

Nitric oxide에 의한 수태지 음경후인근의 비아드레날린 비콜린 동작성 이완

I. 돼지 음경후인근의 비아드레날린 비콜린성 이완을 매개하는 신경전달물질 :
nitric oxide와 vasoactive intestinal polypeptide

문규환 · 김점용 · 김태완 · 강동묵 · 양일석

서울대학교 수의과대학
(1995년 3월 13일 접수)

Nitric oxide(NO) mediating non-adrenergic non-cholinergic(NANC)
relaxation in the boar retractor penis muscle

I. Mediators of nonadrenergic, noncholinergic relaxation of porcine retractor penis
muscle : nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide

Kyu-whan Mun, Jeum-yong Kim, Tae-wan Kim, Tong-mook Kang, Il-suk Yang

Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received March 13, 1995)

Abstract : This study was carried out to characterize nonadrenergic, noncholinergic(NANC) relaxation of porcine retractor penis(PRP) muscle induced by electrical field stimulation(EFS) and to investigate the actions of nitric oxide(NO) and vasoactive intestinal polypeptide(VIP) as candidates for NANC neurotransmitters. Biphasic relaxations of PRP muscle were induced by EFS to NANC nerve. Rapid-phase relaxation was observed at low frequency(0.5-16Hz) and slow-phase relaxation followed during high frequency(8-60Hz). Both relaxations were frequency-dependent and TTX(1×10^{-6} M)-sensitive. L-NAME(2×10^{-5} M) inhibited the rapid-phase relaxation, but not the slow-phase relaxation. The inhibition of the rapid-phase relaxation with L-NAME was reversed by L-arginine (1×10^{-3} M) but not by D-arginine(1×10^{-3} M). Methylene blue(4×10^{-5} M) reduced the rapid-phase relaxation. Exogenous No(ExoNO, 1×10^{-5} - 1×10^{-4} M) induced dose-dependent relaxations of PRP muscle. Oxyhemoglobin(5×10^{-5} M) blocked the relaxation induced by ExoNO and inhibited EFS-induced relaxation. Hydroquinone(1×10^{-4} M) also abolished the relaxation induced by ExoNO, but did not affect EFS-induced relaxation. L-NAME resistant slow-phase relaxation to EFS was inhibited by α -chymotrypsin(2.5 U/ml). Both methylene blue(4×10^{-5} M) and N-ethylmaleimide(1×10^{-4} M) reduced the slow-phase relaxation by EFS.

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr Il-suk Yang, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

[4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP(3×10^{-6} M) inhibited the slow-phase relaxation by EFS. External applications of VIP (1×10^{-7} M) caused relaxations that were similar to the L-NAME resistant slow-phase relaxations induced by EFS, and relaxant effects of exogenous VIP were blocked by α -chymotrypsin(2.5 U/ml).

Key words : porcine retractor penis muscle, NANC neurotransmitter, nitric oxide(NO), vasoactive intestinal polypeptide (VIP)

서 론

포유 동물의 음경 발기(penile erection) 현상과 관련하여 음경조직을 구성하는 평활근의 이완 현상은 음경 발기를 유도하는 중요한 과정으로 이해되고 있다. 음경 조직은 sacral parasympathetic outflow와 lumbar sympathetic outflow의 자율 신경 지배를 받고 있으나 음경 조직을 구성하는 평활근의 이완을 유도하여 음경 발기를 매개하는 신경 화학적 전달물질은 명확히 확립되어 있지 않다^{1,2}.

Gillespie³ 및 Klinge와 Sjöstrand⁴는 rat anococcygeus muscle과 소의 음경후인근에서 nonadrenergic, noncholinergic(NANC) inhibitory nerve가 존재한다고 보고하였다. Liu et al⁵과 Martin et al⁶은 rat anococcygeus muscle과 소 음경후인근에서 이러한 NANC 신경 자극에 의한 이완 현상이 L-arginine에서 유래된 nitric oxide(NO)에 의해 일어난다고 하였으며, Sheng et al⁶은 소 음경후인근에서, Burnett et al⁷은 rat penis에서 neuronal NOS의 존재를 면역조직화학적 기법으로 밝힘으로써, 이들 조직에서 NANC 신경 자극에 의한 이완이 L-arginine/NO pathway의 활성화에 의해 생성된 NO에 기인함을 증명하였다. 그 외에도 토끼와 사람의 음경 조직에서 acetylcholine 등의 약물과 NANC 신경 자극에 의한 음경해면체의 이완이 NO 또는 NO-like substance에 의한다는 보고들이 있어서 음경 발기와 관련된 평활근의 신경원성 이완 현상에 L-arginine/NO pathway가 관여함을 증명하고 있다^{8,9,10}.

한편 Polak et al¹¹은 사람 음경의 발기 조직에 VIPergic nerve가 존재하여 높은 농도의 VIP가 함유되어 있음을 밝혔으며, Willis et al¹²은VIP가 사람에서 발기 조직의 이완을 유도한다고 밝히면서 사람의 음경 발기를 매개하는 신경전달물질로서 VIP를 제안하였다. Gu et al¹³은 impotence 환자에서 VIP-containing nerve의 고갈이 발기 부전(erecile dysfunction)과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. Takahashi et al¹⁴은 개에서 외원성 VIP와 acetylcholine을 음경해면체내에 주입하여 이들 두 약물의 협동 작용(synergistic effect)을 관찰함으로써,

개의 음경 발기시 이들 두 약물이 협동적으로 작용할 것으로 제안하였다. 최근 Dalin과 Martinez¹⁵는 돼지의 음경 조직에서 아드레날린성, 콜린성 신경과 함께 VIP-immunoreactive nerve가 존재함을 밝히면서 돼지 음경 발기 기전에 VIP가 관제한다고 제안하였다. 그러나 사람에서 음경해면체에 대한 VIP의 이완작용이 VIP antiserum¹⁶과 α -chymotrypsin¹⁷에 의해 상쇄 되어지지만 NANC 신경자극에 의한 이완 현상은 차단되지 않았다는 보고는 이들 음경 발기 조직에서의 발기 기전과 발기 현상을 매개하는 신경전달물질이 갖는 종 특이적(species specific)인 성질을 잘 보여준다.

