

결장뉴 전기활동도에 대한 칼슘 길항제의 영향*

서울대학교 의과대학 생리학교실

김 기 환 · 김 우 겸

=Abstract=

Effects of Ca^{2+} -antagonists on the electrical activity of guinea-pig taenia coli

Ki Whan Kim and Woo Gyeum Kim

Department of Physiology, College of Medicine, Seoul National University

The influences of Ca^{2+} -antagonists, verapamil and Mn^{2+} , upon the spontaneous electrical activity and contractions were studied in guinea-pig taenia coli. Spontaneous contractions were recorded with force transducer, and spike action potentials were measured extracellularly by use of suction electrode. All experiments were performed in tris-buffered Tyrode solution which was aerated with 100% O_2 and kept at 35°C.

The results obtained were as follows:

- 1) Verapamil suppressed the frequency and amplitude of spontaneous contractions dose-dependently, and blocked completely mechanical responses at the concentration of 1 mg/l.
- 2) The frequency of bursts of spike discharge (bursts frequency) and the number of spikes in a burst (spikes frequency) were reduced in a dose-dependent manner within the concentration range of 10^{-5} to 10^{-3} g/l, and bursts frequency was affected more readily at a low concentration of 10^{-5} g/l verapamil.
- 3) The verapamil-induced suppression of spontaneous contractions in the Tyrode solution containing 1 mM Ca^{2+} was completely antagonized by the addition of extra Ca^{2+} to the Tyrode solution (2 mM Ca^{2+}).
- 4) Mn^{2+} suppressed the amplitude of spontaneous contractions, whereas Mn^{2+} accelerated the frequency dose-dependently within the range of low concentrations (10^{-7} to 10^{-4} M Mn^{2+}).
- 5) The bursts frequency determining frequency of spontaneous contractions was increased in a dose-dependent manner, whereas the spikes frequency known to determine the contractions amplitude was reduced within the range of low concentrations. At a high concentration of 1 mM Mn^{2+} , however, all spontaneous contractile responses were blocked simultaneously with the disappearance of electrical activity.
- 6) The frequency and amplitude of spontaneous contractions altered by Mn^{2+} in 1 mM Ca^{2+} Tyrode were increased by extra Ca^{2+} (2 mM).

* 이 논문은 1984년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

평활근은 구조상 단단위성 근육(單單位性筋肉, unitary muscle)과 다단위성 근육(多單位性 筋肉, multi-unit muscle)으로 구분된다. 자궁근, 내장근과 같이 자동능(自動能, automatism)이 있는 평활근(平滑筋, smooth muscle)은 단단위성 평활근에 속하며, 안구 내 근육, 큰 혈관 평활근은 자동능이 없이 신경에 의하여만 수축할 수 있는 다단위성 평활근으로 분류되고 있다. guinea-pig의 결장뉴(結腸紐, taenia coli)는 체외에서도 자발적 수축(spontaneous contraction)을 하는 자동능을 보유하고 있는바, 단단위성 평활근에 속하고 있다(Prosser and Mangel, 1982).

결장뉴의 자발적 전기활동도(spontaneous electrical activity)는 빠른 성분인 가시전압(spikes)과, 느린 성분으로 구분될 수 있다. 느린 성분은 주기적인 세포막의 완만 탈분극(slow depolarization)현상으로서 편위 상 3가지 형태로 분류하고 있다(Kuriyama, 1970). 즉

Type I : 개개의 자발적 가시전압의 prepotential

Type II : 신경에 의한 흥분성 시냅스 후 전압(excitatory postsynaptic potential)

Type III : 가시전압의 무리(a train of spike activity, burst of spike discharge)를 일으키는 규칙적인 완만 탈분극 현상으로서 일반적으로 서파(slow wave)라고 부른다.

guinea-pig 결장뉴에서 서파의 주기는 1~3분으로서 이것이 가시전압의 활동도를 조절하고 있다. 가시전압 빈도(spike frequency)는 서파의 최대 탈분극기에 제 1 높아 대개 1 spike/sec 정도로 발생된다.

결장뉴의 자발적 수축은 평활근 세포의 주기적인 활동전압으로 시작되어 유지되며, 이 가시전압은 초기에 발생되는 내향전류(內向電流, inward current)의 대부분이 Ca^{2+} 이라는 것이 알려져 있어(Ca spike; Brading et al., 1969), Ca^{2+} 이 결장뉴의 자발적 수축성에도 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

Ca^{2+} 은 흥분—수축 연결물질(excitation-contraction coupler)로서 근수축에 매우 중요한 구실을 하지만, 세포외액 중의 Ca^{2+} 은 또한 세포막의 안정성에도 기여하므로(stabilizing effect) 어느 농도 이상으로 높은 경우에는 오히려 흥분성을 감소시키는 효과도 나타낸다(Bohr, 1964; Kuriyama, 1968).

근수축에 동원되는 Ca^{2+} 의 중요 공급원을 살펴보면 골격근에서는 근장그물(sarcoplasmic reticulum, SR)

만으로도 충분하지만, 심근의 경우에는 SR의 발달이 덜하여 상당량의 Ca^{2+} 을 세포외로부터 공급받고 있으며 평활근에서는 더욱더 부족하여 세포외액 중의 Ca^{2+} 이 중요 공급원이 되고 있다. 이러한 구조—기능상의 특징으로 인하여 세포막을 통한 Ca^{2+} 이동에 영향을 주는 조건하에서는 평활근, 심장근의 순서로 수축성에 큰 영향을 받게 된다(Fleckenstein, 1977).

평활근의 수축성 단백질(contractile proteins)을 활성화시키는 Ca^{2+} 은 두가지 중요 공급원으로부터 나오는데 첫째는 세포막 외면에 느슨히 붙은 것을 포함한 세포외액 중의 Ca^{2+} 과, 둘째로 세포막 내면에 붙어있는 것을 포함하여 SR, 미토콘드리아 등에 있는 세포내 Ca^{2+} 이 공급원으로 작용한다(Prosser, 1974; Kuriyama et al., 1977).

세포막에 존재하는 Ca^{2+} 통로(Ca^{2+} channel)를 선택적으로 차단하는 물질, 소위 칼슘 길항제(Ca^{2+} -antagonists)에는 유기제제로 verapamil, D-600, nifedipine, diltiazem 등이 있고 무기물질로는 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} 등이 있다. 본 실험에서는 이들중 verapamil 과 Mn^{2+} 을 사용하였다. verapamil(Isoptin)은 심근세포막의 Ca^{2+} 통로를 통과하는 Ca^{2+} 에 의하여 생겨나는 완만내향전류(slow inward current)를 선택적으로 차단하여 수축력을 감소시킴이 잘 알려져 고혈압 치료제로서 널리 이용되고 있다(Fleckenstein, 1964; Kohlhardt et al., 1972). 이것은 심근은 물론 자궁근, 소화관 평활근, 혈관 평활근 등에도 Ca^{2+} 유입(Ca^{2+} influx)을 선택적으로 막아 수축성을 떨어뜨리는 작용이 있음이 알려져 있다(Fleckenstein and Grün, 1969; Bohr, 1973; Fleckenstein, 1977).

결장뉴에서 Mn^{2+} (1~2 mM)은 유발시킨 활동전압을 차단시키고 있으며(Brading et al., 1969) guinea-pig 자궁근에서는 Mn^{2+} 이 Ca^{2+} 통로의 charge carrier 로서 Mn^{2+} current 를 만들고 있다(Ochi, 1976).

