Hemoglobin abolished the relaxations to NO and also caused a concentration-dependent inhibition of the NANC relaxation. The hemoglobin-resistant relaxation induced by EFS was eliminated by L-NNA. Methylene blue significantly reduced the NANC relaxation in a concentration-dependent manner. The NANC relaxation was not affected by a VIP-inactivating peptidase, α -chymotrypsin, whereas VIP-induced relaxation was completely abolished. NO- and VIP-induced relaxation were not affected by L-NNA. These results indicate that the NANC relaxation induced by prolonged EFS of the rabbit corpus cavernosum is mediated by NO-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway as shown in the relaxation induced by the short EFS, and that VIP release is not essential for the NANC relaxation of the rabbit corpus cavernosum and VIP is not involved the generation of NO.

Keywords □ Rabbit corpus cavernosum, Long stimulated non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation, Vasoactive intestinal polypeptide, Nitric oxide

음경해면체(corpus cavernosum) 평활근의 긴장도는 세가지 신경경로에 의해서 지배되고 있다. 즉 아드레날린 효능성 신경전달(neurotransmission)은 음경해면체 평활근을 수축시켜 음경 발기 (penile erection)를 억제하며, 콜린 효능성 신경전달은 교감신경 말단에서 norepinephrine의 유리를 억제함으로써 음경해면

체의 이완작용을 증가하여 음경 발기를 항진하고, 비-아드레날린 비-콜린성(non-adrenergic non-cholinergic : NANC) 신경전달은 음경해면체 평활근의 이완작용의 가장 중요한 기전이며 정상적인 음경 발기를 매개한다고 보고되고 있다.¹⁾

음경해면체 평활근은 NANC신경의 자극으로 현저하게 이완되며^{1,2)}, 음경해면체에 acetylcholine을 투여하면 혈관내피세포의존성 이완반응을 일으키게 되나^{1,3)}, 토끼 음경해면체의 NANC이완반응에는 내피세포가 필요하

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-510-2805 (팩스) 051-513-6754

지 않다고 보고되고 있다.⁴⁾ 음경해면체를 지배하고 있는 NANC신경의 신경전달물질(neurotransmitter)은 종래 vasoactive intestinal polypeptide(VIP)의 면역활성(immunoreactivity)이 음경해면체신경에서 발견되었으며,⁵⁻⁷⁾ 외부에서 투여한 VIP가 적출한 음경해면체 조직을 이완시켰고⁸⁾ 또 발기 중 음경 혈액 중에 VIP농도가 증가되었다는⁹⁾ 점에서 VIP가 음경의 NANC신경의 신경전달물질이라고 추정하였다. 그러나 최근의 연구에 의하면 음경해면체의 NANC 이완반응은 nitric oxide-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(NO-cyclic GMP) 경로에 의하여 매개된다는 많은 보고^{4, 10-14)}가 있다. 그런데 이 경로에서 NO가 NANC신경에서만 생성되어 신경전달물질로서 유리되는지 또는 VIP에 의하여 음경해면체 평활근에서도 생성되는지에 대하여 논란이 되고 있다.^{12, 15, 16)} 종래 음경해면체의 NANC이완반응의 작용기전 연구는 주로 저빈도의 짧은 전기자극으로 일으킨 일과성인 짧은 NANC이완반응에 대하여 연구되었다.^{4, 12, 13, 14, 17)} 그러나 외부에서 투여한 VIP의 이완반응은 지속적인 이완반응을 일으키게 되므로^{12, 18)} VIP가 토끼 음경해면체의 NANC이완반응에 관여하는지에 대한 연구에는 보다 지속적인 NANC이완반응에 대한 연구가 필요하리라고 사료된다. 본 연구에서는 토끼 음경해면체 평활근에 지속적인 전기자극을 하여 비교적 지속적인 NANC이완반응을 일으키게 하여, 이 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 NO-cyclic GMP경로에 의하여 주로 매개되어지는지 또는 이 지속적인 이완반응에 VIP가 신경전달물질로 관여하는지, 그리고 VIP가 NO생합성에 관여하는지를 연구하고자 하였다.

실험방법

음경해면체 평활근 표본의 제작 및 실험방법

토끼(체중 2.5~3 kg)를 ether로써 마취시킨 후 경동맥을 절단하여 출혈사 시키고, 음경을 분리하여 결체조직 및 지방조직을 제거한 후, 음경해면체 조직을 백막(tunica albuginea)으로부터 분리해 내어 각 해면체에서 두개의 표본(3×3×7 mm)을 만들었다. 이 표본을 Krebs용액이 담긴 5 ml 반응조에 설치한 백금선 전극 사이에 장치하고, 37°C에서 약 1.5 g의 안정장력(resting tension)을 부하한 후, 실험개시 전에 60분간 방치하여 평형을 유지시켰다. 이 방치기간 동안에 15분

마다 새로운 영양액으로 교환해 주었다. 등장성 장력(isometric tension)의 변화는 Grass Polygraph(7E)에 연결된 isometric force transducer(Grass FT03D)를 사용하여 기록하였다. Krebs용액의 조성(mM)은 NaCl, 118.3; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; Ca-EDTA, 0.026 및 glucose, 11.1(pH 7.4)이고, 이 영양액은 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스로써 포화시켰다. 전기자극이나 외부에서 투여한 VIP 또는 NO에 의한 이완반응을 관찰하기 위하여 해면체 표본을 phenylephrine(10 μM)으로 미리 수축시킨 상태에서 실험하였다. 전기자극은 Fujiwara 등¹⁹⁾의 방법에 따라 한쌍의 평행한 백금선 전극을 통하여 자극하였다. 비-아드레날린 비-콜린성 반응을 일으키기 위하여 음경해면체 표본을 atropine(1 μM)과 guanethidine(5 μM) 존재하에서 낮은 자극빈도(2~16 Hz, 20 V)에서 0.5 ms 구경파로써 10초 간 짧은 전기자극을 하거나, 각 자극빈도에서 이완반응이 최고반응을 일으킬 때까지 누적적으로 지속적인 자극을 하였다. Tetrodotoxin(0.3 μM), N^G-nitro-L-arginine(L-NNA; 10~100 μM), L-arginine(5 mM) 및 α-chymotrypsin(α-CT; 2 units/ml)은 전기자극 12분 전에, hemoglobin은 전기자극 또는 NO 투여 15분 전에 투여하였으며, methylene blue는 전기자극 30분 전에 각각 반응조에 투여하였다. VIP(0.001~1 μM)는 α-CT(2 units/ml)나 L-NNA(100 μM) 투여전 또는 투여 12분 후에 누적적으로 반응조에 추가하였다.

