

# 기니피그 유문부 운상근의 자발적 수축 및 서파에 대한 nitric oxide의 억제적 작용과 Ca<sup>2+</sup> 및 K<sup>+</sup> 통로의 관련성

김태완 · 라준호 · 양일석\*  
서울대학교 수의과대학 생리학교실  
(2001년 9월 30일 게재승인)

## Involvement of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels in the action of NO on gastric circular muscle

Tae-wan Kim · Jun-ho La · Il-suk Yang\*

Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Accepted September 30, 2001)

**Abstract :** It was investigated whether Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels were involved in the inhibitory action of nitric oxide (NO) on the contractile and slow wave activity of guinea pig gastric antral circular muscle.

The gastric antral circular muscle showed spontaneous phasic contraction and slow wave. NO donors, 3-morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1, 0.01~100  $\mu$ M) and S-nitroso-L-cysteine (CysNO, 0.001~10  $\mu$ M), reduced not only the amplitude of phasic contraction but also that of slow wave in a concentration-dependent manner. Both the perfusion of Ca<sup>2+</sup>-free solution and the administration of Ni<sup>2+</sup>, a nonselective Ca<sup>2+</sup> channel blocker, reduced the phasic contraction as well as the amplitude and frequency of the slow wave. The effects of these treatments were similar to those of NO donors. Nifedipine (10  $\mu$ M), a specific L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, abolished the phasic contraction and remarkably reduced the plateau of slow wave but had no profound effect on the upstroke of slow wave. In the whole-cell patch clamp mode, CysNO shifted the steady-state activation curve for L-type Ca<sup>2+</sup> current to the right and the steady-state inactivation curve to the left. Pretreatment of various K<sup>+</sup> channel blockers such as tetraethylammonium (1 mM), 4-aminopyridine (0.5 mM), glibenclamide (10 mM), apamin (0.1  $\mu$ M), and iberiotoxin (0.1  $\mu$ M) did not affect the inhibitory action of SIN-1.

These results suggest that NO donors suppress mechanical and electrical activity of guinea pig gastric antral circular muscle by inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channel rather than by activation of K<sup>+</sup> channels.

**Key words :** guinea pig, gastric antrum, nitric oxide, slow wave, Ca<sup>2+</sup> channel, K<sup>+</sup> channel

### 서 론

위장관 평활근의 자발적이고 율동적인 위상성 수축은 평활근 세포 막전압의 느리고 주기적인 탈분극 및 재분극 현상(서파, slow wave)에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>.

서파는 위장관의 향도잡이 세포인 interstitial cell of Cajal (ICC)에서 발생하며, 이 세포의 자발적이고 율동적인 전기적 활동이 gap junction을 통해 평활근 세포에 전달됨으로써 위장관의 평활근 전체가 조화된 율동성을 나타낸다고 보고되었다<sup>2</sup>.

이 논문은 서울대학교 발전기금 일반학술연구비와 수의과대학 부속 수의과학연구소 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

\* Corresponding author: 경기도 수원시 권선구 서둔동 서울대학교 수의과대학 생리학교실 441-744

Tel : 031-290-2740 Fax : 031-291-0536 e-mail : isyang@snu.ac.kr

서파의 발생기전에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않으나, 세포외액의  $Ca^{2+}$ 을 제거할 경우 그 활동이 현저히 억제되고<sup>3</sup>, 서파의 시간적 경과와  $[Ca^{2+}]_i$  변화의 시간적 경과가 거의 유사하며<sup>1</sup>,  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  통로 억제제에 의해 서파의 지속시간이 길어진다는 것<sup>4</sup> 등이 관찰되었다. 이는  $Ca^{2+}$  통로 및  $K^+$  통로가 서파를 발생시키거나 조절하는 데 있어 중요한 이온 통로임을 시사한다.

서파는 위장관 평활근에서 나타나는 자발적인 현상이지만 크기, 지속시간 및 빈도 등은 신경에 의해 조절된다고 보고되고 있다. 본 실험자들 또한 억제성 신경전달물질인 nitric oxide (NO)에 의해 기니피그 위 유문부 윤상근에서 관찰되는 서파가 억제됨을 보고하였는 바, 이 조직에서 NO는 cGMP 매개 경로를 경유하여 서파의 upstroke 및 plateau를 현저히 감소시켰다<sup>5</sup>. NO는 생체내의 대표적인 억제성 신경전달물질로서  $[Ca^{2+}]_i$ 를 저하시켜 각종 평활근의 이완을 유발한다고 알려져 있는데<sup>6</sup>, NO에 의한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소는 일부 ' $Ca^{2+}$  유입의 억제'에 기인하며, 이 경우 NO가  $Ca^{2+}$  통로를 직접 억제하거나<sup>7</sup> 또는  $K^+$  통로를 활성화시켜 세포막을 과분극시킴으로써 간접적으로 세포내로의  $Ca^{2+}$  유입을 억제한다고 보고되었다<sup>8</sup>.

서파의 발생 및 조절에 있어  $Ca^{2+}$  통로 및  $K^+$  통로가 중요한 이온 통로임을 밝힌 기존의 보고들과, 평활근에 대한 NO의 작용 기전을 제시한 상기 연구결과들을 종합할 때, 서파에 대한 NO의 억제적 작용이  $Ca^{2+}$  통로의 억제나  $K^+$  통로의 활성화에 의한 것일 수 있다는 가능성이 제기된다. 따라서, 기존의 연구에서 NO 공여물질이 서파 및 위상성 수축을 모두 억제한다고 밝혀진 기니피그 위 유문부 윤상근을 대상으로 이러한 가설을 검증해 보고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물 및 평활근 절편의 제작** : 체중 200-350 g의 기니피그 수컷을 사용하였으며, 둔기로 후두부를 강타하여 기절시킨 후 경정맥을 절단하여 실험시키고, 위 유문부를 분리하였다. Krebs 용액이 담긴 넓은 초차용기에서 위 유문부의 점막층을 제거한 후 윤상근 방향을 따라  $2 \times 6$  mm 크기의 절편을 만들었다. 이때 Krebs 용액에 혼합가스 (95%  $O_2 + 5\%$   $CO_2$ )를 계속 공급하였다.

**근장력과 세포막전압의 측정** : 평활근의 장력과 세포막전압을 세포내 유리미세전극법 (intracellular microelectrode technique)을 이용하여 동시에 기록하였다. 2ml 용량의 수평형 조직배양 수조 내에 위치한 sylgard plate에 절편의 한쪽 절단 정도를 핀으로 고정시켜 전극삽입을 용이하게 하였고,

다른 쪽은 고리를 만들어 등척성 근수축변환기 (MLT-100, AD Instruments, Australia)에 연결하여 0.5 g의 기본장력을 가하였다. 핀으로 고정된 부분의 평활근에 유리미세전극을 삽입하여 평활근의 세포막전압을 측정하였다. 유리미세전극은 3M KCl로 채운 후 tip 저항이 30~80 MΩ인 것을 사용하였으며, 유리전극에서 오는 신호는 표준 electrometer인 Duo 773 (World Precision Instruments, USA)을 통해 기록하였다. 유리미세전극으로부터 오는 세포의 전기적 신호는 근수축변환기로부터 오는 기계적 신호와 함께 데이터 통합장치인 MacLab/2e (AD Instruments, Australia)를 통해 동시에 기록하였으며, 매킨토시 LC III 컴퓨터와 Chart 3.51 소프트웨어를 이용하여 데이터를 기록, 저장하였다.