본 실험은 결장뉴 수축성의 여러단계에서 중요한 작용을 하고 있는 Ca^{2+} 의 효과를 연구하기 위하여, 평활근 세포자체의 자발적 활동전압 발생으로 생기는 자발적 수축(spontaneous myogenic activity)에 대한 verapamil 과 Mn^{2+} 의 투여효과를 광범위한 농도범위에서 관찰하고 비교분석한 것이다.

II. 실험 방법

체중 300 g 내외의 guinea-pig 를 후두부를 강타하고 경동맥을 절단, 실험시켜 즉사시킨 뒤 개복하여 결장

뉴를 적출하였다. 실온에서 100% O₂으로 평형을 이루고 있는 phosphate-완충 Tyrode 용액(NaCl 147, KCl 4, MgCl₂·6 H₂O 1.05, CaCl₂·2 H₂O 2, NaH₂PO₄·2 H₂O 0.42, Na₂HPO₄·12 H₂O 1.81, glucose 5.5 mM, pH 7.35)으로 채워진 준비용기내에서 1시간정도 회복시켜 결장뉴가 충분히 이완된 것을 확인한 뒤, 현미경 밑에서 종주근(longitudinal muscle)인 결장뉴를, 같이 붙어있는 윤상근(circular muscle)과 깨끗하게 분리하고 길이 10 mm, 나비 2 mm(wet weight, 5 mg 내외) 정도로 만들어 30분간 충분히 산소를 공급하면서 회복시켰다.

자발적 수축에 관한 실험은 근육고정기에 준비된 결장뉴 양단을 묶은 뒤, 수직형 실험용기(vertical chamber, 용량 50 ml)를 이용하여 35°C에서 완전히 이완시킨 상태로 1시간동안 새환경에서 회복시킨 뒤 실험을 시작하였다. 실험용액은 35°C에서 100% O₂로 평형을 이루고 있는 tris-완충 Tyrode 용액(NaCl 158, KCl 4, CaCl₂·2 H₂O 2, MgCl₂·6 H₂O 1.05, tris·HCl 10, glucose 5.5 mM, pH 7.35)을 사용하였다.

수축곡선의 기록은 근육고정기와 장력변환기(Grass FT-03)를 연결하여 등장성 수축(isometric contraction)곡선을 기록기(Device physiograph)에 기록하였다. 자발적 수축이 어느 정도 일정한 빈도로 나타날 때, 근육의 길이를 단계적으로 늘려 길이-장력 곡선을 그려 최적길이(optimal length)를 정한 뒤, 이 길이에서 모든 실험조건을 가하였다.

활동전압(action potentials, spikes)의 기록은 용량 3 ml의 수평형 실험용기(horizontal chamber) 내에서 시행하였고, 35°C에서 100% O₂으로 평형을 이루고 있는 정상 tris-완충 Tyrode 용액을 6 ml/min 정도의 속도로 1시간정도 관류시켜 새환경에서 완전히 회복시켰다. 준비용기내에서 준비된 결장뉴는 실험용기내에 설치된 고무판에 한쪽 끝을 핀으로 고정하고, 또 한쪽은 실로 묶고 고리를 만들어 장력변환기(Device force transducer)와 연결하였다. 수직형 실험용기내에서와 같이 접힐 정도로 충분히 이완된 상태로 회복시킨 뒤, 자발적 수축곡선이 기록되면서 그 빈도가 일정해지면 길이-장력 곡선을 구하여 최적길이를 정한 뒤에 실험을 시작하였다. 활동전압은 흡입전극(suction electrode)을 결장뉴의 serosal surface에 부착시켜 세포외(extracellular recording)에서 기록을 하였으며, 직류와 교류 증폭기를 사용하여 비교가 가능하게 연결하였다.

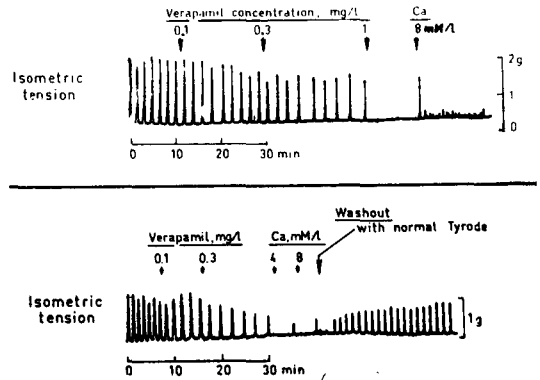


Fig. 1. Effects of verapamil on the spontaneous contractions of guinea-pig taenia coli.

Verapamil suppressed the frequency and amplitude of spontaneous contractions dose-dependently, and blocked completely at the concentration of 1 mg/l. Note that the inhibitory action of verapamil on spontaneity was partially antagonized by the administration of extra Ca²⁺ (upper record), but this verapamil-induced depression of contractility was disappeared by the wash-out with normal Tyrode solution (lower record).

Ⅲ. 실험 성적

1) verapamil 이 자발적 수축에 미치는 영향(그림 1)

정상 Tyrode 용액에서 자발적으로 수축을 하고 있는 결장뉴에 0.1 mg/l verapamil 을 가하자 수축빈도는 느려졌으나, 장력의 크기에는 큰 변화가 없었으며 0.3 mg/l 로 농도를 높이자 수축빈도는 더욱 느려졌고 장력의 크기도 감소하였다. 1 mg/l 로 verapamil 농도를 높이면 자발적 수축은 완전히 정지되었고, 그 효과가 Ca²⁺ 추가투여로 회복되는지를 알아보기 위하여 Ca²⁺ 농도를 정상 2 mM 로부터 8 mM 로 올리자 수축빈도는 대조시보다 오히려 증가되었으나 수축의 크기는 아주 작게 나타났고 정상적인 수축으로는 회복되지 못하였다(그림 1의 상단기록). 그림 1의 하단기록에도 비슷한 결과를 보이고 있다. 즉 정상 대조시 10분간 8번 뛰는 수축빈도를 보이다가, 0.1 mg/l verapamil 투여시 10분에 6번으로 수축빈도가 감소되었으나 수축크기는 별 변화가 없었다. 그러나 0.3 mg/l 로 더 높이자

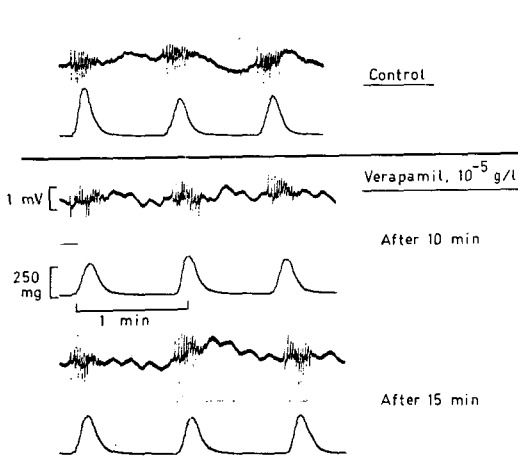


Fig. 2-1. Effects of verapamil on the spontaneous electrical activity and contraction at the concentration of 10^{-5} g/l.

Electrical activity parameters during control period with respect to the interval between bursts of spike discharge and the spikes in a burst were compared with those obtained 10 and 15 min after verapamil administration. The interval increased from control 49.2 sec to 52.8 sec and 56.4 sec respectively. The number of spikes in a burst (spike frequency), however, was almost no changed (10 spikes in a burst).

