

Phenylephrine에 의한 수축에 대한 Sodium Nitroprusside의 혈관수축 증대효과

제 현 동#

대구가톨릭대학교 약학대학

(Received May 3, 2006; Revised June 5, 2006)

The Potentiating Effect of Sodium Nitroprusside on the Contraction Induced by Phenylephrine in Rat Aortic Rings

Hyun Dong Je#

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract — Rat aortic ring preparations were mounted in organ baths, exposed to sodium cyanide (0.01~1.0 mM) for 10 min, and then subjected to contractile agents or relaxants such as acetylcholine, sodium nitroprusside and isoproterenol. Presence of low concentration of sodium cyanide did not affect the contractile response to KCl or phenylephrine in the aortic rings with intact endothelium or endothelium denuded. Sodium nitroprusside but not acetylcholine or isoproterenol augmented phenylephrine-induced intact or denuded vascular contraction in the presence of low concentration of sodium cyanide. In conclusion, this study provides the evidence concerning the potentiating effect of sodium nitroprusside on the contraction induced by phenylephrine in rat aortic rings regardless of endothelial function.

Keywords □ sodium nitroprusside, phenylephrine, KCl, sodium cyanide

혈관의 긴장도 또는 혈관평활근의 수축정도는 심박출량과 함께 신체조직으로 보내는 관류량의 적절성을 결정한다. 혈관 긴장도 조절이상과 관련된 여러 가지 질병상태, 즉 협심증에서 고혈압, 레이나우드 현상, 편두통에 이르기까지 다양한 질병에서 혈관 긴장도의 중요성은 잘 이해되고 있다.¹⁾ 혈관 긴장도는 다양한 기전에 의해 지배되며 최근 혈관내피세포와 혈관평활근세포 사이의 상호작용이 주목되고 있다. 현재 사용되는 혈관확장제로 angiotensin II type 1(AT1) 수용체 길항제, angiotensin converting enzyme(ACE) 억제제, 칼슘통로 차단제, α_1 아드레날린 수용체 길항제, 중추성 아드레날린 효능약, 실데나필, 질산염 등이 있다. 유기질산염과 sodium nitroprusside 같은 약리학 적 nitric oxide (NO) 공여자는 guanylyl cyclase의 활성화와 그로 인한 myosin light chain의 탈인산화 증가를 통하여 혈관확장을 일으킨다.^{2,3)}

Sodium nitroprusside는 nitroso기, 5-cyanide기와 철분으로 구성되어 있다. 유기질산염과 같이 sodium nitroprusside는 NO의 방출로 혈관확장효능을 나타낸다. 그러나 유기질산염과 달리 sodium nitroprusside는 주로 비효소적 과정을 통하여 NO를 방출한다.⁴⁾ 이러한 비효소적 NO로의 전환의 결과로서 sodium nitroprusside의 작용은 특정 혈관에 표적화되지 못하며 결과적으로 동맥과 정맥을 모두 확장시킨다. 따라서 고혈압 위기와 심각한 심부전에 강력한 혈역학적 조절을 위하여 정맥으로 투여된다.⁵⁻⁷⁾ 신속한 작용발현과 높은 효능으로 인하여 sodium nitroprusside는 약물효과를 얻기 위하여 지속적인 혈압 관찰과 용량을 조절하면서 주입해야 한다. Sodium nitroprusside는 NO를 방출하고 시안화물로 신속하게 대사된다. 이후, 시안화물은 간에서 thiocyanide로 전환되어 신장으로 배설된다.

현재 혈관 평활근의 수축기전으로 myosin light chain kinase (MLCK)와 myosin phosphatase가 관여되는 thick filament regulation과^{8,9)} protein kinase C(PKC), mitogen-activated protein kinase kinase(MEK), mitogen-activated protein kinase(MAPK), actin 결합 단백질인 caldesmon 및 calponin 등이 관여되는 thin

