

## Isoproterenol에 의한 자궁근 이완의 기전 : 4-aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup>채널의 개방

김기하 · 이영재\* · 조명행 · 이문한 · 전보권\* · 류판동

서울대학교 수의과대학  
고려대학교 의과대학 약리학교실\*  
(1995년 10월 30일 접수)

Mechanism of isoproterenol-induced relaxation of the rat uterine smooth muscle:  
Activation of 4-aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup> channels

Ki-ha Kim, Young-jae Lee\*,  
Myung-haing Cho, Mun-han Lee, Boe-gwon Chun\*, Pan-dong Ryu

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University*  
*Department Pharmacology, Korea University College of Medicine\**

(Received October 30, 1995)

**Abstract** : Activation of K<sup>+</sup> channels induces relaxation of smooth muscles by reducing electrical excitability and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level.  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol is known to induce relaxation of the uterine smooth muscle by membrane hyperpolarization and K<sup>+</sup> efflux. Recently it is suggested that the activity of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel was increased by isoproterenol in the uterine myocytes isolated from myometrium of the pregnant rat. However, the type of K<sup>+</sup> channel mediating the relaxant effect of isoproterenol in the tissue level has not yet studied. In this work, we investigated the type of K<sup>+</sup> channels involved in the isoproterenol-induced relaxation of uterine smooth muscle by measuring the integrated isometric tension of the estrogen-treated isolated nonpregnant rat uterus. Contraction of uterine tissue was induced by oxytocin(0.2nM, 2~3 contractions/min) or high KCl(20~80mM).

The result are as follows: 1. Isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M) inhibited oxytocin-induced contraction of isolated rat uterus( $EC_{50}=1.17 \times 10^{-10}$ M). 2. Isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M) effectively inhibited uterine contraction induced by low KCl(20~40mM) but little those induced by high KCl(60~80mM). 3. Relaxant effect of isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M) on 0.2nM oxytocin-induced contraction was effectively reduced by 4-aminopyridine(3, 10mM) but little by TEA(10~30mM), Ba<sup>2+</sup>(1~30 $\mu$ M) and glibenclamide(100 $\mu$ M).

Our data suggest that the relaxant effect of isoproterenol is mediated by the K<sup>+</sup> channel(s) which can be blocked by 4-aminopyridine.

**Key words** : isolated uterus, oxytocin, KCl, isoproterenol, K<sup>+</sup> channel blockers.

## 서 론

임신과 분만의 성패를 좌우하는 중요한 한가지 요소는 임신기간과 분만과정에서 시기에 맞는 적절한 자궁평활근 운동성의 조절이라 할 수 있다. 따라서 자궁의 운동성은 신경, 호르몬, 조직의 생화학적 환경, 기계적인 자극 등 여러 요인에 의하여 복합적으로 조절되고 있다<sup>1,2</sup>. 자궁평활근에 대한 신경조절은 주로 교감신경 및 부교감신경에 의하여 조절되는데<sup>3,4</sup>, 일반적으로  $\alpha_1$ -adrenergic 수용체 활성화에 의해서 수축이 일어나고,  $\beta_2$ -adrenergic 수용체 활성화에 의해서 이완이 야기되며 또한 cholinergic 수용체에 작용하는 acetylcholine에 의해서 자궁수축이 일어나는 것으로 알려져 있다. 자궁조직에 분포하는 각각의 수용체 비율은 호르몬 상태, 종(species), 근육층에 따라 다르다. 일반적으로 progesterone의 영향하에서는  $\beta$ -adrenergic 수용체 수가 증가하고 또 임신말기에  $\beta$ -adrenergic 수용체의 수와 민감도가 증가한다고 알려져 있다.

취의 자궁에서  $\beta$ -adrenergic 효능제의 이완효과는 활동전위의 빈도감소, 막전압의 과분극과 관련이 있다<sup>5</sup>. 또 대표적인  $\beta$ -adrenergic 효능제인 isoproterenol은 큰 과분극 및  $K^+$  전도도의 증가와 자궁근내의  $Ca^{2+}$  농도감소의 결과로 자궁근을 이완시키는 것으로 알려져 있다<sup>6,7</sup>.

최근 자궁평활근에서 자주 보고되고 있는 large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  통로는 사람에서 임신기와 분만기에  $Ca^{2+}$ , tetraethylammonium,  $Ba^{2+}$ 에 대한 통로의 반응성이 달라짐이 알려졌다<sup>8</sup>. 특히 Anwer 등<sup>9</sup>은 패취클램프기법을 이용하여 임신취의 자궁근세포로부터  $K^+$  전류를 조사하여 이 채널이 자궁조직에 다수 존재하며  $\beta$ -adrenergic 효능제인 isoproterenol에 의하여 채널의 활성이 증가한다고 하였다. 이러한 사실들은 isoproterenol의 자궁근 이완 작용은 여러  $K^+$  채널 가운데 large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  채널의 활성화와 밀접한 관련이 있음을 시사하고 있다. 그러나 이러한 isoproterenol의 이완 작용 기전이 직접적으로 적출자궁근의 운동성을 측정하여 확인된 바는 없다.