Hemoglobin의 제조

Hemoglobin의 제조는 Bowman 및 Gillespie²⁰⁾에 의한 방법에 준하였다. 즉 토끼의 경동맥에서 채취한 혈액 20 ml를 4°C에서 20분간 1200 g에서 원심분리하여 혈청과 백혈구층을 제거한 후 남아있는 적혈구를 등장성인 산완충식염액(isotonic phosphate buffered saline; pH 7.4)으로 3 회 세척하였다. 세척한 적혈구 2 ml를 저장성인산완충액(hypotonic phosphate buffer) 8 ml에 넣어 용혈시킨 후, 4°C에서 40분간 20,000 g에서 원심분리하여 상등액인 용혈액(hemolysate)을 얻었다. 용혈액의 hemoglobin농도는 cyanmethemoglobin법²¹⁾에 의하여 측정하였다.

사용한 약물 및 용액

실험에 사용한 시약인 N^G -nitro-L-arginine, L-arginine hydrochloride, vasoactive intestinal polypeptide, bovine serum albumin, phenylephrine 및 α -chymotrypsin은 Sigma Chemical 사(USA), tetrodotoxin은 Sankyo사(Japan), atropine sulfate는 Wako사(Japan), guanethidine sulfate는 Tokyo-Kasei사(Japan), methylene blue는 Fluka사(Switzerland), sodium nitrite는 Katayama사(Japan)의 것을 각각 사용하였다. NO용액은 Furchgott의 방법²²⁾에 따라 사용직전에 NaNO_2 에 pH 2의 HCl용액을 가하여 사용하였다. 약물들은 증류수에 녹이거나 회석시켰다. Tetrodotoxin ($0.3 \mu\text{M}$) 및 hemoglobin (0.86 mM)의 저장액은 -20°C 에서 저장하였다. 인산완충액은 Dodge 등²³⁾의 방법에 따라 제조하였다: 저장액은 sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) 0.155 M 과 sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 0.103 M 이며, 등장성인산완충액은 위 두 용액을 적당히 섞어서 pH 7.4에 맞춘것이다. 저장성인산완충액 (20 mosmole , pH 7.4)은 등장성인산완충액을 1:15.5로 회석하여 만들었으며, 등장성인산완충염액은 0.9% NaCl 4용적과 등장성인산완충액 1용적을 혼합하여 만들었다 (pH 7.4).

통계분석

음경해면체 평활근 표본의 이완작용은 phenylephrine ($10 \mu\text{M}$)에 의하여 일으킨 수축반응의 백분율(%)로서 표시하였다. 실험 결과는 실험 횟수에 대한 평균치 \pm S.E.M.로서 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's *t* test로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

실험성적

전기자극으로 일으킨 비-아드레날린 비-콜린성 (NA-NC) 이완반응

토끼 음경해면체 평활근 표본을 atropine ($1 \mu\text{M}$)과 guanethidine ($5 \mu\text{M}$) 존재하에서, phenylephrine ($10 \mu\text{M}$)으로 미리 수축시킨 표본에 대하여 20 Volt에서 저빈도 ($2 \sim 16 \text{ Hz}$, 0.5 ms)의 전기자극을 10초간 짧게 하였을 때와 각 자극빈도에서 최고반응을 일으킬 때까지 누적적으로 지속적인 자극을 하였

을 때 각각 자극빈도 의존성 이완반응 (frequency-dependent relaxation)을 일으켰다 (Fig. 1A, B, C). 이때 10 초 간 짧은 전기자극을 하였을 때는 자극과 동시에 음경해면체 평활근의 긴장도가 급격하게 증가하여 자극이 끝났을 때 신속하게 원상으로 회복되는 일시적인 이완반응을 일으켰으며, 각 자극빈도에서 최고반응을 일으킬 때까지 누적적으로 지속적인 전기자극을 하였을 때는 비교적 지속적인 이완반응을 일으켰으며, 자극이 끝났을 때는 짧은 전기자극을 하였을 때보다 다소 늦게 원상으로 회복되었다 (Fig. 1A, B, C). 지속적인 전기자극으로 일으킨 자극빈도 의존성 이완