혼합가스 (95%  $O_2 + 5\%$   $CO_2$ )를 주입시키고 미리 가온한 용액 (pH 7.4)을 peristaltic pump를 이용하여 수조 안으로 일정한 속도(1.6 ml/min)로 계속적으로 관류시켰으며, 수조 안의 온도를  $37 \pm 0.5$  °C로 유지시켰다.

**단일 평활근 세포의 분리** : 안과용 가위를 이용하여 유문부의 윤상근만을 분리한 후 2~3mm의 크기로 작게 잘랐다. 이러한 조각들을 4°C의 변형된 Kraft-Bröhe (K-B) 용액<sup>9</sup>에서 30분간 배양시킨 후 다시 35°C의 소화효소 용액에서 15~25분간 배양시켰다. 소화효소 용액으로는 0.1% collagenase (Wako), 0.05% dithiothreitol, 0.1% trypsin inhibitor, 0.2% bovine serum albumin (fatty acid free)을 함유한,  $Ca^{2+}$ 이 제거된 생리적 완충용액을 사용하였다. 소화가 끝난 후 상층액은 버리고 부드러운 근육조각을 다시 변형된 K-B 용액으로 옮긴 후, 피펫을 이용하여 용액을 부드럽게 상하운 동시켜 단일 평활근 세포가 떨어져 나오게 하였다. 분리된 위 평활근 세포는 4°C의 K-B 용액에서 사용할 때까지 냉장 보관하였다. 모든 실험은 단일 세포를 분리한 후 12시간 이내에 실온에서 실시하였다.

**막전압 고정법을 이용한  $Ca^{2+}$  전류의 기록** : 분리된 세포를 도립현미경 (Diaphot 300, Nikon, Japan)의 재물대에 있는 작은 chamber에 옮긴 후 생리적 완충용액을 2~3 ml/min의 속도로 관류시켰다. tip 저항이 2~5 MΩ인 유리미세전극을 이용하여 5~10 GΩ의 sealing을 이룬 후 whole-cell patch clamp mode에서 막전압 고정증폭기인 Axopatch-1D (Axon instrument, USA)를 이용하여 막전류를 기록하였으며, IBM 호환성 486 컴퓨터와 pClamp 소프트웨어 v.6.0.1을 이용하여 데이터를 저장 및 분석하였다. 데이터는 디지털 오실로스코프 (PM 3350, Philips, USA)와 컴퓨터 모니터를 이용하여 관측하였다.

**사용약물의 조제와 보관** : 본 실험에서 사용한 약물은

다음과 같다.

3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1, RBI), sodium nitrite (Avondale Laboratories), L-cysteine (Sigma), apamin (Sigma), tetraethylammonium (TEA, Sigma), 4-aminopyridine (Sigma), iberiotoxin (RBI), glibenclamide (Sigma), nifedipine (RBI).

nifedipine은 ethanol에 녹였고 나머지 시약들은 증류수에 녹여서 0.1~100 mM의 stock 용액을 만든 후 실험 전에 배양용액으로 희석하여 최종 농도가 되게 하였다. S-nitroso-L-cysteine (CysNO)은 Barbier와 Lefebvre<sup>10</sup>가 제시한 방법에 따라 직접 조제하여 사용하였다.

장력과 서파 기록에 사용한 Krebs 용액은 NaCl 118, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 2.5, glucose 11 (mM)로 조성되었으며 HCl을 이용하여 pH를 7.4로 보정하였다. 단일세포 분리에 사용한 Ca<sup>2+</sup>-free 용액은 NaCl 131, KCl 4.5, glucose 5, N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid] (HEPES) 10 (mM)으로 조성되었으며, tris[hydroxymethyl] aminomethane (TRIZMA)를 이용하여 pH를 7.4로 보정하였다. 변형된 K-B 용액은 L-glutamate 50, KCl 50, taurine 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20, MgCl<sub>2</sub> 3, glucose 10, HEPES 10, ethyleneglycol bis-(β-aminoethyl ether-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) 0.5 (mM)로 조성되었으며 KOH를 이용하여 pH를 7.4로 보정하였다. Patch clamp 실험에서 사용한 Tyrode 용액은 NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.0, glucose 10, MgCl<sub>2</sub> 1.0, HEPES 5 (mM)로 조성되었으며 TRIZMA를 이용하여 pH를 7.4로 보정하였다. Ca<sup>2+</sup> 전류 기록을 위한 피펫 용액은 CsCl 135, MgCl<sub>2</sub> 4, HEPES 10, Na<sub>2</sub>ATP 2, EGTA 10 (mM)으로 조성되었으며 CsOH를 이용하여 pH를 7.3으로 보정하였다.

**자료분석 및 통계 :** 한 개의 위상성 수축 또는 서파의 크기를 자료로 사용하지 않고, 약물 투여 전과 후의 3개 또는 5개의 연속된 위상성 수축과 이에 상응하는 서파의 최고 크기를 각각 평균하여 자료로 사용하였으며, 약물 투여 후의 평균값을 투여 전의 값에 대한 백분율 (%)로 계산하여 mean ± s.e.m.으로 나타내었다.

NO 공여물질이 Ca<sup>2+</sup> 전류에 미치는 영향을 확인하기 위해, NO 존재하에서 측정된 Ca<sup>2+</sup> 전류의 활성화곡선 (activation curve)과 비활성화곡선 (inactivation curve)을 NO 투여 전에 측정한 곡선과 비교하여 분석하였다. 막전압을 -70 mV로 고정시킨 후 +10 mV씩 증가시키면서 5초 간격으로 300 ms 동안 자극하였을 때 나타나는 Ca<sup>2+</sup> 전류를 기록하여 Ca<sup>2+</sup> 전류의 전류-전압곡선을 구하였고, Ca<sup>2+</sup> 전류의 전류-전압곡선으로부터 활성화곡선을 얻었다.

비활성화곡선을 구하기 위하여는 double-pulse protocol을 이용하였다. 4초 동안 일정한 막전압으로 고정하여 각각의 막전압에서 Ca<sup>2+</sup> 전류의 비활성화를 유도한 후 일시적으로 -70 mV에서 테스트 전압인 +10 mV로 300 ms동안 자극을 주었을 때 나타나는 전류를 기록하였다. 막전압 고정에 의해 비활성화를 유도하는 자극은 -70 mV에서 60 mV까지 10 mV씩 증가시키면서 10초 간격으로 실시하였다. Test pulse에 의해 기록된 Ca<sup>2+</sup> 전류의 값을 구한 후 최대 크기의 전류를 기준으로 표준화한 후(I/I<sub>max</sub>), 각각의 prepulse 전압에 대해 그 값을 표시하였다. 활성화곡선 및 비활성화 곡선은 구해진 각 값을 Boltzmann 방정식을 이용하여 fit 하였다.

실험결과와 통계적 유의성을 검정하기 위해 Student t-test를 사용하였으며, P<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### III. 결과

#### 1. 기니피그 위 유문동 윤상근의 자발적 수축 및 서파에 대한 NO 공여물질의 작용

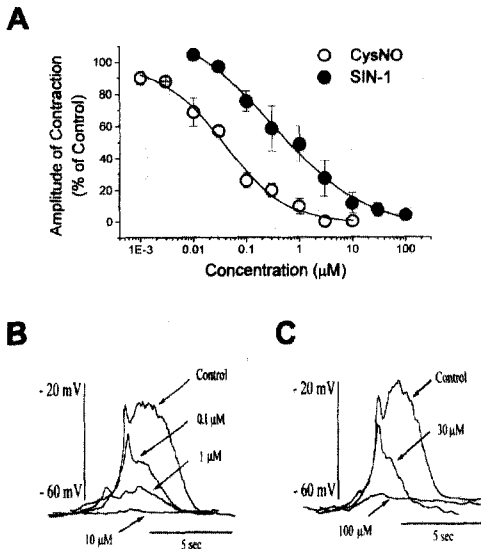
기니피그 위 유문동 윤상근 절편은 분당 5.1±0.2회의 주기적인 자발적 수축과 서파를 나타내었다. 안정막전압은 -62.2±0.75 mV였고, 서파의 크기는 평균적으로 35.9±0.8 mV인 것으로 나타났다 (n=46).

