

흰쥐 대동맥에서 cyclic nucleotide phosphodiesterase 억제제들의 혈관 이완 특성

강형섭 · 최철호 · 김진상*

전북대학교 생체안전성연구소
(제재승인: 2003년 11월 20일)

Vasorelaxant properties of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors in rat aorta

Hyung-sub Kang, Cheol-ho Choi, and Jin-shang Kim*

Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

(Accepted: November 20, 2003)

Abstract : Vascular smooth muscle relaxation is modulated by an increase in cGMP subsequent to nitric oxide (NO) production by endothelial cells. The effects of cAMP and cGMP phosphodiesterase (PDE) inhibitors were investigated in phenylephrine-precontracted rat aorta rings by using the specific inhibitors of PDE I, III, IV and V as relaxing agents (calmodulin-activated PDE inhibitors, IBMX and W₇, type I; cAMP-specific PDE inhibitors, milrinone, type IV; Ro 20-1724, type III and cGMP-specific PDE inhibitor, zaprinast, type V). All the PDE inhibitors produced a concentration-dependent relaxation in the ring with intact endothelium (+E). Except for milrinone, all the PDE inhibitors-induced relaxations were inhibited by removal of extracellular Ca²⁺, N^G-nitro-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine methyl ester, methylene blue (MB) or nifedipine. The specific PDE I and PDE IV inhibitors both produced endothelium-independent relaxations which were inhibited by MB in -E rings. However, zaprinast had no effect in -E rings. Except for milrinone, sodium nitroprusside (a NO donor)-induced relaxation was significantly augmented by all PDE inhibitors in +E rings. The results suggest that 1) the vasorelaxant properties of IBMX, W₇, Ro 20-1724 and zaprinast are dependent on endothelium or on interaction with Ca²⁺ regulation, 2) each PDE is differently distributed in vascular tissues (endothelial and smooth muscle cells), 3) the vasodilations of PDE inhibitors are due to the increase of cAMP and cGMP formation through inhibition of cAMP- and cGMP-PDE and 4) the vasodilation action of milrinone does not involve in endothelial-cyclic nucleotide system.

Key words : Phosphodiesterase inhibitors, endothelium, cGMP, relaxation, aorta

서 론

심혈관계에서 세포내 cyclic nucleotide (CN)인 adenosine 3':5' cyclic-monophosphate (cAMP) 및 guanosine 3':5' cyclic-monophosphate (cGMP)는 혈관이완 등에 중요한 역할을 하고 있으며, 세포내 농도는 합성과 이화작용에 따라 좌우된다 [37]. 첫째, 합성은 내피세포에서 생성되는 내피유래 이완 인자인 nitric oxide (NO)에 의하여

세포내 guanylate cyclase (GC)가 활성화되어 평활근 세포에서 cGMP 생성이 촉진되며 cGMP는 세포내 Ca²⁺의 증가나 myofilament의 Ca²⁺ 감수성을 감소시켜 혈관을 이완시킨다 [9, 30]. 둘째, 이화작용으로 CN은 phosphodiesterase (PDE)에 의하여 가수분해되어 세포내 CN 농도가 감소 [1, 26] 되는데 이를 억제하면 CN 농도가 증가된다 [1, 39]. PDE는 이 cAMP 및 cGMP를 가수분해시키는데 기질에 따라 특이적으로 작용하는 5

이 논문은 2003년도 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어졌음.

*Corresponding author: Jin-shang Kim

Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
[Tel: 82-63-270-2554, Fax: 82-63-270-3780, E-mail: kimjs@chonbuk.ac.kr]

가지 즉, PDE I, II, III, IV 및 V로 분류되며 다양한 조직에 분포되어 있다 [2]. Ca^{2+} -calmodulin에 의하여 활성화되는 PDE I은 cAMP 및 cGMP를, cGMP에 의하여 활성화 될 수 있는 PDE II는 cAMP 및 cGMP를, cGMP에 의하여 억제되는 PDE III은 cAMP 및 cGMP를, 그리고 cGMP에 비선택적인 PDE IV는 특이적으로 cAMP를 가수분해하고, PDE V는 특이적으로 cGMP를 가수분해한다 [2]. 따라서 혈관 세포에서 cAMP 및 cGMP는 adenylate cyclase (AC) 및 GC의 활성에 의한 합성 촉진은 물론, PDE 선택적인 억제에 의한 CN 가수분해 억제로 cAMP 및 cGMP가 증가됨으로써 혈관을 이완시킨다 [6, 23, 31]. PDE 억제제들은 심부전, 천식, 우울증, 발기부전 및 치매와 같은 임상적 질병 치료를 위한 심근수축제, 혈관 이완제, 혈액 항응고제, 기관지 이완제, 발기제 및 항우울제 등으로 사용하기 위하여 연구되고 있으며 [2, 20, 21], 이를 PDE 억제제들은 상기와 같은 특이성에 따라 분류되어 각각 cAMP와 cGMP에 선택적, cAMP에 선택적 그리고 cGMP에 선택적으로 작용함이 밝혀졌다. 이러한 선택적인 작용 이외에 cGMP는 cAMP에 의한 혈관 이완을 강화시키고 [17, 40], PDE III 억제제에 의한 혈관 이완은 cAMP와 cGMP와 관련이 없고 PDE 억제와 무관한 다른 약리학적 작용 즉, Ca^{2+} 유입 억제에 의하며 [38], cGMP 증가는 PDE III을 억제 한다 [4]. PDE IV 억제제의 혈관 이완효과가 cGMP를 증가시키는 약물 및 PDE III 억제제에 의하여 강화 [11] 된다는 보고에 의하면 두 CN간의 적·간접적인 관련이 있을 수 있고, 혈관 이완작용이 혈관 내피세포에 의존적 또는 비의존적임을 알 수 있고, PDE 억제제는 CN 과와 관련없이 직접적으로 혈관을 이완시킬 수 있음을 의미한다. 그러나 혈관 이완효과에 미치는 각각의 PDE 억제제들의 공통점과 특이성, 즉, 혈관 이완성, 내피세포 의존성, NO와의 관련성 및 GC와의 관련성, 그리고 Ca^{2+} 과의 관련성에 대한 연구가 미흡하다. 따라서 이 연구에서는 흰쥐 평활근 세포에 4종류 즉, PDE I, III, IV, 및 V가 존재한다 [11]는 점을 고려하여 PDE I 억제제인 IBMX와 W7, PDE III 억제제인 milrinone, PDE IV 억제제인 Ro 20-1724 그리고 PDE V 억제제인 zaprinast에 의한 혈관 이완작용의 공통점과 특이성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