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3615 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) hyundong@cu.ac.kr

filament regulation이 제안되고 있다.¹⁰⁾ 본 실험에서 myosin phosphatase의 targeting subunit인 myosin protein targeting subunit 1(MYPT1)의 인산화를 통해 RhoA/ Rho-kinase 활성을 간접 측정하였고 MLCK활성에 대한 지표인 myosin의 RLC (regulatory light chain) 20 kDa의 인산화를 측정하여 phenylephrine에 의한 수축의 생화학적 특성을 살펴보았다. 또한 임상에서 혈관확장제로 흔히 쓰이는 sodium nitroprusside의 혈관수축 증대효과를 살펴보고 특수한 조건하에서 오히려 혈압상승 효과가 있음을 보여 sodium nitroprusside 사용에 있어 주의 및 새로운 가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Potassium chloride(Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate(Sigma), pentobarbital sodium(Dongwon, Korea), sodium nitroprusside(Sigma), isoproterenol(Sigma), phenylephrine hydrochloride(Sigma), acetylcholine(Sigma), D-(+)-glucose(Sigma), dithiothreitol(DTT) (Sigma), sodium cyanide(Daejung, Korea), trichloroacetic acid (TCA)(Daejung), acetone(Daejung), phosphorylated myosin protein targeting subunit 1(MYPT1) 항체(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), myosin light chain(LC) 20 kDa 항체(Sigma), ECL(enhanced chemiluminescence) (Supersignal, Pierce, Rockford, IL, USA), SD(Sprague-Dawley) 쥐(Hyochang Science, Korea). 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다. SD 쥐는 효창사이언스에서 구입하였고 pentobarbital sodium은 동원약품에서 구입하였다.

실험과정

무게 250~350 g의 성숙한 웅성 Sprague-Dawley 쥐가 실험에 사용되었다. 실험동물은 분리된 상자에 개별적으로 수용되었고 1주일 이상 사료와 물이 충분히 공급되었다. 실험 당일 pentobarbital sodium(50 mg/kg)을 복강으로 투여하여 마취시키고 고정시켰다.

대동맥 적출

중부 절개로 흉곽이 열렸고 수술도구로 심장과 주변 부위를 노출시켰다. 심장과 폐는 분리되지 않았고 대동맥 적출을 위한 충분한 공간을 확보하기 위해 좌측으로 밀어서 생리식염수로 적셔진 천으로 덮었다. 대동맥은 간 근처에서 심장부근까지 적출되었고 즉시 차가운 Krebs 용액에 담겼다. 대동맥내 혈액과 각종

결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌다.

기계적 활성 측정

동맥의 고리 조각은 2개의 금속 갈고리로 수조내 현수되었다. 아래쪽 갈고리는 수조바닥에 고정되었고 위쪽 갈고리는 등장력 변환기에 연결되었다. 등장력 변환기의 신호는 physiograph에 표시되었다. 수조의 부피는 20 ml이고 수조내 용액은 37°C에서 95% O₂와 5% CO₂로 포화되었다. Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 118.4; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.18; NaHCO₃, 25; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 11.7. 용액의 최종 pH는 7.4~7.5로 유지되었다. 1시간의 평형기간동안 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절되었다. 평형기간 후 대동맥 고리는 50 mM KCl로 자극되었고 근육이 충분히 수축할 경우 실험이 시작되었다. 용량-반응 곡선을 얻기 위해 혈관수축제들이 수조내로 투여되었다. 결과는 50 mM KCl에 의한 대조수축의 %로 표시되었다.

LC20kDa 인산화 측정

대동맥 근육조각이 TCA와 DTT를 포함하는 드라이아이스-아세트론 현탁액 용액에 급속 냉동되었다. 24시간 후 대동맥 근육조각은 실온으로 옮겨져 드라이아이스-아세트론 현탁액 용액 안에 담겨진 상태에서 균질하게 갈렸고 TCA를 제거하기 위해 에테르로 3~4회 씻겼다. 조직은 urea sample buffer에서 추출되었고 12% polyacrylamide gel로 전기 영동되었다.^{11,12)} 단백질은 polyvinylidene difluoride(PVDF) membranes로 옮겨졌고 LC20kDa 항체(1:1,500, Sigma)를 부착시켰다. 이차 항체로 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 항 mouse IgG(Goat)(1:2,000, Calbiochem)가 사용되었다. 밴드는 ECL(enhanced chemiluminescence)(Supersignal, Pierce)로 탐지되었고 densitometer로 분석되었다.

Immunoblotting

대동맥 근육조각이 급속 냉동되었고 균질화되었다. Actin으로 보정된 시료가 SDS-PAGE로 전기영동되었고 PVDF 막으로 옮겨졌고 Thr696 부위에 대한 pMYPT1 항체(1:1,000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)가 1차 항체로 부착되었고 HRP가 달린 2차 항체(goat anti-mouse 1:2,000, Calbiochem; 또는 goat anti-rabbit 1:2,000)가 ECL(Supersignal, Pierce)와 함께 사용되었다.^{13,14)} 신호가 필름으로 탐지되었고 densitometer로 분석되었다.

