

Nitric oxide에 의한 수돼지 음경후인근의 비아드레날린 비콜린 동작성 이완

II. 비아드레날린 비콜린성 신경의 전장자극과 S-nitrosothiols에 의한 돼지 음경후인근의 이완 효과 비교

문규환 · 김태완 · 강동목 · 이완 · 양일석

서울대학교 수의과대학
(1995년 3월 13일 접수)

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

II. Comparison of the relaxant properties induced by nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation and S-nitrosothiols in the porcine retractor penis muscle

Kyu-whan Mun, Tae-wan Kim, Tong-mook Kang, Wan Lee, Il-suk Yang

Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received March 13, 1995)

Abstract : As S-nitrosothiols were proposed as nitrergic carriers in vascular and nonvascular smooth muscle, we have investigated the relaxant properties of several S-nitrosothiols in the porcine retractor penis (PRP) muscle and compared them with the effects of exogenously added NO, electrical field stimulation (EFS) of NANC nerves and sodium nitroprusside (SNP). Also the influences of oxyhemoglobin and hydroquinone on the relaxant responses were investigated. In addition, effects of NO on membrane potentials and its involvement in the generation of inhibitory junction potential (IJP) were investigated with conventional intracellular microelectrode technique. The results were summarized as follows.

1. Frequency-dependent relaxations of PRP muscle were induced by EFS to NANC nerve. Tetrodotoxin ($1 \times 10^{-6} M$) abolished the relaxations of PRP muscle induced by EFS, and L-NAME ($2 \times 10^{-5} M$) and methylene blue ($4 \times 10^{-5} M$) inhibited the relaxations. L-NAME-induced inhibition of the relaxations was reversed by L-arginine ($1 \times 10^{-3} M$), but not

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.

by D-arginine.

2. Exogenous NO(1×10^{-5} - 1×10^{-4} M), sodium nitroprusside($(1 \times 10^{-7}$ - 1×10^{-4} M) induced dose-dependent relaxations of PRP muscle. All S-nitrosothiols(1×10^{-7} - 1×10^{-4} M) tested relaxed the PRP muscle in dose-dependent manner and the potency order was SNAP > GSNO > CysNO > SNAC.

3. Oxyhemoglobin(5×10^{-5} M) blocked the relaxation induced by exogenous NO and inhibited EFS-, S-nitrosothiols-, and SNP-induced relaxation.

4. Hydroquinone(1×10^{-4} M) also abolished the relaxations induced by exogenous NO, and reduced the relaxations induced by S-nitrosothiols, but did not affect EFS- and SNP-induced relaxations.

5. SNP(2×10^{-6} - 5×10^{-6} M) relaxed muscle strips but the membrane potentials were not affected.

6. EFS with several pulses(1ms, 2Hz, 80V) produced an inhibitory junction potential(IJP) with muscle relaxation. They were abolished by TTX(2×10^{-6} M). N^G-nitro-L-arginine(L-NNA, 2×10^{-5} M) abolished the muscle relaxation, but had no effect on IJP.

Key words : NANC relaxation, S-nitrosothiols, nitric oxide, inhibitory junction potential

서 론

Furchgott와 Zawadzki가 토끼의 대동맥에서 혈관내 피세포 유래의 EDRF(endothelium-derived relaxing factor)에 의한 혈관내피의존성 이완을 관찰하였다. 그 후 많은 연구자들에 의해 이 물질은 NO 또는 불안정한 nitrosocompound^{2,3}임이 밝혀진 이래, L-arginine/NO pathway는 gastrointestinal tract^{4,5}, rat와 mouse의 anococcygeus muscle^{6,7,8}, 소 음경후인근^{9,10} 등의 평활근 조직에서 비아드레날린 비콜린성(NANC) 신경전달물질로써 작용한다고 보고되었다. EDRF 및 NANC neurotransmitter로서, NOS에 의해 L-arginine으로 부터 생성된 NO가 세포막을 자유로이 통과하여 표적 세포 내에서 cytosolic guanylate cyclase를 활성화시켜 세포 내 cGMP수준을 증가시킴으로써 생리적 반응을 유도한다는 사실은 대부분의 연구자들에 의해 받아들여지고 있다^{11,12}. 그러나 신경전달물질은 신경 말단에서 합성되어 과립내에 저장되어 있다가 exocytosis 과정에 의해 분비된다는 전통적인 관점 및 EDRF의 화학적, 약리학적 성질과 bioassay system에서의 반응성의 차이에 근거하여, 생체 세포내에서의 저장 및 표적 세포까지의 전달 형태으로써의 'NO 그 자체'에 대하여는 회의적인 입장을 갖는 연구자들이 있다. Myers et al¹³은 chemiluminescence 방법과 bioassay system을 이용하여 소의 대동맥내피세포 유래의 EDRF의 성질을 연구하여 NO만으로는 EDRF의 이완 효과를 충분히 설명할 수 없다고 하면서 EDRF로서 NO와 함께 nitrosocompound가 관련된다고 주장하였으며, Shikano et al¹⁴은 배양시킨 동맥의 혈관내피세포 유래 EDRF와 authentic NO의 약리