NO 공여물질로 알려진 S-nitroso-L-cysteine (CysNO, 0.001~10 μM)과 3-morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1, 0.01~100 μM)는 농도의존적으로 위상성 수축의 크기 및 서파의 지속시간, upstroke 및 plateau의 크기를 감소시켰다 (Fig 1).

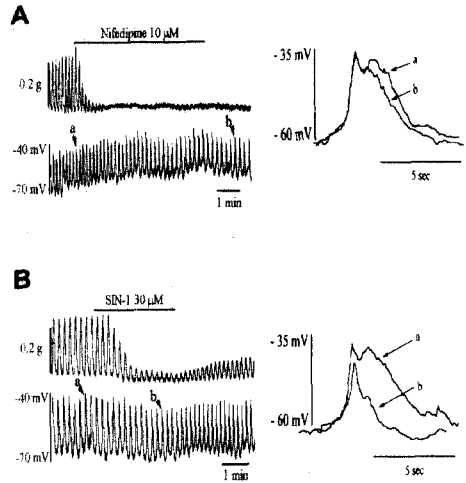
#### 2. Ca<sup>2+</sup> 통로 관련여부 확인

기니피그 위 유문부 윤상근의 자발적 수축과 서파에 대한 NO 공여물질의 억제적 작용이 Ca<sup>2+</sup> 통로 억제효과에 기인한 것인지 알아보기 위해, 먼저 세포의 Ca<sup>2+</sup>에 대한 서파의 의존성을 확인해 보았다. Ca<sup>2+</sup>-free solution을 관류시켰을 때 위상성 수축과 서파의 크기가 현저하게 감소되었으며, 아울러 서파의 빈도 역시 현저하게 감소하였다 (Fig 2A). 비선택적으로 Ca<sup>2+</sup> 통로를 억제하는 Ni<sup>2+</sup> (1 mM) 또한 위상성 수축과 서파의 크기 및 빈도를 감소시켰다 (Fig 2B). 서파의 모양변화를 보면, Ca<sup>2+</sup>-free solution과 Ni<sup>2+</sup>에 의해 서파의 upstroke, plateau의 크기와 지속시간 등이 모두 감소되었다. 이러한 변화들은 NO 공여물질이 서파에 미친 변화와 비교할 때, 그 양상이 유사하였다.

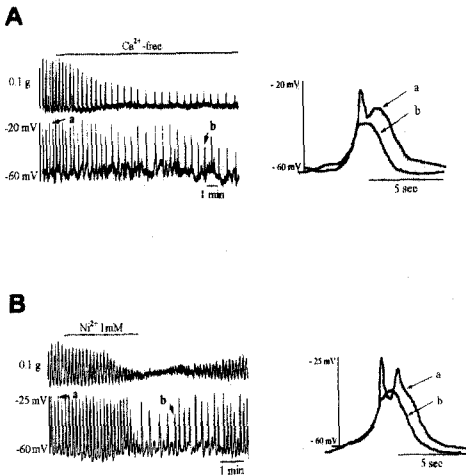
막전압 의존성 L-type Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제인 nifedipine (10 μM)을 투여했을 때, 위상성 수축은 완전히 차단되었고 서



**Fig 1.** Effects of NO donors on phasic contraction and slow wave in the circular muscle of guinea pig gastric antrum. (A) Both CysNO and SIN-1 inhibited the amplitude of phasic contraction in a concentration dependent manner. (B) CysNO and (C) SIN-1 inhibited the upstroke and plateau of slow wave.



**Fig 3.** Effects of nifedipine and SIN-1 on phasic contraction and slow wave in circular smooth muscle of guinea pig gastric antrum. (A) Nifedipine ( $10 \mu\text{M}$ ) abolished phasic contraction and markedly reduced the plateau of slow wave but did not affect upstroke phase. Two expanded traces of slow wave were overlapped to represent the alteration of slow wave shape. Sampling sites (a & b) were indicated by arrows on left traces. (B) In the same preparation, SIN-1 ( $30 \mu\text{M}$ ) did not abolish spontaneous motility but remarkably reduced both plateau and upstroke of slow wave.

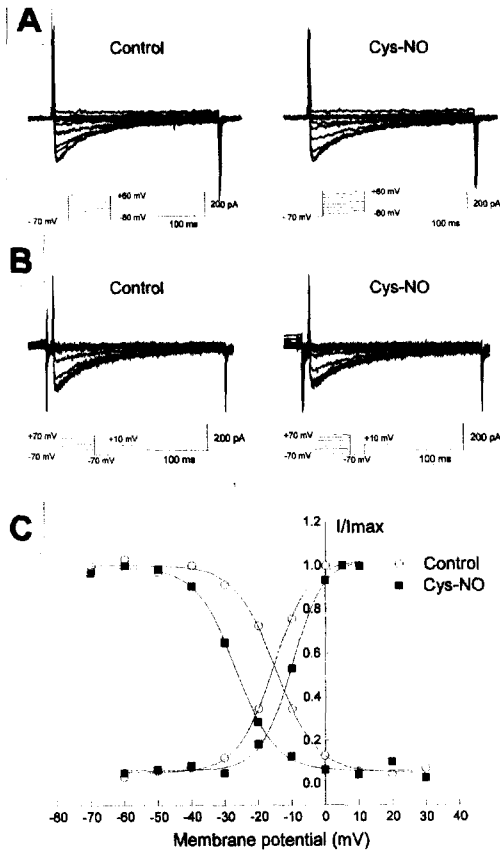


**Fig 2.** Role of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in phasic contraction and slow wave in the circular smooth muscle of guinea pig gastric antrum. (A) extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  removal reduced both frequency and amplitude of phasic contraction as well as those of slow wave. Two expanded traces of slow wave were overlapped to represent the alteration of slow wave shape. Sampling sites (a & b) were indicated by arrows on left traces. (B)  $\text{Ni}^{2+}$  produced similar result.

파의 plateau 크기가 현저히 감소되었으나 upstroke의 크기는 크게 변화하지 않았다 (Fig 3A). 같은 세포에 SIN-1 ( $30 \mu\text{M}$ )을 투여하였을 때 비록 위상성 수축은 남아 있었지만 서파에서 plateau는 거의 사라졌으며 upstroke 역시 상당한 정도로 감소되었다 (Fig 3B).

Nifedipine에 의해 감소되었던 서파의 plateau가 NO 공여 물질에 의해서도 감소된다는 상기 결과는, NO가 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  통로를 억제할 가능성을 제기하였다. 이러한 가능성을 직접적으로 확인하기 위해, whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  전류에 미치는 CysNO의 효과를 조사하였다.