통계 분석

모든 실험결과들은 평균±표준오차로 나타내었고 통계 처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

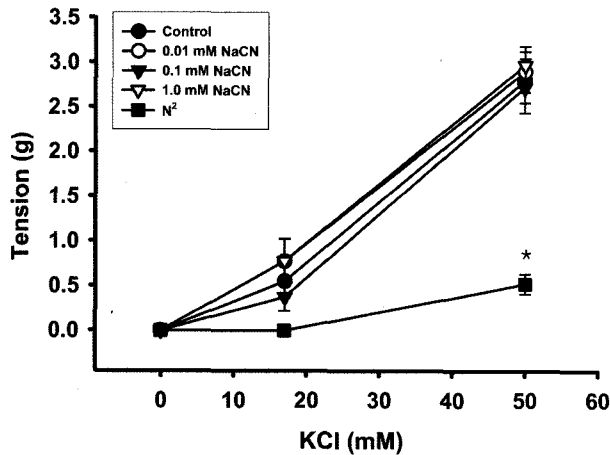


Fig. 1 – Effect of pretreated low concentrations of cyanide on high K^+ -induced contractions in the presence of endothelium compared to the nitrogen-induced hypoxia. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$ vs. control.

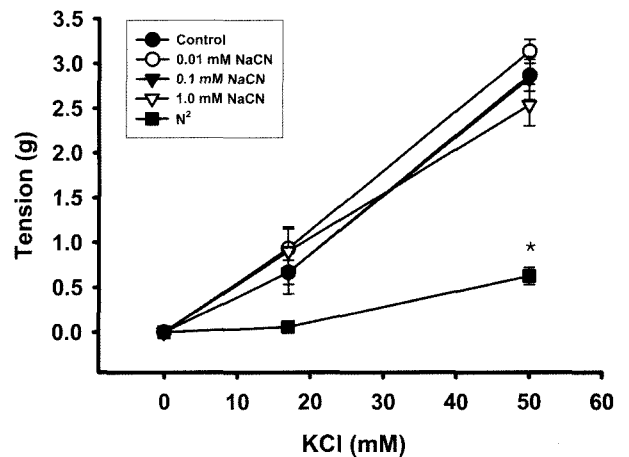


Fig. 2 – Effect of pretreated low concentrations of cyanide on high K^+ -induced contractions in the absence of endothelium compared to the nitrogen-induced hypoxia. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$ vs. control.

실험 결과

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 KCl에 의한 수축에 대한 저농도의 sodium cyanide와 질소기체의 효과비교

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달한다. 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절한다. 내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 고농도 KCl(50 mM)에 의한 수축에 대해 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)는 이완효과가 없었고 고농도의 sodium cyanide(3~10 mM)에서도 $2.6 \pm 0.35 \sim 2.4 \pm 0.46$ g의 수축력을 보여 이완효과가 없는 것으로 판단하였다. 산소기체대신에 투여된 질소기체는 저산소증을 유발하여 이완효과를 보였다(Fig. 1).

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 KCl에 의한 수축에 대한 저농도의 sodium cyanide와 질소기체의 효과비교

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 고농도 KCl(50 mM)에 의한 수축에 대해 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)는 이완효과가 없었고 고농도의 sodium cyanide(3~10 mM)에서도 $2.9 \pm 0.27 \sim 2.5 \pm 0.39$ g의 수축력을 보여 이완효과가 없는 것으로 판단하였다. 산소기체대신에 투여된 질소기체는 저산소증을 유발하여 이완효과를 보였다(Fig. 2).