학적 성질이, 동일한 bioassay system에서 일치하지 않음을 관찰하여 EDRF의 작용을 전적으로 NO만으로는 설명할 수 없다고 하였다. 또, Hobbs et al¹⁵은 mouse anococcygeus muscle에서 NO에 의한 이완이 hydroquinone에 의해 차단되지만 NANC 신경자극과 다른 nitrovasodilators에 의한 이완 효과에는 영향을 미치지 않았다고 하였다. 이처럼, 혈관내피세포에서 유리되는 EDRF 및 평활근 조직의 NANC 신경전달물질은 free NO 보다는 NO-containing 물질로서 유리 또는 분비되어 표적세포에서 NO를 방출하므로써 작용한다는 주장이 있으며, 이러한 물질의 강력한 후보 물질로서 S-nitrosothiols이 제기되고 있다^{16,17,18}. 따라서 본 실험에서는 세포 밖에서 free NO와 결합하여 NO가 표적세포에 작용하는 것을 막는다고 알려진 oxyhemoglobin¹⁹과 free radical scavenger로서 작용하여 free NO를 불활성화시키는 것으로 hydroquinone¹⁵을 이용하여, 돼지 음경후인근에서 NANC 신경의 전장자극에 의한 이완과 외원성 NO 및 몇가지 S-nitrosothiols들에 의한 이완 현상의 특성을 비교 관찰하여 NANC 신경전달물질로써 NO의 분비 형태를 규명하는 실마리를 찾고자 실험하였다. 이와 더불어 NANC 신경을 통해 유도되어지는 이완 과정에 평활근 조직의 세포막전압 변동이 관여하는지를 알아보고자 하였다. NO를 유리하여 이완 효과를 발휘하는 sodium nitroprusside(SNP)를 투여한 후 등장성 수축력과 동시에 세포막전위의 변동을 관찰하였으며, 전장자극을 통해 내재신경만을 자극하여 신경전달물질이 유리되도록 한 후 미세전극을 이용하여 신경-근 접합부전위(junction potential)를 기록하여 막전위의 변동에 관련되는 NANC 신경전달물질의 본체를 알아보고자 하였다.

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°C, pH 7.4)이 담긴 용기의 tissue holder에 고정화 한 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(1×10⁻⁶M)과 아드레날린성 신경차단제인 guanethidine(5×10⁻⁵M)을 사용하였다. Guanethidine을 적용하였을 때 음경후인근은 미약한 긴장성 수축(tonic contraction)의 증가와 함께 자동성을 보였다. 따라서 본 실험에서는 phenylephrine(5×10⁻⁷M)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, 0.5-16Hz의 조건으로 20초 동안 전장자극(electric field stimulation, EFS)을 가하였다. 이완된 평활근이 자극을 가하기 전의 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.

세포막 전위 및 역제성 신경-근 접합부 전위의 측정 : 현미경하에서 길이 10mm, 너비 2mm 되는 조직 절편을 만들어 실험용 조직으로 사용하였다. 조직의 전기활

동을 기록하기 위하여 준비된 조직을 용량 2ml의 수평형 실험용기(horizontal chamber)를 사용하였다. 용기 내에 설치된 고무판 위에 음경후인근 절편을 작은 핀으로 고정시킨 후 35°C에서 혼합가스(95% O₂, 5% CO₂)로 평형을 이루고 있는 bicarbonate-완충 Tyrode 용액에서 실험을 수행하였다. 조직의 전기활동은 3M KCl로 채운 유리 미세전극(glass microelectrode)을 평활근 세포내에 삽입하여 펜 기록기에 기록하였고, 전극은 전극 끝저항(tip resistance)이 40-80MΩ이 되는 것만을 골라서 사용하였다. 이와 동시에 조직절편의 한쪽 끝을 실로 묶어 등장성 장력수축 변환기에 연결하여 근 수축을 기록하였다. 조직 양편에 백금전극을 설치하고 전기 자극기(Grass S88)를 통하여, 폭(duration) 1.0ms, 자극강도 80V의 자극파(square pulse)를 가하여 신경말단에서 신경전달물질이 유리되도록 하고 미세전극을 통하여 신경-근 접합부 전위(junction potential)를 기록하였다. 이 때 세포 속에 삽입한 미세전극은 자극전극으로부터 1mm 이내에 설치하고 막전위 변동을 기록하였다(Fig 1). 모든 실험은 atropine(2×10⁻⁶M), guanethidine(2×10⁻⁵M) 및 norepinephrine(5×10⁻⁷M)을 전처치하여 시행하였다.

사용 약물의 조제와 보관 : 사용한 약물중 tetrodotoxin은 saline에, 다른 약물은 증류수에 녹여 stock 용액을 제조 냉동 보관하면서 사용할 때마다 Krebs 용

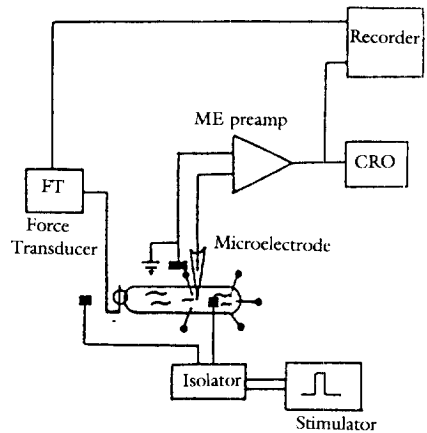


Fig 1. A schematic representation of the isometric contraction and the electrical activity recording system. The isometric contraction was recorded through a tension transducer from the smooth muscle preparation, and the microelectrode puncture technique for intracellular recording of the electrical activities was employed in this experiment.