The frequency of spontaneous contractions was reduced as the interval between bursts increased, but the amplitude was nearly same.

수축빈도와 크기가 모두 감소되어 10분에 5번, 그리고 높이는 50% 정도로 낮아졌다. 여기에 세포의 Ca^{2+} 농도를 4 및 8 mM 로 높여주었으나 verapamil 에 의한 수축성 억제현상은 회복되지 못하였고 8 mM Ca^{2+} 에서 수축빈도는 증가되었다. 그러나 정상 Tyrode 용액으로 갈아주었더니 곧 규칙적인 자발적 수축으로 회복되었다.

2) 결장뉴 활동전압 및 수축성에 미치는 verapamil 효과(그림 2-1, 2-2, 2-3, 그림 3 및 그림 4)

verapamil 의 자발적 수축에 미치는 영향에 대하여 그 작용기전을 밝혀보고자 흡입전극을 사용하여 수축곡선과 동시에 활동전압을 기록한 결과를 여기에 표시하였다. 즉 verapamil 농도를 10^{-6} g/l 에서 단계적으로 높여 10^{-4} g/l 및 10^{-3} g/l 로 만들었을 때, 각 농도에

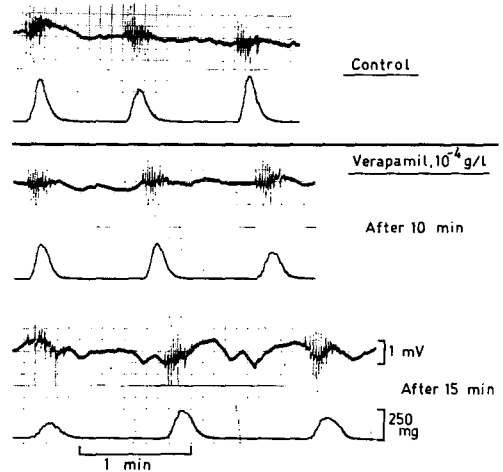


Fig. 2-2. Effects of verapamil on the spontaneous electrical activity and contraction at the concentration of 10^{-4} g/l.

The interval between bursts of spike discharge was increased from control 56.4 sec to 60 sec and 74.4 sec respectively. The spikes frequency was reduced from control 10 spikes in a burst to 8 and 8 spikes respectively. The frequency and amplitude of spontaneous contraction were decreased.

서 시간경과에 따라 활동전압 및 수축곡선에 나타나는 변화를 그림 2-1, 2-2 및 2-3에 각각 나타내었다.

그림 2-1에 10^{-5} g/l verapamil 투여 전후의 자발적 수축곡선과 활동전압에 나타난 변화를 나타내었다. 투여전 정상 대조시의 가시전압 무리(bursts)간의 시간(burst interval)은 49.2 sec 이고 burst 내의 가시전압 수는 10이었다. 투여후 10분 및 15분 경과후의 무리사이(interval)는 각각 52.8 sec 및 56.4 sec 로 길어졌으나 무리내 가시전압수(10/burst)는 변화가 없었다.

그림 2-2에 10^{-4} g/l verapamil 투여효과를 나타내었는데, 정상 대조시의 burst interval 56.4 sec, 가시전압 수는 10이었다. 투여후 10분 및 15분 경과시의 interval 은 60 sec 및 74.4 sec 로 길어졌고, 가시전압 수도 8로 감소되면서 수축곡선의 크기도 감소되었다.

그림 2-3에 진한 농도인 10^{-3} g/l(1 mg/l) verapamil 투여결과를 표시하였다. 정상 대조시의 burst interval 은 76.8 sec 이고, 한 무리내의 가시전압 수는 10이었다. 10분 및 15분 경과후의 무리간의 시간은 81.6 sec 및 109.2 sec 로 심하게 길어졌으나 가시전압수의 감소는 각각 8 및 7로 약간 줄어들었다. 이 농도에서 20분

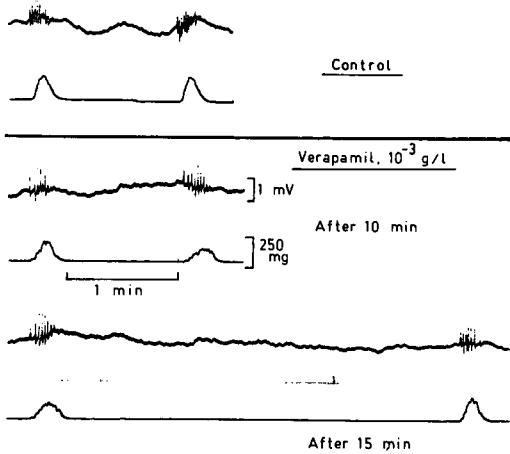


Fig. 2-3. Effects of verapamil on the spontaneous electrical activity and contraction at the concentration of 10^{-3} g/l. The interval between bursts of spike discharge was increased from control 76.8 sec to 81.6 and 109.2 sec respectively. The spike frequency in a burst was decreased from control 10 spikes to 8 and 7 spikes respectively, 10 and 15 min after verapamil administration. About 20 minutes after the administration, all spontaneous electrical activity was disappeared. The frequency and amplitude of spontaneous contraction decreased as the interval of bursts and spike frequency were altered.

후에는 완전히 자발적 수축이 정지되었다.

verapamil 농도증가에 따라 나타나는 결장뉴 전기활동도 중 가지전압 무리의 빈도(bursts frequency)와 한 무리내 가지전압 수(spikes frequency)의 변화를 정상 대조시에 대한 상대적 크기로 표시한 것을 그림 3에 나타내었다. 여기에 나타낸 것은 투여후 15분 경과시에 기록된 것을 대조시의 값과 비교한 것이다. 무리의 빈도는 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/l에서 각각 88, 76 및 70%로 감소되었으나, 무리내 가지전압 수는 10^{-5} g/l에서는 변화가 없었고 10^{-4} 및 10^{-3} g/l에서 80 및 70%로 감소되었다. 그림 4에는 verapamil의 각 농도에서 투여후 시간경과에 따른 무리의 빈도 및 무리내 가지전압 수의 변화과정을 표시하였다. 낮은 농도인 10^{-5} g/l에서는 가지전압 빈도는 변화가 없고 무리의 빈도는 점차로 감소되었으나, 높은 농도인 10^{-3} g/l에서는

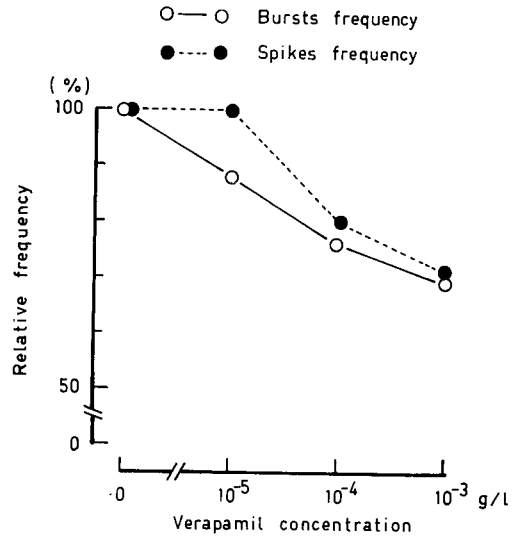


Fig. 3. Dose-dependency of verapamil-induced suppression of spontaneous electrical activity in guinea-pig taenia coli. Bursts frequency (inversely related to the interval between bursts of spike discharge) and spikes frequency (the number of spikes discharge in a burst) were expressed as the ratio of data obtained during control period and 15 minutes after verapamil administration. Note that bursts frequency was reduced dose-dependently, but spikes frequency was not changed at a low concentration of 10^{-5} g/l and then decreased dose-dependently as verapamil increased.