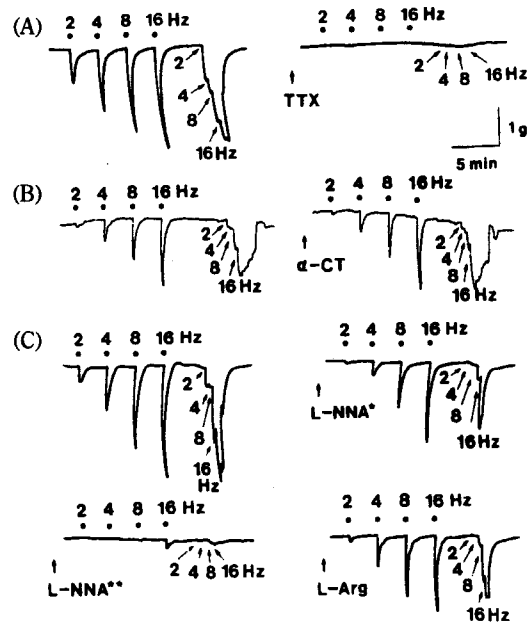


Fig. 1—Representative tracings showing effects of tetrodotoxin (A), α -chymotrypsin (B) and N^G -nitro-L-arginine (C) on the relaxation to short and prolonged electrical field stimulation in rabbit corpus cavernosum. The experiments were performed on the cavernosal strips contracted with phenylephrine ($10 \mu\text{M}$) in the presence of atropine ($1 \mu\text{M}$) and guanethidine ($5 \mu\text{M}$). Short and prolonged EFS ($2 \sim 16 \text{ Hz}$, 0.5 ms) were applied at dots and arrows, respectively. Tetrodotoxin (TTX: $0.3 \mu\text{M}$), N^G -nitro-L-arginine (L-NNA \star : $10 \mu\text{M}$, L-NNA $\star\star$: $100 \mu\text{M}$) and L-arginine (L-Arg: 5 mM), α -chymotrypsin (α -CT: 2 units/ml) were added at arrows, respectively. Hz: frequencies of short and prolonged EFS ($2 \sim 16$). Tracing breaks represent periods of tissue equilibration. Similar results were obtained from four to eleven additional experiments.

반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 이완반응처럼 신경 전도(nerve conductance) 차단제인 tetrodotoxin (0.3 μM)을 전처치하였을 때 완전히 소실되었다 (Fig. 1A).

NANC이완반응에 대한 N^G-nitro-L-arginine(L-NNA)의 영향

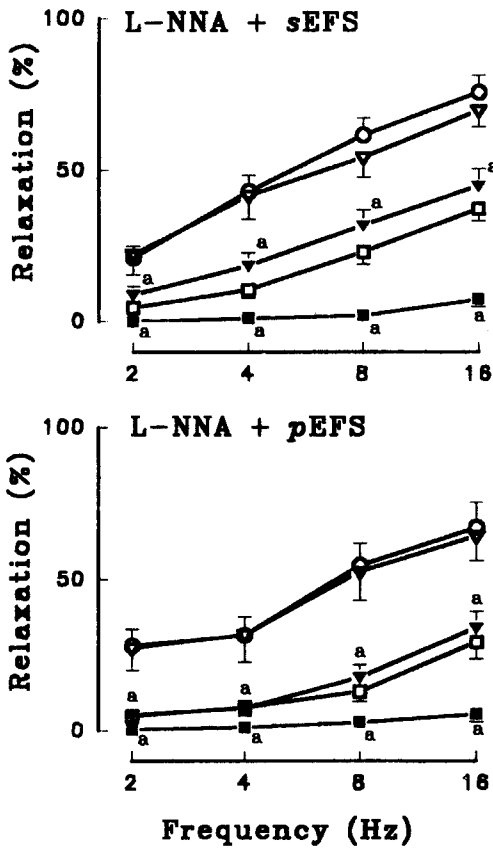


Fig. 2—Effects of L-NNA on the relaxation to short and prolonged electrical field stimulation in rabbit corpus cavernosum. Pretreatment of N^G-nitro-L-arginine (L-NNA: 10 μM, ▼; 100 μM, ■) caused concentration-dependent inhibition to the relaxation induced by short and prolonged electrical field stimulation (sEFS and pEFS: ○) and at 100 μM L-NNA the relaxations were virtually abolished, respectively. The inhibitory effects of 10 μM L-NNA were completely reversed in the presence of L-arginine (5 mM: ▽), and those of 100 μM L-NNA were also partially reversed (□). *P<0.005, different from values in control induced by short and prolonged EFS, respectively. Other experimental conditions were the same those in Fig. 1. Values are mean±S.E.M. of 4 to 10 experiments.

NO생합성 억제제인 N^G-nitro-L-arginine(L-NNA: 10~100 μM)을 전처치하였을 때 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 L-NNA의 농도에 의존하여 현저하게 억제되었으며, 고농도의 L-NNA(100 μM)를 전처치하였을 때는 이완반응이 거의 소실되었다. NO생합성 전구물질인 과량의 L-arginine(5 mM)을 전처치하였을 때 L-NNA 10 μM에 의한 억제작용은 방지되었으며, L-NNA 100 μM에 의한 억제작용도 유의성있게 부분적

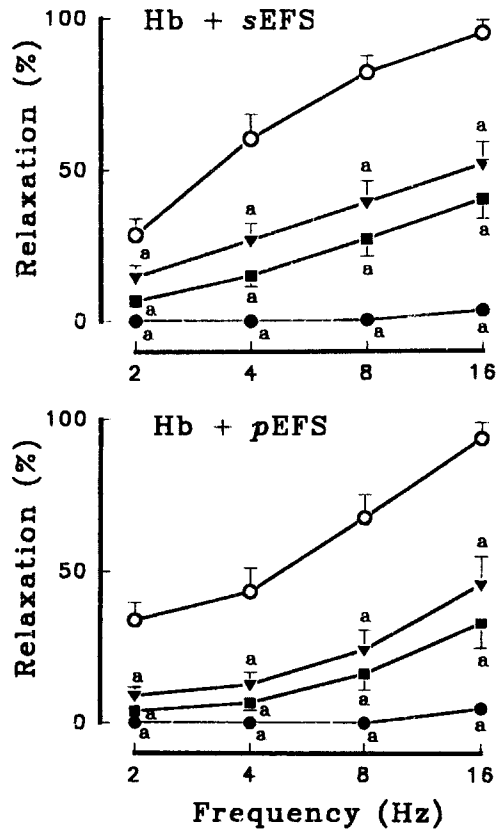


Fig. 3—Effects of hemoglobin on the relaxation to short and prolonged electrical field stimulation in the rabbit corpus cavernosum. Hb (hemoglobin: 20 μM: ▼, 60 μM: ■) caused a concentration-dependent inhibition to the relaxation induced by short and prolonged EFS (sEFS and pEFS: ○), respectively. L-NNA (N^G-nitro-L-arginine: 100 μM: ●) virtually abolished the relaxations induced by short and prolonged EFS. Other experimental conditions were the same as those in Fig. 2. *P<0.005, different from values in control induced by sEFS and pEFS (2~16 Hz), respectively. Values are mean±S.E.M. of 8 experiments.