Immunoblotting

Immunoblotting으로 phenylephrine에 의한 수축의 생화학적 특징을 살펴보았다. Phenylephrine은 탈인산화효소의 구성성분인 MYPT1의 인산화를 증가시키지 않았다. 따라서 Phenylephrine에 의해 MYPT1을 기질로 삼는 RhoA/Rho-kinase의 활

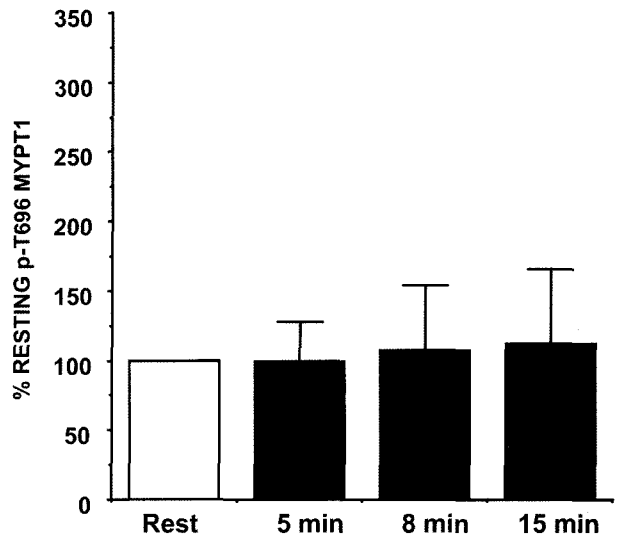


Fig. 3 – Effects of phenylephrine on phosphorylation of MYPT1. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM.

성이 억제되어 탈인산화효소가 활성을 유지하고 탈인산화를 일으켰다(Fig. 3).

LC20kDa 인산화 측정

MLCK 활성의 지표인 LC20kDa 인산화 측정으로 phenylephrine($1 \mu\text{M}$)에 의한 수축의 생화학적 특징을 살펴보았다. α -아드레날린 수용체 효능약인 phenylephrine은 LC20kDa 인산화에서 일시적인 증가를 보여주었고 phenylephrine 투여 후 8분 이후에 LC20kDa 인산화가 감소됨을 관찰하였다(Fig. 4).

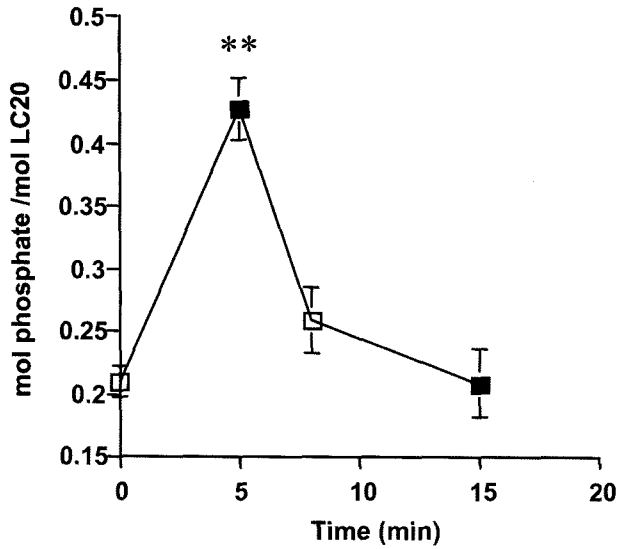


Fig. 4 - The Effect of phenylephrine on myosin light chain phosphorylation. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. **P<0.01% vs. control.

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달한다. 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절한다. Sodium cyanide로 전처리된 쥐 대동맥에서 phenylephrine(1 μM)에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 효과를 조사하였다. 전처리된 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)는 내피가 유지된 쥐 대동맥에서 phenylephrine(1 μM)이

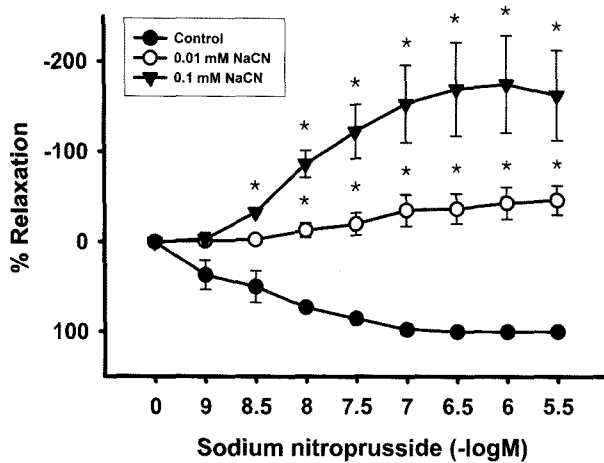


Fig. 5 - The effect of sodium nitroprusside on the phenylephrine-induced contraction in the aortic rings with intact endothelium in the presence of low concentration of sodium cyanide. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. *P<0.05% vs. control.