두 변수가 모두 감소되다가 20분경에는 자발적 활동전압 발생이 완전히 억제되었다.

3) verapamil에 의한 수축 억제상태의 회복 . (그림 5)

정상 Tyrode 용액 (Ca^{2+} , 2 mM)에 verapamil을 투여하여 일으킨 수축력과 수축빈도가 억제된 상태는 Ca^{2+} 의 추가투여로 회복되지 못하였으나(그림 1), Tyrode 용액내 Ca^{2+} 을 1 mM로 낮춘 상태에서 자발적 수축을 하는데에 0.05 mg/l (5×10^{-5} g/l) verapamil을 투여하여 수축빈도와 크기가 감소된 상태에서 2 mM로 세포의 Ca^{2+} 을 높여주면 수축곡선의 빈도와 크기가 완전히 정상으로 회복됨을 보이고 있다(그림 5). Ca^{2+} 농도를 4 mM로 더 높여주면 자발적 수축빈도는 증가되나 크기는 감소되었다.

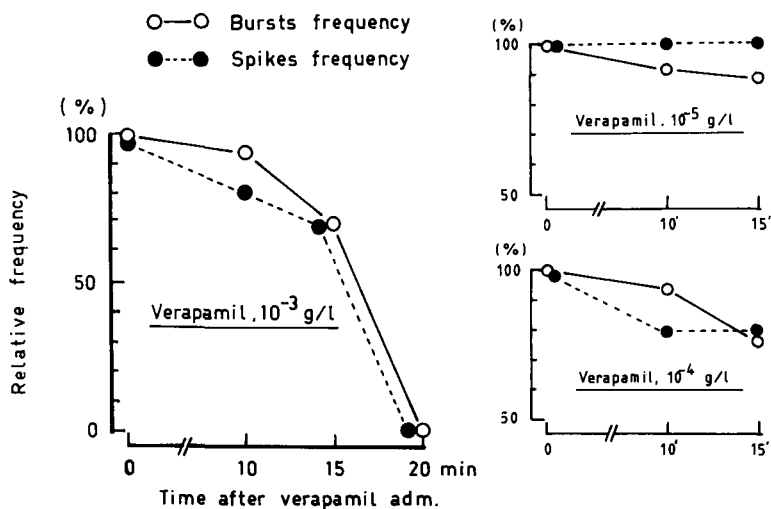


Fig. 4. Changes in bursts frequency and spikes frequency during prolonged exposures to various concentrations of verapamil.

At a low concentration of verapamil (10^{-5} g/l) spikes frequency was decreased gradually during the exposure. At a high concentration of verapamil (10^{-3} g/l), however, two parameters were simultaneously suppressed as the time elapsed, and 20 minutes after the administration spontaneous electrical activity was blocked.

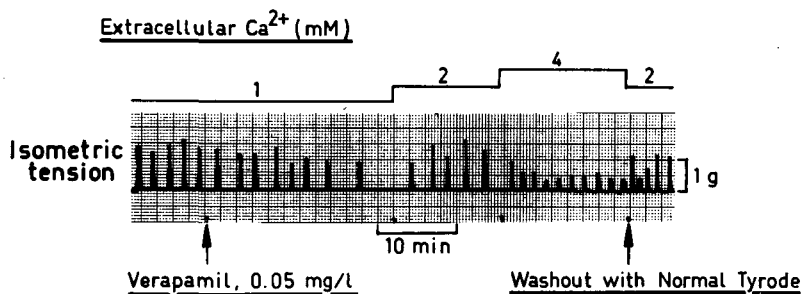


Fig. 5. Recovery from the verapamil-induced suppression of spontaneous contractions in guinea-pig taenia coli. The depressed contractility induced by verapamil administration (5×10^{-5} g/l) in a low Ca^{2+} Tyrode solution (1mM) was completely recovered by the addition of extra Ca^{2+} to the Tyrode solution (2 mM). However, at the concentration of extracellular Ca^{2+} 4 mM the frequency of spontaneous contractions was more accelerated in contrast the amplitude was decreased.

4) Mn^{2+} 이 자발적 수축에 미치는 영향(그림 6)

정상 Tyrode 용액 (Ca^{2+} , 2 mM)에서 규칙적으로 자발적 수축을 하는 결장뉴에 세포의 Mn^{2+} 농도를 10^{-7} M로부터 단계적으로 높여 10^{-3} M이 될 때까지 나타나는 수축곡선의 빈도와 높이의 변화를 그림 6에 나타내었다. 수축빈도는 Mn^{2+} 농도증가에 따라 증가되었으나 수축의 크기는 서서히 감소되었다. 이 결과는 verapamil의 수축빈도에 미치는 효과와는 반대되는 결과이다.

5) Mn^{2+} 이 결장뉴 전기활동도에 미치는 효과(그림 7, 8 및 그림 9-1, 9-2)

그림 6의 상단에도 느린 속도로 그린 전기활동도가 있어 Mn^{2+} 농도증가에 따라 한 무리내의 가시전압 발생 기간이 감소되고, 가시전압의 크기가 작아짐을 알 수 있다. 이러한 관계를 보다 정량적으로 자세하게 표시한 것이 빠른 속도로 기록하여 비교한 그림 7에 나타나 있다. 이 그림에서는 여러 농도중 낮은 농도인 10^{-7}

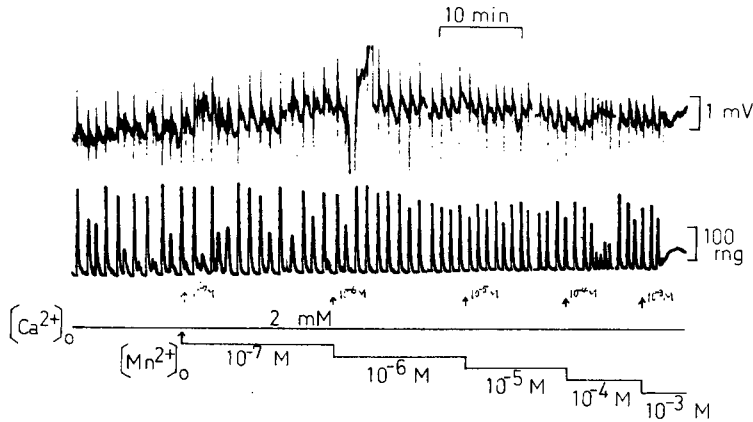


Fig. 6. Effects of manganese(Mn^{2+}) on the spontaneous contractions of guinea-pig taenia coli. Upper tracing; electrical activity recorded extracellularly by use of suction electrode. Lower tracing; isometric tension recording. Mn^{2+} suppressed the amplitude of spontaneous contractions, but accelerated the frequency dose-dependently.