혈관 적출 및 수축력 측정

수컷 흰쥐 (*Sprague-Dawley*, 250~300 g)를 두부 타격하여 방혈시킨 후 흉부 대동맥을 적출하여 30°C의 산소포화 영양액 (133.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM

CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.0 mM KH_2PO_4 , 11.0 mM glucose 및 12.0 mM NaHCO_3 와 95% O_2 : 5% CO_2 , pH 7.3~7.4)으로 혈액을 제거한 다음 실체 현미경하에서 지방 및 결합 조직면을 제거하고 약 2~3 mm의 길이로 절단하였다. 절단된 한 개의 혈관 고리를 상기 영양액이 관류 (4 ± 0.5 mL/min)되는 tissue chamber내에 직경 50 μm 고정핀에 고정하고 한쪽은 직경 25 μm 은선에 연결된 고리에 연결한 후 tension transducer (400A, Cambridge)에 연결하였다. 연결 후 250~300 μg 의 장력 (정지 장력)을 준 후 안정되면 등장성 40~70 mM KCl의 영양액을 20~30분간 1~2회 관류시켜 장력을 안정시켰다. 이 장력의 변동은 recording system (3400, Gould)을 이용하여 기록하였다.

약물처치 및 내피제거

상기에서와 같이 내피가 존재한 상태에서 수축력을 측정한 후 장력을 이완시킨 후 saponin (0.3 mg/mL)을 영양액에 녹여 12-15분간 관류시켜 내피를 제거한 후 다시 정지 장력을 주었고 내피제거 상태의 실험을 실시하였다. 내피 존재 유무는 0.5 μM 의 acetylcholine을 투여하여 이와 여부로 확인하였다. 이와 같이 영양액이 관류되는 tissue chamber내에서 직접 내피를 제거하여 단일 조직에서 내피 유무에 따른 병행실험을 하였다. 40 mM KCl 또는 phenylephrine (PE)을 투여하여 수축력이 일정해지면 PDE 억제제 및 SNP를 투여하여 그 이완효과를 관찰하였다. 수축 혈관에서 PDE 억제제의 혈관 이완실험은 농도 증가에 따른 각 농도의 최대 이완효과가 둑게 나타나는 관계로 농도에 따른 이완효과 (Fig. 1)만을 관찰하였고, 각종 약물의 효과는 단일 농도의 PDE 억제제를 투여하여 시간에 따른 이완효과를 나타냈다 (Fig. 2 이하). L-NNA, L-NAME, MB 및 nifedipine 등은 30분~1시간 동안 전 처치 후 PDE 억제제를 투여하여 그 이완효과를 관찰하였다. 내피제거, NOS 억제제, GC 억제제, 및 Ca^{2+} 통로 차단제 등의 전처치 시에는 PE에 의한 수축력이 강화되거나 약화되기 때문에 비슷한 수축 상태에서 상기 혈관 이완 약물의 반응을 관찰하기 위하여 PE의 농도를 조절하여 비슷한 수축 크기에서 실험하였다.

사용 약물 및 통계처리

Phenylephrine, sodium nitroprusside, saponin, N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^{G} -nitro-L-arginine (L-NNA), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), milrinone, W7, zaprinast, Ro 20-1724, nifedipine 및 methylene blue는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험성적은 means \pm SD으로 나타냈고, 각 실험 결과의 유의성은 Student's *t*-test에 의해 검

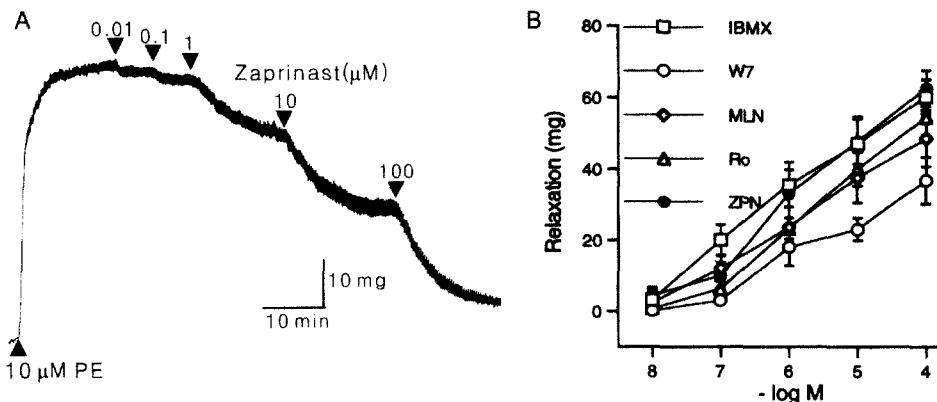


Fig. 1. Concentration response curves of PDE (phospho-diesterase) inhibitors (IBMX, W7, milrinone: MLN, Ro 20-1724; Ro, or zaprinast: ZPN) on isolated rat aortic single rings with endothelium (+E). A: tracing of typical bioassay curve for zaprinast. B: each point represents means±SD expressed as tension (mg) for four to five experiments.

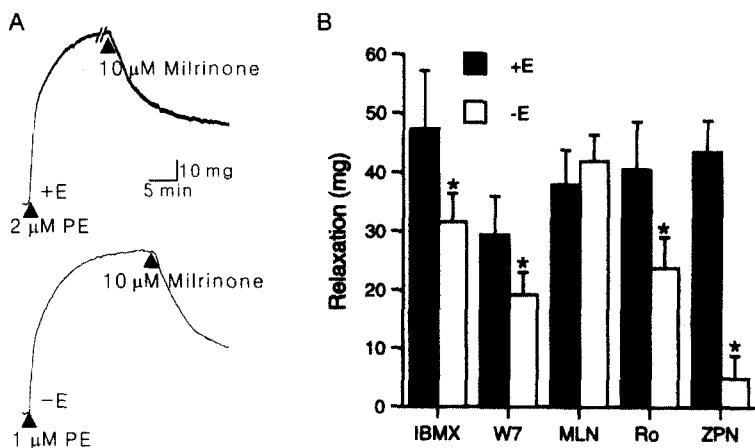


Fig. 2. Relaxing effects of PDE inhibitors on PE-precontracted isolated rat aortic rings with (+E) or without (-E) endothelium. A: tracing of typical bioassay response for effects of 10 μM milrinone on +E and -E aortic rings. B: data summary of the effects of endothelium existence on the relaxation by PDE inhibitors (10 μM IBMX, 50 μM W7, 10 μM milrinone, 50 μM Ro 20-1724, or 10 μM zaprinast). Values are expressed as mean±SD for five to six experiments. *P<0.05 compared with each control, respectively.