액으로 희석하여 사용하였으며, (±)S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)은 ethanol로 stock 용액을 만들었다. 실험에 사용된 외원성 nitric oxide는 acidified sodium nitrite(NaNO_2 , pH 2.0) 형태로 제조하였으며 용해된 NaNO_2 의 농도를 외원성 NO의 농도로 표시하였다. S-nitrosothiols의 제조는 Kowaluk와 Fung²⁰의 방법에 따라, 산성의 sodium nitrite 용액과 각각의 thiol group을 가지는 약물을 반응시켜 제조하였다. Hemoglobin은 bovine hemoglobin을 sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$)를 이용하여 oxyhemoglobin으로 전환시켜 사용하였다. 10mM hemoglobin 용액과 100mM $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 용액을 4°C에서 30분간 반응시킨 후 cellulose tube를 이용하여 12시간 동안 증류수에서 투석하여 $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 를 제거한 후 냉동 보관하면서 14일 이내에 사용하였다. 실험에 사용한 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, glucose 11.7.

본 실험에 사용한 약물은 다음과 같다; atropine sulfate(Kanto chemical Co), guanethidine sulfate (Sigma), phenylephrine hydrochloride(Sigma), tetrodotoxin(Sigma), N ω -nitro-L-arginine methyl ester (Sigma), N^G-nitro-L-arginine(Sigma), L-arginine hydrochloride(Sigma), sodium nitroprusside(Sigma), (±)S-nitroso-N-acetylpenicillamine(Biomol Res Lab Inc), hemoglobin(Sigma), hydroquinone(Sigma), methylene blue(Fluka AG), glutathion(Sigma), L-cysteine(Sigma), N-acetyl-L-cysteine(Sigma)

결과 분석 및 통계 처리 : 전장자극 및 각 약물들에 의한 이완 정도는 전수축고에 대한 백분율(%)로 계산하여 mean±SE로 나타내었으며, Student's paired "t" test와 ANOVA test를 이용하여 P<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

전장자극에 의한 NANC 신경자극 효과 : Atropine($1 \times 10^{-6}\text{M}$), guanethidine($5 \times 10^{-5}\text{M}$) 및 phenylephrine($5 \times 10^{-7}\text{M}$)에 의해 조성된 NANC 환경하에서 전수축을 유도한 돼지 음경후근전절편은 전장자극(electrical field stimulation, EFS, 0.5-16Hz, 0.5ms, 80V, 20초)에 대해 빠른 이완 양상을 보였으며, 8Hz 이상의 자극 빈도에서는 이

완과 회복이 느린 이완 반응이 연달아 관찰되었다(Fig 2). 전장자극에 의한 이러한 이완 효과는 자극빈도 의존적 이완 양상을 보였으며, tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}\text{M}$)에 의해 완전히 차단되었다(Fig 2). N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, $2 \times 10^{-5}\text{M}$)는 초기의 신속한 이완 반응만을 선택적으로 차단하였으나(Fig 3), 고자극 빈도에서 나타나는 느린 이완 반응은 차단하지 못하였

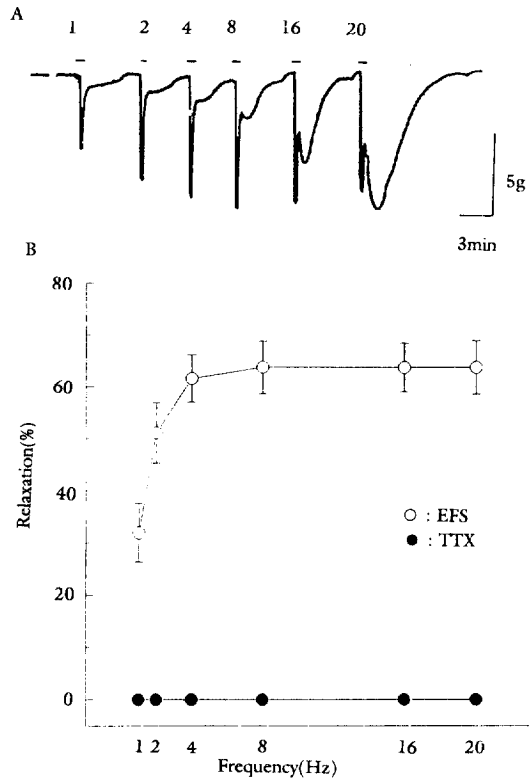


Fig 2. Frequency-dependent nonadrenergic, noncholinergic (NANC) relaxation of porcine retractor penis muscle (PRP) strips to EFS.

In the presence of atropine ($1\mu\text{M}$) and guanethidine ($50\mu\text{M}$), electrical field stimulation (EFS, 0.5ms, 80V, 1-20Hz, 20s trains) induced relaxation of PRP muscle precontracted by phenylephrine ($1\mu\text{M}$). A. Original recordings showing the isometric relaxation to EFS. B. Effect of tetrodotoxin (TTX, $1\mu\text{M}$) on the frequency dependent NANC relaxations of PRP muscle to EFS. n=6; mean±SE

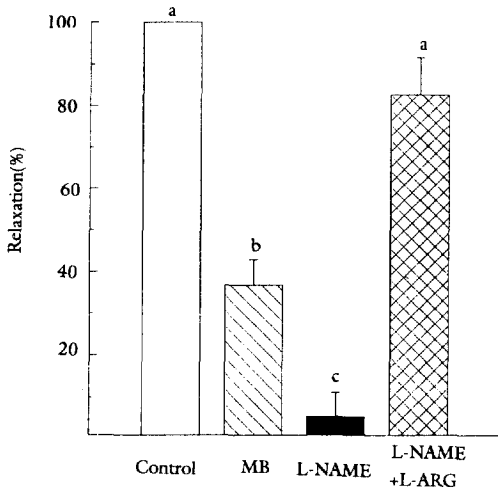


Fig 3. Effects of guanylate cyclase inhibitor, nitric oxide synthase(NOS) inhibitor, and substrate for NOS on the NANC relaxation induced by EFS.