따라서 본 연구는 적출자궁조직을 이용하여 isoproterenol의 이완작용에 관련이 되어 있는  $K^+$  채널의 종류를 조사하고자 수행하였다. 실험의 결과를 보면, 예상과는 달리 isoproterenol의 이완작용은 large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  채널 보다는 오히려 4-aminopyridine에 의하여 차단되는  $K^+$  채널의 활성화와 더 깊은 관련이 있을 것으로 여겨진다. 이 자

료의 일부는 초록의 형태로 대한약리학회에서 보고된 바 있다<sup>10</sup>.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 건강한 200~250g의 미경산 female Sprague-Dawley rat를 1주일동안 환경에 순화시킨 뒤 실험 24시간 전에 estradiol-17 $\beta$ 를 100  $\mu$ g/kg씩 처치하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 실온  $20 \pm 2^\circ C$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12 day: 12 night, 조도 150~300Lux로 조성된 실험동물 사육실에서 polycarbonate cage(24 $\times$ 42 $\times$ 18cm, 명진기계)에 4마리씩 수용하고 사료와 물을 자유로이 먹이며 사육하였다.

**사용약물 및 조제** : 자궁수축제로 사용한 oxytocin(Sigma)은 20nM stock solution을 만들어 냉동실에 보관하면서 매 실험시 3차 증류수를 이용하여 0.2nM의 농도로 희석하여 사용하였고, KCl(Sigma)은 80mM stock solution을 만들어 실험농도까지 3차 증류수로 희석하여 사용하였다.

$\beta$ -adrenergic 효능제인 isoproterenol(Sigma)은 1mM stock solution을 만들어 냉동실에 보관하면서 매 실험시 3차 증류수로 희석하여 사용하였고,  $\beta$ -adrenergic 길항제 propranolol(Sigma)는 1 $\mu$ M 농도로 만들어 사용하였다.  $K^+$  통로 차단제로는 비선택적  $K^+$  통로 차단제인 tetraethylammonium chloride(TEA, Sigma),  $BaCl_2$ (Sigma), delayed rectifier  $K^+$  통로, A current 및 ATP-sensitive  $K^+$  통로를 차단하는 약물인 4-aminopyridine(Sigma), ATP-sensitive  $K^+$  통로 차단제인 glibenclamide(Sigma) 그리고  $Ca^{2+}$  통로 차단제인 nifedipine(Sigma)를 사용하였다. TEA와  $BaCl_2$ 는 3차 증류수에, 4-aminopyridine, glibenclamide, nifedipine은 DMSO에 녹여 stock solution을 만든 뒤 매 실험시마다 각각 증류수와 DMSO로 희석하여 사용하였다. 모든 약물은 20ml 장기 수조에 100 $\mu$ l를 가하였을 때 원하는 최종 농도가 되도록 계산하여 stock solution을 만들었으며 누적적으로 첨가된 약물용매의 최종 부피가 영양액 부피의 0.4%를 넘지 않게 하였다.

본 실험에서 사용한 영양액은 Krebs' solution으로 조성은 다음과 같다. NaCl 118.4mM, KCl 4.7mM,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.2mM,  $KH_2PO_4$  1.2mM,  $NaHCO_3$  2.5mM, glucose 11.7mM,  $CaCl_2$  2.5mM.

**자궁조직 절편 제작** : 실험동물을 경추 탈골로 희생시킨 뒤 복강을 열어 자궁을 노출시켰다. 신속히

주위조직으로부터 자궁각을 분리해낸 뒤  $O_2/C-O_2(95\%/5\%)$  gas가 포화된 cold Krebs' solution이 가득찬 비이커로 옮겨 계속 산소를 공급하면서 지방 및 혈액을 제거하였다. 새로운 영양액이 든 petri dish로 재빨리 조직을 옮긴 후 가는 핀으로 sylgard 바닥에 조직을 고정시키고 자궁각 양끝 부분에서  $0.8 \times 0.5$ cm 크기의 종주근 조직표본을 만들었다. 제작한 표본 양쪽 끝은 silk를 이용해 묶어 하단은 acryl로 제작된 장기 수조내 조직지지대에 상단은 tansducer(F-60, Bio-system)에 연결하였다.

**자궁근 운동성 기록** : 장기 수조내로 옮겨진 조직 표본은  $37^\circ C$ 의 영양액에 충분한  $95\% O_2$ 와  $5\% CO_2$  혼합가스를 계속 공급하면서  $0.5 \sim 1.0$ g의 resting tension을 가한 뒤 매 30분마다 한번씩 영양액을 교환하였고, 조직의 상태를 계속 관찰하면서 적어도 1시간 이상 조직이 안정되어 조직의 자율운동이 일정해질 때까지 평형을 시켰다. 장기 수조의 용량을 20ml로 고정하고 physiograph(MK-IV, Narco Bio-systems)상에서 자궁근 운동을 등척성법으로 기록하였고 적분기(integrator, GPA-10, Narco Bio-systems)를 이용하여 수축고 및 수축빈도를 integrated tension으로 측정하였다. 자궁조직은 각 조직절편에 따라 동일한 약물을 적용할 때에도 수축의 크기, 수축의 횟수에서 차이가 매우 심하여 각기 다른 조직으로부터 약물효과를 일관성 있게 평가하기 위하여 수축크기나 횟수 등을 단순히 측정하여 자료로 이용하는 데는 문제점이 있다. 그래서 수축고와 수축빈도를 integrated tension으로 전환시켜 기록하는 integrator를 사용하여 이러한 문제점을 해결하고자 하였다.

#### 약물처리방법 :

(1) Oxytocin에 의한 자궁수축효과 : 장기 수조내에서 1시간 이상 평형시켜 자궁근의 자율운동이 안정되면 oxytocin을 누적적으로  $10 \sim 70 \mu l$  용량을 10분 간격으로 장기 수조내에 적용하였다. 약물의 최대효과가 나타나면 영양액으로 3회 세척한 후 회복을 위해 30분간 다시 평형을 시켰다. 자궁의 자율운동이 초기의 상태로 회복되면 위와 동일한 방법으로 반복해서 두번째 및 세번째의 용량반응곡선을 구하였다.