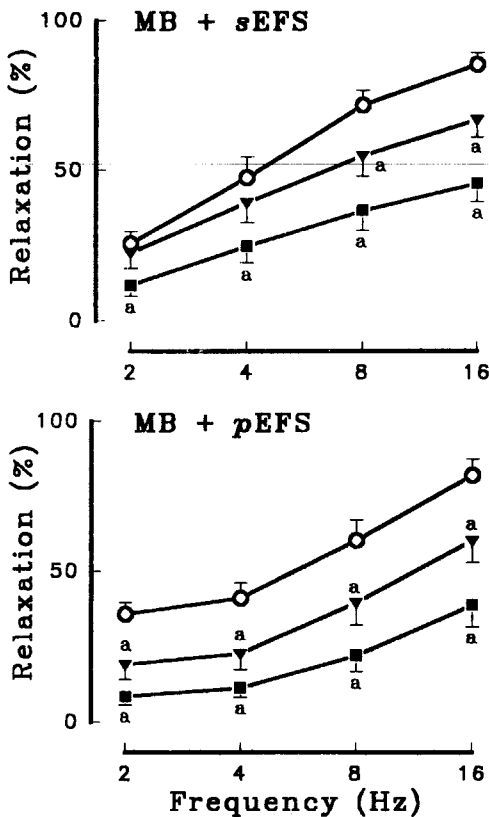


Fig. 4—Effects of methylene blue on the relaxation to short and prolonged electrical field stimulation in the rabbit corpus cavernosum. Methylene blue (MB: 10 μ M: ▼, 100 μ M: ■) caused a concentration-dependent inhibition to the relaxation induced by short and prolonged EFS (sEFS and pEFS: ○), respectively. Other experimental conditions were the same as those in Fig. 2. * P < 0.05, different from values in control induced by sEFS and pEFS (2~16 Hz), respectively. Values are mean S.E.M. of 8 to 10 experiments.

으로 방지되었다 (Fig. 1 C, 2).

NANC이완반응에 대한 hemoglobin 및 methylene blue의 영향

세포 밖에서 NO를 포획하여 불활성화시키는 hemoglobin (20 및 60 μ M)이나, cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue (10~100 μ M)를 전처치하였을 때 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 hemoglobin과 methylene blue의 농도에 의존하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 3 및 4). Hem-

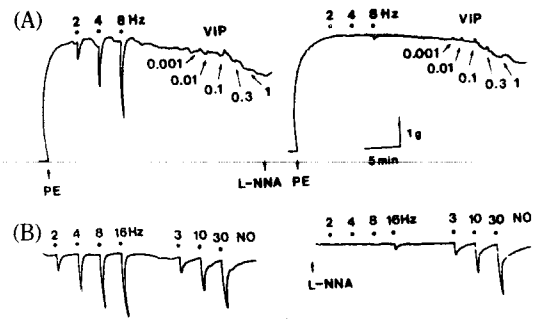


Fig. 5—Representative tracing showing effect of N^G -nitro-L-arginine on the relaxation to exogenous vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide in rabbit corpus cavernosum precontracted with phenylephrine. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP: 0.001~1 μ M) and nitric oxide (NO: 3~30 μ M) were added at arrows and dots, respectively. Phenylephrine (PE: 10 μ M) and N^G -nitro-L-arginine (L-NNA: 100 μ M) were added at arrows, respectively. Hz: frequencies of sEFS (2~16). Similar results were obtained from 8 to 12 additional experiments.

oglobin의 높은 농도 (60 μ M)에서도 억제되지 않고 남은 이완반응은 NO생합성 억제제인 L-NNA를 전처치하였을 때 소실되었다 (Fig. 3).

NANC 이완반응과 외부에서 투여한 VIP의 반응에 대한 α -chymotrypsin의 영향

VIP (0.001~1 μ M)를 외부에서 투여하였을 때 작용 개시가 늦고 지속시간이 길며 반응크기가 작은 원상 상태로 회복되지 않는 농도의존성 이완반응을 일으켰다 (Fig. 5A). VIP를 불활성화시키는 단백질분해효소인 α -chymotrypsin (2 units/ml)을 전처치하였을 때 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 유의한 영향을 미치지 않았으나 (Fig. 1B 및 6), 외부에서 투여한 VIP에 의한 이완반응은 소실되었다 (Fig. 7). 이때 α -chymotrypsin은 지속적인 전기자극의 높은 자극빈도에서 일으킨 NANC이완반응을 약간 증가시키는 경향이 있었으나 유의성은 없었다 (Fig. 6).

