

KCl과 phenylephrine에 의한 대동맥 수축에서 Ca²⁺ 길항제와 protein kinase 억제제들의 비교 효과

심상수* · 문성원 · 이윤희 · 이정근 · 김현준 · 박진형 · 이준한 · 조중형 · 김창종

중앙대학교 약학대학

(Received June 24, 1999)

Comparative Effects of Ca²⁺ Antagonists and Protein Kinase Inhibitors on Rat Aorta Contraction Induced by KCl and Phenylephrine

Sang Soo Sim*, Sung Won Moon, Yun Hye Lee, Jung Keun Lee, Hyun Jun Kim, Jin Hyoung Park, June Han Lee, Jung Hyung Cho and Chang Jong Kim

College of Pharmacy, Chung-Ang University 221, Huksuk-Dong, Dongjak-Ku, Seoul 156-756

Abstract — To investigate the difference of contractile mechanism between KCl and phenylephrine-induced contraction, we observed effects of Ca²⁺ antagonists and protein kinase inhibitors on aorta contraction of rats. Verapamil dose-dependently inhibited the contraction induced by KCl and phenylephrine, the inhibitory effect of verapamil was more potent in KCl-induced contraction than phenylephrine-induced contraction. Econazole and TMB-8 significantly inhibited KCl-induced contraction but did not inhibit phenylephrine-induced contraction. Staurosporine dose-dependently inhibited both KCl and phenylephrine-induced contraction. Genistein and calmodulin antagonists (W-7 and trifluoperazine) also inhibited both contraction in a dose dependent manner. However, the inhibitory effects of genistein and calmodulin antagonists were more potent in phenylephrine-induced contraction than KCl-induced contraction. These results suggest that involvements of Ca²⁺ channel and protein kinase in rat aorta contraction were dependent on agonist causing aorta smooth muscle contraction.

Keywords □ Aorta contraction, calcium antagonists, protein kinase inhibitor.

신경전달물질이나 호르몬들은 자신의 세포막 수용체와 결합하여 phospholipase C를 활성화시키며, 이로 인한 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가는 근수축을 일으킨다.¹⁻⁴⁾ 또한 이들은 receptor-operated Ca²⁺ 통로를 활성화시키며, 이를 통한 세포외 Ca²⁺의 유입은 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시켜서 근수축을 일으키기도 한다.⁵⁻⁷⁾ 수용체를 통한 이러한 근수축 기전 외에도 흥분성 세포는 세포외액에 포함된 과량의 K⁺에 의하여 세포막 전압이 탈분극하며 이때 voltage-dependent Ca²⁺ 통로가 열림으로써 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가하게 되며

근수축이 일어난다.^{8,9)} 이와 같은 두 가지 기전 즉 수용체와 결합하는 기전과 막전압의 탈분극 기전에 의하여 유발되는 근수축들은 일반적으로 Ca²⁺ 통로 차단제들에 의해 억제되는데, 특히 voltage-dependent Ca²⁺ 통로 차단제들은 혈관이나 내장 평활근 수축을 강력하게 억제하는 것으로 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾

평활근의 수축은 Ca²⁺ 통로 차단제 뿐만 아니라 여러가지 protein kinase 억제제들에 의해서도 억제되는 것으로 미루어 볼때 평활근의 수축과 이완은 세포내 Ca²⁺과 protein kinase에 의하여 조절됨을 알수있다. histamine에 의한 기관지 평활근 수축이 protein kinase C 억제제에 의해 차단되며,¹³⁾ calmodulin 길항제는 acetylcholine에 의한 위평활근의 수축을 억제

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-821-7680

한다고 보고되었다.¹⁴⁾ protein kinase C 억제제 및 calmodulin 길항제 이외에도 tyrosine kinase 억제제인 genistein도 혈관평활근 수축을 억제한다는 보고가 있다.^{15,16)} 이와 같이 평활근 수축에는 protein kinase C, calmodulindependent pathway 및 tyrosine kinase가 관여하고 있음을 알 수 있다.

수용체를 통하여 근수축을 일으키는 물질들은 신호 전달 과정에서 phospholipase C를 거쳐 protein kinase C나 receptor tyrosine kinase를 활성화시킨다는 사실은 잘 알려져 있지만,^{17,18)} KCl이 근수축을 일으키는 과정에 어떠한 protein kinase들이 활성화되는지에 대하여는 알려진 바 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 흰쥐의 혈관 평활근에서 수축기전이 다른 KCl과 phenylephrine에 의한 수축에 있어서 Ca^{2+} 길항제 및 protein kinase 억제제들의 효과를 비교 관찰하였다.