Oxytocin( $10^{-11} \sim 10^{-7} M$ )은 농도 의존적으로 자궁근 운동의 수축고와 수축빈도를 증가시켰다. 동일 자궁 조직절편에서 실시한 3회 연속 반복실험에서 두번째의 용량-반응곡선은 첫번째 약물적용 때보다 oxytocin의 효과가 감소되었고 세번째 용량반응곡선은 두번째 것과 같았다(Fig 1). 이 결과에서 oxytocin을 반복적용할 때 oxytocin에 대한 desensitization이 일어

남을 관찰할 수 있었다. 그러나 저농도( $10^{-11} \sim 3 \times 10^{-10} M$ )에서는 연속 3회까지의 반복실험에서 desensitization 효과가 나타나지 않고 유의성 차이도 보이지 않았다. 그래서 이후 실험에서는 자궁 이완제에 의한 약물효과를 평가하기에 적절한 자궁수축이 일어나며 반복실험 과정에 desensitization이 일어나지 않는 농도인  $0.2nM$  로 자궁수축을 유도하기로 하였다.

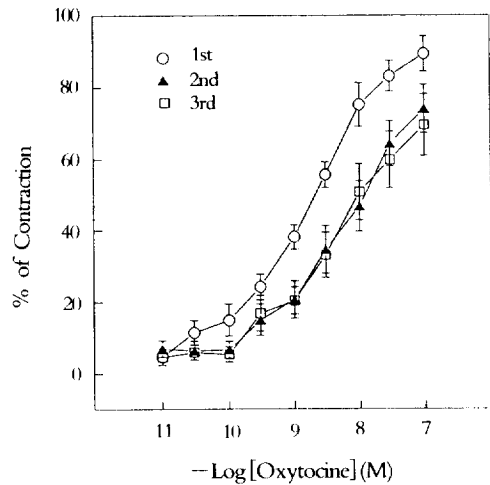


Fig 1. Effect of oxytocin( $0.2nM$ )-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat( $n=14$ ). The symbols are means and vertical bars show the s.e.m.

(2) Oxytocin으로 유도된 자궁근 수축에 대한 isoproterenol의 효과 : 평형시킨 자궁조직에  $0.2nM$  oxytocin을 첨가하여 수축을 유도한 다음, 반응이 안정될 때까지 10분간 운동성을 physiograph 상에서 기록하며 관찰하였다. 자궁조직의 수축운동의 크기와 빈도가 일정해지면 isoproterenol을  $10^{-10} \sim 10^{-6} M$  농도가 되도록 누적적으로  $10 \sim 70 \mu l$  용량을 5분 간격으로 적용하면서 약물효과를 관찰하였다.

$\beta$ -adrenergic 길항제 propranolol의 이완억제효과를 살펴보기 위해서 평형이 된 자궁조직에  $1 \mu M$  propranolol을 20분간 미리 노출시켰다. Propranolol의 노출 마지막 10분전에  $0.2nM$  oxytocin을 첨가하여 수축을 유도하고 자궁조직의 수축고와 수축빈도가 일정해지면 isoproterenol을 5분 간격으로  $10^{-10} \sim 10^{-6} M$  농도가 되도록 누적적으로 적용하여 propranolol을 전처치하지 않고 isoproterenol만을 적용시켰던 경우와 자궁이완정도를 서로 비교하였다.

(3) KCl로 유도된 자궁근 수축에 대한 isoprotere-

nal의 효과 : 적출자궁조직을 장기 수조에서 1시간이상 평형시켜 자궁조직을 안정시킨 후, 장기 수조에 각 농도(20, 40, 60, 80mM)의 KCl을 각각 적용한 뒤 약물에 대한 반응이 안정될 때까지 10분간 운동성을 기록하고 반응이 일정해지면 isoproterenol을  $10^{-10}$ M에서  $10^{-4}$ M 농도까지 누적적으로 적용하여 용량반응곡선을 구하였다.

(4)  $K^+$  통로 차단제 적용시 isoproterenol의 효과 : 만들어진 조직편을 장기 수조 내에서 1시간이상 평형시켜 안정시킨 뒤 0.2nM oxytocin을 첨가하여 수축을 유도한 다음, 수축고와 수축빈도가 일정해질 때까지 10분간 운동성을 관찰하였다. Oxytocin에 대한 반응이 일정해지면 isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M)을 누적적으로 5분 간격으로 작용하였다. Isoproterenol의 최대효과 즉, 최대 이완효과가 관찰되면 영양액으로 3회씩 세척한 후 회복을 위해 30분간 다시 평형을 시켰다. 자궁의 운동이 다시 회복이 되면  $K^+$  통로 차단제인 glibenclamide(100  $\mu$ M), TEA(10, 30mM), BaCl<sub>2</sub>(1, 10, 30  $\mu$ M) 그리고 4-aminopyridine(0.3, 1, 3, 10mM) 등을 isoproterenol 적용 전에 30분간 노출시켰다. Oxytocin에 대한 desensitization을 피하기 위해 약물적용 마지막 10분전에 0.2nM oxytocin을 첨가하고 반응이 일정해지면 isoproterenol을 5분 간격으로 누적적으로 적용하였다.

