

사람 및 흰쥐의 자궁근에서 Vanadate 에 의한 수축에 미치는 외부 Calcium 및 Na-pump 억제의 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

정진섭 · 한복기 · 우재석 · 이상호

=Abstract=

Effects of External Ca^{2+} and the Inhibition of Na-pump on the Vanadate-induced Contraction in the Isolated Human and Rat Uterine Smooth Muscle

Jin Sub Jung, Bok Ki Han, Jae Suk Woo and Sang Ho Lee

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University

The effects of external Ca^{2+} and the inhibition of Na-pump on vanadate-induced contraction in isolated human and rat uterine smooth muscle were studied and the following results were observed.

1) Vanadate induced contraction in rat uterine muscle and showed maximal contraction at concentration of $5 \times 10^{-4}M$, and the contractile response to vanadate was more sensitive in human than rat uterine muscle.

2) Vanadate-induced contraction was not completely inhibited by Ca^{2+} removal from PSS and the response to Ca^{2+} removal was more sensitive in human than rat uterine muscle.

3) Vanadate-induced contraction decreased with increasing concentration of verapamil, but even in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil which inhibited 100 K-induced contraction completely, about 40% of maximal contraction remained, and its amplitude was similar to that of contraction in Ca^{2+} -free solution.

4) Vanadate-induced contraction was increased by the inhibition of Na-pump and this increase also could be observed in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil.

5) After pretreatment with Ca^{2+} -free PSS containing ouabain vanadate-induced contraction was not increased, but the contractile response of these tissues to the addition of external Ca^{2+} was remarkably increased in the presence of vanadate.

6) $3 \times 10^{-5}M$ verapamil inhibited vanadate-induced Ca^{45} influx completely, but after pretreatment with ouabain vanadate could induce remarkable Ca^{45} influx even in the presence of verapamil.

7) With increasing the time of pretreatment with ouabain or K^+ -free solution, the degree of increase in contraction by vanadate was more remarkable.

8) $10^{-4}M$ papaverine showed a considerable inhibition of the increase in the vanadate-induced contraction by pretreatment with ouabain.

9) Acetylcholine-induced contraction increased with lengthening the duration of Na-pump inhibition even in the presence of verapamil.

Considering above results it seems that the uterine muscle of human is more sensitive to

vanadate than that of rat, and both internal and external Ca^{2+} is utilized in vanadate-induced contraction. In the case of Na-pump inhibition several smooth muscle contracting agents seems to induce Ca^{2+} influx which is not inhibited by verapamil. This Ca^{2+} influx seems to be inhibited by papaverine and to be associated with membrane potential, although its precise characteristics is not certain.

서 론

1977년 Cantley 등⁹⁾에 의해 포유류의 생체 내에 존재하는 필수 미량 원소^{16,33)}인 vanadium의 oxyanion 유도체인 vanadate가 Na-K-ATPase의 강력한 억제 물질이라는 것이 밝혀진 후 vanadate의 작용에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다^{8,11~13,34)}. 초기에 Na-K-ATPase의 특이적 억제 물질일 것으로 생각되었던⁸⁾ vanadate는 Ca^{2+} -ATPase^{28,40)}, glucose-6-phosphatase³⁵⁾, adenylate cyclase³²⁾등 많은 다른 효소들의 활성에 영향을 미치고 vanadate의 여러가지 작용중 일부는 Na-pump의 억제와 다른 기전을 통하여 일어나는 것으로 밝혀졌다^{11,13,17,37)}. Vanadate가 심장근^{15,36)}과 평활근^{17,29,38)}의 수축을 일으키는 많은 연구자들에 의해 보고되었고 또한 이 수축 작용은 Na-pump 억제와 무관하고 Ca^{2+} -ATPase의 억제와 관계가 있을 것으로 생각되었고¹⁷⁾, Na-Ca exchange에 대한 영향도 있는 것¹³⁾으로 보고되어 평활근의 수축 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.

Na-K-ATPase의 특이적 억제 물질로 알려진 ouabain이 자궁근에서 저농도에서는 acetylcholine에 의한 수축을 증가시키나²⁶⁾ 고농도에서는 여러 가지 약물의 평활근에 대한 수축 작용을 억제시키는 것이 알려져 있다^{10,22)}. 그리고 Karaki 등¹⁹⁾은 혈관 평활근에서 norepinephrine에 의한 수축은 고농도의 ouabain에 의해서도 증가되는데 이것이 Na-pump 억제시 신경말단에서 신경 전달 물질의 유리가 증가되거나, ouabain의 평활근에 대한 직접 작용에 의한 것이지 Na-K-ATPase 억제에 기인된 것은 아니라고 하였다. 이등²⁰⁾은 고농도의 ouabain이 vanadate의 수축에 영향을 미치지 못하거나 오히려 증가시킨다고 하였으며 Ozaki와 Urakawa³⁰⁾는 혈관 평활근에서 vanadate에 의한 수축이 norepinephrine에 의한 수축과 유사함을 보고하였다.

또한 일반적으로 평활근에서 vanadate에 의한 수축은 세포 외부의 Ca^{2+} 의 유입과 세포 내부의 Ca^{2+} 의 동원에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으나^{20,27,30)} 가토 대동맥에서는 전적으로 외부 Ca^{2+} 에 의존하는 것으

로 보고되었다¹³⁾.

따라서 저자들은 쥐와 사람의 자궁 평활근에서 vanadate의 수축에 이용되는 Ca^{2+} 의 동원 경로를 밝히고 Na-pump 억제가 vanadate의 수축에 어떻게 영향을 미치는지를 밝히고자 이 실험을 시행하였다.

실험재료 및 방법

1) 실험재료

임상 진단상 자궁 근종으로 진단되어 자궁 전적출술을 행한 환자의 자궁 근육중 정상으로 보이는 조직을 배내어 너비 1 mm, 길이 7 mm의 중주근 절편을 만들어 사용하였다. 또한 쥐의 자궁 중주근 절편은 발정기에 있는 흰 쥐(200~300g)에서 위와 같은 방법으로 얻었다.

2) 수축력의 기록

실험에 사용한 용액은 NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, glucose 5.5 mM, Tris 24 mM이며 진한 HCl로 37°C에서 pH를 7.4로 맞추고 100% 산소로 포화시켰다. Ca^{2+} 없는 용액은 생리적 식염수에서 Ca^{2+} 을 제거한 후 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)를 가하여 만들었고 K^+ 없는 용액은 KCl을 뺀 생리적 식염수를 이용하였다. 평활근 절편을 실험 용기(20 ml)에 옮겨 한 끝을 근육 고정기에 연결하고 다른 끝은 근 수축 변환기(Narco, F-60)에 연결하여 기록기(Narco, MK-IV)로 등장성 수축(isometric contraction)을 기록할 수 있도록 한 다음 37°C에서 100%산소를 공급하고 원래의 길이로 1시간 평형시킨 후 0.1 g의 장력을 부하시켜 다시 1시간 동안 평형시켜 실험을 시작하였다.