본 실험에서는 NANC 환경하에서 전장자극에 의한 돼지 음경후인근 이완의 특성을 관찰하여 L-arginine/NO pathway에 의한 이완 현상을 확인하고, 나아가 신경전달물질로써 NO의 전달 형태에 관하여, oxyhemoglobin과 hydroquinone을 이용하여 전장 자극과 외원성 NO에 대한 돼지 음경후인근의 반응을 관찰, 비교하였다. 또한 소에서는 관찰되지 않는 NOS inhibitor-resistant component를 매개하는 신경전달물질로써 VIP가 관련되어 있는지를 알아보기 위하여 실험하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 조직 절편의 제작 : 도살 직후의 성숙한 돼지에서 채취한 음경후인근을 냉각 Krebs 용액에 담아 실험실로 운반하였다. 주위 지방 조직, 결합 조직 및 혈관 조직을 박리, 제거하여 냉장 보관하면서 24시간 이내에 실험에 사용하였다. 음경후인근 근위부 조직 절편(1×2×7mm)을 Krebs 용액(35℃, pH 7.4)이 담긴 용기의 tissue holder에 고정된 후 혼합 가스(95% O₂+5% CO₂)를 지속적으로 공급하였다.

Organ bath system의 설계 : 장기 수조(용량 20ml)의 중앙에 설치된 백금판 전극 사이에 tissue holder로 고정시킨 조직 절편이 위치하도록 하였다. 조직 절편의 상단은 isometric transducer(Narco Biosystem, F-60)에 연결하여 physiograph(Narco)로 평활근의 수축과 이완을

기록하였다. 백금판 전극은 electric stimulator(Narco, SI-10)에 연결하여 전장 자극을 가하였다.

조직의 안정화 및 전수축의 유도 : 음경후인근 절편에 1.0g의 안정화 장력을 적용시켜 매 20분 마다 신선한 영양액을 교환하면서 60분간 안정화 시켰다. NANC 환경을 조성하기 위하여 콜린성 신경차단제인 atropine ($1 \times 10^{-6}M$)과 아드레날린성 신경차단제인 guanethidine ($5 \times 10^{-5}M$)을 사용하였다. Guanethidine을 적용하였을 때 음경후인근은 미약한 긴장성 수축(tonic contraction)의 증가와 함께 자동성을 보였다. 따라서 본 실험에서는 phenylephrine($5 \times 10^{-7}M$)을 전처치한 후 40분 이상 경과하여 전수축으로 유도한 긴장성 수축이 충분히 안정화된 후 실험을 수행하였다.

전장자극 및 이완의 측정 : 안정된 긴장성 수축이 유도된 후 전장자극과 각 약물들에 의한 이완 현상을 등척성으로 기록하였다. Electric stimulator를 이용하여 80V, 0.5ms, 0.5-60Hz의 조건으로 20초 동안 전장자극(electric field stimulation, EFS)을 가하였다. 이완된 평활근이 자극을 가하기전의 전수축에 의한 수축고를 회복하면 다음 전장자극을 가하였다. 각 약물에 의한 이완 효과를 알아보기 위한 실험에서도 동일한 방법으로 전수축을 유도한 후 약물에 의한 이완 효과를 관찰하였다. 전장자극으로 유도된 이완 반응에 대한 각 약물들의 전처치 효과를 알아보기 위하여 각 약물들을 전처치하기 전, 후의 전장자극에 의한 이완 정도를 비교하였다.

사용 약물의 조제와 보관 : 사용한 약물중 tetrodotoxin은 saline에, 다른 약물은 증류수에 녹여 stock 용액을 제조, 냉동 보관하면서 사용할 때마다 Krebs 용액으로 희석하여 사용하였다. VIP와 VIP antagonist는 1% BSA 용액에 녹여서 사용하였다. 실험에 사용된 외원성 nitric oxide는 acidified sodium nitrite($NaNO_2$, pH 2.0) 형태로 제조하였으며 용해된 $NaNO_2$ 의 농도를 외원성 NO의 농도로 표시하였다. Hemoglobin은 bovine hemoglobin을 sodium dithionite($Na_2O_4S_2$)를 이용하여 oxyhemoglobin으로 전환시켜 사용하였다. 10mM hemoglobin 용액과 100mM $Na_2O_4S_2$ 용액을 4°C에서 30분간 반응시킨 후 cellulose tube를 이용하여 12시간 동안 증류수에서 투석하여 $Na_2O_4S_2$ 를 제거한 후 냉동 보관하면서 14일 이내에 사용하였다. 실험에 사용한 모든 약물의 최종 농도는 organ bath내의 농도로 표시하였으며 영양액으로 사용한 Krebs 용액의 조성은 다음과 같다(mM); NaCl 118.4, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, $CaCl_2$ 2.5, glu-

cose 11.7.

본 실험에 사용한 약물은 다음과 같다; atropine sulfate(Kanto chemical Co), guanethidine sulfate(Sigma), phenylephrine hydrochloride(Sigma), tetrodotoxin(Sigma), α -chymotrypsin(Sigma), Nw-nitro-L-arginine methyl ester(Sigma), L-arginine hydrochloride(Sigma), D-arginine hydrochloride(Sigma), sodium nitrite(Avondale laboratories), hemoglobin(Sigma), hydroquinone(Sigma), methylene blue(Fluka AG), N-ethylmaleimide(Sigma), vasoactive intestinal polypeptide(Sigma), [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP(Peninsula laboratories Inc).