자궁근 운동성에 대한 약물반응의 계산 : 적용한 약물반응 즉, isoproterenol의 자궁이완효과는 0.2nM oxytocin과 각 농도의 KCl로 유도된 자궁수축에서  $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M isoproterenol 각 농도를 장기 수조에 적용한 직후 초기 5분간의 수축고 및 수축빈도변화를 integrated tension으로 측정하였고, 이완약물을 적용하기 전 각 자궁조직의 초기(control) 수축효과는 0.2nM oxytocin이나 각 농도의 KCl을 적용한 후 5분간의 integrated tension을 측정하였다. 이완제의 효과는 이 초기 수축작용에 대한 백분율로 표시하였다.

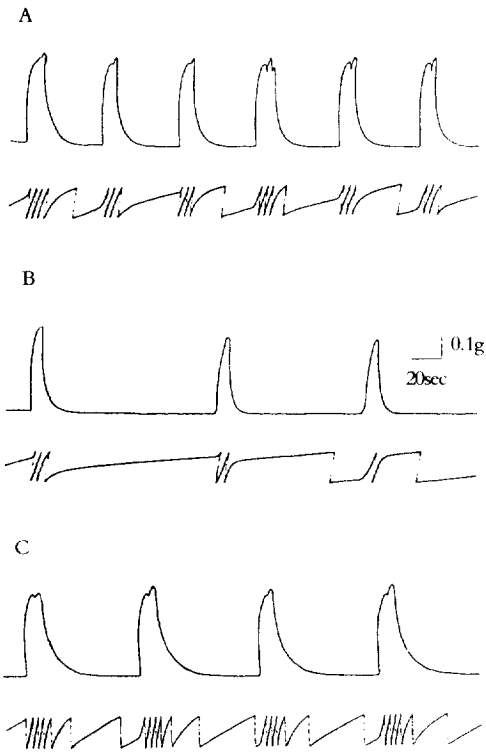
결과분석 및 통계처리 : 약물효과를 평가하기 위해 각 약물에 대한 자궁근 운동성의 용량반응곡선을 구하였다. 컴퓨터 PHARM program을 이용하여 최대효과의 50% 효과를 나타내는데 필요한 agonist의 농도인  $EC_{50}$ 을 구하였고 이로부터  $-\log EC_{50}$ 인  $pD_2$  값을 계산하였다. 각 약물에 대한 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며 각 농도에서 평균의 유의성 검정은 student's-t test로 하였으며  $p$ 값 0.05하인 것만을 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

## 결 과

Oxytocin으로 유도된 자궁수축에 대한 isoproterenol의 효과 : Oxytocin(0.2nM)으로 유도된 자궁근 수축반응이 안정된 다음, isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M)을 점진적으로 농도를 증가시켜 적용하였을 때 농도 의존적으로 수축고와 수축빈도를 감소시켜 자궁근이 이완되는 효과를 관찰하였다(Fig 2, 3). 그림 2A는 자궁근 운동성을 실제로 기록한 것으로서 oxytocin에 의하여 유발된 주기적인 수축운동을 보여주고 있다. 수축운동의 빈도와 수축고가 조직이나 시간에 따라 차이가 있었기 때문에 적분기를 사용하여 수량화하였다. 자궁근 운동성에 대한 isoproterenol의 효과는 수축고와 수축빈도에서 모두 관찰되었다. Isoproterenol은 0.1nM에서부터 oxytocin-유도자궁근운동을 효과적으로 억제하여 10nM에서는 수축운동을 완전히 억제하였다. Isoproterenol의 이완작용의  $EC_{50}$ 값은  $1.17 \times 10^{-10}$ M이고  $pD_2(-\log EC_{50})$ 값은 9.93( $n=25$ )이었다(Fig 3). 한편 그림 2는 isoproterenol에 의한 이완효과가 대표적인  $\beta$ -adrenergic 길항제인 propranolol에 의하여 가역적으로 억제됨을 보여주고 있다. Propranolol(1  $\mu$ M)은 isoproterenol의 이완작용을 효과적으로 차단하여 Isoproterenol  $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$ M의 농도에서 확실한 길항효과가 관찰되었으며( $p < 0.01$ ), isoproterenol의  $pD_2$ 값을 대조실험에서의 9.93보다 3.6 낮은 6.33( $n=6$ )으로 감소시켰다( $EC_{50}$ 값은 약 4,000배 증가).

KCl로 유도된 자궁수축에 대한 isoproterenol의 효과 : 일반적으로 세로바깥쪽의  $K^+$ 의 농도가 증가되면 통로가 열리더라도  $K^+$ 의 유출이 상대적으로 작게 일어난다. 따라서 isoproterenol의 이완작용이  $K^+$  통로의 개방에 의한 것이라면 영양액의  $K^+$  농도가 증가된 경우에는 이완작용이 감소될 것으로 여겨진다. Fig 4는 40mM KCl을 누적적으로 첨가할 때 나타나는 수축에 대한 isoproterenol의 효과를 조사한 것으로 isoproterenol에 의하여 용량의존적으로 이완되고 있음을 보여주고 있다. Fig 5는 이러한 일련의 실험자료를 종합한 것으로서 isoproterenol의 이완작용이  $K^+$ 에 의하여 용량의존적으로 억제되고 있음을 보여주고 있다. 각각 KCl 20, 40, 60 및 80mM을 적용하여 자궁수축을 유발한 뒤 isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M) 농도를 점진적으로 증가시켰을 때 저농도의 KCl(20, 40mM)에서는 효과적으로 자궁수축이 감소되었으나 고농도 KCl(60, 80mM)에서는 완전한 자궁이완효과가 나타나지 않았다. 이때 integrated tension으로 부터 구해진  $pD_2$ 값은 40mM KCl( $n=15$ )로 유발된 자궁수축에서는 8.37, 60mM KCl( $n=4$ )에서는 6.37, 80mM KCl( $n=4$ )에서는 2.18이었다.