3) Ca^{45} influx 측정

생리적 식염수에서 평형시킨 후 조직을 $5 \times 10^{-5}M$ ouabain이 들어 있는 생리적 식염수로 옮겨고 일정한 시간 후 $5 \times 10^{-6}M$ vanadate를 가하여 5분간 처리한 후 $10^6 c.p.m./ml$ 의 Ca^{45} 를 포함하고 위와 조성이 같은 생리적식염수로 옮겨 3분간 두었다. 이렇게 처리한 다

—정진섭 외 3인 : 사람 및 흰쥐의 자궁근에서 Vanadate에 의한 수축에 미치는 외부 Calcium 및 Na-pump 억제제의 영향—

음 조직을 꺼내어 45분간 Ca^{2+} 이 없고 2 mM EGTA를 포함한 냉한 생리적 식염수에 넣어 세포 외부의 Ca^{45} 를 제거한 후 조직의 불기를 제거하고 무게를 달았다. 조직을 5 mM EDTA 용액 3 ml에 넣고 12시간 이상 처치한 후 여기에 7 ml의 scintillation cocktail (Aquasol-2, New England Nuclear)을 넣고 Ca^{45} 의 양을 liquid scintillation counter(Tricarb 300)로 측정하였다. Blank와 medium을 같이 측정하여 medium의 Ca^{45} 양을 이용하여 조직 내 Ca^{45} 함량을 $\mu\text{mole } Ca^{45}/\text{kg tissue}$ 로 나타내었다.

4) 조직내 전해질 농도의 측정

세포 내부의 ion 농도 측정은 James와 Roufogalis의 방법¹⁸⁾으로 하였다. 조직을 평형시킨 후 적절한 실험 조건에 노출시키고 incubation이 끝난 후 조직을 제거하여 불기를 제거하고 무게를 달 후 냉각한 160 mM Tris-HCl과 10 mM $LaCl_3$ 에 50분간 둔 후 조직을 꺼내어 110°C에서 3시간동안 건조시킨 후 진한 질산에 조직을 녹여 flame photometer(Beckman Klinea Flame)로 조직 내 Na^+ 과 K^+ 의 함량을 측정하였다.

실험에 사용한 특수한 시약은 아래와 같다.
Sodium orthovanadate(Fisher Scientific Co)

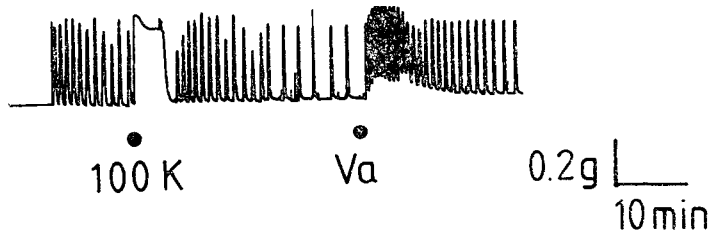
Ouabain octahydrate(sigma)
Verapamil(Knoll Pharmaceutical)
 Ca^{45} (New England Nuclear)
Papaverine(sigma)
Acetylcholine(sigma)

실 험 성 적

1) 흰쥐와 사람 자궁근에서 vanadate에 의한 수축

흰쥐의 자궁근에서 vanadate는 농도에 따라 수축을 유발하였으며 $5 \times 10^{-4}M$ 에서 최대 수축을 보였다(Fig. 1A, 2). 흰 쥐에서는 vanadate 투여후 30초에 수축을 일으켰고 위상성 수축이 증가하여 대략 2~3분 후 최고 수축에 도달하여 그 크기는 100 K 용액에 의한 수축의 $33.34 \pm 2.50\%$ 이었다(Fig. 1A). 사람의 자궁근에서 $5 \times 10^{-4}M$ vanadate는 위상성 수축의 증가를 일으키지 않고 오히려 감소시켰으며 쥐의 자궁근에서 보다 빨리 최대에 도달하는 긴장성 수축을 유발시켰으며(1분 이내) 그 크기는 100 K 용액에 의한 수축의 약 70% 정도이었다(Fig. 1B). 결과는 나타나지 않았지만 vanadate에 의한 수축은 $10^{-6}M$ atropine, $10^{-6}g/ml$ indomethacin 전처치에 의해 영향을 받지 않았다.

A



B

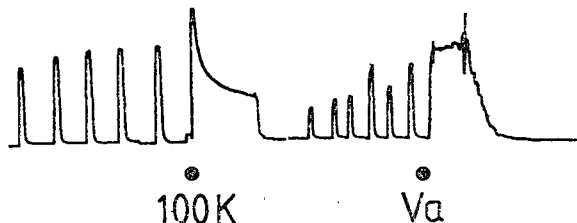


Fig. 1. The contractile response of rat(A) and human(B) uterus to $5 \times 10^{-4}M$ vanadate.

2) 외부 Ca²⁺의 영향

Fig. 3과 4는 vanadate의 수축에 미치는 외부 Ca²⁺의 영향을 보인 것이다. 흰 쥐에서 Ca²⁺이 없고 0.1 mM EGTA를 포함한 용액으로 10분간 전처리 후에도 vanadate는 최대 수축의 40%에 달하는 수축을 유발시켰으

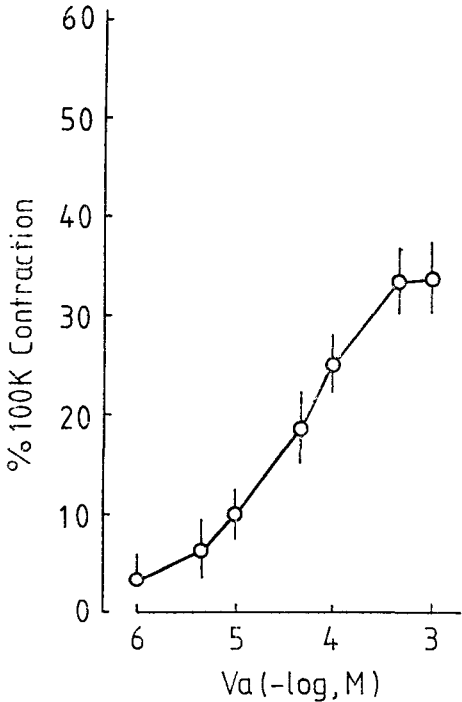


Fig. 2. Concentration-response curves for the contractile effect of vanadate on the longitudinal muscle of rat uterus. Contractions are expressed as a percentage of the response to 100 K solution (Mean \pm S.E.M., n=5).

며 그 후 부가하는 Ca²⁺농도에 따라 증가하여 1.8 mM Ca²⁺에서 최대에 도달하고 그 이후는 더 이상 증가되지 않았다(Fig. 3). 사람의 자궁근에서 vanadate에 의한 수축은 흰 쥐의 자궁근에 비해 외부 Ca²⁺의 영향을 더 크게 받는 것을 볼 수 있고 부가적으로 Ca²⁺을 가하면 수축의 증가가 현저히 나타났다(Fig. 4).

3) Verapamil의 영향

Ca²⁺길항제인 verapamil은 농도가 증가함에 따라 100

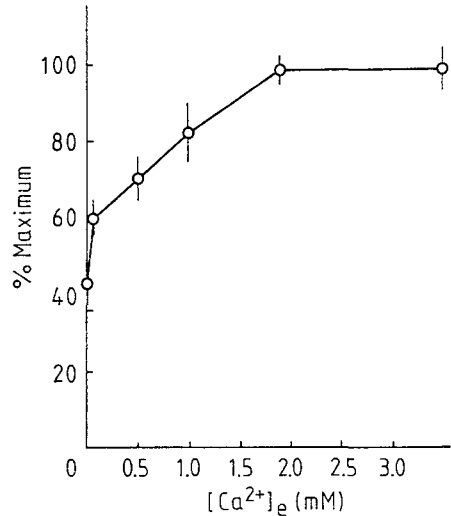


Fig. 3. Effect of external Ca²⁺ on the contractile response of rat uterus to 5 \times 10⁻⁴M vanadate. The results are expressed as a percentage of the response to 5 \times 10⁻⁴M vanadate in the response of 1.8 mM Ca²⁺ (Mean \pm S.E.M., n=4).