결과 분석 및 통계 처리 : 전장자극 및 각 약물들에 의한 이완 정도는 전수축고에 대한 백분율(%)로 계산하여 $mean \pm SE$ 로 나타내었으며, rapid-phase relaxation에 대한 각 약물의 효과를 검정할 때는 0.5-16Hz, slow-phase relaxation에 대한 각 약물의 효과를 검정할 때는 4-60Hz의 전장자극에 의한 이완 효과를 대조군에서의 이완 효과와 비교하였으며, Student's paired "t" test와 ANOVA test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

전장자극에 의한 비아드레날린, 비콜린성 신경자극 효과 : Atropine($1 \times 10^{-6}M$), guanethidine($5 \times 10^{-5}M$) 및 phenylephrine($5 \times 10^{-7}M$)에 의해 조성된 NANC 환경하에서 전수축을 유도한 돼지 음경후인근절편은 전장자극(electrical field stimulation, EFS, 0.5-60Hz, 0.5ms, 80V, 20초)에 대해 이상성 이완(biphasic relaxation)을 일으켰다(Fig 1).

저자극빈도(0.5-16Hz)에서는 전장자극이 가해지는 동안 일어나는 신속한 이완 반응과 그에 따른 rebound contraction에 의한 빠른 회복 양상을 보이는 rapid-phase 이완이 일어났으며, 고자극빈도(4-60Hz)에서는 rapid-phase 이완에 연달아 이완과 회복 속도가 느린 slow-phase 이완이 관찰되었다(Fig 1). 이러한 이상성 이완(biphasic relaxation)은 모두 자극빈도 의존적 이완 양상을 보였다. Tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}M$)은 rapid-phase 이완과 slow-phase 이완을 모두 차단하였으며 N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, $2 \times 10^{-5}M$)는 rapid-phase 이완을 차단하였으나 slow-phase 이완은 차단하지 못하였다(Fig 1, Fig 2).

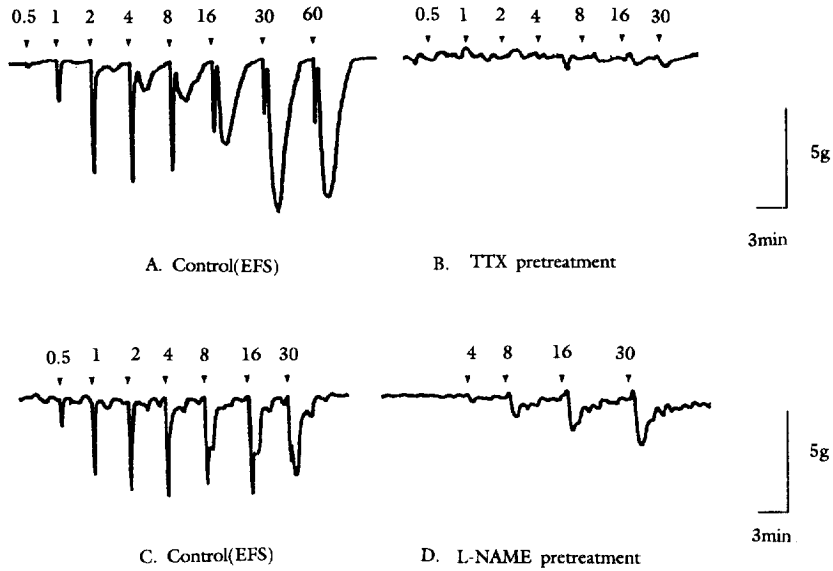


Fig 1. Original records showing the biphasic relaxations of PRP muscles induced by EFS, and the effects of tetrodotoxin(TTX, $1\mu\text{M}$) and L-NAME($20\mu\text{M}$) on the relaxations.

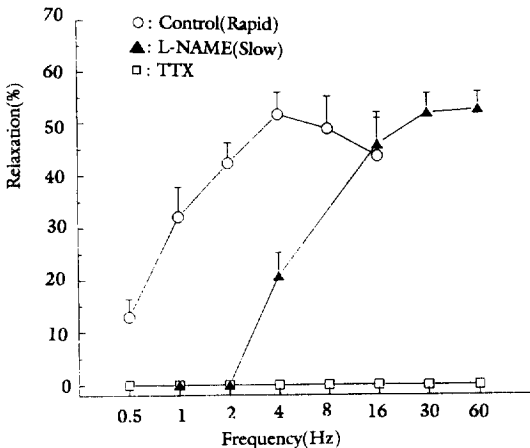


Fig 2. Effects of tetrodotoxin(TTX, $1\mu\text{M}$) and L-NAME($20\mu\text{M}$) on the biphasic NANC relaxations induced by EFS of PRP muscles.

Rapid-phase 이완에 대한 약물 효과 : 전장자극(0.5-16Hz)에 의해 유도된 돼지 음경후인근의 rapid-phase 이완 현상은 자극빈도의존적 이완 양상을 보였으며 4-8Hz에서 최대 이완 반응을 보였다(Fig 2). L-arginine analogue로서 nitric oxide synthase(NOS) 억제제로 알려진 L-NAME는 $1 \times 10^5 \text{M}$ 농도에서는 전장자극에 의한 rapid-phase 이완을 부분적으로 억제하였으며 $2 \times 10^5 \text{M}$ 농도에서는 rapid-phase 이완을 완전히 차단하였다(Fig 1, Fig 2).

L-NAME에 의한 rapid-phase 이완 억제 효과가 NOS에 대한 작용인지 알아보기 위하여 L-NAME에 의해 rapid-phase 이완이 완전히 차단된 후에 NOS 기질인 L-arginine($1 \times 10^3 \text{M}$)을 투여하여 15분간 배양한 후 전장자극을 가하였다. L-arginine($1 \times 10^3 \text{M}$)은 L-NAME에 의해 차단된 rapid-phase 이완을 회복시켰으나, D-arginine($1 \times 10^3 \text{M}$)은 회복시키지 못하였다(Fig 3).