외부에서 투여한 VIP 및 NO의 이완반응에 대한 L-NNA의 영향

외부에서 투여한 VIP의 농도의존성 이완반응은 L-NNA를 전처치하였을 때 영향이 없었으나 (Fig. 5A 및 8), 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 거의 소실

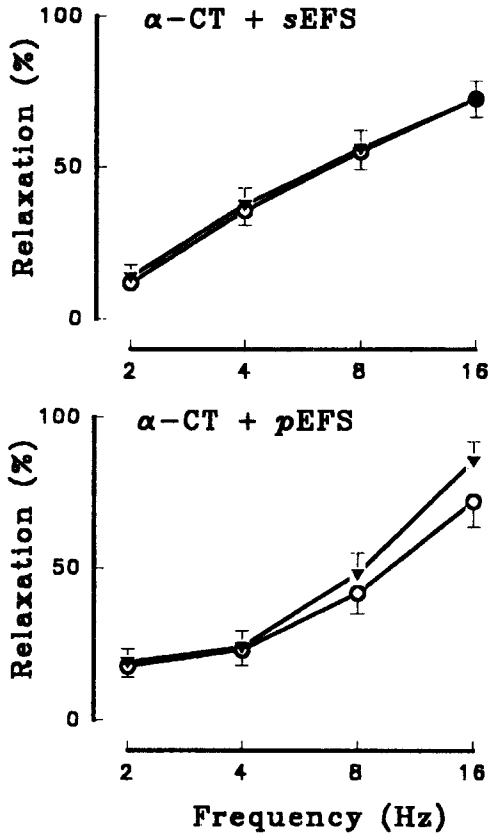


Fig. 6—Effects of α -chymotrypsin on the relaxation to short and prolonged electrical field stimulation in the rabbit corpus cavernosum. The relaxation induced by short and prolonged EFS (sEFS and pEFS; ○) was not affected in the presence of α -chymotrypsin (α -CT; 2 units/ml; ▼), respectively. Relaxations are expressed as percentages of the contraction produced by phenylephrine (10 μ M). Other experimental conditions were the same those in Fig. 1. Values are mean \pm S.E.M. of 11 and 8 experiments for sEFS and pEFS, respectively.

되었다 (Fig. 2 및 5A). 외부에서 투여한 NO(3~30 μ M)의 이완반응은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 유사한 농도의존성 이완반응을 일으켰다 (Fig. 5B). 이 NO의 이완반응은 L-NNA(100 μ M)을 전처치하였을 때 영향이 없었으나 hemoglobin(20 μ M)을 전처치 하였을 때 소실되었다 (Fig. 5B 및 9).

고 찰

토끼 음경해면체 평활근을 교감신경 효과와 부교감신

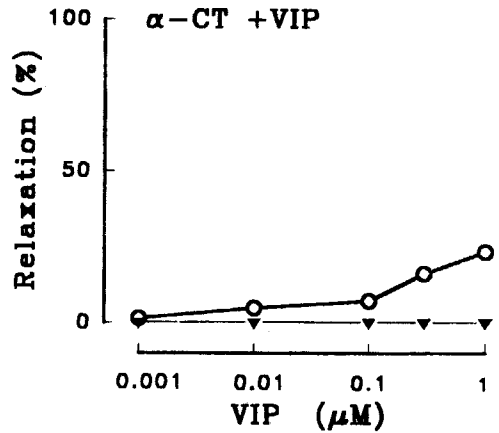


Fig. 7—Effects of α -chymotrypsin on the relaxation to exogenous vasoactive intestinal polypeptide in rabbit corpus cavernosum. α -CT: α -chymotrypsin. VIP: vasoactive intestinal polypeptide. Other experimental conditions were the same those in Fig. 2. Values are mean \pm S.E.M. of 6 experiment in the absence (○) and presence (▼) of α -CT (2 units/ml).

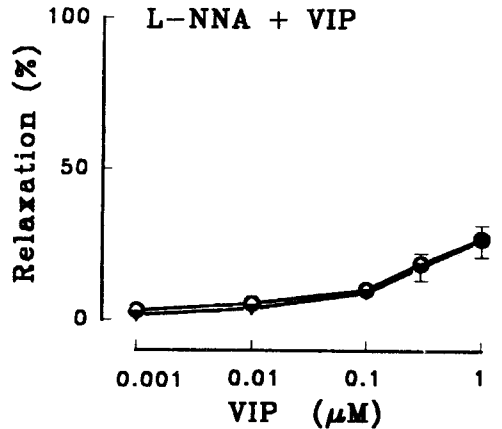


Fig. 8—Effects of N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) on the relaxation to exogenous vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rabbit corpus cavernosum. The relaxation to VIP (0.001~1 μ M; ○) was not affected in the presence of L-NNA (100 μ M; ▼). Other experimental conditions were the same as those in Fig. 2. Values are mean \pm S.E.M. of 8 experiments.

경 효과를 제거한 상태에서 phenylephrine으로써 미리 수축시킨 표본에 대하여 저빈도의 짧은 전기자극과 누적적으로 지속적인 전기자극을 가했을 때 자극빈도에 의존하는 빠른 일과성인 이완반응과 비교적 지속적인 이완반응을 일으켰다. 이들 이완반응은 신경전도 차단제인

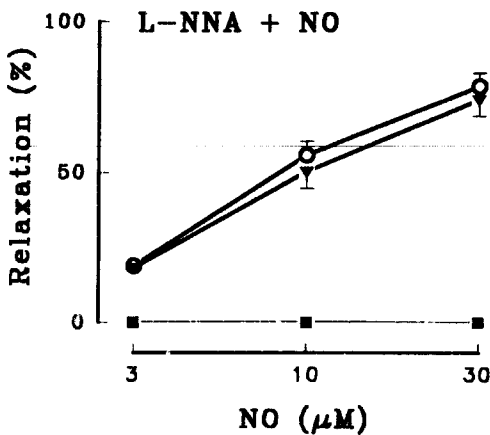


Fig. 9 - Effects of N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) and hemoglobin (Hb) on relaxation to exogenous nitric oxide (NO) in rabbit corpus cavernosum. The relaxation to NO (3~30 μM : ○) was not affected in the presence of L-NNA (100 μM : ▼) and abolished by pretreatment of Hb (20 μM : ■). Other experimental conditions were the same as those in Fig. 2. Values are mean ± S.E.M. of 12 experiments.