정하였다.

결 과

PE에 의한 수축 혈관에서 PDE 억제제들의 농도 의존적 혈관 이완 효과

혈관 내피가 존재하는 혈관을 5~10 μM PE으로 수축시킨 후 각 분류 별 PDE 억제제인 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM IBMX, W7, milrinone, Ro 20-1724 및 zaprinast을 투여한 결과 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다 (Fig. 1A, B).

혈관 내피 제거가 PDE 억제제의 혈관 이완효과에 미치는 영향

혈관 내피가 존재하는 혈관과 제거한 혈관을 PE으로 수축시킨 후 단일 농도인 10 μM IBMX, 50 μM W7, 10 μM milrinone, 50 μM Ro 20-1724 또는 10 μM zaprinast을 투여한 후 최대 이완효과를 비교 관찰하였다. 내피가 존재하는 혈관에서 각각의 PDE 억제제들에 의하여 47.4 ± 9.81, 29.4 ± 6.58, 38.0 ± 5.87, 40.6 ± 8.01 및 43.7 ± 5.16 mg를 이완시켰다. 그러나 내피를 제거한 혈관에서 각각의 PDE 억제제들에 의해 31.6 ± 4.77, 19.2 ± 3.77, 42.0 ± 4.53, 23.8 ± 5.26 및 5.0 ± 3.85 mg를 이완시켜 milrinone

을 제외한 모든 PDE 억제제에 의한 이완효과가 내피 제거에 의하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 2). 내피가 존재하는 혈관에서보다 내피제거 혈관에서 PE의 수축효과가 증가하기 때문에 수축정도를 비슷하게 하기 위하여 혈관 내피세포를 제거한 혈관에서는 PE의 농도를 감소시켜 혈관을 수축시키고 이완제의 효과를 관찰하였다.

Nitric oxide synthase (NOS) 억제제가 PDE 억제제의 혈관 이완효과에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관을 PE으로 수축시킨 후 상기와

같은 단일 농도의 IBMX, W7, milrinone, Ro 20-1724 또는 zaprinast를 투여한 후 최대 이완효과를 관찰한 결과 각각 46.5 ± 7.42 , 27.4 ± 5.94 , 36.3 ± 6.28 , 35.0 ± 4.12 및 38.8 ± 6.52 mg을 이완시켰다. 그 후 NOS 억제제인 20 μM L-NNA를 1시간 동안 전처치한 상태에서 각각의 PDE 억제제들에 의해 33.0 ± 5.21 , 17.2 ± 5.36 , 39.8 ± 6.24 , 22.6 ± 3.05 및 23.6 ± 6.02 mg을 이완시켜 milrinone을 제외한 모든 PDE 억제제에 의한 이완효과가 L-NNA에 의하여 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 3A, B). 또 다른 NOS 억제제인 100 μM L-NAME에 의해서도 L-NNA와 유사

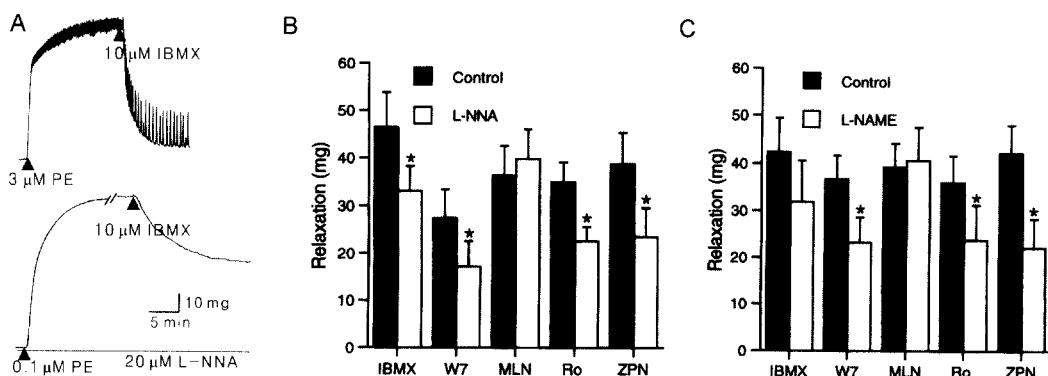


Fig. 3. Effects of L-NNA or L-NAME on the relaxation by PDE inhibitors in +E aortic rings. A: the vasodilation of 10 μM IBMX and the inhibition of 20 μM L-NNA on the relaxation by IBMX. B and C: data summary of the effects of 20 μM L-NNA (B) or 100 μM L-NAME (C) on the relaxation by PDE inhibitors. Values are expressed as means \pm SD for five to six experiments. * $P < 0.05$ compared with each control, respectively.

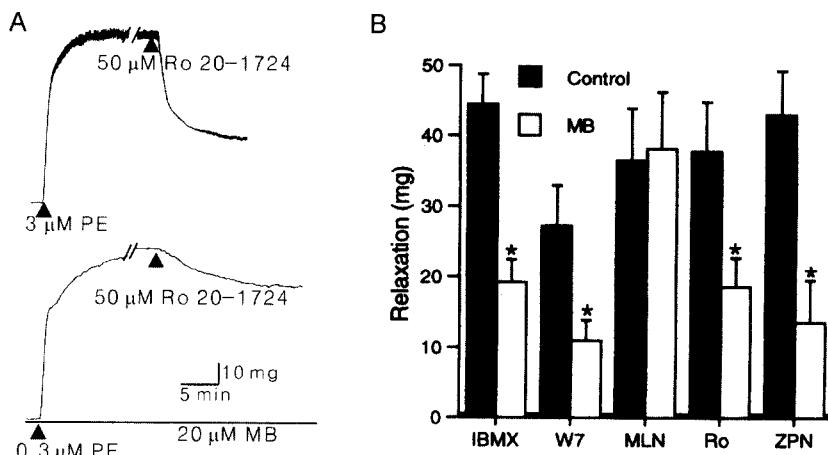


Fig. 4. Effects of methylene blue (MB) on the relaxation by PDE inhibitors in +E aortic rings. A: the vasodilation of Ro 20-1724 and the inhibition of MB on the relaxation by 50 μM Ro 20-1724. B: data summary of the effects of MB on the relaxation by PDE inhibitors. Values are expressed as mean \pm SD for five to six experiments. * $P < 0.001$ compared with each control, respectively.