실험방법

실험재료 - Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil, econazole, 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate(TMB-8)와 protein kinase C 억제제로서 staurosporine을, tyrosine kinase 억제제로서 genistein 및 calmodulin 길항제로서 W-7과 trifluoperazine을 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

등장성 수축 - 암수 구별없이 흰쥐(몸무게: 200~300g)로 부터 흉곽내 대동맥을 적출하여 지방조직 및 연결조직을 제거한후 링 형태로 근표본을 만들었다. 근수축을 기록하기 위하여 근표본을 유리 원통(용적: 10 ml)에 장치하였으며, 원통내에는 pH 7.4 이고 $36 \pm 0.5^{\circ}C$ 로 가온된 Krebs 용액 (mM: NaCl 120.8, KCl 4.5, $NaHCO_3$ 15.5, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.2, NaH_2PO_4 1.2, dextrose 5.6)을 넣었다. 한편 Krebs 용액의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 원통 주위를 $36.5^{\circ}C$ 의 물로 지속적으로 관류하였다. 원통내와 저장용 Krebs 용액은 95% O_2 와 5% CO_2 혼합 가스를 계속 공급하였다. 근표본의 한쪽 끝부위를 원통 밑바닥의 강철 철사 고리에 고정하고, 다른 쪽 끝부분을 실로써 force transducer(Grass FT 03, Quincy, MA, USA)에 연결한 후 이를 polygraph(Grass 7E)에 다시 연결하였다. 근표본은 2g의 장력을 가한 상태로 30 분 이상

원통내 용액속에 방치하여 용액과 평형상태를 이루게 한 후 100 mM KCl을 함유한 용액으로 교체하거나 1 μM phenylephrine을 가하여 수축을 일으켰다. 100 mM KCl 용액은 Krebs 용액 조성중 NaCl 대신 KCl로 해당하는 몰(M) 수를 대치하여 만들었다.

실험 약제의 처치 - calcium 통로 차단제와 protein kinase 억제제들의 효과를 관찰하기 위해서 100 mM KCl 용액과 1 μM phenylephrine에 의한 수축을 측정하여 대조군으로 간주하였다. 이후 KCl과 phenylephrine이 없는 Krebs 용액으로 3회 세척한후 여러 가지 Ca^{2+} 통로 차단제 및 protein kinase 억제제를 가하여 5분간 전처치하고 다시 100 mM KCl과 1 μM phenylephrine을 가하여 수축을 일으켰다. calcium 통로 차단제와 protein kinase 억제제들에 의한 수축의 억제는 % inhibition $[(1 - \text{약물을 전처치한 군의 수축 크기} / \text{대조군의 수축 크기}) \times 100]$ 으로 표시하였다.

자료분석 및 통계 검정 - 실험값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 실험 성적은 t-검정(non-paired Student's t test)으로써 분석하였으며, P 값이 5% 미만 일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

Ca^{2+} 길항제의 효과 - KCl과 phenylephrine에 의한 대동맥의 수축에 대하여 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차

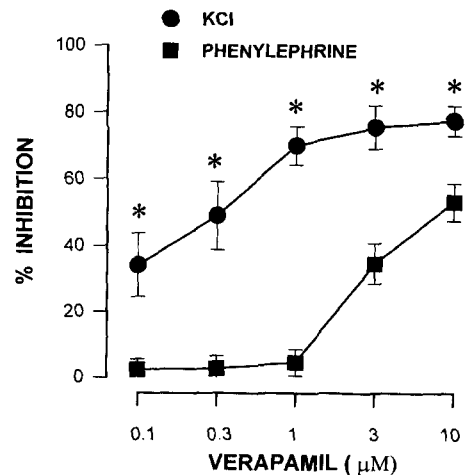


Fig. 1 - Effect of verapamil on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means \pm S.D. of six experiments. * $P < 0.05$ vs. phenylephrine-induced contraction.

단제인 verapamil¹⁹⁾ 영향을 관찰하였다. verapamil은 농도에 비례하여 KCl과 phenylephrine의 수축을 억제하였으며 같은 농도에 있어서 phenylephrine보다는 KCl에 의한 근수축을 유의하게 더 억제하였다(Fig. 1). receptor-operated Ca^{2+} channel을 차단하는 것으로 알려진 econazole은^{20,21)} KCl에 의한 대동맥의 수축은 농도에 비례하여 억제하였으나 phenylephrine에 의한 수축에는 이렇다할 영향을 주지 않았다(Fig. 2). 한편 세포내 Ca^{2+} 유리를 차단하는