tetrodotoxin을 전처리하였을 때는 소실되었으므로 (Fig. 1A) 비교적 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 비-아드레날린 비-콜린성(NANC)이완반응이라고 사료된다. 이들 짧은 전기자극이나 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 NO생합성 억제제인 L-NNA²⁴⁻²⁶⁾에 의하여 농도의존적으로 억제되었으며, L-NNA의 농도를 증가시켜 100 μM을 전처리하였을 때는 거의 소실되었다. 이들 L-NNA의 억제효과는 NO생합성 전구물질인 L-arginine^{27, 28)}에 의해 제거되었으므로 (Fig. 1C, 2) 토끼 음경해면체 평활근에서 지속적인 전기자극으로 일으킨 비교적 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 마찬가지로 NO에 의하여 매개되리라고 사료된다. 이와같은 NO생합성 억제제에 의한 NANC이완반응의 억제작용은 토끼와 사람의 음경해면체 평활근 표본에서 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응에 대하여 입증된 바가 있다.^{4, 10, 11, 13-15, 17)} 또한 이들 NANC이완반응은 세포 밖에서 NO를 강력하게 포획하여 불활성화시키는 hemoglobin²⁹⁾에 의하여 농도의존적으로 억제되었으며, 고농도의 hemoglobin(60 μM)에 의해서도 억제되지 않고 남은 이완반응은 고농도의 L-NNA(100 μM)에 의하여 소실되었다(Fig. 3). 이와같이 짧은 전기자극이나 지속적인 전기자극으로 일으

킨 NANC이완반응이 고농도의 L-NNA(100 μM)에 의해서는 소실되고 고농도의 hemoglobin(60 μM)에 의하여 완전히 억제되지 않는 것은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응이 NO생성에 의하여 매개되나 hemoglobin의 분자가 크기 때문에 전기자극시 NO가 신경근접합부에 유리된 부위나 생성된 부위에 접근하기 어렵기 때문이라 추정되어진다.¹⁴⁾ 또한 짧은 전기자극이나 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 guanylate cyclase억제제인 methylene blue^{29, 30)}에 의해서도 현저하게 억제되었으므로 (Fig. 4) 토끼 음경해면체 평활근의 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼^{4, 13, 14, 17)} NO-cyclic GMP경로에 의하여 매개되리라 사료된다. 한편 외부에서 투여한 NO의 이완반응은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 비슷한 농도의존성 이완반응을 일으켰고, 이 이완반응은 L-NNA에 의해서는 영향을 받지 않았으나 hemoglobin(20 μM)에 의하여 소실되었으므로 (Fig. 5B 및 9) NANC이완반응은 NO의 매개에 의하여 초래된 현상이라고 추정되어진다.¹⁷⁾

종래 VIP가 음경해면체 평활근에서 NANC신경의 전달물질이라는 많은 보고^{5, 6, 8, 9, 31-33)}가 있고, 최근 Kim 등¹⁶⁾은 VIP가 음경해면체의 NANC이완반응에 기여하며, NO합성이 VIP매개 NANC이완반응에 관여한다고 보고하였다. 한편 Pickard 등¹²⁾은 사람의 음경해면체 조직에서 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응이 VIP를 불활성화시키는 단백질분해효소인 α-chymotrypsin에 의하여 영향을 없었으며, VIP가 일으킨 이완반응이 NO생합성 억제제인 L-NNA와 guanylate cyclase억제제인 methylene blue에 의하여 영향을 없었음을 관찰하고 사람의 음경해면체의 NANC이완반응시에 VIP가 유리되지 않으며, VIP가 이 조직에서 NANC이완반응을 일으키는 주된 신경전달물질로서 작용하지 않으리라 추정하였으며, Holmquist 등¹⁵⁾은 토끼 음경해면체에서 VIP에 의한 이완작용이 L-NNA에 의하여 유의하게 억제되지 않음을 시사한 바 있다.

본 실험에서 짧은 전기자극이나 지속적 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응이 L-NNA에 의하여 소실되었고, 이 L-NNA의 억제작용은 과량의 L-arginine에 의하여 반대되었으므로 지속적 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응처럼 NO에 의하여 매개됨을 시사하였다. 또

한 이들 NANC이완반응은 세포 밖에서 NO를 불활성화시키는 hemoglobin과 cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의하여 억제되었으므로 토끼 음경해면체의 신경근 표본의 NANC이완반응은 NANC신경에서 생성된 NO가 세포밖으로 유리되어 해면체 세포에서 cyclic GMP를 생성하여 매개하는 NO-cyclic GMP경로에 의하여 일어남을 시사하고 있다. 그러나 이 경로에서 NO가 VIP에 의해서도 음경해면체 평활근에서 생성되는 것인지에 관하여 논란이 되고 있다.^{12, 15, 16)} 본 연구에서는 이들 논란을 해명하기 위하여 NANC신경의 추정 전달물질로서 보고되고 있는 VIP에 의한 이완반응과 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응에 대하여 단백분해효소인 α -chymotrypsin과 NO생합성 억제제인 L-NNA의 영향을 검토하였다. 저빈도(2~16 Hz)의 짧은 전기자극에 의하여 일으킨 NANC이완반응은 일과성인 이완반응을 일으켰고 지속적인 전기자극으로 일으킨 비교적 지속적인 NANC이완반응도 자극이 끝났을 때는 원상으로 회복되는데 비하여 VIP(0.001~1 μ M)는 농도의존적 이완반응을 일으켰으나 작용 개시가 늦고 지속 시간이 길고 반응의 크기가 작은 원상으로 회복되지 않는 이완반응을 일으켰다(Fig. 5A). 이들 이완반응에 대하여 단백분해효소인 α -chymotrypsin(2 units/ml)을 전처치하였을 때 전기자극으로 일으킨 이완반응에는 영향을 미치지 않았으나 외부에서 투여한 VIP에 의한 이완반응은 소실되었다(Fig. 1B, 6 및 7). 이들 실험결과로써 토끼 음경해면체의 NANC이완반응도 사람의 음경해면체에서 처럼¹²⁾ VIP의 유리에 의존하지 않음을 시사하고 있다. 또한 NO생합성 억제제인 L-NNA를 전처치하였을 때는 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 거의 소실되었으나 외부에서 투여한 VIP의 이완반응에는 영향을 미치지 않았으므로(Fig. 5A 및 8), 토끼 음경해면체 평활근에서 NANC이완반응시 VIP가 NO를 생성할 가능성은 없는 것으로 사료된다.