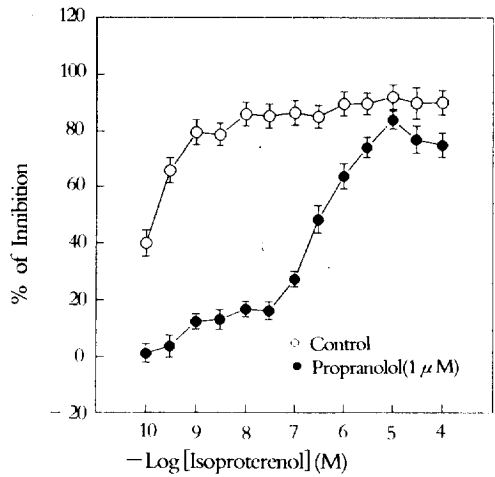
$K^+$  통로 차단제 적용시 isoproterenol의 효과 :  $K^+$



**Fig 2.** Inhibitory effect of isoproterenol on oxytocin(0.2nM)-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. A, Phasic contraction was induced by 0.2nM oxytocin. B, Oxytocin(0.2nM)-induced phasic contraction was reduced in the presence of isoproterenol(0.3nM). C, Propranolol(1 μM) inhibited the relaxation induced by isoproterenol(0.3nM). Upper panels in A, B and C are paper recording showing isometric contraction of rat uterus and lower panels are integrative outputs of tension.

통로는 그 종류가 다른 어느 종류보다도 다양하며, 차단제 역시 다양하게 알려져 있다<sup>13</sup>. Isoproterenol이 작용할 때 활성화되는 통로가 차단이 되는 경우에는 그 이완효과도 억제될 것이다. 본 연구에서는 4종의 K<sup>+</sup> 통로 차단제가 존재하는 상태에서 isoproterenol이 이완효과를 조사하였다.

Tetraethylammonium(TEA)은 비특이적인 K<sup>+</sup> 통로 차단제이지만 large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로의 경우 mM이하의 농도에서 이 통로를 유효하게 차단하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>. Fig 6은 TEA가 각각 10, 30mM 존재할 때 isoproterenol의 이완작용에 미치는 영향을 조사한 것으로 용량반응곡선은 미약



**Fig 3.** Effect of isoproterenol(○, n=25) and propranolol(●, n=6) on oxytocin(0.2nM)-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. The symbols are means and vertical bar show s.e.m.

하게 오른쪽으로 이동하였으나 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

Ba<sup>2+</sup>은 비특이적인 K<sup>+</sup> 통로 차단제로서 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로, muscarinic 'M' 통로 등을 유효하게 차단하는 것으로 알려져 있다<sup>15</sup>. Fig 7은 isoproterenol의 이완작용에 미치는 Ba<sup>2+</sup>의 영향을 보여주는 것으로 저농도(10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> M)의 isoproterenol의 효과는 유의성 있게 길항되었으나 nM 이상의 isoproterenol의 효과는 Ba<sup>2+</sup>(1~30 μM)에 의해서 길항되지 않았다.

4-aminopyridine(4-AP)은 delayed rectifier K<sup>+</sup> 통로 또는 A-current에 작용하는 K<sup>+</sup> 통로 차단제이다<sup>16</sup>. 4-AP를 전처리한 후 isoproterenol을 적용했을 때 용량반응곡선이 농도 의존적으로 오른쪽으로 이동하여 isoproterenol의 이완작용이 유의성 있게 억제됨을 관찰하였다(Fig 8).

한편 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 통로 차단제로 알려진 glibenclamide(100 μM)의 경우 isoproterenol의 자궁이완 효과에는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다(자료제시하지 않음).

## 고 찰

본 연구는 β-adrenergic agonist인 isoproterenol의 자궁이완작용에 관련된 K<sup>+</sup> 통로의 종류를 조사하기

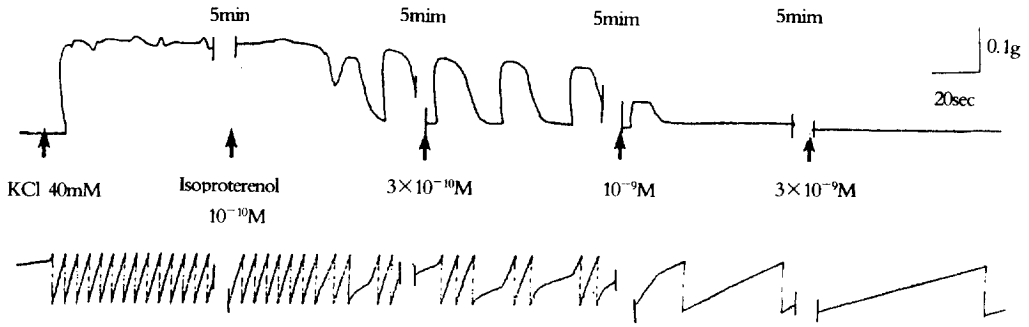


Fig 4. Effect of isoproterenol on 40mM KCl-evoked contraction. Upper panel is paper recordings showing isometric contraction of rat uterus and lower panel is integrative outputs of tension.