한 억제효과가 관찰되었다 (Fig. 3C). NOS 억제제 전처리는 PE의 수축효과를 강화시키기 때문에 수축정도를 비슷하게 하기 위하여 NOS 억제제 전처리 혈관에서는 PE의 농도를 감소시켜 혈관을 수축시키고 이완제의 효과를 관찰하였다.

GC 억제제가 PDE 억제제의 혈관 이완효과에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관에서 상기와 같은 농도의 PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과가 milrinone을 제외하고 GC 억제제인 $20 \mu\text{M}$ methylene blue에 의하여 억제되었

다 (Fig. 4). Saponin으로 내피를 제거한 혈관에서 cGMP 선택적인 PDE 억제제인 zaprinast에 의한 혈관 이완효과는 극히 경미 (Fig. 2B)하여 내피 제거 혈관에서 zaprinast에 의한 혈관 이완효과에 대한 methylene blue의 영향은 관찰이 불가능하였다. 그러나 내피 제거 혈관에서도 milrinone을 제외한 IBMX, W7 및 Ro 20-1724에 의한 혈관 이완효과가 methylene blue에 의하여 억제되었다 (Fig. 5). Methylene blue 전처리는 PE의 수축효과를 강화시키기 때문에 수축정도를 비슷하게 하기 위하여 methylene blue 전처리 혈관에서는 PE의 농도를 감소시켜 혈관을 수축시키고 이완제의 효과를 관찰하였다.

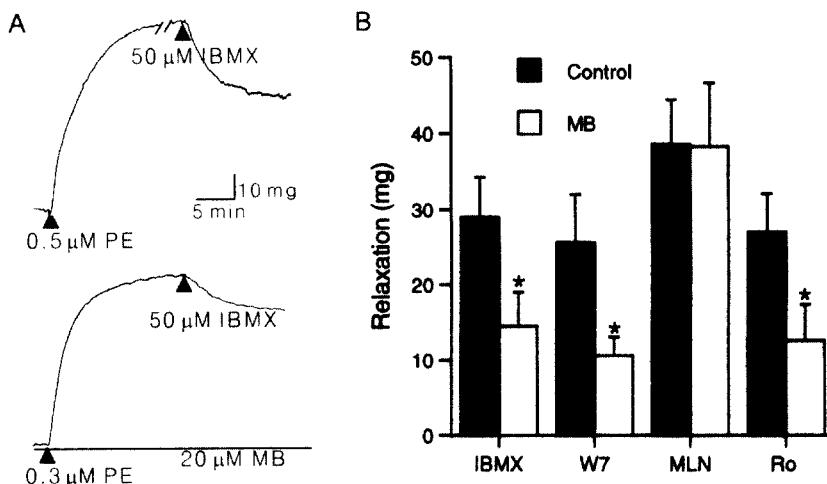


Fig. 5. Effects of MB on the relaxation by PDE inhibitors in -E aortic rings. A: the vasodilation of $50 \mu\text{M}$ IBMX and the inhibition of $20 \mu\text{M}$ MB on the relaxation by IBMX. B: data summary of the effects of on the relaxation by PDE inhibitors. Values are expressed as mean \pm SD for five to six experiments. * $P<0.005$ compared with each control, respectively.

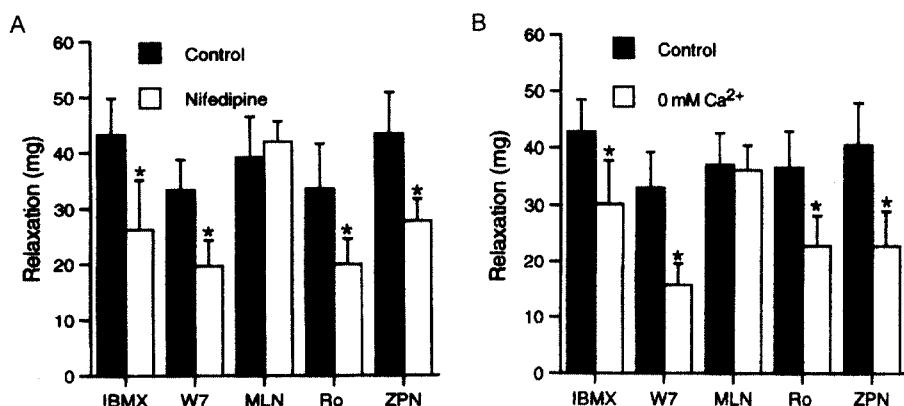


Fig. 6. Effects of nifedipine (A) or 0 mM Ca^{2+} (B) on the relaxation by PDE inhibitors in +E aortic rings. Data summary of the effects of $0.3 \mu\text{M}$ nifedipine or 0 mM Ca^{2+} on the relaxation by PDE inhibitors. Values are expressed as mean \pm SD for four to six experiments. * $P<0.05$ compared with each control, respectively.