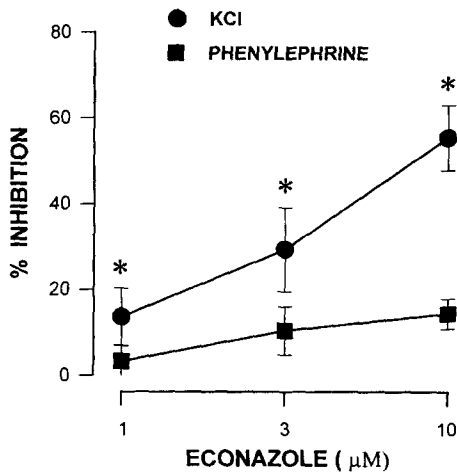


Fig. 2 - Effect of econazole on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments. * P<0.05 vs. phenylephrine-induced contraction.

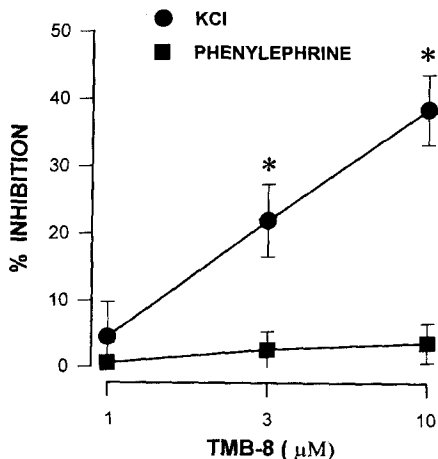


Fig. 3 - Effect of TMB-8 on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments. * P<0.05 vs. phenylephrine-induced contraction.

TMB-8은²²⁾ KCl에 의한 근수축을 농도에 비례하여 억제하였으나 phenylephrine에 의한 근수축에는 이렇다할 영향을 주지 않았다(Fig. 3). 이상의 결과를 종합하여 보면 KCl에 의한 근수축은 다양한 Ca^{2+} 길항제에 의해 억제되지만 phenylephrine에 의한 근수축은 verapamil에 의해서만 억제되고 econazole이나 TMB-8에 의해서는 영향을 받지 않았다.

KCl에 의한 근수축 기전은 세포막 전압이 탈분극되므로써 voltage-dependent Ca^{2+} 통로가 열리며 세포외 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되므로써 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하며 근수축이 일어난다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.¹⁰⁻¹²⁾ 세포내 Ca^{2+} 유리를 차단하는 TMB-8이 KCl에 의한 근수축을 억제하였는데 이러한 결과는 토끼의 대동맥에서도 같은 결과가 보고되었다.²²⁾ 그러나 고양이 위평활근에서 TMB-8은 KCl에 의한 근수축에는 영향을 주지 않고 acetylcholine에 의한 근수축은 억제하였다는 보고가²³⁾ 있는데 이러한 차이점은 종과 조직의 특이성의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Protein kinase 억제제들의 영향 - KCl과 phenylephrine에 의한 근수축에 동원되는 protein kinase가 다른 지를 알아보기 위하여 protein kinase C 억제제인 staurosporine과 tyrosine kinase 억제제인 genistein 및 calmodulin 길항제인 W-7과 trifluoperazine을 전처치하여 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였다. staurosporine

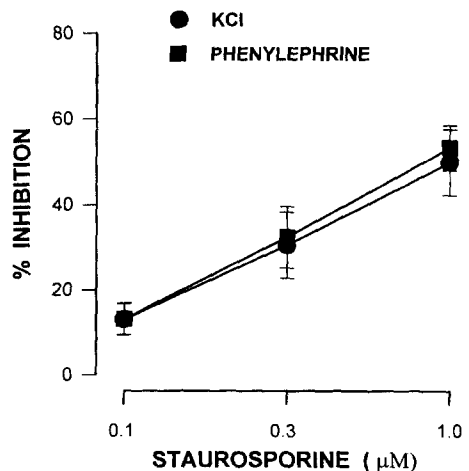


Fig. 4 - Effect of staurosporin on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments.

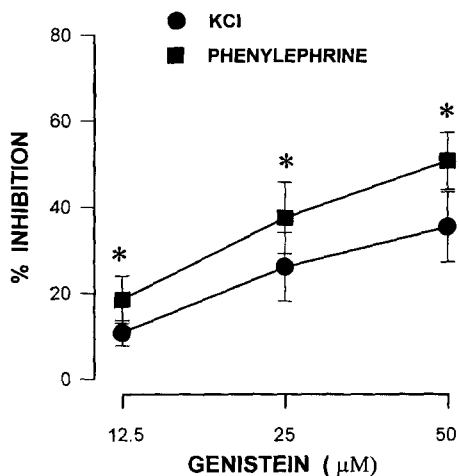


Fig. 5 - Effect of genistein on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments. * P<0.05 vs. KCl-induced contraction.