Both guanylate cyclase inhibitor, methylene blue(MB, 40 μ M, n=9), and NOS inhibitor, N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, 20 μ M, n=6) inhibited the EFS-induced relaxation. L-NAME-induced inhibitions were reversed by NOS substrate, L-arginine(L-ARG, 1mM, n=6), incubation. Relaxations are expressed as percent of control(4Hz). mean \pm SE, P<0.05.

다. L-NAME에 의해 차단된 이완 효과는 L-arginine (1×10^{-3} M)에 의해 회복되었으며, methylene blue(4×10^{-5} M) 전처치에 의해서 전장자극에 의한 초기의 신속한 이완반응이 억제되었다(Fig 3). NOS 억제제에 의한 선택적인 차단 효과로 보아 전장자극에 의한 초기의 신속한 이완 반응은 L-arginine/NO pathway에 의한 이완인 것으로 판단되었으며, 이 후의 실험과정에서는 초기의 신속한 이완반응을 각 약물에 의한 이완 반응과 비교하였다.

전장자극, 외원성 NO, SNP 및 S-nitrosothiols에 의한 이완효과와 비교 : 0.5-16Hz의 자극빈도의 전장자극(EFS)에 의해 돼지 음경후인근은 자극빈도 의존적인 이완 양상을 보였으며, 4-8Hz에서 최대 이완 효과를 나타내었다(Fig 4). 산(acid)으로 활성화시킨 sodium

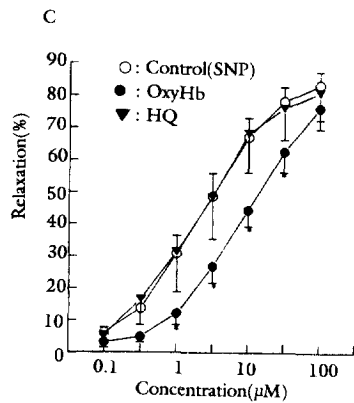
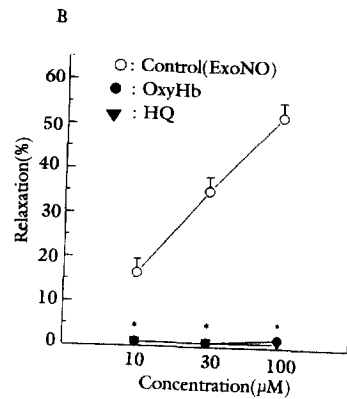
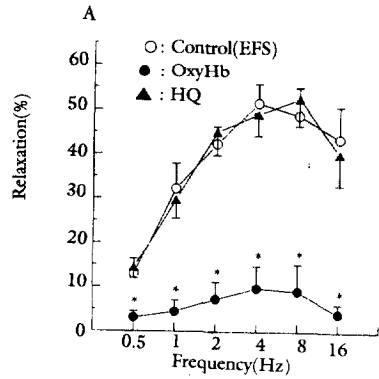


Fig 4. Effects of oxyhemoglobin and hydroquinone on the relaxations of PRP muscle induced by EFS, exogenous NO, and SNP.

Oxyhemoglobin(OxyHb, 50 μ M) blocked the relaxation induced by exogenous NO, and inhibited the relaxant properties of EFS and SNP. Hydroquinone(HQ, 100 μ M) also abolished the effect of exogenous NO, but did not affect to the relaxations of PRP muscle induced by EFS and SNP. mean \pm SE, P<0.05.

nitrite(NaNO_2 , pH 2.0)의 형태로 투여된 외원성 NO (SNP)는 1×10^{-5} - $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 농도에서 농도의존적으로 폐지 음경후인근을 빠르게 이완시켜 전장자극에 의한 이완과 유사한 양상을 보였다(Fig 4). Sodium nitroprusside (SNP)도 1×10^{-7} - 3×10^{-4} 에서 농도의존적인 이완을 보였으며, SNP에 의한 이완 양상은 전장자극이나 외원성 NO에 의한 신속한 이완 및 회복 효과와는 달리 이완과 회복 속도가 완만하여 누적적인 용량증가에 의한 결과를 그래프에 나타내었다(Fig 4). 실험에 사용한 S-ni-

trothiols로써, (\pm)S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP), S-nitroso-glutathione(GSNO), S-nitroso-L-cysteine(CysNO), S-nitroso-acetyl-L-cysteine(SNAC)들은 1×10^{-7} - $3 \times 10^{-4} \text{M}$ 의 범위에서 누적적으로 농도를 증가시켰을 때, 모두 농도의존적인 이완 양상을 보였으며, 이들 S-nitrosothiols들간의 potency order는 SNAP > GSNO > CysNO > SNAC의 순을 보였다. Ox-yhemoglobin $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 은 전장자극에 의한 이완과 외원성 NO에 의한 이완을 거의 차단하였으며, SNP 및 S-ni-