그림 4에 제시된 바대로, CysNO ( $2 \mu\text{M}$ )에 의해 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 활성화곡선은 우측으로, 불활성화곡선은 좌측으로 이동되었다. CysNO를 투여하지 않았을 경우 나타나는  $\text{Ca}^{2+}$  전류의  $V_{1/2(\text{act})}$ ,  $V_{1/2(\text{inact})}$  값은 각각  $-15.5 \text{ mV}$ ,  $-14.8 \text{ mV}$ 였고, 이러한 값은 CysNO에 의해  $-9.9 \text{ mV}$ ,  $-26.7 \text{ mV}$ 로 이동되었다 (Fig 4C). 이 결과는 CysNO가 서파의 막전압 범위인  $-60 \sim -20 \text{ mV}$  사이에서 형성되는  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 window current 크기를 감소시킴으로써 세포내로 유입되는  $\text{Ca}^{2+}$ 의 양을 감소시킬 수 있음을 시사하였다.



**Fig 4.** Effects of CysNO on the L-type Ca<sup>2+</sup> current (I<sub>Ca</sub>). (A) Representative traces of L-type Ca<sup>2+</sup> currents elicited by 10mV increment voltage steps from a holding potential of -70 mV. (B) Representative traces of L-type Ca<sup>2+</sup> currents recorded at a constant test potential of +10 mV after the conditioning prepulse (4 sec) of varying potential (-70 - +60 mV). Currents elicited by prepulses were trimmed. (C) CysNO (2 μM) shifted the activation curve for Ca<sup>2+</sup>-current to the right and the inactivation curve to the left.

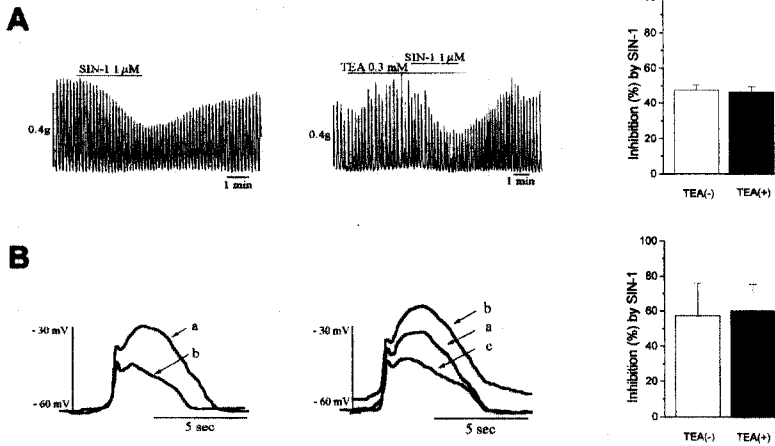
### 3. K<sup>+</sup> 통로의 관련여부 확인

혈관평활근을 비롯한 많은 조직에서 NO의 작용에 K<sup>+</sup> 통로의 활성화가 관여한다고 보고되었다. 기니피그 위 유문동 평활근 세포에 대한 NO의 작용에도 K<sup>+</sup> 통로가 관여하는가를 확인하고자 이후의 실험에서는 각종 K<sup>+</sup> 통로 억제제를 전처치한 후 SIN-1을 투여하고, SIN-1의 효과가 이들 K<sup>+</sup> 통로 억제제에 의해 변화되는지 살펴보았다. 위상성 수축과 서파에 대한 실험을 분리하여 실시하였으며, 위상성 수축에 대한 실험에서는 1 μM, 서파에 대한 실험에서는 30 μM의 SIN-1을 사용하였다.

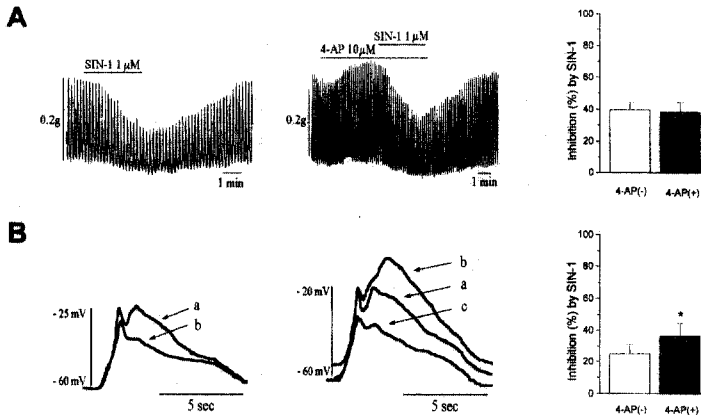
(1) *Non-selective K<sup>+</sup> channel blocker*의 작용 : Non-selective K<sup>+</sup> channel 억제제로 알려진 TEA를 투여한 후 SIN-1 (1, 30 μM)을 투여하였다. 위상성 수축의 경우 0.3 mM의 TEA를 전처치하였고, 서파에 대한 실험에서는 TEA 1 mM을 사용하였다. 위상성 수축의 경우 TEA 전처치 농도를 0.3 mM로 한 까닭은 TEA 1 mM을 사용하면 위상성 수축의 크기가 4배 이상 증가되었고, 이러한 장력의 증가가 SIN-1의 작용에 영향을 줄 수 있기 때문이었다. TEA 전처치에 의해 위상성 수축은 0.23 ± 0.03 g에서 0.35 ± 0.04 g으로 유의성 있게 증가되었으며, TEA 존재하에서도 SIN-1 (1 μM)에 의해 위상성 수축의 크기가 0.19 ± 0.02 g으로 현저하게 감소되었다. 그리고 TEA 전처치시 감소되는 비율과 SIN-1 단독투여시 감소되는 비율은 각각 46.3 ± 3.22%, 47.4 ± 3.15%로서 둘 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 5A). 서파의 경우도 역시 TEA 전처치에 의해 서파의 높이가 31.3 ± 1.52 mV에서 35.5 ± 0.52 mV로 유의성 있게 증가되었으며, TEA 존재하에서도 SIN-1 (30 μM)에 의해 그 크기가 현저하게 감소되었고, 감소되는 비율은 57.4 ± 18.3%로서 TEA의 전처치 없이 SIN-1을 단독투여하였을 경우 감소되는 비율인 60.0 ± 15.0%와 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 5B). 서파의 모양을 보면 TEA에 의해 주로 plateau의 크기가 뚜렷하게 증가하였고, 안정막전압이 -68.7 ± 1.91 mV에서 -66.0 ± 2.41로 변화하였다. 그러나 TEA가 전처치된 조건에서도 SIN-1에 의해 upstroke와 plateau의 크기가 뚜렷하게 감소되었으며 그 양상은 같은 조직에서 TEA 전처치 없이 SIN-1을 투여하였을 때와 유사하게 나타났다. 아울러 안정막전압은 SIN-1의 투여에 의해 재분극되어 TEA 투여전의 안정막전압과 비슷한 크기인 -68.2 ± 1.94 mV로 돌아갔다.

(2) *Delayed rectifier K<sup>+</sup> channel blocker*의 작용 : Delayed rectifier K<sup>+</sup> channel blocker인 4-aminopyridine (4-AP)을 전처치한 후 SIN-1의 효과를 관찰하였다. 위상성 수축에 대한 실험에서는 10 μM, 서파에 대한 실험에서는 0.5 mM의 4-AP를 사용하였다. 위상성 수축의 경우 4-AP에 의해 크기가 0.21 ± 0.03 g에서 0.28 ± 0.04 g으로 유의성 있게 증가되었으나, 4-AP의 존재하에서도 SIN-1에 의해 억제가 일어나 그 크기가 0.16 ± 0.01 g으로 감소되었으며, 4-AP를 전처치 했을 때와 하지 않았을 때의 감소되는 비율은 각각 38.2 ± 6.07%, 39.5 ± 4.62%로서 두 값 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 6A).