은 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축을 모두 농도에 비례하여 억제하였으나 두 군사이에 있어서 억제효과의 차이는 없었다(Fig. 4). genistein도 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축을 농도에 비례하여 억제하였으며, 같은 농도에서 genistein의 억제효과는 phenylephrine에 의한 근수축에서 유의하게 크게 나왔다(Fig. 5). calmodulin 길항제인 W-7과 trifluoperazine은 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축을 모두 농도에 비례하여 억제하였다(Figs. 6 & 7). 그러나 calmodulin 길항제는 KCl에 의한 근수축을 50% 이하로 억제하지만 phenylephrine에 의한 근수축은 80% 정도 억제하였으며 같은 농도에서 비교시 KCl에 의한 근수축보다는 phenylephrine에 의한 근수축에서 유의한 억제효과를 나타냈다.

Ca²⁺ 길항제의 효과와 마찬가지로 protein kinase 억제제들의 효과도 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축에 미치는 영향이 다르게 나타나고 있다. 위평활근에서 protein kinase C 억제제인 H-7과 bisindolmaleimide 및 tyrosine kinase 억제제인 genistein과 dihydroxycinnamate는 KCl에 의한 근수축을 억제하였으나 calmodulin 길항제는 아무런 영향도 미치지 않는다는 보고로²³⁾ 미루어 볼 때 조직과 종 특이성이 있는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축시 동원되는 protein kinase는 protein kinase C와 tyrosine kinase

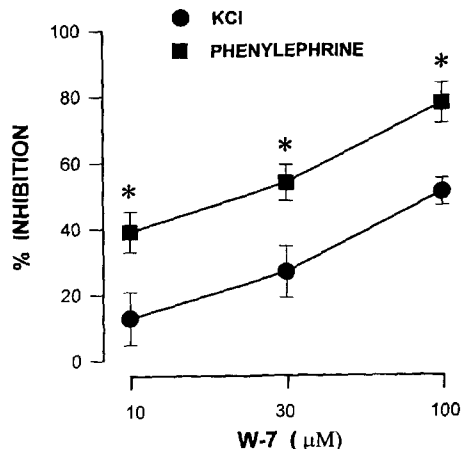


Fig. 6 - Effect of W-7 on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments. *P<0.05 vs. KCl-induced contraction.

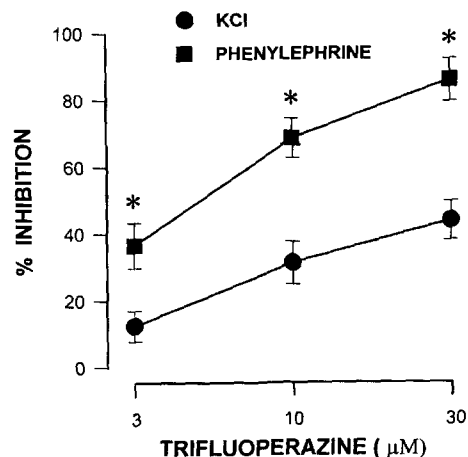


Fig. 7 - Effect of trifluoperazine on aorta contraction induced by 100 mM KCl and 1 μM phenylephrine-induced contraction. Results are means±S.D. of six experiments. * P<0.05 vs. KCl-induced contraction.

및 calmodulin-dependent pathway 모두가 관여하고 있음을 알 수 있다. 그러나 protein kinase가 근수축에 관여하는 정도는 근수축을 일으키는 작동제에 따라 다르다는 것을 짐작할 수 있다.

결론

흰쥐의 혈관 평활근에서 수축기전이 다른 KCl과 phenylephrine에 의한 수축에 있어서 Ca²⁺ 길항제

및 protein kinase 억제제들의 효과를 비교 관찰하였다. KCl에 의한 근수축은 verapamil, econazole 및 TMB-8에 의해 유의하게 억제되었으나 phenylephrine에 의한 근수축에서는 verapamil 만이 억제하였다. protein kinase C 억제제와 tyrosine kinase 억제제 및 calmodulin 길항제에 의해 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축이 모두 억제되었으며, 이중 tyrosine kinase 억제제와 calmodulin 길항제의 작용이 KCl에 의한 근수축 보다는 phenylephrine에 의한 근수축에서 억제효과가 크게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 KCl과 phenylephrine에 의한 근수축에 동원되는 Ca^{2+} 의 통로와 근수축에 관여하는 protein kinase는 다르다는 것을 알 수 있다.