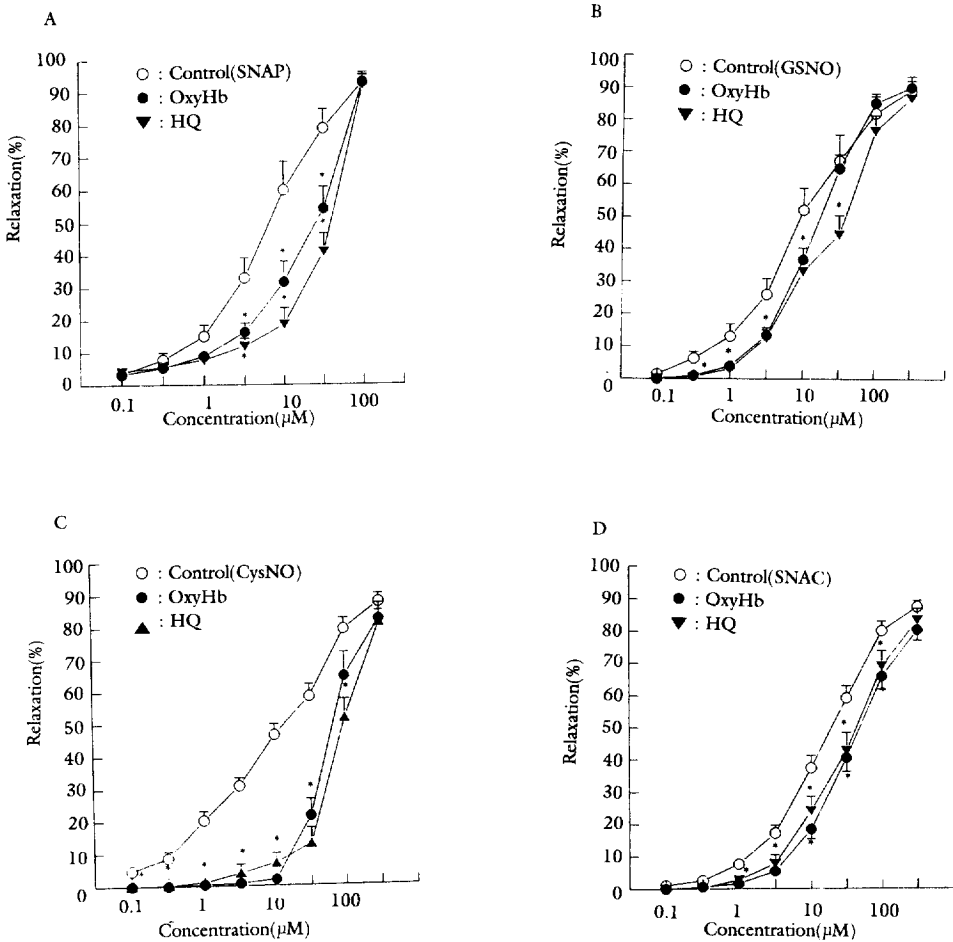


Fig 5. Effects of oxyhemoglobin and hydroquinone on the relaxations of PRP muscle induced by S-nitrosothiols.

All S-nitrosothiols tested relaxed PRP muscle in dose-dependent manner and the potency order was (\pm)S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP) > S-nitroso-glutathione(GSNO) > S-nitroso-L-cysteine(CysNO) > S-nitroso-acetyl-L-cysteine(SNAC). Both oxyhemoglobin(OxyHb, $50 \mu\text{M}$) and hydroquinone(HQ, $100 \mu\text{M}$) inhibited the relaxations of PRP muscle induced by S-nitrosothiols. mean \pm SE, $P < 0.05$.

trosothiols들에 의한 이완에 대하여는 유의성 있는 억제 효과를 나타내어 용량-반응 곡선을 우측으로 이동시켰다 (Fig 4, Fig 5). Hydroquonone $1 \times 10^{-4} M$ 을 전처리 하였을 때는, 외원성 NO에 의한 이완은 완전히 차단되었으며, S-nitrosothiols들에 의한 이완은 유의성 있게 억제되었으나, 전장자극과 SNP에 의한 이완 효과는 아무런 영향을 받지 않았다 (Fig 4, Fig 5).

SNP 및 전장자극에 의한 막전위 및 억제성 신경-근 접합부 전위의 변화 : 돼지 음경후인근에서 NANC 신경의 억제성 신경전달물질로 증명된 NO의 유리물질로 알려진 SNP를 처리하여 근이완과 막전위를 동시에 측정하였다 (Fig 6). 세포막 안정막 전위는 약 $-63.5 \pm 5.0 mV$ ($n=4$)였으며 위장관조직에서 보이는 slow wave와 같은 주기적인 막전위의 변화가 없이 약간의 탈분극과 과분극을 반복하는 불규칙한 양상을 보였다. SNP ($1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6} M$)는 norepinephrine에 의해 전수축된 조직을 유의성 있게 이완시켰으나 세포막전위에는 유의적인 변화가 관찰되지 못하였다.

전장자극(4pulse, 2Hz)에 의해 비아드레날린 비플러린

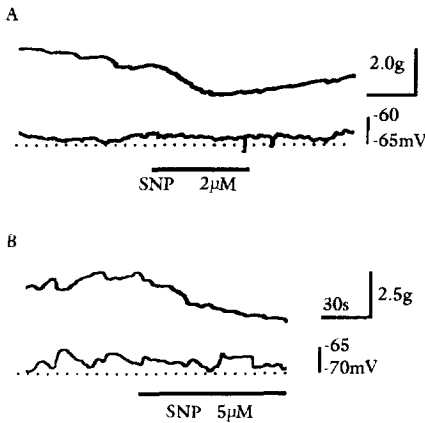


Fig 6. Effects of sodium nitroprusside on the mechanical contraction and membrane potential of PRP muscle.