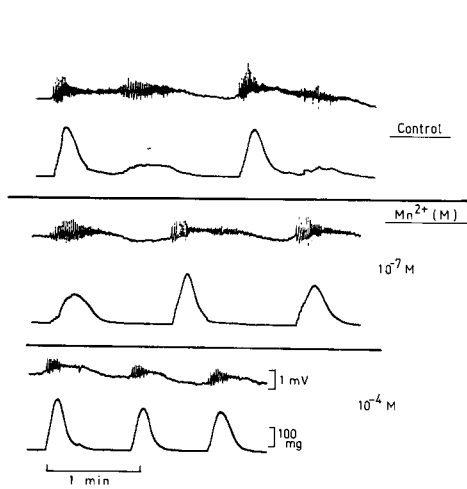


Fig. 7. Effects of Mn^{2+} on spontaneous electrical activity and contractions in guinea-pig taenia coli.

The interval between bursts of spike discharge was reduced from control 118.8 seconds to 78.0 and 54.0 seconds at the concentration of 10^{-7} M and 10^{-4} M respectively.

The number of spikes in a burst was also decreased dose-dependently from control 42 spikes/burst to 25 and 9 spikes/burst respectively.

M 과 높은 농도로서 10^{-4} M Mn^{2+} 에서 나타난 변화를 보여주고 있다. 가시전압들 무리사이 간격과 한 무리 내 가시전압 수는 대조시 119 sec와 42였고, 10^{-7} M과

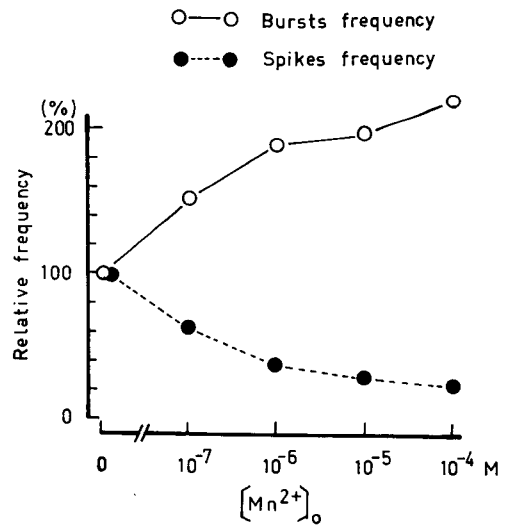


Fig. 8. Dose-dependency of Mn^{2+} effects on spontaneous electrical parameters in guinea-pig taenia coli. Bursts frequency determining the frequency of spontaneous contractions was increased dose-dependently, whereas spikes frequency which is usually known to determine the amplitude of contractions was reduced over the range of low concentrations (10^{-7} to 10^{-4} M).

Frequency at various concentrations of Mn^{2+} was given as a relative value of the frequency during control period.

10^{-4} M에서는 각각 78 sec와 15, 그리고 54 sec와 9로서 농도증가에 따라 무리간 간격은 짧아지고(즉 무리

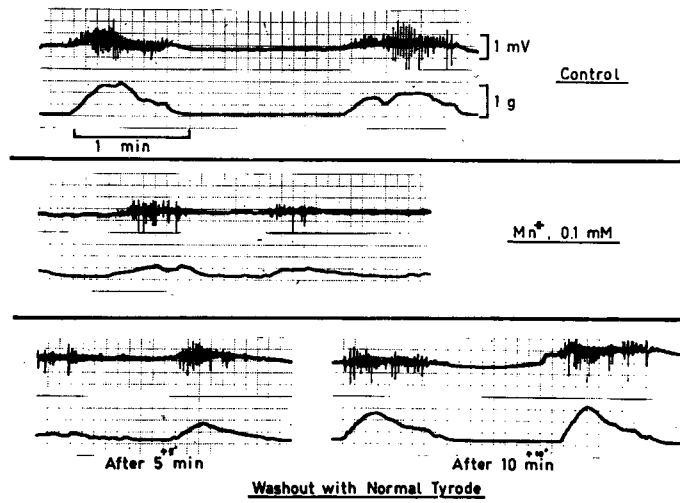


Fig. 9-1. Effects of Mn^{2+} on spontaneous electrical activity and contraction at a relatively high concentration of 0.1 mM in guinea-pig taenia coli. The interval between bursts of spike discharge and the spikes frequency were 141.6 seconds and 35 spikes in a burst during control period, while those obtained after Mn^{2+} administration were 76.8 seconds and 17 spikes respectively. Mn^{2+} -induced altered phenomena were completely recovered 10 min after the washout with normal Tyrode solution.

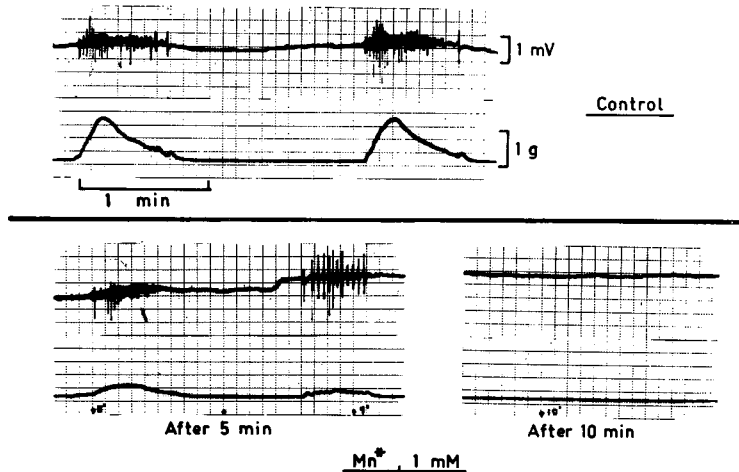


Fig. 9-2. Effects of Mn^{2+} on spontaneous electrical activity and contractions at a high concentration of 1 mM in guinea-pig taenia coli. The interval between bursts of spike discharge and the number of spikes in a burst during control period were 129.6 seconds and 24 spikes respectively, whereas 5 minutes after Mn^{2+} administration the interval and spikes frequency were 96.0 seconds and 12 spikes. Contractions parameters, frequency and amplitude, were altered similarly to changes in spontaneous electrical parameters. About 10 minutes after Mn^{2+} administration spontaneous activity was completely blocked.

의 빈도는 증가), 무리내 가시전압 수는 감소되었다.

이러한 관계를 대조시의 무리빈도와 무리내 가시전압 빈도를 각각 100%로 하였을 때, 각 농도에서의 변

화를 그림 8에 나타내었다. 무리 빈도(bursts frequency)는 Mn^{2+} 농도를 $10^{-7}M$ 에서 단계적으로 $10^{-6}M$, $10^{-5}M$ 및 $10^{-4}M$ 까지 높일 경우, 152, 187, 197 및

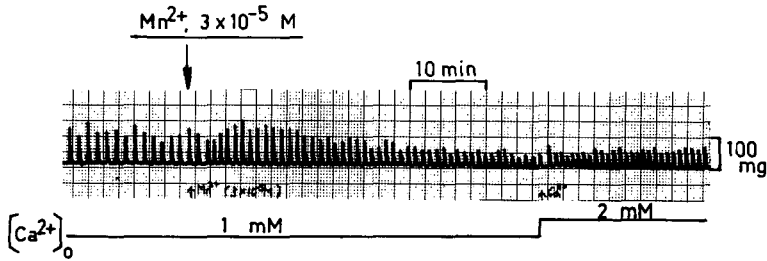


Fig. 10. Effects of extra Ca^{2+} on the altered spontaneous contractions induced by Mn^{2+} (3×10^{-5} M) in guinea-pig taenia coli. The altered spontaneous contractions, an increased frequency and decreased amplitude, were changed to increases of frequency and amplitude of contractions simultaneously by extra Ca^{2+} .