문 헌

- 1) Baron, C. B., Cunningham, M., Strauss III, J. F. and Coburn, R. F.: Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **81**, 6899 (1984).
- 2) Takuwa, Y., Takuwa, N. and Rasmussen, H.: Carbachol induces a rapid and sustained hydrolysis of polyphosphoinositide in bovine tracheal smooth muscle measurements of the mass of polyphosphoinositides, 1,2-diacylglycerol, and phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **261**, 14670 (1986).
- 3) Duncan, R. A., Krzanowski, J. J., Davis, J. S., Polson, J. B., Coffey, R. G., Shimoda, T. and Szentivanyi, A.: Polyphosphoinositide metabolism in canine tracheal smooth muscle (CTSM) in response to a cholinergic stimulus. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 307 (1987).
- 4) Sim, S. S., Jo, Y. H., Hahn, S. J., Yoon, S. H., Rhie, D. J. and Kim, M. S.: H1 receptor mediates inositol phosphates response to histamine in gastric smooth muscle of guinea pigs. *Scand. J. Gastroenterol.* **28**, 69 (1993).
- 5) Somlyo, A. V., Bond, M., Somlyo, A. P. and Scarpa, A.: Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **82**, 5231 (1985).
- 6) Ozaki, H., Stevens, R. J., Blondfield, D. P., Puvlicover, N. G. and Sanders, K. M.: Simultaneous measurement of membrane potential cytosolic Ca^{2+} , and tension in intact smooth muscles. *Am. J. Physiol.* **260**, C917 (1991).
- 7) Ohta, T., Kawai, K., Ito, S. and Nakazato, Y.: Ca^{2+} entry activated by emptying of intracellular Ca^{2+} stores in ileal smooth muscle of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 1165 (1995).
- 8) Vogalis, F., Publicover, N. G., Hume, J. R. and Sanders, K. M.: Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **260**, C1012 (1991).
- 9) Kageyama, M., Yanagisawa, T. and Taira, N.: Effects of semotiadil fumarate, a novel Ca^{2+} antagonist, on cytosolic Ca^{2+} level and force of contraction in porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 1289 (1991).
- 10) Benham, C. D., Hess, P. and Tsien, R. W.: Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ. Res.* **61**, 110 (1987).
- 11) Chijiwa, Y., Harada, N., Misawa, T., Yoshinaga, M., Kabemura, T. and Nawata, H.: The direct contractile effect of gastrin releasing peptide on isolated gastric smooth muscle cells of the guinea pig. *Life Sci.* **49**, PL173 (1991).
- 12) Hagiwara, S., Mitsui, M. and Karaki, H.: Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **234**, 1 (1993).
- 13) Yang, K. X. F. and Black, J. L.: The involvement of protein kinase C in the contraction of human airway smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **275**, 283 (1995).
- 14) Hillemeier, C., Bitar, K. N., Marshall, J. M. and Biancani, P.: Intracellular pathways for contraction in gastroesophageal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **260**, G775 (1991).
- 15) Laniyonu, A. A., Saifeddine, M., Yang, S. G. and Hollenberg, M. D.: Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of G-protein-linked vascular agonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 1985 (1994).
- 16) Jinsi, A. and Deth, R. C.: α_2 -Adrenoceptor-mediated vasoconstriction requires a tyrosine kinase. *Eur. J.*

- pharmacol.* **277**, 29 (1995).
- 17) Nishizuka, Y. : The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**, 693 (1984).
- 18) Force, T., Kyriakis, J. M., Avruch, J. and Bonventres, J. V. : Endothelin, vasopressin and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 6650 (1991).
- 19) Catterall, W. A. and Striessnig, J. : Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *TIPS*. **13**, 256 (1992).
- 20) Mason, M. J., Mayer, B., and Hymel, L. J. : Inhibition of Ca^{2+} transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole, and SKF 96365. *Am. J. Physiol.* **264**, C654 (1993).
- 21) Alvarez, Z., Montero, M., and Gaecia-Sancho, J. : Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* **274**, 193 (1991).
- 22) Ishihara, H., and Karaki, H. : Inhibitory effect of 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB-8) in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **197**, 181 (1991).
- 23) Sim, S. S., Kim, S. R., Shim, H. S., Rhie, D. J., Hahn, S. J., Yoon, S. H., Jo, Y. H., and Kim, M. S. : Regulation of protein kinase in KCl-induced contraction of cat gastric smooth muscle. *Kor. J. Gastroenterol.* **32**, 290 (1998).