전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 rapid-phase 이완 현상을 매개하는 세포내 second messenger로서 cGMP가 관여하는지 알아보기 위하여 soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue($4 \times 10^5 \text{M}$, 30분 배양)의 전처리 효과를 관찰하였다. Methylene

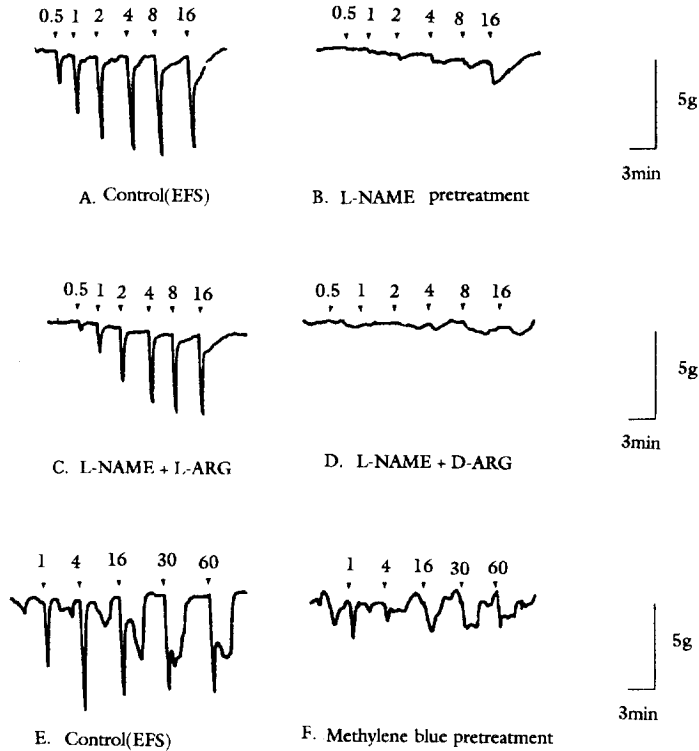


Fig 3. Original records showing the effects of L-NAME(20 μ M), L-arginine(1mM), D-arginine(1mM), and methylene blue(40 μ M) on the rapid-phase relaxations of PRP muscles induced by EFS at low frequency.

blue는 전장자극에 의한 rapid-phase 이완을 억제하였으며 slow-phase 이완을 부분적으로 억제하는 양상을 보였다(Fig 3). 산(acid)으로 활성화시킨 sodium nitrite(NaNO₂, pH 2.0)의 형태로 투여된 외원성 NO (1×10^{-5} - 1×10^{-4} M)는 농도의존적 이완을 일으켰으며 oxyhemoglobin과 hydroquinone 모두 외원성 NO에 의한 이완 효과를 차단하였다(Fig 5). 반면에 전장자극에 의한 rapid-phase 이완 현상은 oxyhemoglobin에 의해 거의 차단되었으나 hydroquinone에 의해서는 영향을 받지 않았다(Fig 4).

L-NAME resistant slow-phase 이완에 대한 약물 효과 : L-NAME에 의해 차단되지 않으나 tetrodotoxin에 의해 차단되는 slow-phase 이완의 특성을 알아보기 위

하여 L-NAME(2×10^{-5} M)로 rapid-phase 이완을 차단시킨 후 각 약물들의 효과를 알아보았다.

L-NAME(2×10^{-5} M) 전처리하에 peptide 분해 효소인 α -chymotrypsin(2.5 U/ml)은 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 slow-phase 이완을 유의성 있게 억제하였다(Fig 6, Fig 8). L-NAME resistant slow-phase 이완에 관여하는 세포내 second messenger로서 cAMP와 cGMP의 관련성을 알아보기 위하여 soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue(4×10^{-5} M)와 adenylyl cyclase 억제제인 N-ethylmaleimide(1×10^{-4} M)가 L-NAME 전처리하에 slow-phase 이완에 미치는 효과를 관찰하였다. Methylene blue와 N-ethylmaleimide는 모두 L-NAME resistant slow-phase 이완을 억제하였으

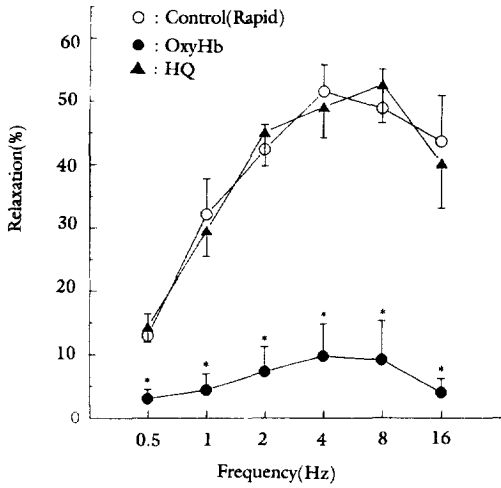


Fig 4. Effects of oxyhemoglobin(OxyHb, 50 μ M) and hydroquinone(HQ, 100 μ M) on the rapid-phase relaxations of PRP muscles induced by EFS at low frequency.

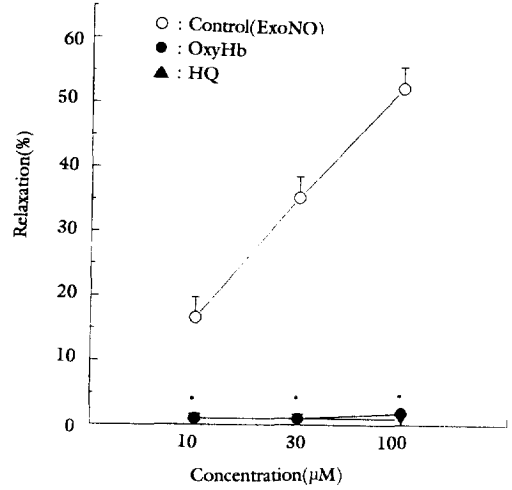


Fig 5. Effects of oxyhemoglobin(OxyHb, 50 μ M) and hydroquinone(HQ, 100 μ M) on the relaxations of PRP muscle induced by exogenous nitric oxide(ExoNO).

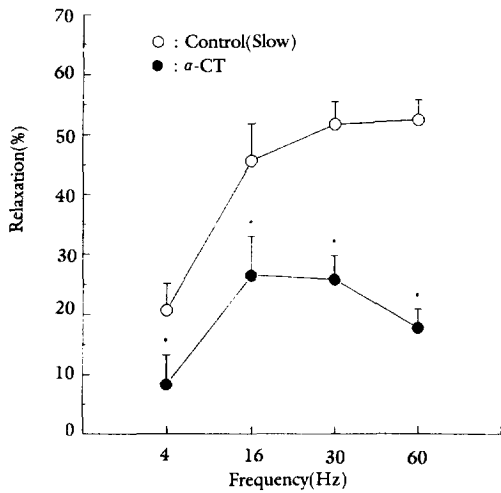


Fig 6. Effects of α -chymotrypsin(α -CT, 2.5U/ml) on the L-NAME resistant slow-phase relaxations of PRP muscles induced by EFS at high frequency under L-NAME pretreatment.