Sodium nitroprusside (SNP, $2-5 \mu M$) relaxed norepinephrine ($0.5 \mu M$) precontracted muscle strips without changes in membrane potentials. Resting membrane potentials before the administration of norepinephrine were denoted as broken lines.

upper traces: mechanical contraction, lower traces: membrane potential

성 내재신경을 자극하여 유발된 억제성 신경-근 접합부 전위 (inhibitory junction potential, IJP)의 크기는 대조군에서 $5.0 \pm 2.5 mV$ ($n=4$)였으며 신경차단제인 tetrodotoxin ($2 \times 10^{-6} M$)에 의해 근이완과 IJP 모두 차단되었다 (Fig 7). 이러한 IJP가 nitric oxide에 의하여 매개되는지를 확인하기 위하여 NOS 억제제인 N^G -nitro-L-arginine (L-NNA, $2 \times 10^{-5} M$)을 처리하였던 바, 근이완은 차단되었으나 IJP는 차단되지 아니하였다 (Fig 7). 이러한 결과는 NANC 신경에 의한 이완은 NO에 의하여 유발되나 IJP의 발생은 NO에 의한 것이 아님을 시사하며 동시에 NANC 신경에 의한 이완과정에 있어서 IJP는 주요한 역할을 담당하지는 않는 것으로 사료된다.

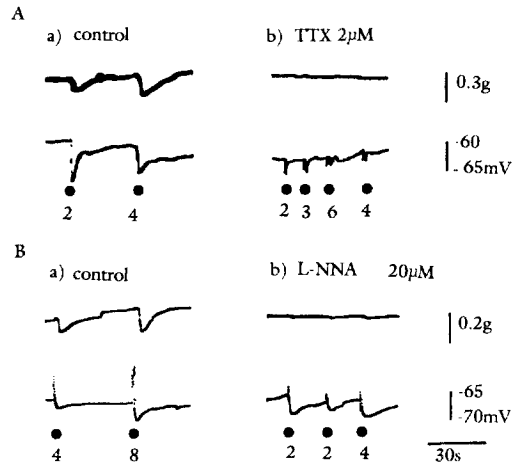


Fig 7. Effects of tetrodotoxin and N^G -nitro-L-arginine on the mechanical contractions and inhibitory junction potential (IJP).

IJPs were generated in response to a short train of 2 to 8 pulses (1ms, 2Hz, 80V) in the presence of atropine and guanethidine. Number of trains were marked at lower traces of each panel. A. Tetrodotoxin (TTX, $2 \mu M$) completely blocked EFS-induced relaxation and IJP. B. EFS-induced relaxation was blocked by N^G -nitro-L-arginine (L-NNA, $20 \mu M$) but the IJP was not affected.

upper traces: mechanical contraction, lower traces: electrical activity

고 찰

비아드레날린 비콜린성(NANC) 신경의 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 이완 효과는 cytosolic guanylate cyclase 억제제와 NOS 억제제에 의해 억제되었으며, NOS 억제제에 의한 이완 억제 효과는 L-arginine에 의해 회복되었다. L-arginine/NO pathway가 NANC 신경전달과정에 관련되어 있는 여러 평활근 조직에서, L-arginine analogues는 NOS에 대해 기질과 경쟁적으로 작용하여 NOS를 억제하며 이러한 NOS에 의한 억제효과는 NOS의 기질인 L-arginine을 과량 투여하면 회복된다^{5,7,8,9}. L-arginine/NO pathway에 의해 생성된 NO는 지용성의 free radical로서 세포막을 자유로이 통과하여 표적 세포내에서 soluble guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cGMP의 농도를 증가시킴으로써 생리적 반응을 나타낸다^{11,12}. 따라서 NOS 억제제에 의한 억제, 기질에 의한 회복 및 guanylate cyclase 억제제에 의한 억제 등에 근거하여, 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 신속한 이완 현상은 L-arginine/NO pathway에 의해 매개되는 것으로 판단되었다. pH 2.0으로 산성화시킨 sodium nitrite 용액은 nitrous acid(HONO)를 형성한 후 NO를 유리하여 소의 음경후인근을 이완시킨다는 보고가 있다^{18,21}. 본 실험에서도 acidified sodium nitrite 형태로 투여된 외원성 NO는 돼지 음경후인근을 농도의존적으로 이완시켰으며, 그 이완 양상은 전장자극에 의한 신속한 이완과 유사하였으며, L-NAME 및 tetrodotoxin 전처치에 의해 영향받지 않았으므로 외원성 NO에 의한 이완은 평활근 세포에 대한 직접 작용임을 알 수 있었다. EDRF 및 NANC 신경전달물질로서 표적세포내에서 작용하는 최종적인 effector molecule로서의 NO에 대하여는 이론의 여지가 없다. 그러나 신경전달물질은 신경세포에서 합성되어 신경말단의 과립내에 저장되어 있다가 신경세포의 탈분극과 함께 exocytosis 되어 표적세포의 세포막에 있는 수용체에 결합하여 생리적 반응을 유도한다는 신경전달물질에 대한 전통적인 관념과 bioassay system내에서의 EDRF와 authentic NO에 의한 반응성의 차이 및 화학적 성질에 있어서의 차이 등에 근거하여, EDRF 및 NANC 신경전달물질은 NO 그 자체보다 S-nitrosothiols과 같은 NO-containing 또는 NO-releasing 물질일 가능성이 있다는 주장이 있다^{13,16}. 본 실험에서는 세포외에서 NO와 결합하여 NO가 표적세포에 도달하는 것을 막는다고 알려진 oxyhemoglobin¹⁹과 free radical scavenger로서 작용하는 hydroquinone¹⁵에