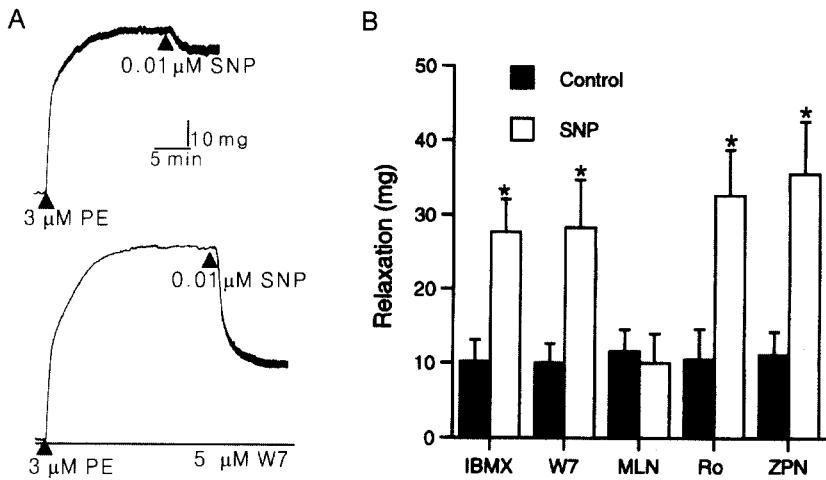


Fig. 7. Typical tracing and data summary of the effects of PDE inhibitors on the relaxation by sodium nitroprusside (SNP) in +E aortic rings. A: the vasodilation of 0.01 μM SNP and enhancement of relaxation by SNP in the presence of 5 μM W7. B: the data summary shows that PDE inhibitors (except for milrinone) enhanced the relaxation induced by SNP. Values are expressed as mean \pm SD for five to six experiments. * $P < 0.001$ compared with each control, respectively.

Ca^{2+} 통로 차단제 및 영양액내 Ca^{2+} 제거가 PDE 억제제의 혈관 이완효과에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관에서 상기와 같은 농도의 PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과가 milrinone을 제외하고 막전위 의존성 Ca^{2+} 통로 억제제인 0.3 μM nifedipine 또는 5 μM verapamil (자료 미제시)에 의하여 억제되었다 (Fig. 6A). Ca^{2+} 를 제거한 영양액내에서 각각의 PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과가 유의성 있게 억제되었다 (Fig. 6B). 단, milrinone에 의한 이완효과는 억제되지 않았다.

PDE 억제제들이 SNP의 혈관 이완효과에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관에서 내피 비의존적 혈관 이완제인 sodium nitroprusside (SNP)의 혈관 이완효과에 대한 PDE 억제제들의 영향을 관찰하였다. PE으로 혈관을 수축시킨 후 0.01 μM SNP 투여에 의하여 10.0~11.6 mg 정도로 혈관을 이완시켰다. 그러나 milrinone을 제외한 모든 PDE 억제제가 존재한 상태에서 SNP를 투여한 결과 혈관 이완효과가 현저히 강화되었다 (Fig. 7).

고 찰

cAMP 및 cGMP는 혈관 평활근 긴장도 조절에 있어서 매우 중요한 역할을 하며 세포내 이들 농도는 adenylate cyclase (AC) 및 GC의 활성과 PDE간의 균형에 의하여

조절된다. 즉, 평활근 세포에서 cAMP 증가에 의한 혈관 이완 기전으로 cAMP 의존적 protein kinase의 자극에 의한 근섬유막 Ca^{2+} 펌프 활성, $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ ATPase 자극에 의한 과분극 또는 세포내 Ca^{2+} 와 Na^{+} 의 제거, myosin light chain의 탈인산화 등을 들 수 있다 [7]. cGMP 활성 역시 평활근 이완 기전에 중요한 인자이다. cGMP 증가는 protein kinase G (PKG) 활성에 의한 세포내 Ca^{2+} 감소와 평활근 수축 구조의 Ca^{2+} 에 대한 감응도 감소를 일으키며 [3], 세포내 Ca^{2+} 감소기전으로 Ca^{2+} -활성 K⁺ 통로 활성, 세포막 Ca^{2+} 통로 억제, 세포질 Ca^{2+} 펌프 활성, 근질세마망 Ca^{2+} 펌프 활성, phospholipase C (PLC) 억제에 의한 IP₃ 수용체 억제 및 IP₃ 생성 억제 등이 알려져 있다 [3, 13, 14, 28]. 이와 같이 cGMP 및 cAMP계를 경유한 다양한 기전 뿐만 아니라 어떠한 물질은 상기 기전에 직접적인 영향으로 혈관을 이완시킬 수 있다 [3]. 따라서 혈관 평활근 세포내 cAMP 및 cGMP 농도는 혈관 이완의 척도가 될 수 있어서 PDE에 의한 CN의 가수분해를 억제하는 약물은 세포내 CN의 농도를 높여 혈관을 이완시킬 수 있다. 그러나 혈관에서 PDE 종류에 따라 각각의 CN에 비선택적, 선택적 또는 비특이적으로 작용하기 때문에 PDE 종류 별 억제제의 효과도 특징적이고 억제제간의 상호 관련성이 있게 나타난다.

PE로 수축시킨 내피세포 존재 혈관에서 모든 PDE 억제제는 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰고 milrinone을 제외한 PDE 억제제들의 이완효과가 혈관 내피세포 제거에 의하여 억제되었다. Ca^{2+} -calmodulin에 의하여 활

성화되는 PDE I는 IBMX에 의하여 억제되지만 특이적으로 다른 PDE도 억제하며 이는 Gi 단백을 억제하여 AC를 활성화시키는 약물로 알려져 있다 [24]. 이 연구에서 IBMX와 W7에 의한 내피세포의 존적 혈관 이완은 비선택적으로 cAMP 및 cGMP를 가수분해를 억제하기 때문에 다른 cAMP 선택적 PDE 억제제처럼 내피세포의 존적 혈관 cGMP 가수분해 억제에 의한 혈관 이완으로 추측할 수 있다. 그러나 이 연구 결과의 Fig. 2에서 보는 바와 같이 내피 제거로 cGMP 선택적 PDE V 억제제보다 PDE I 억제제의 억제 정도가 적게 나타났다. 이 결과에 의하면 PDE I 억제제에 의한 혈관 이완은 내피세포의 존적 또는 비의존적으로 일어날 수 있음을 의미한다. 그리고 혈관 내피세포가 존재한 경우 수용체를 경유한 혈관 이완 인자인 nitric oxide (NO) 유리는 물론 평활근에서 NO는 cGMP를 증가시키기 때문에 많은 혈관 이완 및 수축 기전 연구에서 혈관 내피세포의 유무 및 NOS 억제 및 활성 상태는 중요하다. 이 연구 결과에서 PDE I 억제제들에 의한 혈관 이완이 NOS 억제제인 L-NNA와 L-NAME 그리고 GC 억제제인 methylene blue에 의하여 부분적으로 억제되었음은 내피의 존적 GC를 경유한 cGMP 가수분해 억제에 의하여 일어남을 암시하고 있다. 그러나 혈관 내피세포에서 유리된 NO나 직접적인 외인성 NO 물질은 혈관 내피세포내 또는 혈관 평활근 세포내에서 GC를 활성화시켜 cGMP를 활성화시킬 수 있기 때문에 GC 활성은 혈관 내피세포에 전적으로 의존적이라고 할 수 없다. 즉 내피세포 비의존적 GC 활성에 의한 혈관 이완도 고려해야 하기 때문에 GC 관련 성 실험은 내피세포 유무에 따라 실시하여야 한다. 이 연구에서 혈관 내피세포 제거 혈관에서도 GC 억제제인 methylene blue에 의하여 PDE I 억제제들의 혈관 이완 효과가 억제되었다. 이는 상기에서 언급한 바와 같이 PDE I 억제제에 의한 혈관 이완은 내피세포의 존적 또는 비의존적인 cGMP 가수분해 억제로 인한 cGMP 증가에 의하여 일어날 수 있다는 보충적인 결과이다.