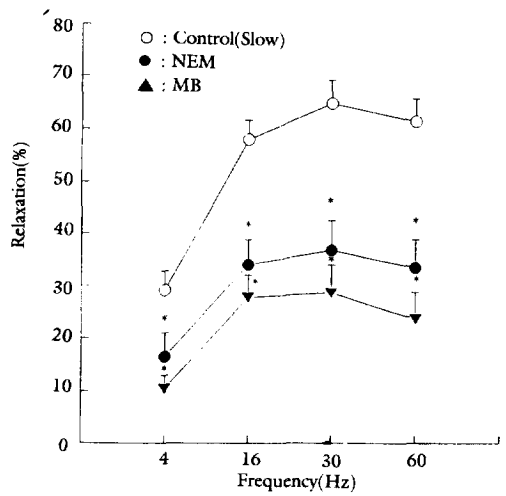


Fig 7. Effects of methylene blue(MB, 40 μ M) and N-ethylmaleimide(NEM, 100 μ M) on the L-NAME resistant slow-phase relaxations of PRP muscles induced by EFS at high frequency under L-NAME pretreatment.

며($P < 0.05$), methylene blue에 의한 억제 효과와 N-ethylmaleimide에 의한 억제 효과는 통계적으로 다르지 않았다(Fig 7). VIP antagonist인 [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP($3 \times 10^{-6}M$)를 전처리 하였을 때, 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 L-NAME resistant slow-phase 이완 효과는 억제 되었으며, 60Hz에서 39.3%로 최대 억제 효과를 보였다(Fig 8). 또 tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}M$)을 전

처리 하기 전, 후에 투여한 외원성 VIP($1 \times 10^{-6}M$)는 돼지 음경후인근에서 전장자극에 의한 slow-phase 이완과 유사한 양상의 이완을 유도하였으며, 이러한 외원성 VIP에 의한 돼지 음경후인근의 이완 효과는 α -chymotrypsin(2.5U/ml) 전처치에 의해 차단되었다(Fig 8).

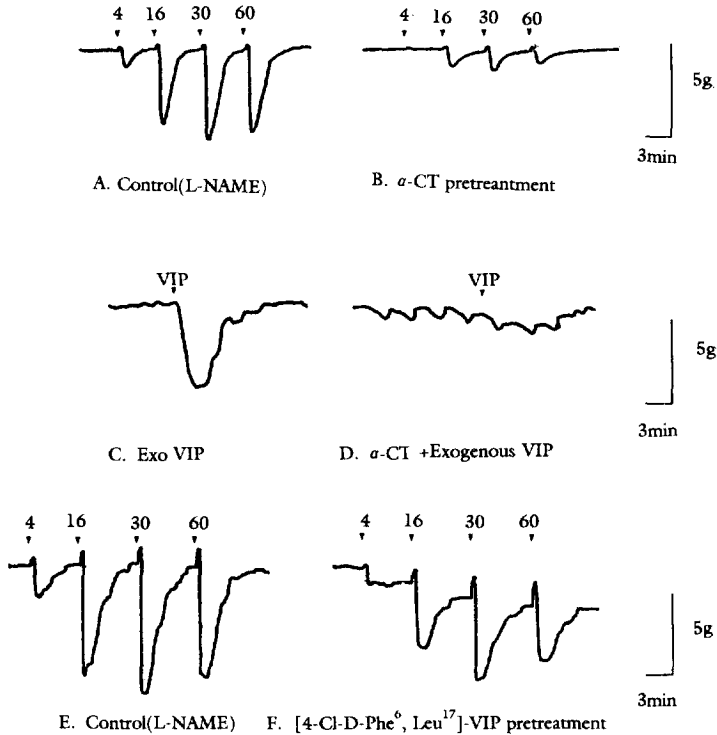


Fig 8. Original records showing the effects of α -chymotrypsin(α -CT, 2.5U/ml), [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP($3\mu M$), and exogenous VIP(ExoVIP, $0.1\mu M$) on the L-NAME resistant slow-phase relaxations of PRP muscles under L-NAME pretreatment.

돼지 음경후인근의 비아드레날린 비콜린성(NANC) 신경 자극에 의한 이완의 특성과 이를 매개하는 신경전달물질로서 NO와 VIP의 관련성을 알아보기 위한 본 실험에서, guanethidine과 atropine으로 NANC 환경을 조성하고 phenylephrine으로서 전수축을 유도한 돼지 음경후인근은 전장자극(electrical field stimulation)에 의해 이상성 이완(biphasic relaxation)을 일으켜, 저자극빈도에서는 이완과 회복이 빠른 rapid-phase 이완이 관찰되었고 고자극빈도에서는 이완과 회복과정이 느린 slow-phase 이완이 관찰되었으며, 이러한 돼지 음경후인근의 NANC 이완 현상은 신경차단제인 tetrodotoxin에 의해 완전히 차단되었으므로 신경원성(neurogenic) 이완 현상임을 알 수 있다. 반면, L-arginine analogue로서 nitric oxide synthase(NOS) 억제제로 알려진 *N ω* -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)는 rapid-phase 이완을 차단하였으나 slow-phase 이완은 차단하지 못하였다. 그러므로, 이러한 NOS 억제제에 대한 반응과 자극빈도에 따른 이완 양상으로 보아 돼지 음경후인근의 NANC 이완에는 최소한 두 가지 이상의 비아드레날린 비콜린성의 신경전달물질이 관여하고 있음을 짐작할 수 있었다.