대한 돼지 음경후인근의 NANC 이완의 반응을 관찰하여 외원성 NO, NO-releasing 물질로서 SNP 및 S-nitrosothiols들의 반응과 비교함으로써, 돼지 음경후인근에서 전장자극에 의한 NANC 이완을 매개하는 신경전달물질의 전달 또는 유리 형태를 규명하는 실마리를 찾고자 하였다. Oxyhemoglobine은 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 NANC 이완과 SNP 및 S-nitrosothiols에 의한 이완을 억제하였으며 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였다. 이는 소 음경후인근과 rat anococcygeus muscle²², mouse anococcygeus muscle²³, 사람과 토끼의 corpus cavernosum²⁴ 등에서 보고된 내용과 일치하였으며, SNP 및 S-nitrosothiols에 의해 유도된 이완에 대한 억제 효과가 부분적인 이유는, 이 물질이 지용성으로 대부분이 세포막을 통과하여 세포내에서 NO를 유리시키기 때문으로 짐작된다²⁵. 한편 hydroquinone은 전장자극에 의한 NANC 이완과 SNP에 의한 이완에는 영향을 미치지 않았으나, S-nitrosothiols에 의한 이완을 억제하였으며, 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였다. Gillespie와 Sheng²⁶은 rat anococcygeus muscle의 NANC 이완은 hydroquinone에 의해 미약한 정도로 억제되었으나 소 음경후인근에서는 억제 효과가 없었다고 보고하였으며, Hobbs et al¹⁵은 외원성 NO에 의한 이완은 hydroquinone에 의해 억제되었으나 NANC 신경자극과 SNP에 의한 이완은 억제되지 않았다고 보고하였다. 또한 Gibson et al²³은 mouse anococcygeus muscle의 NANC 이완이 hydroquinone에 의해 억제되지 않았다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 그러나 본 실험에서 SNP와 S-nitrosothiols에 의한 이완의 반응 양상이 oxyhemoglobin과 hydroquinone에 대해서 동일하지 않은 특징을 보였다. Kitamura et al²⁷은 rat gastric fundus에서 oxyhemoglobin은 NANC 신경자극, S-nitrosocysteine 및 SNP에 의한 hyperpolarization을 억제하였으나, hydroquinone은 단지 S-nitrosocysteine에 의한 hyperpolarization만을 억제하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 실험의 결과와 잘 일치하고 있으나 oxyhemoglobin과 hydroquinone에 대한 반응에 있어서 이러한 차이점에 대해서는 더 자세한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서 외원성 NO로서 sodium nitrite(NaNO₂, pH 2.0)를 사용하였고, 몇 가지의 S-nitrosothiols들만을 실험하였다는 한계에도 불구하고, oxyhemoglobin과 hydroquinone에 대한 반응 양상으로 보아, 돼지 음경후인근의 NANC 이완은 외원성 NO나 S-nitrosothiols 보다는 NO-releasing 물질로서 SNP에 의한 이완에 더 유사하였

으므로 이를 유도하는 신경전달물질의 저장 및 전달 형태는 SNP처럼 세포막을 통과하여 세포내에서 NO를 유리하는 NO-containing 물질일 가능성을 시사한다.

평활근조직내에 존재하는 여러 내재신경으로 부터 분비되는 신경전달물질들은 평활근세포막의 고유수용체에 작용하여 여러 이온 통로를 조절하므로써 세포막전위를 변화시키고 그에 따라 평활근의 수축력을 조절한다. 지금까지 여러 위장관 평활근조직에서 내재성신경 자극에 의한 흥분성 혹은 억제성 신경-근 접합부 전위의 성상에 대한 보고가 있었다^{28,29}. Komori와 Suzuki³⁰는 guinea pig 위체부 및 위저부에서 IJP가 apamin에 의해 선택적으로 차단되어지나 콜린성 및 아드레날린성 차단제에 의해 차단되어지지 않는다고 하였으며 IJP 발생은 세포막에 대한 K⁺ 이온의 투과도 변화에 의한다고 하였다. 또한 Crist et al³¹은 guinea pig의 ileum에서 NANC 신경자극에 의해 발생하는 IJP는 ATP와 VIP에 의해 유발된다고 하였다. 그러나 NO가 IJP의 형성에 관여한다는 보고가 있다. He와 Goyal³²은 guinea pig ileum에서 NO는 ATP에 의해 유발되는 fast IJP에는 관여하지 않으나 VIP와 NO가 동시에 작용하는 slow IJP에는 NO가 관여한다고 하였으며, NO 자체로도 막전위의 과분극(membrane hyperpolarization)을 유도한다고 하였다. 본 실험에서는 apamin이나 다른 신경전달물질 차단제의 효과를 검증하지는 못하였고 NO 차단제를 투여하여 보았던바 이완 현상은 선택적으로 억제되었으나 IJP는 차단되지 못하였다. 또한 NO 유리물질인 SNP를 투여하여도 세포막전위의 변동없이 근이완이 유도되어지는 것으로 보아 NO 이외에 다른 NANC 신경전달물질이 IJP를 발생시키는 것으로 생각할 수 있으며 IJP의 발생이 근이완과 비슷한 시간적 경과를 가지고 나타난다 하더라도 곧 근이완과 직접적으로 연결되어지지 않는다는 것을 시사한다.