한편 전보에 의하면 음경의 견인근(retractor penis muscle)에서 NANC신경을 전기적으로 자극하였을 때 조직내의 cyclic GMP 농도는 증가되었으나 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cyclic AMP) 농도는 변화되지 않았으며, 외부에서 투여한 VIP는 같은 조직에서 cyclic AMP농도의 증가와 이완작용을 동시에 일으켰다고 하였다.³⁴⁾ 이와같은 결과를 종합하여 볼 때 VIP는 토끼 음경해면체 평활근의 NANC이완반

응시에 유리되거나 NO생합성에 관여하지 않으리라 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 토끼 음경해면체 평활근의 지속적인 전기자극으로 일으킨 비교적 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 마찬가지로 주로 NO-cyclic GMP경로에 의하여 매개되리라고 사료되며, VIP유리가 토끼 음경해면체의 NANC이완반응에 중요한 역할을 하지 않으며, 그리고 VIP는 NO생성에 관여하지 않으리라 사료된다.

결 론

토끼 음경해면체 평활근에 짧은 전기자극을 하거나 지속적인 전기자극을 하였을 때 일으킨 비-아드레날린 비-콜린성(NANC)이완반응에 대하여 N^G -nitro-L-arginine, hemoglobin, methylene blue 및 α -chymotrypsin의 영향을 검토하고, 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 외부에서 투여한 nitric oxide(NO)와 vasoactive intestinal polypeptide(VIP)의 반응에 대한 L-NNA의 영향을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 토끼 음경해면체 평활근을 atropine(1 μ M)과 guanethidine(5 μ M) 존재하에서 저빈도(2~16 Hz)의 짧은 전기자극과 지속적인 전기자극을 하였을 때 자극빈도에 의존하는 일과성인 빠른 이완반응과 비교적 지속적인 이완반응을 일으켰으며, 이들 반응은 신경전도 차단제인 tetrodotoxin(0.3 μ M)에 의하여 소실되었다.
2. NO생합성 억제제인 N^G -nitro-L-arginine (L-NNA: 10~100 μ M)은 짧은 전기자극이나 지속적인 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응을 농도의존적으로 억제하였으며, 높은 농도의 L-NNA(100 μ M)에 의해서는 이들 NANC이완반응이 거의 소실되었다. 이들 L-NNA의 억제작용은 NO생합성 전구물질인 광량의 L-arginine(5 mM)에 의하여 역전되었다.
3. 세포 밖에서 NO를 포획하여 불활성화하는 hemoglobin(20~60 μ M)은 외부에서 투여한 NO의 이완반응을 소실시켰으며, 짧은 전기자극이나 지속적인 전기자극으로 일으킨 이완반응도 농도의존적으로 현저하게 억제하였고, 높은 농도의 hemoglobin(60 μ M)에 의하여서도 억제되지 않고 남아 있는 이완반응은 대량

의 L-NNA(100 μ M)에 의하여 소실되었다.

4. Guanylate cyclase 억제제인 methylene blue (50 μ M)는 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응을 현저하게 억제하였다.

5. 외부에서 투여한 VIP(0.001~1 μ M)는 농도의존성 이완반응을 일으켰으나 짧은 전기자극이나 지속적 전기자극으로 일으킨 이완반응에 비하여 반응 개시가 늦고 지속적이고 원상으로 회복되지 않는 약한 이완반응을 일으켰으며, 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응은 α -chymotrypsin에 의하여 유의한 영향을 받지 않았으나, 외부에서 투여한 VIP의 이완반응은 소실되었다.

6. 외부에서 투여한 NO(3~30 μ M)는 전기자극으로 일으킨 이완반응과 비슷한 짧은 일과성인 농도의존성 이완반응을 일으켰으며, 이들 이완반응은 L-NNA(100 μ M)에 의하여 영향을 받지 않았다.

7. L-NNA(100 μ M)는 전기적 자극으로 일으킨 이완반응을 소실시켰으나, 외부에서 투여한 VIP의 이완반응에는 영향이 없었다.

이상의 결과로서 토끼 음경해면체의 평활근에 지속적인 전기자극을 하였을 때의 비교적 지속적인 NANC이완반응도 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC이완반응과 마찬가지로 NO-cyclic GMP경로에 의하여 매개되며, NANC이완반응을 매개하는 추정 전달물질로 보고되고 있는 VIP는 토끼 음경해면체 평활근의 NANC이완반응시에 유리되거나 NO생합성에 중요한 역할을 하지 않으리라 사료된다.