NOS에 의해 생성된 NO가 억제성 신경전달물질로 작용하는 여러 조직에서 L-arginine analogue에 의해 억제된 평활근의 이완 효과가 L-arginine에 의해 회복되었다.^{5,18} 본 실험에서도 L-NAME에 의해 억제된 rapid-phase 이완이 L-arginine에 의하여 회복되었으나, D-arginine에 의해서는 회복되지 않았다. 이는 L-arginine에 의한 회복 효과가 평활근 세포에 대한 직접 작용이 아니라 그 이전 단계, 즉 presynaptic 수준에서 NOS에 대한 기질로써 작용하기 때문이다.

pH 2.0으로 산성화시킨 sodium nitrite 용액은 nitrous acid(HONO)를 형성한 후 NO를 유리하여 소의 음경후인근을 이완시킨다는 보고가 있다.¹⁹ 본 실험에서도 acidified sodium nitrite 형태로 투여된 외원성 NO는 돼지 음경후인근을 농도의존적으로 이완시켰으며, 그 이완 양상은 전장자극에 의한 rapid-phase 이완과 유사하였으며, L-NAME 및 tetrodotoxin 전처치에 의해 영향받지 않았으므로 외원성 NO에 의한 이완은 평활근 세포에 대한 직접 작용임을 알 수 있었다.

NOS에 의해 생성된 NO는 지용성의 free radical로서 세포막을 자유로이 통과하여 표적 세포내에서 soluble guanylate cyclase를 활성화 시켜 세포내 cGMP의

농도를 증가시킴으로써 생리적 반응을 나타낸다.²⁰ 본 실험에서도 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 rapid-phase 이완이 cGMP 의존성인지 알아보기 위하여 soluble guanylate cyclase 억제제로 알려진 methylene blue를 전처치하여 전장자극에 의한 rapid-phase 이완이 억제됨을 관찰하였다. 세포외에서 NO와 결합하여 NO가 표적세포에 도달하는 것을 막는다고 알려진 oxyhemoglobin은 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 rapid-phase NANC 이완을 억제하였으며 외원성 NO에 의한 이완을 차단하여, 소 음경후인근과 rat anococcygeus muscle²¹, mouse anococcygeus muscle²², 사람과 토끼의 corpus cavernosum⁹ 등에서 보고된 내용과 일치하였다. 한편 free radical scavenger로서 작용하는 hydroquinone은 전장자극에 의한 rapid-phase 이완에는 영향을 미치지 않았으나, 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였다. Gillespie와 Sheng²³은 rat anococcygeus muscle의 NANC 이완은 hydroquinone에 의해 미약한 정도로 억제되었으나 소 음경후인근에서는 억제 효과가 없었다고 보고하였으며, Hobbs et al²⁴은 외원성 NO에 의한 이완은 hydroquinone에 의해 억제되었으나 NANC 신경자극과 SNP에 의한 이완은 억제되지 않았다고 보고하였다. 또한 Gibson et al²²은 mouse anococcygeus muscle의 NANC 이완이 hydroquinone에 의해 억제되지 않았다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 이와 같이 외원성 NO는 전장자극에 의한 rapid-phase 이완과 유사한 양상으로 신속한 이완과 회복 과정을 보여 주었으나, oxyhemoglobin과 hydroquinone에 대한 반응에 있어서는 전장자극에 의한 이완 효과와 동일하지 않은 결과를 보이므로써, bioassay system내에서의 EDRF와 authentic NO에 의한 반응성의 차이 및 화학적 성질에 있어서의 차이 등에 근거하여, EDRF 및 NANC 신경전달물질은 NO 그 자체 보다 S-nitrosothiol과 같은 NO-containing 또는 NO-releasing 물질일 가능성이 있다는 주장^{8,24}과 일치하고 있어 더 깊은 연구가 요구된다.

이상의 관찰 내용으로써, NOS 억제제인 L-NAME에 의한 이완 억제, L-arginine에 의한 회복 효과, 외원성 NO에 의한 이완 효과, cGMP 의존성 이완 현상 및 oxyhemoglobin에 의한 억제 등에 근거하여 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 rapid-phase 이완은 NOS에 의해 생성된 NO가 매개함을 확인할 수 있었다.

돼지 음경후인근의 전장자극에 의한 L-NAME resistant slow-phase 이완에 관여하는 NANC 신경전달물질을 규명하기 위한 예비실험 과정에서, cyclooxygenase

억제제인 indomethacin은 아무런 효과를 나타내지 못했으며, $PGF_{2\alpha}$ 를 전수축전과 후에 직접 투여하여도 아무런 반응이 없었고, ATP는 돼지 음경후인근에서 수축을 일으킨 후 완만한 이완을 일으켰으나 그 이완 정도는 전수축에 의한 수축고에 비하여 현저하지 않았으며, P_{2y} -purinoceptor antagonist로 알려진 reactive blue 2도 돼지 음경후인근의 L-NAME resistant slow-phase 이완을 억제하지 못하였으므로 이를 매개하는 NANC 신경전달물질로서 prostaglandin 또는 ATP일 가능성을 배제하였다.

VIP는 위장관 평활근²⁶, 기도 평활근²⁷ 및 음경 조직^{11,12} 등에서 NANC 신경전달물질로 작용하여 평활근의 이완을 유도한다고 보고되었다. Angel et al²⁸은 canine gastric muscularis mucosa에서, De Beurme와 Lefebvre²⁹는 rat gastric fundus에서 NANC 신경자극과 외원성VIP에 의한 이완 효과가 α -chymotrypsin에 의해 억제된다고 하였으며, Nurko와 Rattan³⁰은 opossum의 내항문괄약근에서, Li와 Rand³¹는 rat gastric fundus에서 외원성VIP와 신경자극에 의한 이완이 [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP에 의해 억제되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 외원성VIP는 돼지 음경후인근에서 L-NAME resistant slow-phase 이완과 유사한 양상의 이완을 유도하였고, α -chymotrypsin은 외원성 VIP와 NANC 신경자극에 의한 이완을 차단 또는 억제하였으며, [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP는 돼지 음경후인근의 L-NAME resistant slow-phase 이완을 부분적으로 억제하여 이상의 보고들과 일치하고 있다. 그러나 본 실험에서 관찰된 [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP에 의한 부분적 억제효과는 [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP가 VIP에 대한 특이적인 antagonist가 아니기 때문인 것으로 생각된다.