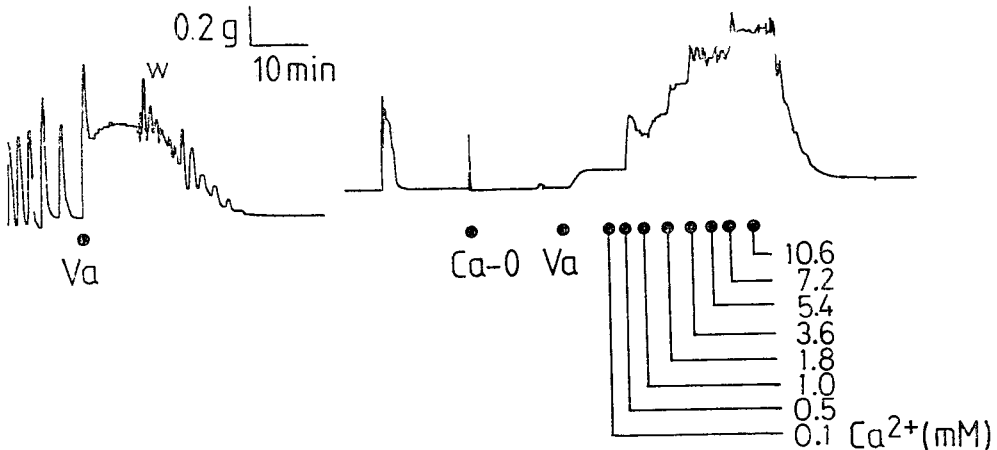


Fig. 4. Contractile response of human uterus to the cumulative addition of external Ca²⁺ in the presence of 5 \times 10⁻⁴M vanadate.

—정진섭 외 3인 : 사람 및 흰쥐의 자궁근에서 Vanadate에 의한 수축에 미치는 외부 Calcium 및 Na-Pump 억제제의 영향—

K 용액에 의한 수축을 억제시켰고 $3 \times 10^{-5} M$ 에서 완전히 억제되었다. Vanadate에 의한 수축 역시 verapamil에 의해 억제되었으나 $3 \times 10^{-5} M$ verapamil 존재 하에서도 상당한 크기의 수축이 남아 있음을 볼 수 있고 그 크기는 Ca^{2+} 없는 용액에서 나타나는 vanadate 수축의 크기와 유사하였다(Fig. 5). 결과는 나타내지

않았지만 외부 Ca^{2+} 의 영향을 본 실험과 마찬가지로 사람의 자궁근은 흰 쥐에 비하여 verapamil에 더 민감한 반응을 보였고, $3 \times 10^{-5} M$ verapamil 존재시 나타나는 vanadate에 의한 수축의 크기도 Ca^{2+} 없는 용액에서의 수축 크기와 유사하였다.

4) Na-pump 억제제의 효과

Fig. 6, 7 및 8은 vanadate에 의한 수축에 대한 K 없는 용액과 ouabain의 영향을 본 것이다. Ouabain 농도는 사람의 자궁근을 이용한 실험에서는 $5 \times 10^{-5} M$ 을 사용하였고 흰쥐는 ouabain에 덜 민감한 것으로 알려져 있기 때문에²⁾ $10^{-8} M$ 을 사용하였다. 흰쥐에서 ouabain 및 K^+ 없는 용액으로 전처리시 vanadate에 의한 수축이 현저히 증가하였고(Fig. 6), $3 \times 10^{-5} M$ verapamil 존재하에서도 흰 쥐의 자궁근에서 K 없는 용액과 ouabain 전처리시 대조군보다 현저한 수축의 증가 현상이 나타났으며 ouabain 전처리시 더욱 큰 증가가 있었고 또한 K^+ 없는 용액으로 전처리에 의하여 증가된 수축은 2 mM K^+ 부여에 의해 완전히 이완되었다(Fig. 7). 사람의 자궁근에서도 ouabain 전처리시 vanadate에 의한 수축력이 verapamil 존재하에서 현저히 증가되었다(Fig. 8). 이러한 수축의 증가가 내부 Ca^{2+} 동원의 증가에 의한 것인지 세포 외부에서 Ca^{2+} 유입에 의한 것인지를 밝히기 위하여 다음 실험을 하였다.

Verapamil 존재 하에서 Ca^{2+} 없는 용액에 vanadate

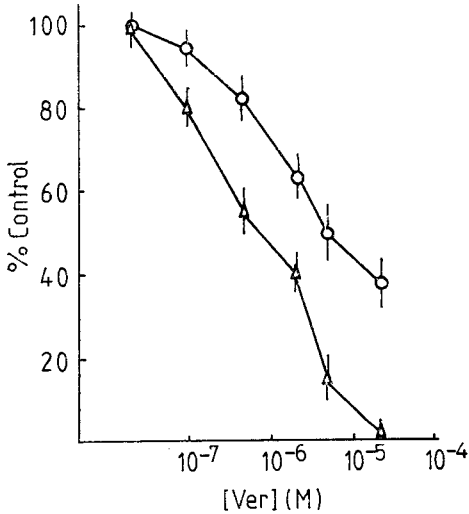


Fig. 5. Effect of verapamil on the contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-4} M$ vanadate(O) and 100K solution(Δ). The results are expressed as a percentage of the initial response to vanadate and 100K solution(Mean \pm S.E.M., n=5).

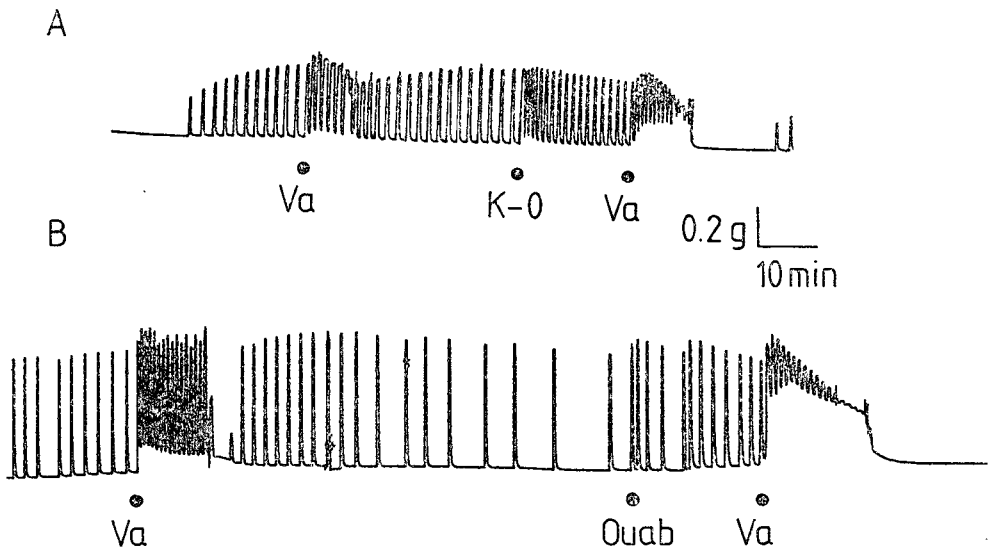


Fig. 6. Contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-4} M$ vanadate in K-free solution(A) or PSS containing $10^{-8} M$ ouabain(B).