우선적으로 cAMP를 가수분해하는 PDE III는 cGMP에 의하여 경쟁적으로 억제되며 특이적으로 cilostamide, CI 930, indolidan 및 SK&F 94120 등에 의하여 억제된다 [17]. 흰쥐 흉대 동맥에서 cilostazol에 의한 혈관 이완은 cAMP 증가 및 내피세포의 존적 NO 유리에 의하며 [22], 사람 neuroblastoma cell에서 cilostazol은 직접적으로 cAMP 및 NO 생성을 증가시키며 [8], 흰쥐 대동맥에서 cilostamide는 isoprenaline에 의한 이완을 강화시킨다 [4]. cGMP 선택적 PDE III 억제로 cAMP에 의한 이완을 강화시킨다고 하였고 [17]. 그리고 혈관 이완 기전으로 cAMP의 존적 PKA 활성, Na⁺-K⁺ ATPase 활성 및 myosin light chain의 탈인산화 촉진 등이 알려져 있

다 [7]. PDE III 역시 milrinone에 선택적인데 이는 다른 PDE 억제제들과는 다른 효과가 있고 [35], 고농도로 IV 및 V에도 작용하며 [18, 27], 혈관 이완효과가 cAMP 및 cGMP와 무관하고 Ca²⁺ 통로 억제와 관련 [38]되고, milrinone이나 amrinone는 norepinephrine나 PE와 같은 α₁-수용체 자극에 의한 혈관 수축을 억제한다는 결과 [33, 36]를 보여 수용체 경유 PLC-IP₃ 경로를 경유한 Ca²⁺ 조절과 관련성이 있음을 시사한 바 있으나 milrinone을 포함한 PDE III 억제제는 내피 비의존적 혈관을 이완시키며 L-NAME에 의해서도 억제되지 않음을 보였으나 [11] methylene blue에 의하여 milrinone에 의한 혈관 이완이 내피세포의 존적 또는 비의존적 cGMP와 관련되거나 직접적으로 수용체 활성 또는 Ca²⁺ 저장소 활성 Ca²⁺ 통로 억제와 관련될 수 있음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서 다른 PDE 억제제와는 다르게 milrinone에 의한 혈관 이완 효과는 혈관 내피세포 제거, NOS 억제제, GC 억제제, Ca²⁺ 통로 억제제 및 세포외 Ca²⁺ 제거에 의해서 전혀 억제되지 않았을 뿐만 아니라 GC 활성제인 SNP에 의한 다른 억제제들의 혈관 이완 강화와는 다르게 SNP에 의하여 milrinone의 혈관 이완효과가 전혀 강화되지 않았다.

cGMP에 비선택적인 PDE IV는 특이적으로 cAMP를 가수분해한다. PDE IV 억제제인 rolipram이나 denufylline은 내피의 존적으로 혈관을 이완시키며 이러한 이완효과는 methylene blue에 의하여 억제되었고 [17] 흰쥐 대동맥에서 PDE IV 및 V 억제제는 내피의 존적 이완효과를 보였다 [11]. 이 연구에서도 가장 PDE IV 선택적 억제제인 Ro 20-1724 [18, 27] 역시 혈관을 이완시켰고 이 이완효과가 내피 제거, NOS 억제제 및 methylene blue에 의하여 억제되어 PDE IV 억제제에 의한 혈관 이완효과가 혈관 내피성 NO-cGMP계와 관련될 수 있음을 추측할 수 있다. 이와 같은 추측은 혈관 평활근에서 cGMP는 cAMP에 의한 이완(가수분해 억제에 의한)을 강화시킨다는 보고 [17] 및 흰쥐 대동맥에서 isoprenaline은 내피에 β-adrenoceptor에 작용하여 cAMP를 증가시키고 직·간접적으로 NO 유리하여 혈관을 이완시킨다는 보고 [5]를 근거로 할 수 있다. 그리고 PDE V는 특이적으로 cGMP를 가수분해한다. 혈관 내피세포에는 PDE I, V가 존재하지 않기 때문에 대표적인 PDE V 억제제인 zaprinast의 내피의 존적 혈관 이완은 내피와 직접적으로 관련이 없다고 하였으나 [2, 32] 많은 연구 결과에 의하여 혈관 내피의 존적 cGMP계와 관련되어 있음을 밝혀졌다. 그 중 zaprinast는 내피존재 혈관에서 이완을 일으켰고 이 이완효과가 L-NAME 및 methylene blue로 억제됨을 관찰하여 혈관 내피의 존적

임을 밝혔다 [11]. 이러한 연구 결과의 공통점으로 zaprinast의 이완 효과는 내피세포 유리 NO에 반응하는 cGMP 가수분해의 억제에 의한 것으로 볼 수 있다 [19]. 이 연구에서도 zaprinast의 혈관 이완효과가 혈관 내피 제거에 의하여 현저히 차단되었고 NOS 억제제 및 methylene blue에 의하여 부분적으로 억제되었다. 이와 같이 내피 제거에 의하여 이완효과가 현저히 차단된 결과에 의하면 zaprinast에 의한 혈관 이완효과는 전적으로 내피 세포 의존적이라고 할 수 있으며 즉·간접적인 cGMP계 이외의 기전에 의하여 혈관을 이완시킬 수 있음을 알 수 있다. 추가적으로 zaprinast에 선택적인 PDE V는 주로 내피세포에 존재함을 암시하고 있다. 그러나 IBMX, W7 및 Ro 20-1724는 내피 존재 및 제거 혈관에서 부분적으로 이완효과를 보였기 때문에 type I 및 IV에 선택적인 PDE들은 내피와 평활근에 존재할 수 있음을 추측할 수 있다.