나 KCl(50 mM)에 의한 수축을 변화시키지 않았고 전처리된 고농도의 sodium cyanide(3~10 mM)는 KCl에 의한 수축을 변화시키지 않았고 phenylephrine(1 μM)에 의한 수축을 이완시켰다(20±3.1~41±4.6%). 이번 실험에서 sodium nitroprusside 자체는 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축을 억제하였다. 그러나 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)로 전처리된 쥐 내피유지 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 수축 증대 효과가 발견되었고(Fig. 5) acetylcholine이나 isoproterenol의 경우 수축 증대 효과가 나타나지 않았다(data not shown).

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 효과

Sodium cyanide로 전처리된 쥐 대동맥에서 phenylephrine(1 μM)에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 효과를 조사하였다. 금속 봉을 쥐 대동맥 고리 안에 넣고 4~6회 돌려 내피를 제거하였다. 50 mM KCl에 의한 수축에 대한 1 μM acetylcholine의 이완이 20% 이하일 경우 내피가 제거되었다고 판단하였다. 전처리된 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)는 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phenylephrine(1 μM)이나 KCl(50 mM)에 의한 수축을 변화시키지 않았고 전처리된 고농도의 sodium cyanide(3~10 mM)는 KCl에 의한 수축을 변화시키지 않았고 phenylephrine(1 μM)에 의한 수축을 이완시켰다(24±5.2~48±5.9%). 이번 실험에서 sodium nitroprusside 자체는 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축을 억제하였다. 그러나 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM)로 전처리된 쥐 내피제거

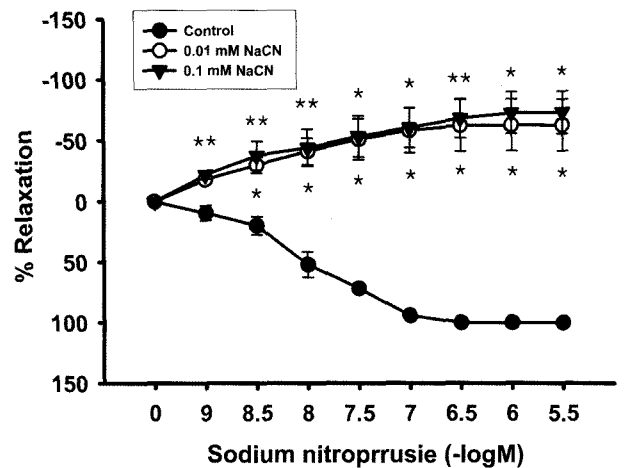


Fig. 6 - The effect of sodium nitroprusside on the phenylephrine-induced contraction in the aortic rings with endothelium denuded in the presence of low concentration of sodium cyanide. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. *P<0.05% vs. control. **P<0.01% vs. control.

대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대한 sodium nitroprusside의 수축 증대 효과가 발견되었고(Fig. 6) isoproterenol의 경우 수축 증대 효과가 나타나지 않았다(data not shown).

고찰

화학적 저산소증 유발물질로 알려진 sodium cyanide는 내피의 기능과 상관없이 저농도(0.01~1.0 mM) 투여시 산소기체대신 투여된 질소기체에 의한 저산소증만큼의 저산소증을 유발하지 않았고 KCl에 의한 수축을 억제하지 못하였다(Fig. 1, Fig. 2). 현재 혈관 평활근의 수축기전으로 myosin light chain kinase (MLCK)와 myosin phosphatase가 관여되는 thick filament regulation과 protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase kinase(MEK), mitogen-activated protein kinase(MAPK), actin 결합 단백질 caldesmon 및 calponin 등이 관여되는 thin filament regulation이 제안되고 있다. 따라서 본 실험에서 myosin phosphatase의 targeting subunit인 MYPT1의 인산화를 통해 Rho-kinase 활성을 간접 측정하여 phenylephrine에 의한 수축의 생화학적 특성을 살펴보았는데 phenylephrine에 의한 수축에서 RhoA/Rho-kinase 활성이 증가되지 않았고(Fig. 3) MLCK활성에 대한 지표인 RLC 20 kDa의 인산화를 측정하여 수축의 생화학적 특성을 살펴보았는데 RhoA/Rho kinase 활성증가에 의한 myosin phosphatase 활성 억제가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 그런데 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM) 존재하에 phenylephrine에 의한 수축이 내피의 기능과 상관없이 sodium nitroprusside에 의해 유의성 있게 증대되었다(Fig. 5, Fig. 6). 따라서 sodium nitroprusside에 의한 평활근 수축기전중 흥분-수축 연결단계에서 중요한 Ca^{2+} sensitivity를 증대시키는 기전인 protein kinase C, RhoA/Rho-kinase 또는 tyrosine kinase 활성 증대가 의심된다.^{8,9)} 즉, protein kinase C, MEK, MAPK 등에 의한 caldesmon의 인산화나 RhoA/Rho-kinase 또는 tyrosine kinase 중의 src family 등에 의한 myosin phosphatase의 targeting subunit인 myosin protein targeting subunit 1(MYPT1)의 인산화를 통해 sodium nitroprusside가 혈관 평활근 수축을 증대시키는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 임상에서 혈관확장제로 흔히 쓰이는 sodium nitroprusside의 내피의 기능과 관련 없는 혈관수축 증대효과를 살펴보고 특수한 조건하에서 오히려 혈압상승효과가 있음을 보여 비선택성 혈관 이완제로 흔히 이용되는 sodium nitroprusside 사용에 있어 주의 및 새로운 가능성을 보고자 하였다.