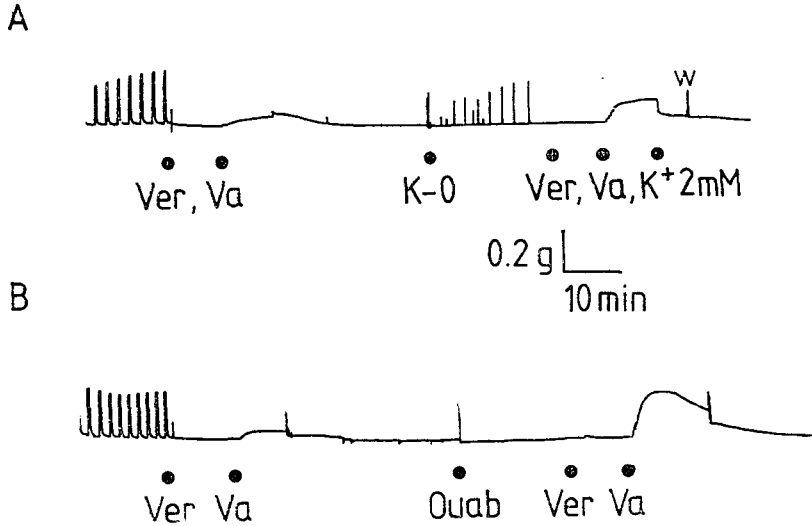


Fig. 7. Contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-4}M$ vanadate in K^+ -free solution(A) or PSS containing $10^{-9}M$ ouabain(B) in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil.

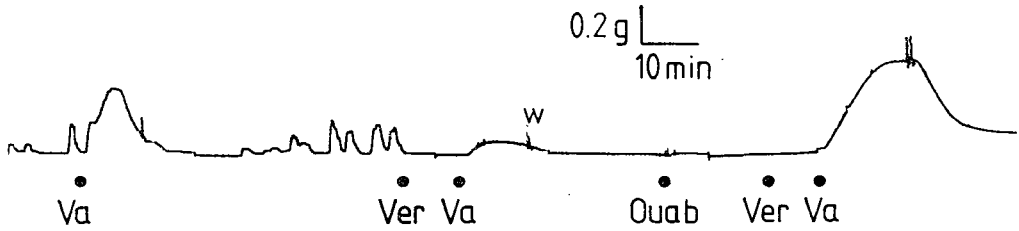


Fig. 8. Contractile response of human uterine smooth muscle to $5 \times 10^{-4}M$ vanadate after the pretreatment of $5 \times 10^{-9}M$ ouabain in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil.

Table 1. Effect of the Pretreatment with Ouabain on Vanadate-Induced Ca^{45} Influx in the Presence of $3 \times 10^{-5}M$ Verapamil in Human Uterus

	0 min	30 min	ΔCa^{45} influx
Control	103.04 ± 4.40	$144.87^+ \pm 13.30$	$41.83^+ \pm 19.04$
Vanadate	104.46 ± 13.71	$193.34^{**} \pm 26.59$	$88.88^* \pm 15.08$
ΔCa^{45} influx	1.42 ± 5.83	$48.47^+ \pm 13.49$	

, n=4

+, Significantly different from zero time($p < 0.05$). *, Significantly different from control($p < 0.05$).

를 가하면 수축이 일어났고 여기에 Ca^{2+} 을 가하여도 수축의 증가는 나타나지 않았다. Ouabain 전처리 후 Ca^{2+} 없고 verapamil 을 포함한 용액에서는 vanadate 를 가하여도 대조군과 거의 같은 수축을 유발하거나 감소하였고 여기에 외부 Ca^{2+} 을 농도별로 부가하면 대조군과는 달리 Ca^{2+} 농도에 따라 현저한 수축의 증가가 나타났다(Fig. 9). Vanadate 를 가하지 않고 단순히 ouabain 만 전처리한 경우에도 Ca^{2+} 을 가하면 대조군

과 달리 수축의 증가가 나타났다. 그러나 그 크기는 vanadate 존재시보다 그 증가 정도는 유의있게 적었다 ($p < 0.05$)(Fig. 10).

5) 사람의 자궁근에서 Ca^{45} influx 에 미치는 vanadate 의 효과

Table 1은 사람의 자궁근에서 vanadate 에 의한 Ca^{45} 유입에 미치는 verapamil 과 ouabain 의 효과를 본 것

—정진섭 외 3인 : 사람 및 흰쥐의 자궁근에서 Vanadate에 의한 수축에 미치는 외부 Calcium 및 Na-Pump 억제제의 영향—

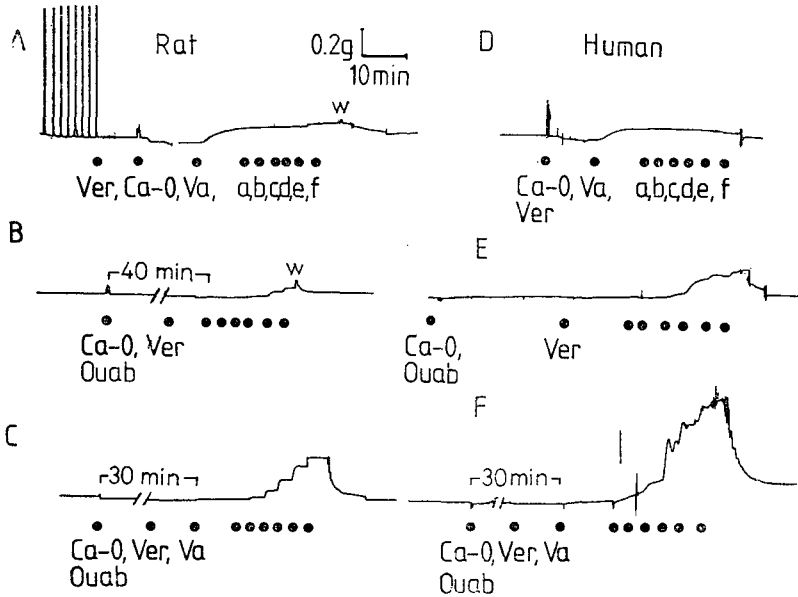


Fig. 9. Effect of ouabain on the contractile response of rat(A-C) and human(D-F) uterus to the cumulative addition of external Ca^{2+} in the presence of $5 \times 10^{-4}\text{M}$ vanadate and $3 \times 10^{-5}\text{M}$ verapamil. a,b,c,d,e, and f represent 0.1, 0.5, 1.0, 1.8, 3.6 and 5.4 mM Ca^{2+} respectively.

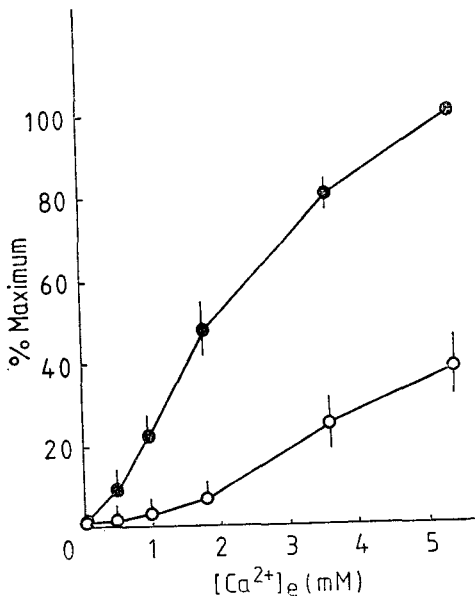


Fig. 10. Contractile response of rat uterus to the cumulative addition of external Ca^{2+} in the absence(○) or presence(●) of $5 \times 10^{-4}\text{M}$ vanadate after the pretreatment with 10^{-3}M ouabain for 30 min. The results are expressed as a percentage of the response to 5.4 mM Ca^{2+} in the presence of vanadate. (Mean \pm S.E.M., $n=5$).