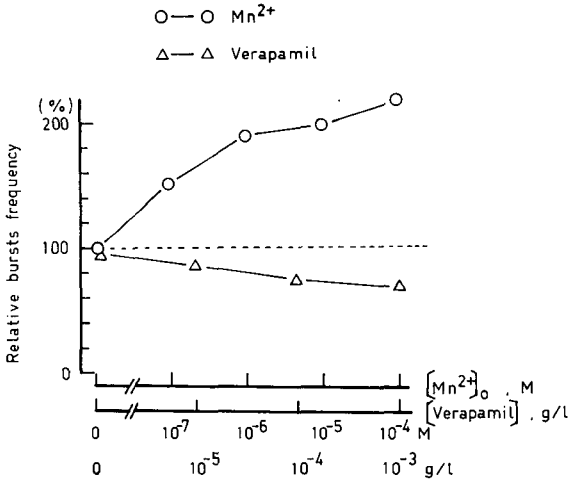


Fig. 11. Comparison of the effects of verapamil on bursts frequency with that of Mn^{2+} in guinea-pig taenia coli. Verapamil suppressed the bursts frequency, whereas Mn^{2+} accelerated the burst frequency, over the range of low concentrations of verapamil or Mn^{2+} .

220%로 증가되었으나 한 무리내의 가시전압 수 (spike frequency)는 63, 38, 30 및 23%로 농도증가에 따라 감소되었다.

비교적 높은 농도인 0.1 mM (10^{-4} M)과 1 mM에서의 변화를 다른 결장뉴에서 기록한 것을 그림 9-1과 그림 9-2에 나타내었다. 그림 9-1에서 보면 대조시 무리간격이 141.6 sec, 무리내 가시전압 수가 35이었는데 0.1 mM Mn^{2+} 에서는 무리간격 76.8 sec, 가시전압이 17로 감소되었다가 규칙적인 burst period와 silent period의 구분이 없어지고 계속적인 막전압의 동요가

지속되면서 수축곡선도 동요되었다. 그러나 정상 대조 용액으로 갈아준 후 5분경부터 rhythm이 나타나기 시작하였고 10분 후에는 완전히 회복됨을 보여주고 있다. 그림 9-2에는 1 mM (10^{-3} M) Mn^{2+} 에서의 시간경과에 따른 변화를 잘 나타내었다. 정상 대조시의 무리간격 129.6 sec, 무리내 가시전압 24이었다가 높은 농도의 Mn^{2+} 에 노출된지 5분경 무리간격 96 sec, 가시전압 12개로 심한 감소현상을 보였고 10분경에는 모든 전기적 활동도는 없어지면서 수축곡선도 기준선을 그리고 있었다.

6) Mn^{2+} 에 의한 수축력 억제효과에 대한 Ca^{2+} 영향(그림 10)

Tyrode 용액내의 Ca^{2+} 농도를 1 mM로 만든 용액내에서 자발적 수축을 하는데에 3×10^{-5} M Mn^{2+} 을 투여하면 수축빈도는 곧 증가하여 빨라졌으나 크기는 서서히 감소하여 30분정도 지나야 항정상태에 도달하고 있음을 볼 수 있다. 대조시의 수축빈도는 10분에 9번, 수축크기는 100 mg, 투여후 항정상태에 도달했을 때의 값은 10분에 12번 및 40 mg으로 변하였다. 여기에 세포의 Ca^{2+} 농도를 2 mM로 높여주자 수축빈도는 10분에 14번, 그리고 수축력의 크기는 60 mg으로 증가 회복되었다.

그림 11에 verapamil과 Mn^{2+} 이 결장뉴 전기활동도 중 서파(slow wave)의 빈도에 의하여 좌우되는 것으로 알려진 가시전압들의 무리(a train of spike discharges, or a burst of spike discharge)들의 간격(interval)에 반비례의 관계가 있는 무리의 빈도(burst frequency)를 정상시의 값과 비교한 상대적 빈도로 표시한 것을 그림 11에 나타내었다. 이 그림에서 알 수

있는 바와 같이 농도증가에 따라 Mn^{2+} 은 무리의 빈도가 증가시키고 있으나, verapamil의 경우에는 반대로 감소시키고 있음을 알 수 있다. 이러한 전기 활동도의 변화로 인하여 수축곡선의 빈도 역시 Mn^{2+} 은 증가, verapamil은 감소시키는 현상이 나타남을 이해할 수 있었다.

IV. 고 찰

많은 평활근의 자동능(automatism)은 평활근 세포 자체의 자발적 활동에 의한 것이며, 이것은 세포막의 주기적인 완만 탈분극(slow depolarizations) 현상에 의하여 발생된다는 사실이 알려져 있다. 이러한 자동능을 가능케하는 완만 탈분극현상이 평활근 세포자체, 즉 근원형성이라는 사실은 tetrodotoxin(TTX)이나 atropine 투여시에도 자발적 수축이 유지된다는 사실로부터도 추측할 수 있다(Papasova et al., 1968; Liu et al., 1969; Golenhofen et al., 1970; El-Sharkawy et al., 1978). 완만 탈분극 즉 pacemaker potentials은 전의상 3가지 유형으로 구분된다(Kuriyama, 1970). 즉 Type I은 개개 자발적 가시전압의 prepotential을 말하며, Type II는 신경에 의하여 생겨나는 흥분성 시냅스후 전압(excitatory postsynaptic potential, EPSP), Type III는 가시전압의 무리(a train of spike discharge)를 생기게 하는 완만 탈분극으로서, 이중 매우 규칙적으로 나타나는 것을 흔히 서파(slow wave, minute rhythm)라고 부른다.

guinea-pig의 결장뉴에서는 1~3분을 주기로 막전압의 완만한 동요, 즉 일정한 주기의 서파가 있는데, 이 서파가 가시전압의 발생을 조정하여 서파의 정점(최대탈분극 시기)에서 가시전압 발생빈도가 최고가 되어 매개 1 spike/sec 정도된다. 결장뉴가 신전되면 늘어남 정도에 따라 가시전압 무리간의 간격(interval between the bursts of spike discharge)이 감소되어 자발적 수축빈도는 증가한다(Mashima and Yoshida, 1965; Mashima et al., 1966, Hukuhara and Fukuda, 1968; Golenhofen and Loh, 1970). 만일 결장뉴가 지나치게 신전되면(overstretched), 가시전압이 쉬지않고 계속하여 나타날 수 있다. 이러한 현상은 가시전압도 개개의 향도잡이 전압(individual pacemaker potential, prepotential)에 의하여 생기는 것이 아니라, 가해진 조건에 따라 달라지는 막전압의 탈분극으로 일어나는 어떤 완만한 과정(some slow process)에 의하여 생겨날 것임을 암시하고 있다. 일반적으로 서파는 그 탈분

극의 정점 근처에서 수많은 가시전압의 발생을 유발시키고, 기계적 수축반응의 크기는 가시전압의 수와 밀접한 관계가 있다. 그러나 때로는 가시전압이 없는 서파만으로도 약하지만 수축을 일으킬 수 있다.

guinea-pig 결장뉴의 가시전압은 세포의 Ca^{2+} 유입(Ca^{2+} -entry), 즉 Ca spike라는 것이 실험적으로 증명되어 있다(Brading et al., 1969). 일반적으로 평활근의 활동전압은 TTX에 의하여 영향을 받지 않으나, 칼슘 길항제들에 의하여 심하게 억제됨이 알려져 있다. 즉 Mn^{2+} (1~2 mM 이상)이 결장뉴나 자궁근에 유발시킨 활동전압을 차단시켰다(Brading et al., 1969; Osa, 1973).