VIP는 세포내에서 cAMP의 농도를 증가시켜 생리적 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 그러나 Rattan과 Moumami³⁴는 opossum의 lower esophageal sphincter에서 전장자극과 VIP에 의한 이완 현상이 methylene blue와 N-ethylmaleimide 모두에 의해 억제되었으므로, VIP는 이 조직에서 억제성 신경전달물질로 작용하며, 이에는 second messenger로서 cAMP와 cGMP가 모두 관련되어 있다고 하였으며 또다른 억제성 신경전달물질이 관여할 가능성도 있다고 하였다. Chakder와 Rattan³⁵은 opossum의 내항문괄약근에서 NANC 신경자극과 NO 및 VIP가 cAMP와 cGMP를 동시에 증가시킴을 관찰하여 억제성 신경전달물질로 NO와 VIP가 작용하며, 이들은 세포내 공통의 second messenger를 통해 작용할 것이라고 하였다. Gaw et al³⁶은 sheep cerebral artery에서, Li

와 Rand³¹는 rat gastric fundus에서 VIP에 의한 평활근의 이완이 NO/cGMP pathway에 의해 매개된다고 하였다. Murthy et al³⁷은 rabbit stomach cell에서 VIP가 cAMP와 cGMP를 동시에 증가시킴으로써 cAMP-kinase와 cGMP-kinase의 활성을 증가시킨다고 하면서 VIP-specific 수용체에 의해 매개되는 G-protein coupled Ca^{2+} influx에 의해 Ca^{2+} -calmodulin dependent, constitutive type NOS를 활성화시킴으로써 NO의 생성을 유도한다고 주장하였다. 이상과 같이 여러 조직에서 VIP는 세포내 cAMP 수준을 증가시킬 뿐만 아니라 간접적인 경로를 통해 cGMP 수준을 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 NOS 억제제인 L-NAME를 전처치하여 rapid-phase 이완을 차단한 후 methylene blue와 N-ethylmaleimide에 대한 반응을 관찰하였으므로, 이상의 NO와 VIP간의 상호 작용으로는 L-NAME resistant slow-phase 이완에 대하여 methylene blue와 N-ethylmaleimide 두 물질 모두가 통계적으로 동일한 정도의 억제 효과를 나타낸 실험 결과를 충분히 설명할 수 없다. 그러나 NOS를 억제할 목적으로 사용한 L-NAME의 농도가 불충분하여, 평활근의 기계적인 이완 현상을 유도하지는 못해도 다른 신경전달물질의 생성과 분비를 조절할 수 있을 정도의 NO가 생성될 가능성 및 이미 생성된 NO가 S-nitrosothiol과 같은 NO-유리물질로 저장되어 있다가 함께 유리되었거나 또는 또다른 cGMP의 존성 신경전달물질이 VIP와 함께 cotransmission 되어 표적세포에서 cAMP와 cGMP를 동시에 증가시킬 가능성을 배제할 수 없다. L-NAME resistant slow-phase에 대한 결과로써, VIP inactivating peptidase인 α -chymotrypsin에 의한 억제, VIP antagonist에 의한 부분적 억제, 외원성 VIP에 의한 이완 효과 및 adenylate cyclase 억제제에 의한 부분적 억제등에 근거하여 돼지 음경후인근의 L-NAME resistant slow-phase 이완을 유도하는 신경전달물질은 VIP일 것으로 사료되며, 이는 돼지의 음경 조직에서 VIP-immunoreactive nerves가 분포하고 있음을 밝힌 Dalin과 Martinez¹⁵의 보고에 의해 뒷받침되고 있다. 이러한 결과는 기니픽의 trachea³⁸와 gastric fundus³⁹ 및 rat gastric fundus³¹ 등에서 NO와 VIP가 cotransmission 되어 NO는 초기의 신속한 이완을, VIP는 나중의 지속적인 이완을 유도하였다는 보고들과 잘 일치하고 있다.

이상의 결과들으로써 돼지 음경후인근의 전장자극에 의한 비아드레날린 비콜린성 이완에는 NO 또는 NO-유리물질과 VIP가 공통으로 관련되어 있는 것으로 사료되어진다. 그러나 NANC 신경전달물질로서 작용하는 NO의 저장 및 전달 형태에 대한 연구로써 S-ni-

trosothiols일 가능성을 살펴보아야 할 것이며, NO와 VIP가 신경전달과정에서 어떤 상호 작용을 가지는지, 생체내에서 음경 발기를 위한 과정에서 어떻게 기여하고 있는지 등에 대하여 더 연구되어야 할 것이다.

결 론

비아드레날린 비콜린성(NANC) 신경의 전장자극에 의한 돼지 음경후인근 이완의 특성을 밝히고 이를 매개하는 신경전달물질을 규명하기 위한 본 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다. 돼지 음경후인근 절편은 NANC 신경의 전장자극에 의해 이상성(biphasic) 이완을 일으켜, 저자극빈도에서는 rapid-phase 이완이, 고자극빈도에서는 slow-phase 이완이 관찰되었으며, 이러한 이상성 이완은 모두 신경차단제인 TTX에 의해 차단되었다. L-NAME는 rapid-phase 이완을 차단하였으나 slow-phase 이완은 억제하지 않았으며, L-NAME에 의한 rapid-phase 이완의 억제 효과는 L-arginine 투여에 의해 회복되었으나 D-arginine에 의하여는 회복되지 않았다. Guanylate cyclase 억제제인 methylene blue도 rapid-phase 이완을 억제하였다. 외원성 NO는 돼지 음경후인근을 농도의존적으로 이완시켰다. Oxyhemoglobin은 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였으며 전장자극에 의한 rapid-phase 이완을 감소시켰다. Hydroquinone도 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였으나 전장자극에 의한 이완에는 영향을 미치지 않았다. L-NAME로 차단되지 않는 slow-phase 이완은 α -chymotrypsin, methylene blue, N-ethylmaleimide 및 [4-Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP에 의해 억제되었다. 외부에서 투여한 VIP는 전장자극에 의한 slow-phase 이완과 유사한 양상의 이완을 유도하였으며, 이러한 외원성 VIP에 의한 이완효과는 α -chymotrypsin에 의해 차단되었다.