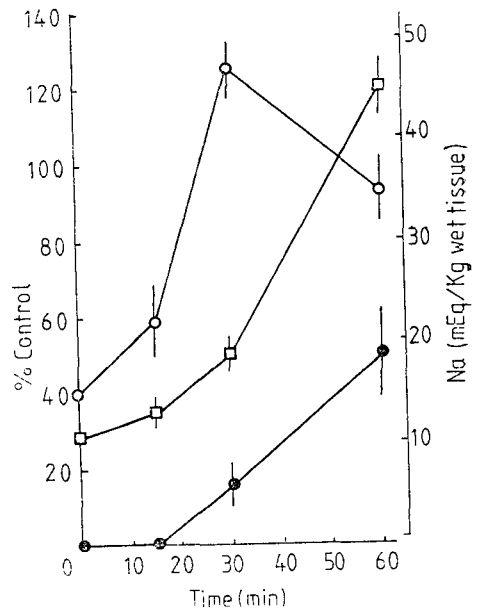


Fig. 11. Effect of exposure time to $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ouabain on the contraction induced by $5 \times 10^{-4}\text{M}$ vanadate(○), basal tone(●) and intracellular Na^{+} content(□) in the presence of $3 \times 10^{-5}\text{M}$ verapamil in human uterus. The results are expressed as a percentage of the initial response to $5 \times 10^{-4}\text{M}$ vanadate in the absence of verapamil. (Mean \pm S.E.M., $n=5$).

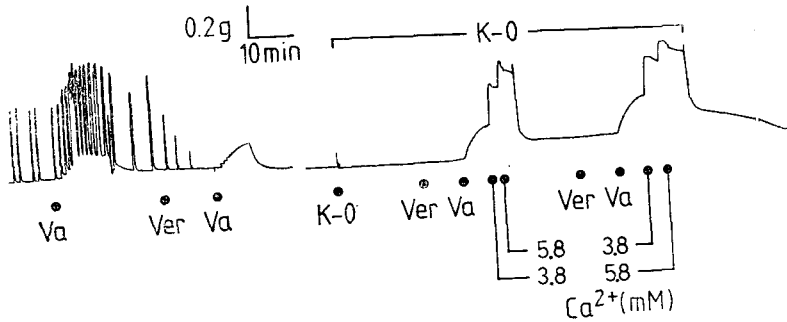


Fig. 12. Effect of the exposure time to K-free PSS on the contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-4}M$ vanadate in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil.

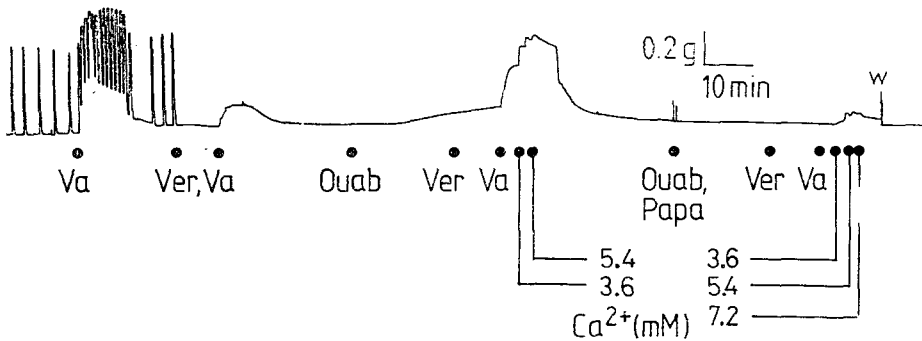


Fig. 13. Effect of $10^{-4}M$ papaverine on the contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-4}M$ vanadate enhanced by the pretreatment with $10^{-5}M$ ouabain.

이다. 대조군에서 verapamil 존재하에서 30분간 $5 \times 10^{-5}M$ ouabain 으로 처리한 후에 Ca^{45} 의 influx가 현저히 증가하였다. Vanadate는 ouabain으로 처리하지 않았을 때의 Ca^{45} influx를 verapamil 존재시 증가시키지 못하였으나 ouabain 전처리후에는 현저히 증가시켜 그 증가정도는 ouabain 단독처리 군에 비해 유의있게 컸다($p < 0.05$)(Table 1).

6) Ouabain 및 K 없는 용액 처리 시간에 따른 vanadate의 수축효과

Fig. 11과 12는 ouabain 전처리에 의한 vanadate의 수축증가가 세포내부의 Na^+ 의 축적과 관계가 있는지를 알기 위하여 ouabain 및 K^+ 없는 용액에서의 처리 시간에 따라 vanadate의 수축정도를 본 것이다. 사람의 자궁근에서 ouabain의 처리 시간이 길어짐에 따라 세포내부의 Na^+ 의 축적은 현저히 증가하였으며 기초장력도 현저히 증가하였고 vanadate에 의한 수축은 30분까지 증가하였으며 60분에는 오히려 약간 감소되었다(Fig. 11). 결과는 나타내지 않았으나 흰쥐의 자

궁근에서도 ouabain 처리시 유사한 양상이 나타났다. 흰쥐의 자궁근은 K^+ 없는 용액에서도 처리 시간이 증가함에 따라 그 수축력이 증가되는 양상을 보였다(Fig. 12).

7) Na pump 억제에 의한 vanadate 수축의 증가에 미치는 papaverine의 영향

Ouabain 전처리에 의해 증가된 vanadate의 수축은 $4 \times 10^{-5}M$ papaverine에 의해 현저히 억제되었고 Ca^{2+} 을 가했을 때 나타나는 수축의 증가와 ouabain 처리 시간 증가에 따라 나타나는 기초장력의 증가도 papaverine에 의해 감소되었다(Fig. 13).

8) Acetylcholine에 의한 자궁근 수축에 미치는 Na pump 억제에 의한 영향

Na pump 억제에 의한 vanadate의 수축력의 증가가 vanadate에만 나타나는 특이적인 작용인지를 알기 위하여 흰쥐의 자궁근에서 verapamil 존재하에서 $5 \times 10^{-5}M$ acetylcholine에 의한 수축에 미치는 ouabain

및 K없는 용액의 효과를 관찰하였다. Acetylcholine에 의한 수축은 $3 \times 10^{-5}M$ verapamil에 의해 현저히 억제되어 대조군의 약 6%정도이었고 verapamil 존재하에서 acetylcholine에 의한 수축은 vanadate에 의한 수축처럼 K⁺없는 용액이나 ouabain에 의한 처리 시간이 길어짐에 따라 크게 증가하는 양상을 나타내었으며 ouabain으로 처리시 그 증가정도가 더 컸다(Fig.