본 실험에서도 $10^{-3}M$ (1 mM) Mn^{2+} 에서 투여후 10분경에 모든 가시전압발생이 차단되면서 자발적 수축이 사라졌다. 막전압 고정법을 이용하여 관찰된 내향전류가 Mn^{2+} (0.5~5 mM)에 의하여 억제됨이 보고되고 있다(Kumamoto and Horn, 1970). 자발적 활동성이 유발시킨 경우보다 무기물질인 Mn^{2+} 등에 의하여 보다 더 쉽게 억제되는 사실(Brading et al., 1969; Osa, 1973)은 자동능을 일으키는 기전이 활동전압 발생기전보다 심하게 억제될 수 있음을 암시하고 있다. Mn^{2+} 의 Ca^{2+} -antagonist 작용외의 또다른 실험사실로서 guinea-pig 심근에서는 Mn^{2+} 이 Ca^{2+} 과 같이 완만이온 통로를 통하여 이온전류(Mn^{2+} 전류)를 발생시킨다는 증거가 있으며(Ochi, 1976), mouse myometrium이 Na-free solution에서 탈분극되면서 가시전압이 차단된 데에, 0.6 mM Mn^{2+} 을 투여하면 완전치는 않으나 가시전압이 다시 회복됨이 보고되었다(Osa, 1973). 이러한 사실은 Mn^{2+} 이 charge carrier로서 작용한 가능성을 암시하고 있다.

유기제제인 verapamil은 $10^{-6}M$ 에서 guinea-pig 결장뉴의 자발적 가시전압 발생빈도, 크기 및 탈분극 속도를 감소시켰다(Golenhofen and Lammel, 1972).

verapamil과 Ca^{2+} 의 용량-반응 관계로부터 guinea-pig의 결장뉴에서는 verapamil 1분자가 8,000 Ca^{2+} 을 막을 수 있다는 계산을 보고하였다(Riemer et al., 1974). verapamil과 유사한 유기물질로서 Ca^{2+} -antagonist인 D-600($5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4}M$)은 guinea-pig의 자궁근에서 내향전류를 억제 혹은 차단하였는데, 낮은 농도($10^{-8} \sim 10^{-7}M$)에서는 주요 효과로서 완만 탈분극(즉 향도잡이 전압, 서파)을 억제하여 결과적으로 자발적 수축의 빈도를 감소시키는 것이었다(Reiner and Marshall, 1975). 본 실험에서도 verapamil 농도가 $10^{-5}g/l$ 인 경우에는 무리의 빈도는 감소되었으

나 가지전압의 발생에는 큰 영향이 없는 점으로 보아 낮은 농도의 verapamil에서는 주효과가 서파에 미친 결과로 해석된다(그림 2-1, 그림 3 및 그림 4).

서파의 발생기전을 설명하는 학설로서는 electrogenic Na^+ pump의 주기적 동요에 의하여 생겨난다는 설이 있다(Connor et al., 1974). 이 설을 뒷받침 해주는 실험사실로는 ouabain 투여, 세포의 K^+ 제거 등으로 서파가 제거되는 직접적인 증거가 있으며(Connor et al., 1974; Prosser, 1978), 그 외에도 이 설을 지지해주는 간접적인 사실들이 있다. 즉, 서파의 빈도는 온도에 예민하고(Prosser, 1978), 발생빈도에 대한 Q_{10} 은 $17\sim 27^\circ\text{C}$ 에서 3.25, $27\sim 37^\circ\text{C}$ 에서는 2.1이다. 세포의 Ca^{2+} 를 감소시키면 서파의 빈도가 감소되는 것으로 보아 Ca^{2+} 이 서파의 항도잡이 기전(pacemaker mechanism)에 기여할 것이라는 주장이 있다(Connor et al., 1977). 서파의 크기는 ATP 공급에 의하여 좌우되는 Na^+ 유통량에 관계되고, 빈도는 밝혀지지 않은 Ca^{2+} 에 의하여 좌우되어 조정되는 electrogenic Na^+ pump의 활성도에 따라서 결정된다는 설이 있다(Prosser, 1978).

본 실험의 결과중 verapamil과 Mn^{2+} 효과중 가장 두드러진 현상으로서 내향전류 차단 목적으로 사용하는 verapamil 1 mg/l 이상, Mn^{2+} 1 mM 이상에서는 두 물질은 별 차이가 없이 자발적 전기활동도를 완전히 차단시켰지만(그림 2-3, 그림 9-2), 그 이하의 낮은 농도에서는 verapamil은 농도 증가에 따라서 무리빈도를 감소시켜 수축빈도를 떨어뜨렸으나, Mn^{2+} 은 오히려 무리빈도가 증가되어 수축빈도가 증가된 점을 볼 수 있다(그림 11). 이러한 차이점은 서파에 미치는 작용이 verapamil과 Mn^{2+} 이 다르다는 것을 암시하고 있는 바, verapamil의 작용기전은 Ca^{2+} 에 좌우되어 조정되는 서파발생 과정에 작용을 할 것이라는 해석이 가능하나, Mn^{2+} 의 결과는 Mn^{2+} 이 칼슘 길항제 작용뿐만 아니라, 이온통로를 통한 charge carrier로서도 작용한다는 실험사실들(Osa, 1973; Ochi, 1976)이 그 기전을 추측케는 하나, 이 실험결과만으로는 알 수 없고, 서파발생 기전이 좀 더 밝혀지면 해석될 것으로 판단된다.

V. 결 론

평활근 흥분-수축연결(excitation-contraction coupling)과정의 여러단계에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 Ca^{2+} 의 효과를 연구하기 위하여, 평활근 세

포자체의 자발적이고 주기적인 막전압의 동요와 활동전압(가시전압)으로 생기는 자발적 수축(spontaneous myogenic activity)에 대한 Ca^{2+} -길항제들의 투여효과를 광범위한 농도범위에서 관찰하고 비교분석하였다.

즉 guinea-pig의 결장뉴를 저출하여 35°C 에서 100% O_2 으로 평형을 이룬 정상 tris-완충 Tyrode 용액에서 일정한 빈도와 크기로 자발적 수축을 하고 있는 상태에, 흡입전극(suction electrode)을 이용하여 수축곡선과 동시에 전기활동도(막전압의 변화와 가지전압)를 기록하였다. 칼슘 길항제로 유기제제인 verapamil이나, 무기물인 Mn^{2+} 을 투여하여 수축곡선과 전기활동도에 나타난 변화를 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 정상 Tyrode 용액(Ca^{2+} , 2 mM)에서 일정한 항 정상태의 자발적 수축을 하는 데에 verapamil 농도를 0.1 및 0.3 mg/l로 단계적으로 높이면, 수축의 빈도(frequency)와 크기(amplitude)가 모두 감소되었고 1 mg/l에서는 자발적 수축이 완전히 차단되었다. 이러한 verapamil에 의한 수축성 감소현상은 세포의 Ca^{2+} 농도를 높일 경우(4, 혹은 8 mM) 수축빈도는 증가되었으나 크기는 회복되지 못하였다.