서파의 크기도 4-AP의 투여에 의해 32.0 ± 2.64 mV에서 36.3 ± 3.37 mV로 유의성 있게 증가하였으며, 4-AP를 전처치한 상태에서 SIN-1을 투여하였을 때 서파가 감소되는 비율은 36.6 ± 7.71%로서, SIN-1을 단독투여하였을 때의



**Fig. 5.** The effect of TEA on the action of SIN-1. (A) The inhibitory action of SIN-1 on phasic contraction was still observed under the presence of TEA (left: SIN-1 alone, middle: TEA + SIN-1, right: summarized graph). (B) TEA did not modify the inhibitory action of SIN-1 on slow wave (left: a=control, b=SIN-1, middle: a=control, b=TEA, c=SIN-1, right: summarized graph).



**Fig. 6.** The effect of 4-AP on the action of SIN-1. (A) SIN-1 still inhibited the phasic contraction under the presence of 4-AP (left: SIN-1 alone, middle: 4-AP + SIN-1, right: summarized graph). (B) The action of SIN-1 on slow wave was not inhibited by 4-AP (left: a=control, b=SIN-1, middle: a=control, b=4-AP, c=SIN-1, right: summarized graph).

감소비율  $24.9 \pm 6.68\%$ 보다 오히려 유의성 있게 증가되었다 (Fig 6B). 서파의 모양을 보면, 4-AP에 의해 plateau가 현저하게 증가하였으며, 안정막전압은  $-69.9 \pm 1.58$  mV에서  $-66.3 \pm 2.31$  mV로 변화하였다. 그러나 SIN-1에 의해 안정막전압은 4-AP를 투여하기 이전과 비슷한 값인  $-70.5 \pm 1.27$  mV로 되돌아갔으며, 서파의 upstroke와 plateau의 크기가 감소되어 SIN-1 단독투여시의 모습과 비슷한 모양의 서파가 나타났다.

(3) *Nifedipine*의 존재하에서 고농도의 TEA와 4-AP의 효과:  $K^+$  전류를 충분히 억제하기 위하여 고농도의 TEA (10

mM)와 4-AP (5mM)를 동시에 투여한 후 이들이 SIN-1 (30 μM)의 작용에 대해 억제적으로 작용하는가를 살펴보았다. 한편 이러한 고농도의 TEA와 4-AP에 의한 급격한 수축력 증가에 의해 유리전극이 쉽게 빠지는 것을 방지하기 위해 L-type  $Ca^{2+}$  통로 억제제인 nifedipine (10 μM)을 계속적으로 투여하여 수축을 완전히 차단한 상태에서 실험을 실시하였다. nifedipine의 존재하에서도 고농도의 TEA와 4-AP의 투여에 의해 서파의 크기는 현저하게 증가되었으나, 이러한 조건에서도 SIN-1 (30 μM)을 투여하였을 때 서파의 크기가 감소되었으며, 감소되는 정도는 nifedipine 존재하에서 SIN-1을 단독 투여하였을 때의 감소되는 정도와 비슷하였

다 (Fig 7).

(4)  $K_{ATP}$  channel blocker의 작용 : ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) blocker인 glibenclamide ( $10 \mu M$ )를 투여하였을 때 기니피그 위 유문동 윤상근 절편의 자발적 위상성 수축은 감소하는 경향이 나타났으며, 서파의 크기는 큰 변

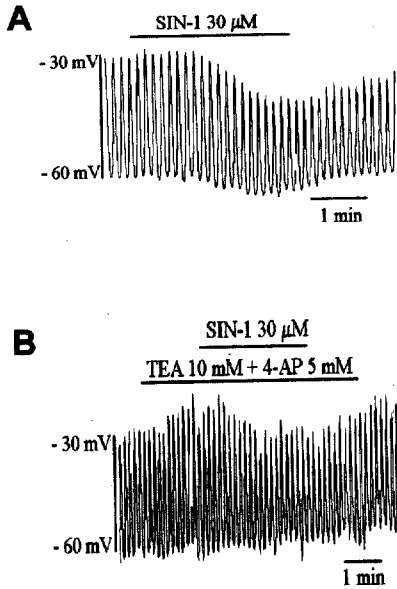


Fig 7. Effect of combined treatment of TEA and 4-AP on the action of SIN-1. Slow wave was still inhibited by SIN-1 under the presence of TEA ( $10 \text{ mM}$ ) and 4-AP ( $5 \text{ mM}$ ).

화가 없었다. 위상성 수축의 경우 glibenclamide ( $10 \mu M$ )가 존재하는 경우와 그렇지 않을 경우에 SIN-1에 의한 감소비율은 각각  $57.2 \pm 3.42\%$ ,  $53.2 \pm 5.16\%$ 로서 둘 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 8A). 반면에 서파의 경우 glibenclamide ( $10 \mu M$ )가 전처치되어 있을 때 SIN-1에 의해 억제되는 비율은  $43.3 \pm 9.43\%$ 로서 SIN-1의 단독투여에 의한 억제비율인  $33.3 \pm 9.74\%$ 보다 오히려 유의성 있게 증가되었다. 서파의 모양을 보면 glibenclamide에 의해 서파의 plateau의 크기가 감소되었으며, SIN-1에 의해 upstroke와 plateau의 크기가 감소되어 SIN-1의 단독투여에 의한 모습과 유사한 모양을 나타내었다 (Fig 8B). 또한 glibenclamide 투여 전후의 안정막전압은 각각  $-64.3 \pm 3.18 \text{ mV}$ ,  $-64.2 \pm 3.03 \text{ mV}$ 로서 거의 변화가 없었다.

(5) Small-conductance  $K_{Ca}$  channel blocker의 효과 : Small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel blocker로 알려진 apamin ( $0.1 \mu M$ )을 전처치하였을 경우 위상성 수축의 크기는  $0.25 \pm 0.03 \text{ g}$ 에서  $0.4 \pm 0.06 \text{ g}$ 으로 유의성 있게 증가되었으나, SIN-1 ( $1 \mu M$ )을 단독 투여하였을 때 수축이 감소되는 비율과 apamin ( $0.1 \mu M$ )이 전처치된 상태에서 SIN-1 ( $1 \mu M$ )을 투여하였을 때 수축이 감소되는 비율은 각각  $51.0 \pm 5.05\%$ ,  $50.5 \pm 6.42\%$ 로서 둘 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 9A). 한편 서파에 대한 영향에서도 마찬가지로 apamin ( $0.1 \mu M$ )에 의해 서파의 크기가  $28.1 \pm 1.76 \text{ mV}$ 에서  $33.2 \pm 1.43 \text{ mV}$ 로 증가되었으나 apamin ( $0.1 \mu M$ )이 존재할 때와 그렇지 않을 때의 SIN-1 ( $30 \mu M$ )에 의한 억제비율은 각각  $49.1 \pm 15.8\%$ ,  $49.3 \pm$