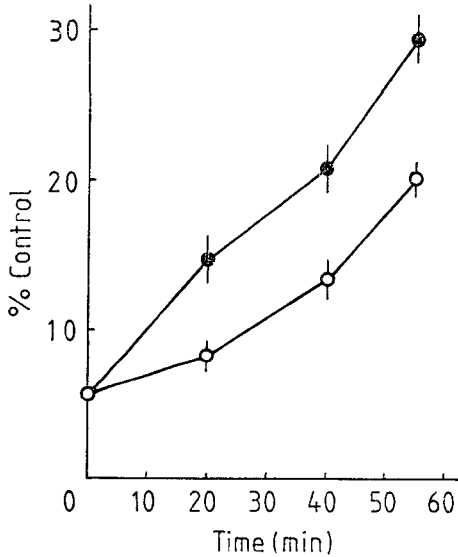


Fig. 14. Effect of exposure time to K-free solution (○) or $10^{-3}M$ ouabain (●) on the contraction of rat uterus induced by $5 \times 10^{-5}M$ acetylcholine in the presence of $5 \times 10^{-5}M$ verapamil. The results are expressed as a percentage of the initial response to $5 \times 10^{-5}M$ acetylcholine in the absence of verapamil (mean \pm S.E.M., n=4).

14). 그리고 여기에 $2mM$ Ca^{2+} 를 부가적으로 가할 때 나타나는 수축의 크기도 현저히 증가하였다(Fig. 15).

고 찰

Vanadate에 의한 수축력은 조직에 따라 다른 것으로 알려져 있어 혈관의 경우 동맥에서 보다 정맥에서 더 강한 수축을 일으키고¹³⁾ 혈관 평활근보다 장관평활근에 대한 수축력이 큰 것으로 보고되어 있다¹⁷⁾. 종간에는 비교된 바가 없으나 본 실험에서 vanadate는 흰쥐의 자궁근에 비해 사람의 자궁근에서 보다 강력한 수축을 일으켰으며 최대 수축 농도는 $5 \times 10^{-4}M$ 로 유사하였다(Fig. 1, 2). 장관 평활근에서 보고된 것처럼²⁰⁾ vanadate에 의한 수축은 atropine과 indomethacin에 의해 영향을 받지않아 평활근에 대한 직접 작용에 의해 수축이 일어남을 시사한다. 또한 평활근에서 vanadate에 의한 수축에 이용되는 Ca^{2+} 은 저자에 따라 그 동원 경로가 다른 것으로 보고되어 내부와 외부 Ca^{2+} 이 모두 관여한다는 보고도 있으나^{20, 30)} Fox등¹³⁾은 가토 대동맥에서는 외부 Ca^{2+} 에 전적으로 의존하는 것으로 보고하였다¹³⁾. 본 실험에서 사람의 자궁근에서 vanadate에 의한 수축이 외부 Ca^{2+} 의 제거와 verapamil에 더욱더 민감한 반응을 보였고 외부 Ca^{2+} 의 부가에 대해서도 훨씬 민감한 반응을 보여 흰쥐의 자궁근에 비하여 주로 외부 Ca^{2+} 유입에 의해 수축이 일어나는 것으로 보이며 그 정도는 적으나 Ca^{2+} 이 없고 $0.1mM$ EGTA를 포함한 용액으로 10분 처리한 후에도 그 수축이 지속되어 내부 Ca^{2+} 도 일부 이용하는 것으로 생각된다(Fig. 3, 4).

Fox 등¹³⁾은 가토 대동맥에서 vanadate가 일부 Na-Ca 교환 기전에 영향을 주어 수축을 일으킨다고 하였고 만약 이것이 사실이라면 Na-Ca 교환 기전에 의한

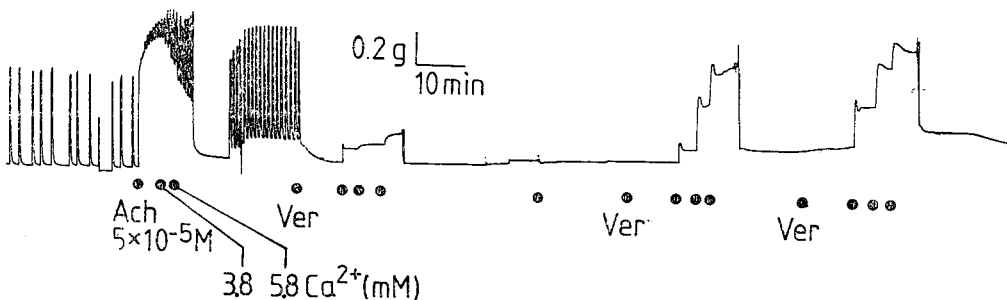


Fig. 15. Effect of the exposure time to K-free PSS on the contractile response of rat uterus to $5 \times 10^{-5}M$ acetylcholine in the presence of $3 \times 10^{-5}M$ verapamil.

Ca²⁺의 이동은 Ca channel 봉쇄 약물에 의해 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있기 때문에⁵⁾ verapamil 존재시의 수축의 크기가 Ca²⁺없는 용액에서의 수축 크기보다 커야 한다. 그러나 본 실험에서 Ca²⁺없는 용액에서의 수축과 verapamil 존재시의 수축의 크기가 동일하고 verapamil 존재시 vanadate가 Ca⁴⁵의 유입을 증가시키지 못하므로(Fig. 5) vanadate에 의한 Ca²⁺의 유입은 주로 막 전위에 민감한 Ca channel을 이용하여 일어나는 것으로 생각된다. 또한 중간에 외부 Ca²⁺에 대한 반응이 다른 것은 vanadate에 의한 막 전위의 탈분극 정도가 다르기 때문으로 생각된다. Mironneau 등²³⁾은 흰 쥐의 자궁근에서 Ca²⁺없는 용액에 5×10⁻⁴M vanadate를 가하면 3 mV 정도의 매우 적은 탈분극이 나타난다고 하였다. 이와같은 사실은 흰 쥐의 자궁근에서 vanadate에 의한 수축이 세포의 내부 Ca²⁺에 크게 의존하지 않는 것과 유관한 것 같다.

Na pump의 억제제 여러 가지 약물에 의한 평활근의 수축에 미치는 영향에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 아니하였다. Casteels¹⁰⁾과 Matthews와 Sutter²²⁾는 guinea pig의 결장뉴에서 ouabain이 전기 자극 및 histamine과 acetylcholine에 의한 수축력을 감소시킨다고 하였고 Matthews와 Sutter²²⁾는 가토의 전장간막정맥에서 ouabain이 norepinephrine과 5-hydroxytryptamine에 의한 수축에 영향을 미치지 못한다고 하였다. 그리고 Karaki 등¹⁹⁾은 ouabain이 가토 및 guinea pig 대동맥에서 norepinephrine에 의한 수축이 ouabain에 의해 증가되고 쥐의 대동맥에서는 이 효과를 관찰할 수 없다고 하였다. Broekaert와 Godfraind⁷⁾는 저농도의 ouabain이 가토와 guinea pig의 대동맥의 NE에 대한 반응을 증가시키나 고농도에서는 오히려 억제시킨다고 하였다. 따라서 고농도의 ouabain에 의한 수축력의 증가는 주로 혈관 평활근에서 관찰되었고 장관 평활근 및 자궁 평활근에서는 관찰된 바가 없으며 그 기전도 명확히 밝혀져 있지 않다.

Karaki 등¹⁹⁾은 ouabain은 가토 대동맥의 NE에 의한 수축은 증가시키나 외부 K⁺농도의 감소는 NE에 의한 수축을 증가시키지 못하므로 ouabain에 의한 수축력의 증가가 Na-K-ATPase활성의 억제때문은 아니며 ouabain의 직접 작용 때문에 일어난다고 하였다. 최근 본 실험실에서 이등²¹⁾은 흰 쥐 자궁근에서 vanadate에 의한 수축이 ouabain 전처치에 의해 증가됨을 관찰하였고 본 실험에서도 사람 및 흰 쥐의 자궁근에서 3×10⁻⁵M verapamil 존재 하에서도 K⁺없는 용액과 ouabain 전처치에 의해 vanadate에 의한 수축이

현저히 증가하였다(Fig. 6, 7, 8). 이러한 수축의 증가는 적어도 다음 3가지 가능성에 의해 나타나는 것으로 생각해 볼 수 있다.