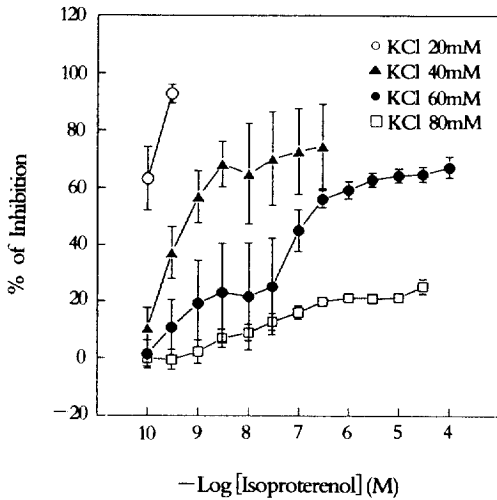


Fig 5. Effect of isoproterenol on KCl(20mM, n=17; 40mM, n=16; 60mM, n=4; 80mM, n=19)-evoked contraction. The symbols are means and vertical bars show the s.e.m.

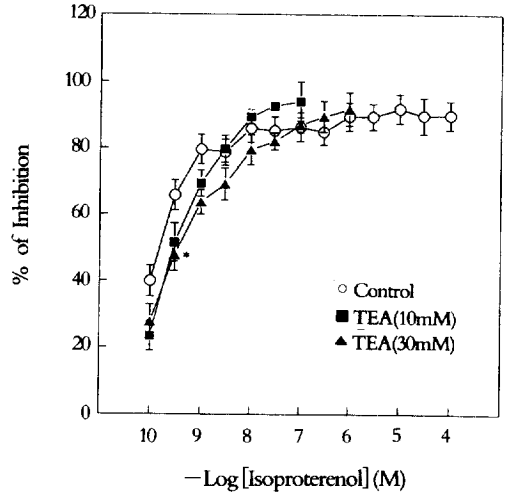


Fig 6. Effect of TEA(10mM, n=8; 30mM, n8) on oxytocin(0.2nM)-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. The symbols are means and vertical bars show the s.e.m. \*: p<0.05, significantly different from the 0.2nM oxytocin control dose response curve.

위하여 수행한 것으로 estrogen을 전투여한 비임신 쥐의 자궁에서 isoproterenol의 이완작용은 주로 4-aminopyridine에 의하여 억제되는 K<sup>+</sup>통로의 개방과 관련이 있을 것이라는 결과를 얻었다.

지금까지 자궁근의 K<sup>+</sup>통로를 개방하여 이완작용을 가져오는 약물로는 cromakalim, pinacidil 등과 같은 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 통로 개방제<sup>15-17</sup>와 isoproterenol과 같은 β-adrenergic agonist가 있다<sup>18</sup>. 그러나 ATP-sensitive K<sup>+</sup> 통로 길항제인 glibenclamide<sup>14</sup>는 고농도(100 μM)에서도 isoproterenol의 이완작용에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 isoproterenol은 이 통로

에는 작용하지 않는 것으로 보인다. 본 연구에서는 isoproterenol의 작용이 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>통로를 개방할 것이라는 가정을 하고 이를 조직수준에서 확인하고자 하였다. 이러한 가정은 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>통로가 자궁조직에서 쉽게 관찰이 되는 통로이고<sup>10,11,19-21</sup>, 또 임신한 쥐의 자궁근 세포에서는 isoproterenol에 의하여 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>통로에 의한 전류를 증가시키며, 이 효과가 propranolol에 의하여 길항된다

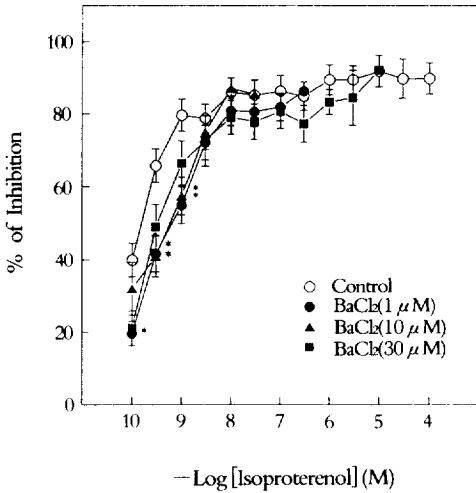


Fig 7. Effect of BaCl<sub>2</sub>(1 μM, n=6; 10 μM, n=8; 30 μM, n=5) on oxytocin(0.2nM)-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. The symbols are means and vertical bars show the s.e.m. \*: p<0.05, significantly different from the 0.2nM oxytocin control dose response curve.

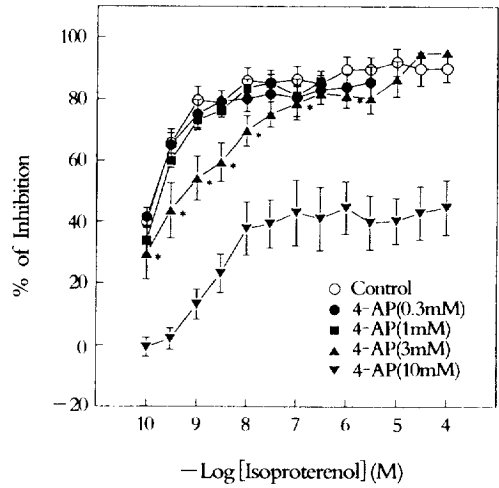


Fig 8. Effect of 4-AP(3mM, n=10) on oxytocin(0.2nM)-induced contraction in the isolated uterus of non-pregnant rat. The symbols are means and vertical bars show the s.e.m. \*: p<0.05, significantly different from the 0.2nM oxytocin control dose response curve.