결론

본 연구에서는 내피를 제거하지 않은 흰쥐 동맥혈관과 내피를

제거한 흰쥐 동맥혈관에서 sodium nitroprusside가 저농도의 sodium cyanide(0.01~1.0 mM) 존재시 phenylephrine에 의한 수축을 증대시켰다는 것을 관찰하였고 또한 phenylephrine에 의한 수축시 myosin phosphatase에서 targeting subunit의 RhoA/Rho kinase 인산화부위(Thr696)에서의 인산화를 증대시키지 못해서 myosin phosphatase를 억제하지 못한 것을 확인하였고 myosin의 light chain(LC) 20 kDa 인산화가 일시적으로 증대되었고 일정시간 후에 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 sodium nitroprusside에 의해 phenylephrine의 수축이 지속적으로 증대되는 것에 Ca^{2+} sensitivity를 증대시키는 protein kinase C, tyrosine kinase 또는 RhoA/Rho-kinase의 활성 증대 등이 작용할 가능성이 있다. 향후 sodium nitroprusside의 RhoA/Rho-kinase 활성화효과 및 myosin phosphatase 억제효과를 생화학적 방법으로 연구하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구는 2005학년도 대구가톨릭대학교 연구비 지원에 의한 것이다.

문헌

- 1) Bansal, B. C., Agarwal, A. K. and Rewari, B. B. : Hypertension and cerebrovascular disease. *J. Indian. Med. Assoc.* **97**(6), 226 (1999).
- 2) Yamamoto, T. and Bing, R. J. : Nitric oxide donors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **225**, 200 (2000).
- 3) Sanders, D. B., Kelly, T. and Larson, D. : The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion.* **15**, 97 (2000).
- 4) Feelisch, M. : The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **358**, 113 (1998).
- 5) Patel, H. P. and Mitsnefes, M. : Advances in pathogenesis and management of hypertensive crisis. *Curr. Opin. Pediatr.* **17**, 210 (2005).
- 6) Elliot, W. J. : Clinical features and management of selected hypertensive emergencies. *J. Clin. Hypertens.* **6**, 587 (2004).
- 7) Stough, W. G., O'Connor, C. M. and Gheorghade, M. : Overview of Current noninodilator therapies for acute heart failure syndromes. *Am. J. Cardiol.* **96**, 41 (2005).
- 8) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* **83**(4), 1325 (2003).
- 9) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth

- muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* **522**, 177 (2000).
- 10) Morgan, K. G. and Gangopadhyay, S. S. : Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J. Appl. Physiol.* **91**(2), 953 (2001).
- 11) Li, Y., Je, H. D., Malek, S. and Morgan, K. G. : Role of ERK1/2 in uterine contractility and preterm labor in rats. *Am. J. Physiol.* **287**, 328 (2004).
- 12) Li, Y., Je, H. D., Malek, S. and Morgan, K. G. : ERK1/2-mediated phosphorylation of myometrial caldesmone during pregnancy and labor. *Am. J. Physiol.* **284**, 192 (2003).
- 13) Jeon, S. B., Jin, F., Kim, J. I., Kim, S. H., Suk, K., Chae, S. C., Jun, J. E., Park, W. H. and Kim, I. K. : A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 27 (2006).
- 14) Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J. and Haystead, T. A. : Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **279**, 34496 (2004).