첫째, Na pump가 억제된 조직에서 vanadate가 정상 조직에서 작용하지 않았던 어떤 경로를 통하여 Ca²⁺의 유입을 더욱더 증가시킬 수 있는 가능성이다.

둘째, Reuter와 Seitz³¹⁾에 의해 심장근에서 처음 보고된 Na-Ca 교환 기전은 그 뒤 거대오징어의 축색²⁵⁾이나 평활근^{4, 5)}에도 존재하는 것으로 시사되었고 세포 내부 Ca²⁺을 낮은 농도로 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 주장되었다. 그리고 배 등⁸⁾은 사람 자궁근에서 Grover 등¹⁴⁾은 흰 쥐의 자궁근에 Na-Ca 교환 기전이 존재함을 보고하였다. 따라서 Na-pump 억제시 내부 Na⁺의 증가가 초래되고 Na⁺의 농도 경사가 감소함으로써 내부 Ca²⁺이 vanadate에 의한 수축에 더 많이 이용될 수 있는 가능성이 있다.

마지막으로 Na-pump 억제시 Na⁺경사도가 감소하면 배 등⁸⁾이 사람의 자궁근에서 관찰한 것처럼 Na-Ca 교환 기전에 의한 Na-Ca 유출율이 감소하여 수축의 증가가 올 수도 있다.

본 실험에서 verapamil 존재 하에서 Na-pump 억제시 vanadate에 의한 수축력의 증가가 내부 Ca²⁺이 농도의 증가로부터 기인된 것이 아니라 주로 외부 Ca²⁺의 유입 증가에 의한 것이라는 것은 다음 사실로부터 알 수 있다.

첫째, verapamil이 존재하고 Ca²⁺없는 용액에서 ouabain으로 전처치를 한 후 vanadate를 가했을 때는 수축력의 증가가 나타나지 않았다(Fig. 9). 둘째, ouabain으로 전처치하지 않았을 때는 verapamil 존재시 외부에 Ca²⁺을 가하여도 수축의 증가가 없었으나 ouabain 전처치 후 외부에 Ca²⁺을 농도별로 증가하면 의의있는 수축의 증가가 나타났다(Fig. 9, 10). 셋째, Ca⁴⁵를 이용한 실험에서 vanadate에 의한 Ca⁴⁵의 유입은 verapamil에 의해 완전 억제되었으나 ouabain 전처치시 verapamil 존재하에서도 Ca⁴⁵의 상당한 유입이 나타났다(Table 1).

또한 이러한 Ca²⁺유입의 기전이 ouabain 그 자체의 작용이 아니고 Na-pump 억제에 의한 Na⁺의 축적과 직접 관련되어 있다는 것은 ouabain 전처치 시간이 증가함에 따라 수축이 더욱 증가하고(Fig. 10) K⁺없는 용액에 전처치 했을 때도 ouabain 전처치 시와 동일한 현상이 나타나고 2 mM K⁺투여시 vanadate에 의해 증가된 수축이 거의 완전히 이완된다는 것으로도 알 수 있다(Fig. 7).

Na-pump 억제시 vanadate에 의한 수축증가에 관여하는 Ca^{2+} 유입의 기전은 명확히 알 수 없으나 Ca^{2+} 없는 용액에서 ouabain 처리 후 Ca^{2+} 만 주어도 대조군과는 달리 수축의 증가가 나타나고(Fig. 9) vanadate 뿐만 아니라 자궁근에서 탈분극을 일으키는 것으로 알려진 acetylcholine에 의한 수축도 ouabain과 K^+ 없는 용액에서의 전처치에 의해 증가되므로(Fig. 14, 15) 이러한 Ca^{2+} 의 유입 경로가 특정 약물에 의해서만 유발되는 것은 아닌 것으로 생각된다.

요관에서 활동전압의 plateau phase에 일어나는 slow Ca/Na channel에 주로 작용하는 것으로 보고된⁶⁾ papaverine이 ouabain 전처치에 의한 기초장력의 증가와 vanadate에 의한 수축력의 증가를 현저히 억제시켰고(Fig. 13) 자궁근에서도 요관과 유사한 Ca channel이 존재하는 것으로 알려져 왔으나 이 경로는 D-600에 의해 억제되므로^{24, 33)} ouabain에 의한 수축의 증가를 이 기전과 연관시키기는 어려운 것으로 보인다. 또한 K^+ 없는 용액에서 전처치 후 K^+ 투여시 K^+ 없는 용액에 의해 증가된 vanadate에 의한 수축은 즉시 이완되었는데(Fig. 7) 이는 짧은 시간동안에 Na^+ 의 농도 경사가 정상으로 회복되었다고 보기는 어렵고 electrogenic Na-pump의 활성화에 의한 과분극에 기인된 것⁴¹⁾으로 생각된다.

따라서, Na-pump 억제시 여러 가지 약물에 대한 자궁근의 수축이 증가되는 것은 Aickin 등¹⁾에 의해 guinea-pig요관에서 시사된 것처럼 verapamil 존재하에서도 억제되지 않는 막전위에 민감한 Ca channel이나 내부 Na^+ 축적에 의해 변화된 기존 Ca channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입으로 생각해 볼 수 있으며 명확한 결론을 얻기 위해서는 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

Vanadate의 수축에 이용되는 Ca^{2+} 의 동원 경로와 Na-pump 억제가 vanadate의 수축에 어떤 영향을 미치는지를 밝히기 위해 본 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 흰쥐의 자궁근에서는 vanadate는 수축을 일으켜 $5 \times 10^{-4}M$ 에서 최대수축을 나타내었으며 사람의 자궁근이 흰쥐의 자궁근에 비해 vanadate에 더 민감한 반응을 보였다.

2) Vanadate에 의한 수축은 Ca^{2+} 제거에 의해 완전히 억제되지 않았고 사람의 자궁근이 외부 Ca^{2+} 의 농도변화에 더 민감한 반응을 보였다.

3) Vanadate에 의한 수축은 verapamil 농도를 증가시키기에 따라 억제되었으며 100 K에 의한 수축을 완전히 억제시키는 $3 \times 10^{-5}M$ verapamil 존재하에서도 최대수축의 40%정도가 남아있었고, 이 크기는 Ca^{2+} 없는 용액에서의 수축의 크기와 유사하였다.

4) Na-pump 억제시 vanadate의 수축은 증가하였고 이 현상은 $3 \times 10^{-5}M$ verapamil 존재하에서도 나타났다.

5) Ca^{2+} 없는 ouabain 용액에서 전처치후에 vanadate에 의한 수축은 증가하지 않았으나 외부내 Ca^{2+} 를 부가할 때 나타나는 반응은 대조군에 비해 현저히 증가하였다.

6) Verapamil 존재시 vanadate에 의한 Ca^{45} 유입은 완전히 억제되었으나 ouabain으로 처리한 후는 verapamil 존재하에서도 vanadate가 현저히 Ca^{45} 유입을 일으켰다.

7) Ouabain이나 K^+ 없는 용액으로 처리시간이 증가함에 따라 vanadate에 의한 수축의 증가정도는 더욱 더 현저하였다.