는 사실에 근거하고 있다. 그러나 이러한 예상과는 다르게 본 실험의 결과는 mM 농도에서 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로를 효과적으로 차단하는 tetraethylammonium에 의해서 차단되지 않아 Anwer 등<sup>11</sup>의 결과와는 일치되지 않고 있다. 뿐만 아니라 본 실험에서 사용한 estrogen을 하루전에 전투여한 비임신쥐의 자궁조직에서 isoproterenol의 이완작용은 4-aminopyridine에 의해서 억제되는 K<sup>+</sup> 통로를 개방하여 유발되는 것으로 나타났다. 이러한 차이가 나타나는 이유로 가장 중요한 것은 자궁조직에 대한 호르몬의 영향을 들 수 있다. 즉, Anwer 등<sup>11</sup>의 실험에 사용된 임신중의 쥐는 주로 progesterone의 영향하에 있는 반면, 본 연구의 경우에는 실험 하루전에 estrogen을 투여하기 때문에 주로 estrogen의 영향하에 있다<sup>22-24</sup>. 이는 또한 자궁근의 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로가 임신중에는 세포내 Ca<sup>2+</sup>과 막전압에 민감하나 분만시에는 이러한 반응성이 소실되며, 아울러 TEA, Ba<sup>2+</sup> 등과 같은 차단제에 대한 반응성도 변화된다고 하였다. 이러한 사실들은 첫째, large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로가 자궁의 운동성을 조절하는 중요한 인자로서 호르몬의 밀접한 조절하에 있으며 둘째, 임신 및 분

만과정을 거치는 동안 이 통로의 조절기관과 아울러 구조적인 변화까지 수반된다는 점이다. 따라서 estrogen의 영향하에서는 isoproterenol에 의하여 열리는 통로가 large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로이라 할지라도 차단제에 대한 반응성도 변화되었을 가능성도 있다. 또 다른 측면에서는 호르몬의 영향에 따라 isoproterenol에 의하여 열리는 K<sup>+</sup> 통로의 종류가 달라질 수 있는 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 추후의 실험에서는 K<sup>+</sup> 통로를 개방하여 자궁근을 이완시키는 약물의 작용을 조사할 때 성호르몬의 영향을 충분히 고려하여 수행이 되어야 할 것이다.

본 실험의 결과 isoproterenol의 자궁근 이완작용은 4-aminopyridine(4-AP)에 의하여 차단되는 K<sup>+</sup> 통로를 개방하여 나타나는 것으로 보인다. 일반적으로 4-AP는 휴지막전위 주위에서 활성이 나타나며 저분극되면서 활성이 빠르게 억제되는 A-type K<sup>+</sup> 통로를 억제한다<sup>18</sup>. 또한 4-AP는 수mM 농도에서 delayed<sup>18,25</sup> 따라서 estrogen을 전처치한 쥐 자궁에서 isoproterenol의 작용을 매개하는 K<sup>+</sup> 통로의 종류를 정확하게 규명하는 데에는 추가적인 실험이 더 필요할 것으로 여겨진다.

자궁의 수축을 유도하는데 가장 널리 쓰이고 있는 oxytocin은 자궁 평활근에서는 활동전압 발생빈도를 증가시켜 자궁수축빈도를 증가시키고 활동전압 크기를 증가시켜 수축력과 수축기간을 증가시킨다<sup>2)</sup>. Oxytocin의 작용기전은 oxytocin이 자궁근 수용체에 결합하여 재빠르게 voltage-gated  $Ca^{2+}$  통로를 활성화시켜<sup>3)</sup> 외부  $Ca^{2+}$  유입을 일으켜 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시키고<sup>2)</sup> 수축을 유발한다. 본 실험에서도 oxytocin을 적출자궁조직에 적용하였을 때 자궁수축운동이 농도의존적으로 증가되는 현상을 관찰하였다. 그러나 동일 자궁조직에서 연속 3회 반복해서 oxytocin을 이용하여 자궁수축을 유도하였을 때 첫 번째에 비해 2, 3회 약물적용시 자궁수축운동의 수축빈도, 수축력, 수축기간이 감소하였다. 추후의 실험에서는 이러한 oxytocin의 작용에 대한 desensitization과 그 기전에 대하여도 관심을 기울여야 할 것으로 여겨진다.

결론적으로 본 연구에서는 estrogen을 전처치한 쥐 자궁에서 isoproterenol의 이완작용은 4-aminopyridine에 차단이 되는  $K^+$  통로를 개방하여 나타난다는 새로운 사실을 발견하였다. 이 통로의 성질에 대한 전기생리학적인 규명과 아울러 isoproterenol의 이완작용과 자궁의 호르몬 지배상태의 관련성에 대한 추가적인 연구가 요청되고 있다.

## 결 론

$K^+$  통로의 활성화는 세포막의 전기적 흥분성을 감소시키고 세포질내 유리  $Ca^{2+}$  농도를 감소시켜 평활근의 이완을 야기시킨다. 자궁이완제로 잘 알려진 isoproterenol의 작용도 자궁근에서의  $K^+$ 의 유출과 세포막의 과분극에 기인하며, 쥐의 임신자궁에서 분리된 세포에서 isoproterenol에 의해서  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  통로의 활성화가 증가됨이 관찰되었다. 그러나 실제 isoproterenol의 이완작용을 매개하는  $K^+$  통로의 종류에 대하여는 깊이 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 isoproterenol의 자궁근 이완작용과  $K^+$  통로의 관련성을 적출자궁조직을 이용하여 조직수준에서 알아보고자 하였다. 실험 24시간 전에 estrogen을 처치한 미경산 쥐에서 자궁근을 적출하여 oxytocin(0.2nM)과 KCl(20~80mM)로 수축을 유도한 다음,  $\beta$ -adrenergic 효능제인 isoproterenol을 처치하고 나타나는 자궁이완효과를 등척성기록법으로 측정하였다. 실험결과는 다음과 같다.

1. Isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M)은 0.2nM oxytocin에 의해 유도된 적출 쥐 자궁근의 수축을 억제하였다

( $EC_{50}=1.17 \times 10^{-10}$ M). 이 효과는  $\beta$ -adrenergi antagonist인 propranolol( $1 \mu$ M)에 의해 효과적으로 차단되었다.

2. KCl에 의해 유도된 자궁수축도 수용체 차단제인 isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M)에 의해 농도의존적으로 이완되었다. 그러나, Isoproterenol은 낮은 농도의 KCl(20~40mM)에 의해 유도된 자궁수축은 효과적으로 억제하였으나 높은 농도의 KCl(60~80mM)에서는 완전한 억제효과가 관찰되지 않았다.

3. Oxytocin(0.2nM)으로 유도된 수축에서 isoproterenol( $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ M)이 이완효과는 glibenclamide(100  $\mu$ M)에 의해 억제되지 않았고, TEA(10~30mM)와  $Ba^{2+}$ (1~30  $\mu$ M)에 의해서 저농도의 isoproterenol 효과는 길항되었으나 전반적으로 유의성 있는 길항작용은 관찰되지 않았다. 그러나 4-aminopyridine(3, 10mM)에 의해서는 유의성 있게 길항되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 isoproterenol의 이완 효과는 주로 4-aminopyridine에 민감한  $K^+$  통로가 활성화되어 나타나는 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Carsten ME, Miller JD. A new look at uterine muscle contraction. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1303~1315.
2. Wray Susan. Uterine contraction and physiological mechanism of modulation. *Am J Physiol* 1993; 264: C1~18.
3. Bottari SP, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier JP, Vauquelin G. Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor sub classes by gonadal steroids in human myometrium. *Acta Physiol Hung* 1985; 65: 335~346.
4. Carl A and Anders KM.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels of colonic myocytes. *Am J Physiol* 1989; 257(Cell Physiol. 26): C470~480.
5. Cohen-Tannoudji J, Vivat V, Heilmann J, Legrand C, Maltier JP. Regulation by progesterone of the high affinity state of myometrial  $\beta$ -adrenergic receptor and of adenylate cyclase activity in the pregnant rat. *J Mol Endocrinol* 1991; 6: 137~145.
6. Diamond J, Marshall JM. Smooth muscle relaxants: dissociation between resting membrane potential and resting tension in rat myometrium. *J Pharmacol Exptl Therap* 1969; 168: 13~20.
7. Bulbring E, Tomito T. Catecholamine action on



- smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1987; 39: 49~96.
8. Kroeger EA, Marshall JM. Beta-adrenergic effects on rat myometrium: mechanisms of membrane hyperpolarization. *Am J Physiol* 1973; 225: 1339~1345.
  9. Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, Ashford. Properties of large-conductance K<sup>+</sup> channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Proc R Soc Lond B* 1993; 251: 9~15.
  10. Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, Ashford. Properties of large-conductance K<sup>+</sup> channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Pro R Soc Lond B* 1993; 251: 9~15.
  11. Anwer K, Hovington JA, Sanborn BM. Antagonism of contractants and relaxants at the level of intracellular calcium and phosphoinositide turnover. *Endocrinology* 1989; 124: 2995~3002.
  12. Kim KH, Cho MH, Lee MH, Ryu PD. Relaxant effect of isoproterenol on the isolated uterus of non-pregnant rat. *Kor J Pharmacol Suppl.* 1994; 30: p43.
  13. Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25: 729~749.
  14. Watson S, Girdlestone G. Receptor & ion channel nomenclature. *Trends in Pharmacol Sci Suppl* 1995; 66~69.
  15. Piper IT, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M, Sadraei. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 901~907.
  16. Cheuk JMS, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT, Maresh MJA. Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 953~960.
  17. Kim HJ, Lee MH, Ryu PD. 쥐자궁근의 운동성에 대한 K<sup>+</sup> 채널 개방제에의 이완작용. *Kor J Pharmacol* 1994; 30: 191~203.
  18. Marshall JM, Kroeger E. Beta-adrenergic effects on rat uterus. 1. Ionic mechanisms of hyperpolarization. *Pharmacologist* 1971; 13: 315.
  19. Toro L, Ramos-Franco E, Stefani E. GTP-dependent regulation of myometrical K<sub>v</sub> channels incorporated into lipid bilayer. *J Gen Physiol* 1990; 96: 373~394.
  20. Toro L, Stefani E, Erulkar S. Hormonal regulation of potassium currents in single myometrial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2892~2895.
  21. Perez GJ, Toro L, Erulkar SD, Stefani E. Characterization of large-conductance, calcium-activated potassium channels from human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 652~660.
  22. Csapo A. Defence mechanism of pregnancy. Progesterone and the defence mechanism of pregnancy. *Ciba Fdn Study Grps* 1961; 9: 3~27.
  23. Marshall JM. Regulation of activity in uterine smooth muscle. *Physiol Rev* 1962; 42: 213~227.
  24. Kuriyama H, Suzuki H. Changes in electrical properties of rat myometrium during gestation and following hormonal treatments. *J Physiol* 1976; 260: 315~333.
  25. Gelband CH, Hume JR. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. *Cir Res* 1992; 71(4): 745~758.
  26. Marshall JM. Relation between the ionic environment and the action of drugs on the myometrium. *Fedn Proc* 1968; 27: 115~119.
  27. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979; 59: 606~692.
  28. Anwer K, Hovington JA, Sanborn BM. Antagonism of contractants and relaxants at the level of intracellular calcium and phosphoinositide turnover. *Endocrinology* 1989; 124: 2995~3002.