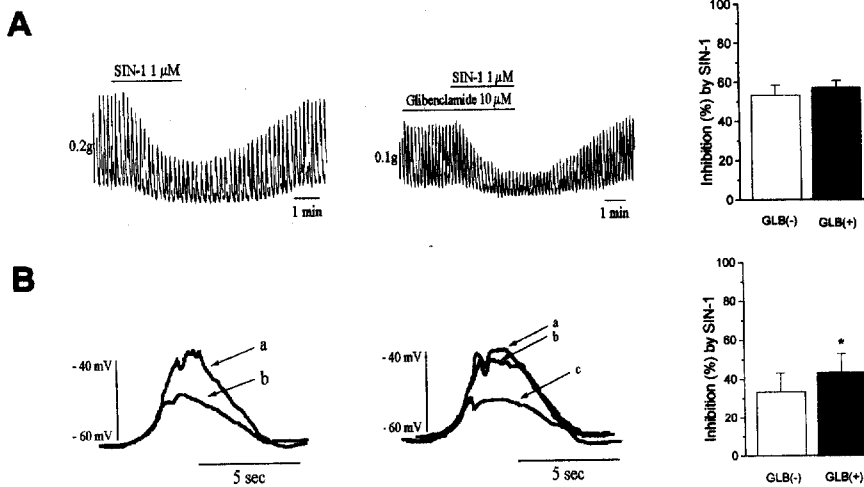
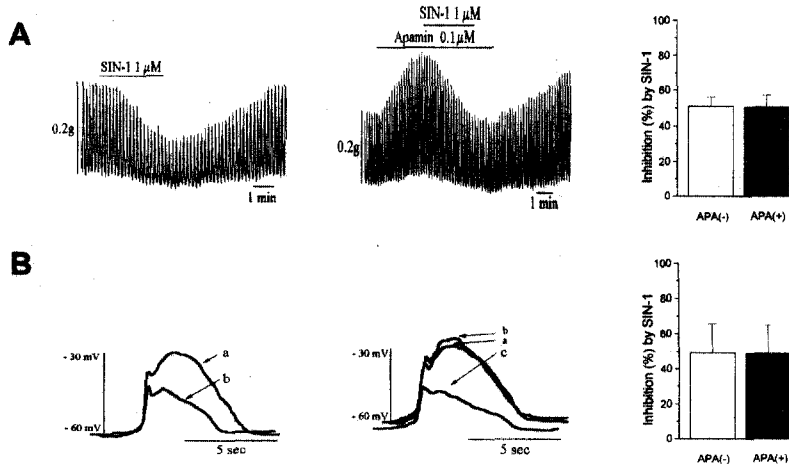
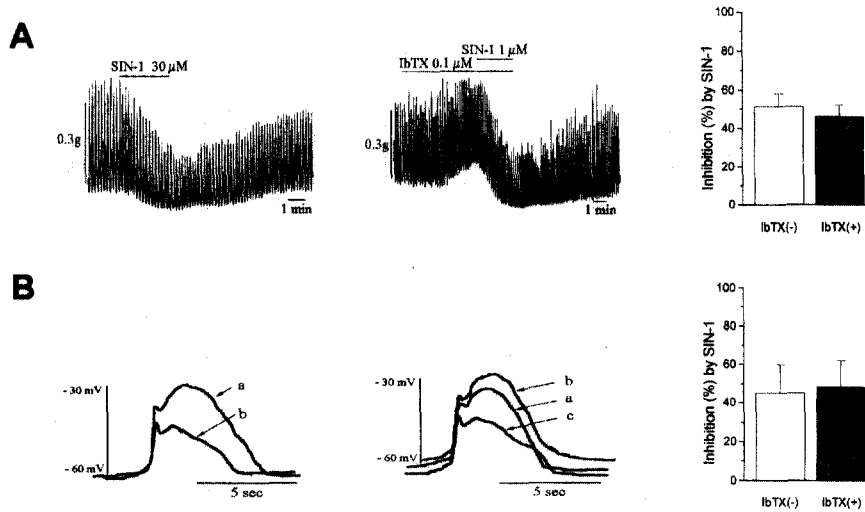


Fig 8. The effect of glibenclamide (GLB) on the action of SIN-1. (A) GLB did not inhibit the action of SIN-1 on phasic contraction (left: SIN-1 alone, middle: GLB + SIN-1, right: summarized graph). (B) The action of SIN-1 on slow wave was not affected by GLB (left: a=control, b=SIN-1, middle: a=control, b=GLB, c=SIN-1, right: summarized graph).



**Fig 9.** The effect of apamin on the action of SIN-1. (A) The inhibitory action of SIN-1 on phasic contraction was still observed under the presence of apamin (left: SIN-1 alone, middle: apamin + SIN-1, right: summarized graph). (B) Apamin did not showed any significant effect on the inhibitory action of SIN-1 on slow wave (left: a=control, b=SIN-1, middle: a=control, b=apamin, c=SIN-1, right: summarized graph).



**Fig 10.** The effect of iberiotoxin (IbTX) on the action of SIN-1. (A) The inhibitory action of SIN-1 on phasic contraction was still observed under the presence of IbTX (left: SIN-1 alone, middle: IbTX + SIN-1, right: summarized graph). (B) IbTX did not modify the inhibitory action of SIN-1 on slow wave (left: a=control, b=SIN-1, middle: a=control, b=IbTX, c=SIN-1, right: summarized graph).

16.3%로 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 9B). 서파의 모양 변화를 보면, apamin에 의해 plateau의 크기가 약간 증가하나 SIN-1의 작용을 억제하지는 못하였다. 그리고 apamin에 의해 비록 통계적인 유의성은 없었지만, 안정막전압이  $-66.9 \pm 4.82$  mV에서  $-65.1 \pm 5.01$  mV로 탈분극되는 경향이 관찰되었으며, SIN-1에 의해 원래의 안정막전압과 비슷한 값인  $-67.5 \pm 3.82$  mV로 재분극되었다.

(6) *Large-conductance  $K_{Ca}$  channel blocker*의 효과 : Large-conductance  $K_{Ca}$  channel blocker로 알려진 iberiotoxin ( $0.1 \mu M$ )을 투여하였을 때 비록 유의성은 없었지만 위상성 수축과 긴장성 수축의 크기가 증가되는 경향이 나타났으며, SIN-1 ( $1 \mu M$ )에 의해 위상성 수축과 긴장성 수축이 모두 감소되었다. SIN-1 ( $1 \mu M$ )을 단독 투여하였을 때 수축이 감소되는 비율과 iberiotoxin ( $0.1 \mu M$ )이 전처치된 상



태에서 SIN-1 (1 μM)을 투여하였을 때 수축이 감소되는 비율은 각각 41.2 ± 6.75%, 44.8 ± 8.35%로서 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다 (Fig 10A).

Iberiotoxin (0.1 μM)은 서파의 크기를 29.1 ± 2.36 mV에서 33.6 ± 3.25 mV로 유의성 있게 증가시켰으나, iberiotoxin (0.1 μM)이 존재하는 상황에서도 SIN-1 (30 μM)에 의해 그 크기가 16.7 ± 4.76 mV로 감소되었다. Iberiotoxin (0.1 μM)이 존재하는 경우와 그렇지 않은 경우에 있어서 SIN-1 (30 μM)에 의해 서파의 크기가 감소되는 비율은 각각 48.4 ± 13.4%, 45.1 ± 14.8%로서 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig 10B). 서파의 모양변화를 보면, iberiotoxin에 의해 plateau의 크기가 약간 증가하나 SIN-1의 작용을 억제하지는 못하여 SIN-1을 단독투여하였을 때와 유사한 양상을 나타내었다. 안정막전압의 변화를 보면, 비록 유의성은 없었지만 iberiotoxin (0.1 μM)에 의해 -63.7 ± 1.71 mV에서 -60.5 ± 2.43 mV로 탈분극이 일어났으며, SIN-1 (30 μM) 투여시 iberiotoxin을 투여하기 전과 비슷한 값인 -62.7 ± 1.87 mV로 재분극되었다.