결 론

L-arginine/nitric oxide(L-arg/NO) system은, 혈관 평활근의 내피 의존성 이완을 매개한다는 사실이 알려진 이후 여러 평활근 조직에서 비아드레날린 콜린성의 억제성 신경전달과정을 매개하는 것으로 알려져 있다. 그러나 L-arg/NO system에 의해 생성된 신경전달물질의 정확한 실체에 대하여는 논란이 있어서 일부에서는 NANC 신경전달물질의 저장 또는 전달 형태로서 S-nitrosothiols이 제기되고 있다. 본 연구는 돼지 음경후인

근에서 L-arg/NO system에 의한 이완 현상을 확인하고, NANC 신경전달물질로서 S-nitrosothiols일 가능성을 알아보기 위하여 실시하였으며, 이와 더불어 NO가 세포막전위 및 억제성 신경-근 접합부 전위의 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 미세전극법을 이용하여 세포막전위와 수축력을 동시에 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 돼지 음경후인근은 NANC 신경의 전장자극에 의해 자극 빈도 의존적 이완 현상을 보였으며, 이러한 이완은 tetrodotoxin에 의해 완전히 차단되었다.

2. 전장자극에 의한 돼지 음경후인근의 이완 현상은 NO synthase 억제제인 L-NAME와 soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의해 억제되었으며, L-NAME에 의한 이완 억제 효과는 L-arginine에 의해 회복되었다.

3. 외원성 NO와 sodium nitroprusside(SNP) 및 S-nitrosothiols로써 SNAP, GSNO, CysNO 및 SNAC는 1×10^{-7} - 3×10^{-6} M 농도에서 농도의존적 이완을 유도하였으며, 실험에 사용된 S-nitrosothiols의 potency order는 SNAP > GSNO > CysNO > SNAC 순서를 나타내었다.

4. Oxyhemoglobin은 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였으며, 전장자극, SNP 및 nitrosothiols에 의한 이완을 억제하였다.

5. Hydroquinone은 외원성 NO에 의한 이완을 차단하였으며 S-nitrosothiols에 의한 이완을 억제하였으나 전장자극과 SNP에 의한 이완에는 억제효과가 없었다.

6. SNP(2×10^{-6} - 5×10^{-6} M)는 근 이완을 유도하였으나 막전위에는 영향이 없었다.

7. 억제성 신경-근 접합부 전위는 TTX에 의해 차단되었으나 L-NNA에 의해서는 차단되지 않았다.

이상의 결과로 보아 돼지 음경후인근의 NANC 신경 자극에 의한 이완현상은 L-arg/NO system에 의해 매개됨을 알 수 있었으며, oxyhemoglobin과 hydroquinone에 대한 반응성을 비교하였을 때 전장자극에 의한 이완 현상은 외원성 NO나 S-nitrosothiols 보다 SNP에 의한 이완에 더 유사한 양상을 보임으로써, 돼지 음경후인근의 NANC 신경원성 이완을 매개하는 신경전달물질은 NO 그 자체 보다는 NO-containing 물질일 가능성을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-377.
2. Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol* 1985; 249: H95-H101.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
4. Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Bogers JJ, et al. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic, noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 441.
5. Dalziel HH, Thornbury KD, Ward SM, et al. Involvement of nitric oxide synthetic pathway in inhibitory junction potentials in canine proximal colon. *Am J Physiol* 1991; 260: G789-G792.
6. Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 933-938.
7. Gibson A, Mirzazadeh S, Hobbs AG, et al. L - N^G -monomethyl arginine and L - N^G -nitro arginine inhibit non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 602-606.
8. Gillespie JS, Liu X, Martin W. The effects of arginine and N^G -monomethyl-L-arginine on the responses of the rat anococcygeous muscle and to NANNC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1080-1082.
9. 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.
10. 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.
11. Bowman A, Drummond AH. Cyclic GMP mediates neurogenic relaxation in the bovine retractor penis muscle. *Br J Pharmacol* 1984; 81: 665-674.
12. Ward SM, Dalziel HH, Bradley ME, et al. Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, noncholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br J Physiol* 1992; 107: 1075-1082.
13. Myers PR, Guerra R, Herrison DG. Release of NO and EDRF from cultured bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1989; 256: H1030-H1037.
14. 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.
15. 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.
16. Myers PR, Minor RL, Guerra R, et al. Vasoreaxant properties of the endothelium derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990; 345: 161-163.
17. Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, et al. Nitric oxide and nitrososysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 1991; 261: G553-G557.
18. 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.
19. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-716.
20. Kowaluk EA, Fung HL. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 1256-1264.
21. Martin W, Smith JA, Henderson AH. Evidence

- that inhibitory factor extracted from bovine retractor penis is nitrite, whose acid activated derivative is stabilized nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 597-586.
22. Gillespie JS, Sheng H. A comparison of hemoglobin and erythrocytes as inhibitors of smooth muscle relaxataion 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.
 23. Gibson 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.
 24. Kim N, Azadzoi KM, Goldstein I, et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest* 1991; 88: 111-118.
 25. Ignarro LJ, Kadowits PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 171-191.
 26. 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.
 27. Kitamura K, Lian Q, Carl A, et al. S-nitrosocystein, but not sodium nitroprusside, produces apamin-sensitive hyperpolarizaiton in rat gastric fundus. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 415-423.
 28. Kuriyama H, Osa T, Tasaki H. Electrophysiological studies of the antrum muscle fibers of the guinea-pig stomach. *J Gen Physiol* 1970; 55: 48-62.
 29. Bauer V, Kuriyama H. Evidence for non-cholinergic, non-adrenergic transmission in the guinea-pig ileum. *J Physiol* 1982; 330: 95-110.
 30. Komori K, Suzuki H. Distribution and properties of excitatory and inhibitory junction potentials in circular muscle of the guinea-pig stomach. *J Physiol* 1986; 370: 339-355.
 31. Crist JR, He XD, Goyal RK. Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J Physiol* 1992; 447: 119-131.
 32. He XD, Goyal RK. Nitric oxide involvement in the peptide VIP-associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *J Physiol* 1993; 461: 485-490.