혈관 이완 기전 중 cGMP를 경유한 기전 이외에 PDE 억제제의 직접적이고 다양한 작용 기전에 의한 세포내 Ca^{2+} 감소를 들 수 있다 [3, 10, 34]. 이 연구에서 milrinone을 제외한 모든 PDE 억제제들의 혈관 이완효과가 전압의존성 Ca^{2+} 통로 억제제 및 세포의 Ca^{2+} 제거에 의하여 억제되었다. 그리고 PDE 억제제가 Ca^{2+} 조절 계에 직접적 또는 간접적인 영향인지는 밝히지 못했으나 직접적으로 Ca^{2+} 통로 억제에 의한 세포내 Ca^{2+} 감소로 NOS가 비활성화 되면 CN 합성은 감소함으로 PDE 억제에 의해서 혈관 이완효과가 감소될 것으로 사료된다.

외인성 유기 질산 화합물 혈관 이완제 (nitrovasodilator, NVD)는 혈관 내피세포와 관련 없이 NO를 제공하여 GC를 활성화시킴으로써 혈관을 이완시키고, 내인성 호르몬 또는 신경전달 물질들은 혈관 내피세포에서 NO를 유리시켜 GC를 활성화시킴으로써 세포내 cGMP를 증가시키거나, 수용체 경유 AC 활성을 통한 cAMP 증가로 혈관을 이완시킨다 [3]. 특히 NVD 중 SNP는 오래전부터 쓰였던 강력한 혈관 이완제 [12]로 내인성 NO와 다른 기전에 의한 혈관 이완 반응을 보인다. NVD는 혈관 내피세포가 제거된 혈관과 고혈압 쥐의 혈관에서 정상 혈관에서보다 더 많은 혈관 이완효과를 나타내어 임상적으로 NVD의 사용을 고려해야 한다 [25, 29]고 보고된 바 있다. PDE V 억제제인 zaprinast는 NVD에 의한 혈관 이완에 영향을 미치지 않는다 [16]고 하였으나 이 연구에서는 NVD에 의한 이완효과가 milrinone을 제외한 모든 PDE 억제제들에 의하여 강화되어 cGMP는 물론 cAMP의 가수분해 억제로 인한 이를 2차 신호전달 물질의 증가에 의하여 혈관 이완효과가 강화됨을 추측할 수 있다. 또한 cGMP는 PKG 활성을 통하여 cAMP 증가로 혈관 이완에 관여 [15]하며, cAMP는 cGMP-선

택적 PDE 억제제와 같은 cGMP 증가 물질 (SNP 등)에 의해서 증가되고 [4], PDE IV 효과가 cGMP 증가 물질로 현저히 증가된다 [17]. 따라서 PDE 억제제의 혈관 이완작용에 있어서 상호 보완적인 관계가 있고, PDE 억제 상태에서 세포내 CN의 농도는 증가되고 이때 NO 제공은 세포내 CN 농도는 더 증가시켜 혈관 이완효과가 강화될 것이다. 그러나 milrinone은 다른 PDE 억제제와는 달리 SNP에 의한 이완효과를 강화시키지 않았다.

결론적으로 PDE III 억제제인 milrinone을 제외한 모든 PDE 억제제에 의한 혈관 이완효과는 혈관 내피세포에 의존적 또는 비의존적이며 Ca^{2+} 과 관련되며, cAMP 및 cGMP의 증가 및 상호 작용에 의하여 일어날 수 있다. 그러나 PDE III 억제제인 milrinone에 의한 혈관이완은 다른 PDE 억제제들과 전혀 다른 기전에 의하여 일어나며 그 이완 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

혈관 평활근 이완은 내피세포에서 유리되는 NO에 의해 활성화되는 cGMP에 의하여 조절되는데 cGMP 증가 기전 중 하나인 PDE 억제에 의하여 혈관은 이완된다. 이 연구에서는 흰쥐 대동맥에서 각 type 별 PDE 억제제인 IBMX, W7, Ro 20-1724, milrinone 및 zaprinast의 혈관 이완 특성이 비교 검토하였다. 상기 모든 PDE 억제제들은 내피 존재 혈관에서 농도 의존적으로 이완시켰으며, milrinone를 제외한 모든 PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과는 NOS 억제제, GC 억제제, Ca^{2+} 통로 차단제 또는 영역액내 Ca^{2+} 제거에 의하여 억제되었다. 내피 제거 혈관에서 PDE 억제제들에 의한 혈관이완은 내피존재 혈관에 비하여 약하였지만 milrinone를 제외한 모든 PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과는 GC 억제제에 의하여 억제되었다. 단, 내피 제거 혈관에서 zaprinast에 의한 혈관 이완효과는 경미하거나 관찰되지 않았다. 내피세포 비의존적으로 혈관을 이완시키는 SNP에 의한 혈관 이완효과가 milrinone를 제외한 모든 PDE 억제제에 의하여 강화되었다.