2) 전기 활동도의 변수 중 가지전압 무리(a train of spike discharge, burst)의 빈도(burst frequency)와 한 무리내 가지전압 수(spikes frequency in a burst)는 verapamil 농도증가($10^{-6}\sim 10^{-3}\text{g/l}$)에 따라 모두 감소되었으나 무리빈도에 대한 감소현상이 더욱 예민하였다.

3) Tyrode 용액중의 Ca^{2+} 농도를 1 mM로 만든 상태에서는, verapamil(0.05 mg/l)의 수축성 억제현상은 세포의 Ca^{2+} 농도를 2 mM로 높일 경우 수축빈도와 크기 모두 회복되었다.

4) 정상 Tyrode 용액에서 일정하게 자발적 수축을 하는데에 manganese(Mn^{2+})를 단계적으로 투여하여 농도를 높여주면($10^{-7}\sim 10^{-4}\text{M}$), 수축의 빈도는 증가되었으나 크기는 감소되었다.

5) bursts frequency와 spikes frequency는 Mn^{2+} 농도 증가에 따라 무리 빈도는 증가(무리 간격은 감소)되었으나 무리내 가지전압 빈도는 감소되었다. 1 mM Mn^{2+} 에서는 모든 전기 활동도가 차단되면서 자발적 수축도 사라졌다.

6) 1 mM Ca^{2+} 을 보유한 Tyrode 용액에서 자발적 수축을 하고 있는데에 Mn^{2+} ($3\times 10^{-6}\text{M}$)을 투여하여 수축빈도는 증가하고, 크기는 감소된 상태에 Ca^{2+} 을 추가 투여하여 2 mM로 높이면 수축빈도는 더욱 증가되

고 크기도 회복되었다.

이상의 성격들을 보아, ① 가시전압 무리의 주기적 자발적 발생과 관련된 서파(slow wave)에 대한 verapamil 과 Mn^{2+} 의 작용기전이 다름을 알 수 있었고, ② 가시전압 발생은 농도증가에 따라 두 Ca^{2+} 결항체에 의하여 억제되었으나, 서파에 대한 영향이 보다 예민하였다. ③ 전기 활동도 전체가 모두 차단되어 자발적 수축이 사라지는 농도는 verapamil 1 mg/l, Mn^{2+} 1 mM 이상이었다.

REFERENCES

- Bohr, D.F.: *Electrolytes and smooth muscle contraction. Pharmacol. Rev.* 16:85-111, 1964.
- Bohr, D.F.: *Vascular smooth muscle updated. Circ. Res.* 32:665-672, 1973.
- Brading, A., E. Bülbring, and T. Tomita: *The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. J. Physiol.* 200:637-654, 1969.
- Connor, J.A., C.L. Prosser, and W.A. Weems: *A study of pacemaker activity in intestinal smooth muscle. J. Physiol.* 240:671-701, 1974.
- Connor, J.A., D. Kreulen, C.L. Prosser, and R. Weigel: *Interaction between longitudinal and circular muscle in intestine of cat. J. Physiol.* 273:665-689, 1977.
- El-Sharkawy, T.Y., K.G. Morgan, and J.H. Szurszewski: *Intracellular electrical activity of canine and human gastric smooth muscle. J. Physiol.* 279:291-307, 1978.
- Golenhofen, K., and D.V. Loh: *Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Taenia coli des Meerschweinchens. Pflügers Arch. ges. Physiol.* 314: 312-328, 1970.
- Golenhofen, K., D.V. Loh, and K. Milenov: *Elektrophysiologische Untersuchungen zur Spontanaktivität isolierter Muskelpräparate aus verschiedenen Abschnitten des Meerschweinchen-Magen. Pflügers Arch. ges. Physiol.* 315: 336-356, 1970.
- Golenhofen, K., and E. Lammel: *Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by Ibuproveratril(Verapamil). Pflügers Arch.* 331: 233-243, 1972.
- Hukuhara, T., and H. Fukuta: *The electrical activity of guinea-pig small intestine with special reference to the slow wave. Jap. J. Physiol.* 18:71-86, 1968.
- Fleckenstein, A.: *Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktibilität und Tonus des Myokards. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 70:81-99, 1964.
- Fleckenstein, A., and G. Grün: *Reversible blockade of excitation-contraction coupling in rat's uterine smooth muscle by means of organic calcium antagonists. Pflügers Arch.* 307:R. 26, 1969.
- Fleckenstein, A.: *Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemaker, and vascular smooth muscle. Ann. Rev. Toxicol.* 17: 149-166, 1977.
- Kumamoto, M., and L. Horn: *Microvas. Res.* 2: 188-201, 1970.
- Kuriyama, H.: *Effects of ions and drugs on the electrical activity of smooth muscle. In Smooth Muscle, pp.366-395. Ed. by E. Bülbring et al. Edward Arnold: London. 1970.*
- Kuriyama, H., Y. Ito, and H. Suzuki: *Effects of membrane potential on activation of contraction in various smooth muscle. In Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle, Ed. R. Casteels et al. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1977.*
- Kohlhardt, M., P. Bauer, H. Krause, and A. Fleckenstein: *Differentiation of the transmembrane Na and Ca channel in mammalian cardiac fibers by the use of specific inhibitors. Pflügers Arch.* 335:309-322, 1972.
- Liu, J., C.L. Prosser, and D.D. Job: *Ionic dependence of slow waves and spikes in intestinal muscle. Am. J. Physiol.* 217:1542-1547, 1969.
- Mashima, H., and T. Yoshida: *Effect of length on the development of tension in guinea-pig's taen-*

- nia coli*. *Jap. J. Physiol.* 15:463-477, 1965.
- Mashima, H., T. Yoshida, and M. Handa: *Contraction and relaxation of the guinea-pig's taenia coli in relation to spike discharges*. *Jap. J. Physiol.* 16:304-315, 1966.
- Osa, T.: *The effects of sodium, calcium and manganese on the electrical and mechanical activities of the myometrial smooth muscle of pregnant mice*. *Jap. J. Physiol.* 23:113-133, 1973.
- Ochi, R.: *Manganese-dependent propagated action potentials and their depression by electrical stimulation in guinea-pig myocardium perfused by sodium-free media*. *Jap. J. Physiol.* 263:139-156, 1976.
- Papasova, M.P., T. Nagai, and C.L. Prosser: *Two-component slow waves in smooth muscle of cat stomach*. *Am. J. Physiol.* 214:695-702, 1968.
- Prosser, C.L.: *Smooth muscle*. *Ann. Rev. Physiol.* 36:503-533, 1974.
- Prosser, C.L.: *Fed. Proc.* 37:2153-2157, 1978.
- Prosser, C.L., and A.W. Mangel: *Mechanisms of spike and slow wave pacemaker activity in smooth muscle cells*. In *Cellular Pacemakers, Volume 1, Mechanisms of pacemaker generation*. pp.273-301, Ed. D.O. Carpenter, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, 1982.
- Riemer, J., F. Dörfler, C.-J. Mayer, and G. Ulbrecht: *Calcium-antagonistic effects on the spontaneous activity of guinea-pig taenia coli*. *Pflügers Arch.* 351:241-258, 1974.
- Reiner, O., and J.M. Marshall: *Action of D-600 on spontaneous electrically stimulated activity of the parturient rat uterus*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 290:21-28, 1975.
- Tomita, T.: *Electrical activity(spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles*. In *Smooth Muscle*, pp.127-156. Ed. E. Bülbbring et al. Edward Arnold, 1981.