문 헌

- 1) Saenz de Tejada, I., Blanco, R., Goldstein, I., Azadzo, K., Morenas, A., Krane, R. J. and Cohen, R. A. : Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am. J. Physiol.* **254** (Heart Circ. Physiol. 23), H459 (1988).
- 2) Saenz de Tejada, I., Goldstein, I., Azadzo, K., Krane, R. J. and Cohen, R. A. : Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1025 (1989).
- 3) Knispel, H. H., Goessl, C. and Beckmann, R. : Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. *J. Urol.* **146**, 1429 (1991).
- 4) Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., Wood, K. S., Fukuto, J. M. and Rajfer, J. : Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 2, 843 (1990).
- 5) Polak, J. M., Gu, J., Mina, S. and Bloom, S. R. : VIPergic nerves in the penis. *Lancet* **1**, 217 (1981).
- 6) Steers, W. D., McConnell, J. and Benson, G. S. : Anatomical localization and some pharmacological effects of vasoactive intestinal polypeptide in human and monkey corpus cavernosum. *J. Urol.* **132**, 1048 (1984).
- 7) Keast, J. F. and de Groat, W. C. : Immunocytochemical characterization of pelvic neurons which project to the bladder, colon or penis in rat. *J. Comp. Neurol.* **288**, 307 (1989).
- 8) Willis, E. A., Ottesen, B., Wagner, G., Sundler, F. and Fahrenkrug, J. : Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a putative neurotransmitter in penile erection. *Life Sci.* **33**, 381 (1983).
- 9) Ottesen, B., Wagner, G., Virag, R. and Fahrenkrug, J. : Penile erection : Possible role for vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter. *Br. Med. J.* **288**, 9 (1984).
- 10) Kim, N., Azadzo, K. M., Goldstein, I. and Saenz de Tejada, I. : A nitric oxide-like factor mediates non-adrenergic, non-cholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.* **88**, 112 (1991).
- 11) Pickard, R. S., Powell, P. H. and Zar, M. A. : The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 755 (1991).
- 12) Pickard, R. S., Powell, P. H. and Zar, M. A. : Evidence against vasoactive intestinal polypeptide as the relaxant neurotransmitter in human cavernosal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 497 (1993).
- 13) Rajfer, J., Aronson, W. J., Bush, P. A., Dorey,

- F. J. and Ignarro, L. J. : Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *New. Engl. J. Med.* **326**, 90 (1992).
- 14) Bush, P. A., Aronson, W. J., Rajfer, J. and Ignarro, L. J. : The L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway mediates inhibitory nonadrenergic-noncholinergic neurotransmission in the corpus cavernosum of human and rabbit. *Circulation* **87** [suppl V] : V30 (1993).
- 15) Holmquist, F., Hedlund, H. and Andersson, K. E. : Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J. Physiol.* **449**, 295 (1992).
- 16) Kim, Y. C., Kim, Y. H., Davies, M. G., Hagen, P-O and Carson, III, C. C. : Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostaglandins in the rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.* **158**, 807 (1995).
- 17) Bush, P. A., Aronson, W. J., Buga, G. M., Rajfer, J. and Ignarro, L. J. : Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.* **147**, 1650 (1992).
- 18) Adikan, P. G., Kottogoda, S. R. and Ratnam, S. S. : Is vasoactive intestinal polypeptide the principal transmitter involved in human penile erection? *J. Urol.* **135**, 638 (1986).
- 19) Fujiwara, M., Hong, S. C. and Muramatsu I. : Effects of goniopora toxin on non-adrenergic non-cholinergic response and purine nucleotide release in guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* **326**, 515 (1982).
- 20) Bowman, A. and Gillespie, J. S. : Block of some non-adrenergic inhibitory response of smooth muscle by a substance from hemolysed erythrocytes. *J. Physiol.* **328**, 11 (1982).
- 21) Simmons, A. : Technical hematology, 2nd ed. (J. B. Lippincott company, Philadelphia and Tronto), p.7 (1976).
- 22) Furchgott, R. F. : Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite : The basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *Vasodilation : Vascular smooth muscle, Peptides, Autonomic nerves and Endothelium*, ed. P. M. Vanhoutte, Raven Presses, New York, p.401 (1988).
- 23) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanaham, D. J. : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* **100**, 119 (1963)
- 24) Ishii, K. B., Chang, B., Kerwin, J. F. Jr., Hung, I. J. and Murad, F. : N^o-nitro-L-arginine : a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* **176**, 219 (1990).
- 25) Moore, P. K., Al-Swayhl, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R. A. and Gibson, A. : L-N^o-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 408 (1990).
- 26) Musch, A. and Busse, R. : N^o-nitro-L-arginine (N^o-[imino-(nitroamino) methyl]-l-ornithine) impairs endothelium-dependent dilatation by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **341**, 143 (1990).
- 27) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S. : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (1988).
- 28) Schmidt, H. H. H. W., Nan, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F. and Bohme, E. : Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **154**, 213 (1988).
- 29) Martin, W., Villani, G. M., Jothianadan, D. and Furchgott, R. F. : Selective blockage of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 708 (1985).
- 30) Marczin, N., Ryan, U. S. and Catravas, J. D. : Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**,

- 170 (1992).
- 31) Juenemann, K. -P., Lue, T. F., Lue, J. A., Jadal-
lah, S. A., Nunes, L. L. and Tanagho, E. A. :
The role of vasoactive intestinal polypeptide as a
neurotransmitter in canine penile erection : a
combined in vivo and immunohistochemical
study. *J. Urol.* **138**, 871 (1987).
- 32) Aoki, H., Matsuzaka, J., Yeh, K. -H., Sato, F.,
Fujioka, T., Kubo, T., Ohhori, T. and Yasuda,
N. : Involvement of vasoactive intestinal pep-
tide (VIP) as a humoral mediator of penile erec-
tile function in the dog. *J. Androl.* **15**, 2, 174
(1994).
- 33) Yeh, K. -H., Aoki, H., Matsuzaka, J., Ra, S.,
Sato, F., Fujioka, T., Ohhori, T., Kubo, T. and
Yasuda, N. : Participation of vasoactive in-
testinal polypeptide (VIP) as a humoral medi-
ator in the erectile response of canine corpus
cavernosum penis. *J. Androl.* **15**, 187 (1994).
- 34) Bowmann, A. and Drummond, A. H. : Cyclic
GMP mediates neurogenic relaxation in the bo-
vine retractor penis muscle. *Br. J. Pharmacol.* **81**,
665 (1984).