이상의 결과에 의하면 IBMX, W7, Ro 20-1724 및 zaprinast의 혈관 이완은 공통적으로 내피 의존적 또는 비의존적이고 Ca^{2+} 조절과 관련되며, PDE는 흰쥐 대동맥 혈관 조직 (내피 및 평활근 세포)내에 다르게 분포하고, PDE 억제제들에 의한 혈관 이완효과는 cAMP- 및 cGMP-PDE 억제에 의한 cAMP 및 cGMP에 의하며, 다른 PDE 억제제들과는 달리 PDE III 억제제인 milrinone에 의한 혈관 이완작용은 내피세포 cyclic nucleotide system과 관련이 없고 상기와 같은 PDE 억제제들과는

전혀 다른 기전에 의하여 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995, **75**, 725-748.
- Beavo, J. A. and Reifsnyder, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 1990, **11**, 150-155.
- Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P. and Weiner, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000, **184**, 409-420.
- Delpy, E., Coste, H. and Gouville, A. C. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol.* 1996, **119**, 471-478.
- Gray, D. W. and Marshall, I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adre-noceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* 1992, **107**, 684-690.
- Harrison, S. A., Chang, M. L. and Beavo, J. A. Differential inhibition of cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes by cardiotonic drugs. *Circulation.* 1986, **73**(3 Pt 2), III109-116.
- Honerjager, P. Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. *Eur Heart J.* 1989, **10**(Suppl C), 25-31.
- Inada, H., Shindo, H., Tawata, M. and Onaya, T. Cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, stimulates nitric oxide production and sodium potassium adenosine triphosphatase activity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Life Sci.* 1999, **65**, 1413-1422.
- Ito, S., Suzuki, S. and Itoh, T. Effects of a water-soluble forskolin derivative (NKH477) and a membrane-permeable cyclic AMP analogue on noradrenaline-induced Ca^{2+} mobilization in smooth muscle of rabbit mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1993, **110**, 1117-1125.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J. and Sato, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 1997, **42**, 157-230.
- Komas, N., Lugnier, C. and Stoclet, J. C. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 1991, **104**, 495-503.
- Lincoln, T. M. Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983, **224**, 100-107.
- Lincoln, T. M. and Cornwell, T. L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 1993, **7**, 328-338.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P. and Cornwell, T. L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* 1994, **23**(6 Pt 2), 1141-1147.
- Lugnier, C., Keravis, T. and Eckly-Michel, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharmacol.* 1999, **50**, 639-652.
- Lugnier, C., Keravis, T., Le Bec, A., Pauvert, O., Proteau, S. and Rousseau, E. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta.* 1999, **1472**, 431-446.
- Lugnier, C. and Komas, N. Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J.* 1993, **14**(Suppl I), 141-148.
- Lugnier, C., Schoeffter, P., Le Bec, A., Strouthou, E. and Stoclet, J. C. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol.* 1986, **35**, 1743-1751.
- Martin, W., Furchtgott, R. F., Villani, G. M. and Jothianandan, D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986, **237**, 539-547.
- Medina, P., Segarra, G., Martinez-Leon, J. B., Vila, J. M., Aldasoro, M., Otero, E. and Lluch, S. Relaxation induced by cGMP phosphodiesterase inhibitors sildenafil and zaprinast in human vessels. *Ann Thorac Surg.* 2000, **70**, 1327-1331.
- Medina, P., Segarra, G., Vila, J. M., Domenech, C., Martinez-Leon, J. B. and Lluch, S. Effects of sildenafil on human penile blood vessels. *Urology.* 2000, **56**, 539-543.

22. Nakamura, T., Houchi, H., Minami, A., Sakamoto, S., Tsuchiya, K., Niwa, Y., Minakuchi, K. and Nakaya, Y. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2001, **69**, 1709-1715.
23. Nicholson, C. D., Challiss, R. A. and Shahid, M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991, **12**, 19-27.
24. Parson, W. J., Ramkumar, V. and Stiles, G. L. Isobutyl methylxanthine stimulates adenylylate-cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein Gi. *Mol. Pharmacol.* 1988, **34**, 37-41.
25. Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A. L., Zaragoza-Arnaez, F., Fajardo, S., Ibarra, M., Lopez-Lopez, J. G. and Tamargo, J. Vasodilator effects of sodium nitroprusside, levocromakalim and their combination in isolated rat. *Br. J. Pharmacol.* 1999, **128**, 1419-1426.
26. Polson, J. B. and Strada, S. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996, **36**, 403-427.
27. Prigent, A. E., Fougier, S., Nemoz, G., Anker, G., Pacheco, H., Lugnier, C., Lebec, A. and Stoclet, J. C. Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms from rat heart and bovine aorta. Separation and inhibition by selective reference phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 1988, **37**, 3671-3681.
28. Rapoport, R. M. Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ. Res.* 1986, **58**, 407-410.
29. Shirasaki, Y. and Su, C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur. J. Pharmacol.* 1985, **114**, 93-96.
30. Shiraishi, Y., Kambara, Y. and Itoh, T. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor, on histamine-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and force in middle cerebral artery of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1998, **123**, 869-878.
31. Silver, P. J. Biochemical aspects of inhibition of cardiovascular low (Km) cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. *Am. J. Cardiol.* 1989, **63**, 2A-8A.
32. Souness, J. E., Dioce, B. K., Martin, W. and Moodie, S. A. Pig aortic endothelial-cell cyclic nucleotide phosphodiesterases. Use of phosphodiesterase inhibitors to evaluate their roles in regulating cyclic nucleotide levels in intact cells. *Biochem. J.* 1990, **266**, 127-132.
33. Strosberg, A. D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* 1993, **2**, 1198-1209.
34. Taggart, M. J., Menice, C. B., Morgan, K. G. and Wray, S. Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca^{2+} , phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. *J. Physiol.* 1997, **499**, 485-496.
35. Taira, N. Inotropic agents: new positive inotropic agents and their mechanism of action. In: Rand, MJ, Raper, C. (EDs.), *Pharmacology*. pp. 477-480, Elsevier, Amsterdam. 1987.
36. Tejerina, T., Sesin, J., Delgado, C. and Tamargo, J. Effect of milrinone on contractility and $45Ca$ movements in the isolated rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1988, **148**, 239-246.
37. Tomkinson, A. and Raeburn, D. The effect of isoenzyme-selective PDE inhibitors on methacholine-induced contraction of guinea-pig and rat ileum. *Br. J. Pharmacol.* 1996, **118**, 2131-2139.
38. van der Zypp, A., Rechtman, M. and Majewski, H. The role of cyclic nucleotides and calcium in the relaxation produced by amrinone in rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 2000, **34**, 245-253.
39. Weishaar, R. E., Burrows, S. D., Kobylarz, D. C., Quade, M. M. and Evans, D. B. Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and in platelets. Isolation, characterization, and effects of various reference phosphodiesterase inhibitors and cardiotonic agents. *Biochem. Pharmacol.* 1986, **35**, 787-800.
40. Yu, S. M., Cheng, Z. J. and Kuo, S. C. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta by butein, a novel cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, **280**, 69-77.