## 고 찰

### NO와 세포내로의 Ca<sup>2+</sup> 유입

세포외액에 있는 Ca<sup>2+</sup>은 위장관에서 자발적 수축과 서파의 생성에 필수적인 것으로 알려져 있다<sup>3</sup>. 이러한 사실은 개 회장 윤상근<sup>11</sup>과 고양이 위 유문부 윤상근<sup>12</sup> 등에서도 보고되었다. 이들 조직에서 세포외액으로부터 Ca<sup>2+</sup>을 제거하거나, low-Ca<sup>2+</sup> (0.5mM) 용액을 관류시키면 자발적 수축은 물론 서파의 크기와 지속시간, 빈도 등이 모두 감소된다고 보고되었다. 본 실험에서도 Ca<sup>2+</sup>-free Krebs 용액을 관류하였을 때와 비선택성 Ca<sup>2+</sup> 통로 억제제인 Ni<sup>2+</sup>을 투여한 경우에 서파의 크기와 빈도 등이 감소되었다. 이러한 사실은 위상성 수축과 서파의 발생에 있어서 세포의 Ca<sup>2+</sup>이 반드시 필요하다는 것을 의미한다.

한편, NO 공여물질이 서파에 미치는 영향과 세포의 Ca<sup>2+</sup>의 유입 억제가 서파에 미치는 영향이 상호 유사한 양상을 나타내었다. 이는 서파에 대한 NO 공여물질의 작용이 세포외로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유입과 밀접한 관련이 있음을 시사하였다. 세포막을 통한 Ca<sup>2+</sup>의 유입은 막전압의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로와 비선택성 양이온 통로 (nonselective cation channel, NSC)에 의해 이루어진다고 볼 수 있다<sup>13</sup>. 비신경세포의 막전압의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로는 L-type과 T-type의 통로인 것으로 알려져 있으며, NO가 이 두 종류의 Ca<sup>2+</sup> 통로를 억제한다는 것이 보고된 바 있다<sup>14-16</sup>. 비선택성 양이온 전류는 서파의 지속시간을 증가시켜 더 많은 Ca<sup>2+</sup>이 유입되어 수축력을 증가시키는 기능을 한다고 알려져 있으며<sup>17</sup>, NO가 Ca<sup>2+</sup> 투과성의 비선

택성 양이온 통로 또한 억제한다는 것이 랫드 대동맥<sup>18</sup>, 랫드 갈색 지방조직<sup>19</sup>에서 보고되었다.

본 실험에서 L-type Ca<sup>2+</sup> 통로 억제제인 nifedipine은 위상성 수축을 완전히 차단하였고, 서파의 경우 plateau를 뚜렷하게 감소시켰다. NO 공여물질 역시 서파의 plateau를 억제하였고, L-type Ca<sup>2+</sup> 전류의 활성화곡선과 불활성화곡선을 각각 우측 및 좌측으로 이동시켰다. 이러한 결과는 NO가 서파의 막전압 변화 범위내에서 L-type 통로를 통해 유입될 수 있는 Ca<sup>2+</sup>의 양을 감소시킴으로써 위상성 수축과 서파를 억제할 수 있음을 보여준다.

그러나 NO 공여물질과 달리 nifedipine은 서파의 upstroke에 대해서는 거의 영향을 미치지 못하였다. 이는 L-type Ca<sup>2+</sup> 통로를 통해 일어나는 Ca<sup>2+</sup> 유입 이외의 또 다른 기전이 기니피그 위 유문부의 서파 생성에 영향을 주며, NO가 그 기전에 억제적으로 작용할 수 있음을 시사한다. 본 실험에서 Ca<sup>2+</sup>-free Krebs 용액을 관류하였을 때와 Ni<sup>2+</sup>을 투여하였을 때 서파의 upstroke가 감소되었으므로, NO가 L-type 외에 T-type 통로 또는 NSC 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제함으로써 서파의 upstroke를 억제하였을 가능성이 남아있다.

한편, 배양된 ICC<sup>20</sup> 및 설치류의 소장<sup>21</sup>을 대상으로 서파의 생성기전을 조사한 최근의 연구를 통해, inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)-sensitive한 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 저장소로부터 방출되는 Ca<sup>2+</sup>이 서파의 발생과 밀접히 연관되어 있음이 보고되었다. 비록 위장관 평활근은 아니지만, NO가 cGMP 경로를 통해 IP<sub>3</sub> 생성효소인 phospholipase C를 인산화하거나<sup>22</sup> IP<sub>3</sub> 수용체 자체를 인산화시키며<sup>23</sup>, 혈관평활근에서는 IP<sub>3</sub>에 의한 세포내로부터의 Ca<sup>2+</sup> 동원을 억제한다고 보고되었다<sup>24,25</sup>. 상기한 연구 결과들은 기니피그 위 유문부의 서파 발생에도 IP<sub>3</sub>를 통한 세포내로부터의 Ca<sup>2+</sup> 동원이 관여하며, NO가 이를 억제함으로써 서파의 발생을 조절할 수 있다는 가능성을 제기하므로, 이후의 실험을 통해 이러한 가능성을 연구할 필요성이 대두된다.

### NO와 K<sup>+</sup> 통로의 활성화

혈관 평활근에 대한 NO의 억제적 작용은 주로 K<sup>+</sup> 통로의 활성화에 의한 것이라고 보고되어 왔으며<sup>26-28</sup>, 근래에는 위장관 평활근에서도 유사한 연구결과가 보고되고 있다.

기니피그 근위결장에서 sodium nitroprusside (SNP)와 CysNO가 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로에 직접 작용하여 이 통로를 통한 K<sup>+</sup> 전류를 활성화시킨다고 보고되었다<sup>29</sup>. 기니피그 회장 중주근에서는 NO가 cGMP 경로를 통하여 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로를 활성화시켜 과분극을 일으키고, 이로 인해 막전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로가 억제됨으로써 이완이 유발된다고 보고되었다<sup>30,31</sup>. 한편 Cayabyab 등<sup>32,33</sup>은 opossum의 식도 윤상근에서 NO가 세포내

Ca<sup>2+</sup> 저장고인 sarcoplasmic reticulum (SR)으로의 Ca<sup>2+</sup> 회수를 증가시키고, 회수되었던 Ca<sup>2+</sup>이 Kca 통로가 밀집한 subplasmalemmal space 쪽으로 방출됨으로써 quinine-sensitive 한 K<sup>+</sup> 통로를 개방시켜 과분극이 일어난다고 제안하였다.

그러나 본 실험에서는 자발적 수축과 서파에 대한 SIN-1의 작용이 여러 종류의 K<sup>+</sup> 통로 차단제에 의해 억제되지 않았다. 또한 SIN-1에 의해 뚜렷한 과분극현상이 나타나지도 않았다. 이는 기니피그 위 유문동 윤상근에서 NO의 작용이 K<sup>+</sup> 통로의 매개로 일어나지 않는다는 것을 의미하며 위에 언급된 보고들과 상충된다. 그러나 랫드의 회장에서는 본 실험의 결과와 유사한 내용이 보고되었다. Franck 등<sup>34</sup>은 랫드의 회장에서 NO 공여물질인 SIN-1과 cGMP의 유도체에 의한 이완이 K<sup>+</sup> 통로 억제제인 apamin, charybdotoxin, iberiotoxin, glibenclamide 등에 의해 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 랫드 근위결장에서는 NO에 의한 이완반응이 막전압의 변화와 관련이 없다고 추정되었으며<sup>35</sup>, 개 위저부에서 관찰되는 NO에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 저하와 장력의 감소는 막전압의 과분극에 의한 것이 아니라고 보고되었다<sup>36</sup>. 그러나 위장관 평활근에서는 본 실험에 사용된 각종 K<sup>+</sup> 통로 차단제에 의해 억제되지 않는 K<sup>+</sup> 통로가 NO에 의해 활성화된다는 보고들이 있으므로<sup>33,37</sup>, 다른 종류의 K<sup>+</sup> 통로가 SIN-1에 의한 이완반응에 관여할 가능성을 완전히 배제할 수는 없으며, 본 실험에서도 일부의 조직에서 고농도의 SIN-1을 투여하였을 때 과분극 현상이 나타나기도 하였다.