이상의 결과로써 돼지 음경후인근의 전장자극에 의한 비아드레날린 비콜린성 신경 매개성 이완 현상에서, rapid-phase 이완에는 NO 또는 NO-유리물질이, slow-phase 이완에는 VIP가 NANC 신경전달물질로 작용하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Klinge E, Sjöstrand NO. Contraction and relaxation of the retractor penis muscle and the pen-

- ile artery of the bull. *Acta Physiol Scand* 1974; 420(suppl): 1-88.
2. Anderson KE. Pharmacology of low urinary tract smooth muscles and penile erectile tissue. *Pharmacol Rev* 1993; 45(3): 253-308.
3. Gillespie JS. The rat anococcygeus muscle and its response to nerve stimulation and to some drugs. *Br J Pharmacol* 1972; 45: 404-416.
4. Liu X, Gillespie JS, Gibson IF, et al. Effect of N^G-substituted analogues of L-arginine on NANC relaxation of the rat anococcygeus and bovine retractor penis muscle and bovine penile artery. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 53-58.
5. Martin W, Gillespie JS, Gibson IF. Action and interactions of N^G-substituted analogues of L-arginine on NANC neurotransmission in the bovine retractor penis and rat anococcygeus muscles. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 242-247.
6. Sheng H, Schmidt HHW, Nakane M, et al. Characterization and isolation of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 768-773.
7. Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, et al. A physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-403.
8. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-560.
9. Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest* 1991; 88: 111-118.
10. Bush PA, Aronson WJ, Buga GM, et al. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 1992; 147: 1650-1655.
11. Polak JM, Gu J, Mina S, et al. VIPergic nerves in the penis. *Lancet* 1981; 2: 217-219.
12. Willis EA, Ottensen B, Wagner G, et al. Vasoactive intestinal polypeptide(VIP) as a putative neurotransmitter in penile erection. *Life Science* 1983; 33: 383-391.
13. Gu J, Polak JM, Lazarides M, et al. Decrease of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) in the penises from impotent men. *Lancet* 1984; 2: 315-318.

14. Takahashi Y, Aboseif SR, Benard F, et al. Effect of intracavernous simultaneous injection of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide on canine penile erection. *J Urol* 1992; 148: 446-448.
15. Dalin AM, Martinez HR. Vasointestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerves in the boar penis. *J Vet med* 1992; A 39: 792-797.
16. Adaikan PG, Kottogoda SR, Ratnam SS. Is vasoactive intestinal polypeptide the principal transmitter involved in human penile erection? *J Urol* 1986; 135: 638-640.
17. Pickard RS, Powell PH, Zar MA. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve evoked relaxation of human cavernosol smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 755-759.
18. Gillespie JS, Xiaorong L, Martin W. The effects of L-arginine and N^G-monomethyl-L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1080-1082.
19. Kerr SW, Buchanan LV, Bunting S, et al. Evidence that S-nitrosothiols are responsible for the smooth muscle relaxing activity of the bovine retractor penis inhibitory factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 285-292.
20. Bowman A, Drummond AH. Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle. *Br J Pharmacol* 1984; 81: 665-674.
21. Gillespie JS, Sheng H. A comparison of hemoglobin and erythrocytes as inhibitors of smooth muscle relaxation by the NANC transmitter in the BRP and rat anococcygeus and by EDRF in the rabbit aortic strip. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 445-450.
22. Givson A, Babbedge R, Brare SR, et al. An investigation of some S-nitrosothiols, and of hydroxyarginine, on the mouse anococcygeus. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 715-721.
23. Gillespie JS, Sheng H. The effects of pyrogallol and hydroquinone on the response to NANC nerve stimulation in the rat anococcygeus and bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 194-196.
24. Hobbs AJ, Tucker YF, Gibson A. Differentiation by hydroquinone of relaxation induced by exogenous and endogenous nitrates in non-vascular smooth muscle: role of superoxide anions. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 645-650.
25. Shikano K, Ohlstein EH, Berkowitz BW. Differential selectivity of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 483-485.
26. Goyal RK, Rattan S, Said SI. VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurons. *Nature* 1980; 288: 378-380.
27. Altieri RJ, Diamond L. Relaxation of cat tracheobroncheal and pulmonary arterial smooth muscle by vasoactive intestinal peptide: lack of influence of peptide inhibitors. *Br J Pharmacol* 1984; 82: 321-328.
28. Angel F, Go VLW, Schmalz PF, et al. Vasoactive intestinal polypeptide; a putative transmitter in the canine gastric muscularis mucosa. *J Physiol* 1983; 341: 641-654.
29. De Beurme, Lefebvre RA. Influence of α -chymotrypsin and trypsin on the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus *Br J Pharmacol* 1987; 91: 171-177.
30. Nurko S, Rattan S. Role of Vasoactive intestinal polypeptide in the interanal anal sphincter relaxation of the opossum. *J Clin Invest* 1988; 81: 1146-1153.
31. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 303-309.
32. Bitar KN, Makhlof GM. Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* 1982; 216: 531-533.
33. Torphy TJ, Fine CF, Burman M, et al. Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increased cyclic nucleotide content. *Am J Physiol* 1986; 251: G 786-G 793.
34. Rattan S, Moumami C. Influence of stimulators and inhibitors of cyclic nucleotides on lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;

- 248: 703-709.
35. Chakder S, Rattan S. Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP, and No. *Am J Physiol* 1993; 264: G 702-G 707.
36. Gaw AJ, Aberdeen J, Humphrey PPA, et al. Relaxation of sheep cerebral arteries by vasoactive intestinal polypeptide and neurogenic stimulation: inhibition by L-N^G-monomethylarginine in endothelium-denuded vessels. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 567-572.
37. Murthy KS, Zhang KM, Jin JG, et al. VIP-mediated G protein-coupled Ca²⁺ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265: G 660-G 672.
38. Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, et al. L-N^G-nitro-arginin inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 663-664.
39. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of N^G-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 173-179.
-