이상의 결과로 보아, NO는 서파가 나타나는 막전압 범위에서 활성화될 수 있는 Ca<sup>2+</sup> 전류의 분율을 감소시킴으로써 기니피그 위 유문부 윤상근의 서파와 위상성 수축의 크기를 감소시키는 것으로 추정되며, K<sup>+</sup> 통로의 활성화에 의한 억제효과는 미미할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. Stevens RJ, Weinert JS, Publicover NG. Visualization of origin and propagation of excitation in canine gastric smooth muscle. *Am J Physiol*, 277(46): C448-460, 1999.
2. Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of gastrointestinal tract. *Am J Physiol*, 257(26): C830-835, 1989.
3. El-Sharkawy TY, Daniel EE. Ionic mechanisms of intestinal electrical control activity. *Am J Physiol*, 229(5): 1287-1298, 1975.
4. Thorbury KD, Ward SM, Sanders KM. Participation of fast-activating, voltage-dependent K currents in electrical slow waves of colonic circular muscle. *Am J Physiol*, 263(1): C226-236, 1992.
5. 김태완, 라준호, 양일석. 기니피그 유문부 윤상근의 서파 및 자발적 수축에 대한 nitric oxide donor의 억제적 작용. *대한수의학회지*, 40(4): 691-699, 2000.
6. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, 1178(2): 153-175, 1993.
7. Beech DJ. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *Pharmacol Ther*, 73(2): 91-119, 1997.
8. Blatter LA, Wier WG. Nitric oxide decreases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium*, 15(2): 122-131, 1994.
9. Isenberg G, Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers Arch*, 395(1): 6-18, 1982.
10. Barbier AJ, Lefebvre RA. Influence of S-nitrosothiols and nitrate tolerance in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 111(4): 1280-1286, 1994.
11. Cayabyab FS, deBruin H, Jimenez M, et al. Ca<sup>2+</sup> role in myogenic and neurogenic activities of canine ileum circular muscle. *Am J Physiol*, 271(6): G1053-1066, 1996.
12. Renzetti LM, Wang MB, Ryan JP. Modulation of cat antral slow waves by ion substitution, Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel blockade, and ACh stimulation. *Am J Physiol*, 263(6): G880-886, 1992.
13. Kim SJ, Koh EM, Kang TM, et al. Ca<sup>2+</sup> influx through carbachol-activated non-selective cation channels in guinea-pig gastric myocytes. *J Physiol (Lond)*, 513(3): 749-760, 1998.
14. Kumar R, Namiki T, Joyner RW. Effects of cGMP on L-type calcium current of adult and newborn rabbit ventricular cells. *Cardiovasc Res*, 33(3): 573-582, 1997.
15. Taguchi K, Ueda M, Kubo T. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells. *Jpn J Pharmacol*, 74(2): 179-186, 1997.
16. Quignard JF, Frapier JM, Harricane MC, et al. Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. *J Clin Invest*, 99(2): 185-193, 1997.
17. Lee HK, Bayguinov O, Sanders KM. Role of nonselective cation current in muscarinic responses of canine colonic muscle. *Am J Physiol*, 265(6): C1463-1471, 1993.
18. Minowa T, Miwa S, Kobayashi S, et al. Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel in rat aortic

- smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 120(8): 1536-1544, 1997.
19. Koivisto A, Nedergaard J. Modulation of calcium-activated non-selective cation channel activity by nitric oxide in rat brown adipose tissue. *J Physiol (Lond)*, 486(1): 59-65, 1995.
  20. Ward SM, Ordog T, Koh SD, et al. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol (Lond)*. 525(2): 355-361, 2000.
  21. Maysz J, Donnelly G, Huizinga JD. Regulation of slow wave frequency by  $IP_3$ -sensitive calcium release in the murine small intestine. *Am J Physiol* 280(30):G439-G448, 2001.
  22. Xia C, Bao Z, Yue C, et al. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 276(23): 19770-19777, 2001.
  23. Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem*. 271(36): 21933-21938, 1996.
  24. Ji J, Benishin CG, Pang PK. Nitric oxide selectively inhibits intracellular  $Ca^{2+}$  release elicited by inositol triphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 285(1): 16-21, 1998.
  25. Pauvert O, Marthan R, Savineau J. NO-induced modulation of calcium-oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. *Cell Calcium*. 27(6): 329-338, 2000.
  26. Simonsen U, Prieto D, Sanz de Tejada I, et al. Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive  $K^+$ -channels. *Br J Pharmacol*, 116(6): 2582-2590, 1995.
  27. Plane F, Hurrell A, Jeremy JY, et al. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1-evoked relaxation of rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 119(8): 1557-1562, 1996.
  28. Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Villamor E, et al. Role of  $K^+$  channel opening and stimulation of cyclic GMP in the vasorelaxant effects of nicorandil in isolated piglet pulmonary and mesenteric arteries: relative efficacy and interactions between both pathways. *Br J Pharmacol*, 123(3): 847-854, 1998.
  29. Lang RJ, Watson MJ. Effects of nitric oxide donors, S-nitroso-L-cysteine and sodium nitroprusside, on the whole-cell and single channel currents in single myocytes of the guinea-pig proximal colon. *Br J Pharmacol*, 123(3): 505-517, 1998.
  30. Lee YH, Kim JH, Kang BS. Action mechanisms of NANC neurotransmitters in smooth muscle of guinea pig ileum. *Korean J Physiol Pharmacol*, 1(6): 783-796, 1997.
  31. Kwon SC, Rim SJ, Kang BS. Modulation of outward potassium currents by nitric oxide in longitudinal smooth muscle cells of guinea-pig ileum. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2(2): 225-232, 1998.
  32. Cayabyab FS, Daniel EE. Role of sarcoplasmic reticulum in inhibitory junction potentials and hyperpolarizations by nitric oxide donors in opossum oesophagus. *Br J Pharmacol*, 118(8): 2185-2191, 1996.
  33. Cayabyab FS, Daniel EE.  $K^+$  channel opening mediates hyperpolarizations by nitric oxide donors and IIPs in opossum esophagus. *Am J Physiol*, 268(5): G831-842, 1995.
  34. Franck H, Storr M, Puschmann A, et al. Involvement of intracellular  $Ca^{2+}$  stores in inhibitory effects of NO donor SIN-1 and cGMP. *Am J Physiol*, 275(1): G159-168, 1998.
  35. Sutharmatpong N, Hosokawa M, Takeuchi T, et al. Nitric oxide-mediated inhibitory response of rat proximal colon: independence from changes in membrane potential. *Br J Pharmacol*, 112(2): 676-682, 1994.
  36. Bayguinov O, Sanders KM. Dissociation between electrical and mechanical responses to nitrergic stimulation in the canine gastric fundus. *J Physiol (Lond)*, 509(2): 437-448, 1998.
  37. Koh SD, Campbell JD, Carl A, et al. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol (Lond)*, 489(3): 735-743, 1995.