8) Ouabain 전처치시 증가된 vanadate에 의한 수축은 $10^{-4}M$ papaverine에 의해 현저히 억제되었다.

9) Acetylcholine에 의한 수축은 verapamil 존재하에서도 Na-pump 억제 시간이 증가함에 따라 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때 vanadate에 대해 사람의 자궁근이 흰쥐의 자궁근에 비해 더 민감한 반응을 보이고 vanadate에 의한 수축에는 외부와 내부 Ca^{2+} 이 모두 이용되며 Na-pump 억제시 여러 가지 근수축물질이 verapamil에 의해 억제되지 않는 Ca^{2+} 유입을 일으키며 이 유입경로의 성질은 확실히 알 수 없으나 papaverine에 의해 억제되며 막전위의 변화와 관련이 있는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Aickin, C.C., Brading, A.F. and Burdya, T.B.: Evidence for sodium-calcium exchange in the guinea-pig ureter. *J. Physiol.*, 347:411, 1984.
- 2) Allen, J.C. and Schwartz, A.: A possible biochemical explanation for the insensitivity of the rat to cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 168:42, 1960.
- 3) Bae, S.C., Kim, W.H. and Lee, S.H.: Effect of Na-free solution and ouabain on intracellularly.

- lar Ca content and Ca^{45} flux in human uterus. *J. Pusan Med. College*, 25(1), 1985, (in print).
- 4) Blautein, M.P.: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am. J. Physiol.*, 232:C165, 1977.
 - 5) Brading, A.F.: Calcium-induced increase in membrane permeability in the guinea-pig taenia coli: Evidence for involvement of a sodium-calcium exchange mechanism. *J. Physiol.*, 275: 65, 1978.
 - 6) Brading, A.F., Burdyga, V. and Scripnuyk, Z.D.: The effects of papaverine on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig ureter. *J. Physiol.*, 334:79, 1983.
 - 7) Broekaert, A. and Godfraind, T.: The actions of ouabain on isolated arteries. *Arch. Intern. Pharmacodyn.* 203:393, 1973.
 - 8) Cantley, L.C., Cantley, L.G. and Josephson, L.: A characterization of vanadate interactions with the $(Na^+ + K^+) - ATPase$. *J. Biol. Chem.*, 253:7351, 1978.
 - 9) Cantley, L.C., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C. and Guidotti, G.: Vanadate is a potent $(Na^+ + K^+) - ATPase$ inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.*, 252:7421, 1977.
 - 10) Casteels, R.: The action of ouabain on the smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli. *J. Physiol.*, 184:131, 1966.
 - 11) Churchill, P.C. and Churchill, M.C.: Vanadate inhibits renin secretion from rat kidney slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 213:144, 1980.
 - 12) Elvenspeck, G.: Vanadate-induced inhibition of sodium transport and of sodium-independent anion transport in turtle bladder. *Biochim. Biophys. Acta*, 601:427, 1980.
 - 13) Fox, A.A.L., Borchard, U. and Neumann, M.: Effects of vanadate on isolated vascular tissue: Biochemical and functional investigations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5:309, 1983.
 - 14) Grover, A.K., Kwan, C.Y., Rangachari, P.K. and Daniel, E.E.: Na-Ca exchange in a smooth muscle plasma membrane-enriched fraction. *Am. J. Physiol.*, 244:C158, 1983.
 - 15) Hackbarth, I., Schmitz, W., Scholz, H., Erdmann, E., Krawietz, W. and Philipp, G.: Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle. *Nature*, 275:67, 1978.
 - 16) Hopkins, L.L. Jr.: Essentiality and function of vanadium. In: Trace element metabolism in animals, vol. 2, edited by Holkstra, W.G., Suttie, J.W., Ganther, H.E. and Merty, W. p. 397, Univ. Park. Baltimore, 1974.
 - 17) Hudgins, P.M. and Bond, G.H.: Alteration by vanadate of contractility in vascular and intestinal smooth muscle preparations. *Pharmacol.*, 23:156, 1981.
 - 18) James, M.R. and Roufogalis, B.D.: The effect of ouabain on the guinea pig longitudinal smooth muscle. I. ATPase activities of a sarcolemma-enriched fraction prepared with the aid of divalent cation depletion of the intact muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55:1190, 1977.
 - 19) Karaki, H., Ozaki, H. and Urakawa, N.: Effects of ouabain and potassium-free solution on the contraction of isolated blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.*, 48:439, 1978.
 - 20) Lee, J.Y., Jung, J.S., Kim, Y.K. and Lee, S.H.: Effect of vanadate and ouabain on the contractile response of cat ileal smooth muscle. *Korean J. Physiol.*, 18:139, 1984.
 - 21) Lee, S.H., Han, B.K. and Jung, J.S.: Effect of vanadate on the contractile response of the rat uterus. (Unpublished result).
 - 22) Matthews, E.K. and Sutter, M.C.: Ouabain-induced changes in the contractile and electrical activity, potassium content, and response to drugs of smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 45:509, 1967.
 - 23) Mironneau, C., Mironneau, J. and Savineau, J.P.: Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a Ca^{2+} -free solution. *Br. J. Pharmacol.*, 82:735, 1984.
 - 24) Mironneau, J.: Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J. Physiol.*, 233:127, 1973.

- 25) Mullins, L.J. and Briney, F.J.: *Sensitivity of calcium efflux from squid axons to change in membrane potential. J. Gen. Physiol., 65:135, 1975.*
- 26) Murthy, R.V., Kidwai, A.M. and Daniel, E.E.: *Dissociation of contractile effect and binding and inhibition of Na⁺-K⁺-adenosine triphosphatase by cardiac glycosides in rabbit myometrium. J. Pharmacol. Exp. Ther., 188:575, 1974.*
- 27) Nayler, R.A. and Sparrow, M.P.: *Mechanism of vanadate-induced contraction of airways smooth muscle of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol., 80:163, 1983.*
- 28) O'Neal, S.G., Rhoads, D.B. and Racker, E.: *Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and other ATPase. Biophys. Res. Commun., 89(3):845, 1979.*
- 29) Ozaki, H., Ueda, F. and Urakawa, N.: *Inhibitory effects of vanadate on the contractile responses in vascular smooth muscle. Eur. J. Pharmacol., 80:317, 1982.*
- 30) Ozaki, H. and Urakawa, N.: *Effects of vanadate on mechanical and Na-K pump in vascular smooth muscle. Eur. J. Pharmacol., 68:339, 1980.*
- 31) Reuter, H. and Seitz, N.: *The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol., 195:451, 1968.*
- 32) Schwabe, U., Puchstein, C., Hannmann, H. and Söchtig, E.: *Activation of adenylate cyclase by vanadate. Nature, 277:144, 1979.*
- 33) Schwarz, K. and Milne, D.B.: *Growth effects of vanadium in the rat. Science., 174:426, 1971.*
- 34) Simons, T.J.B.: *Vanadate, a new tool for biologists. Nature, 282:337, 1979.*
- 35) Singh, J., Nordlie, R.C. and Jorgenson, A.: *Vanadate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. Biochim. Biophys. Acta, 678:477, 1981.*
- 36) Takeda, K., Temma, K. and Akera, T.: *Inotropic effects of vanadate in isolated rat and guinea-pig heart under conditions which modify calcium pools involved in contractile activation. J. Pharmacol. Exp. Ther., 222(1):132, 1982.*
- 37) Thomson, O.O. and Larsen, J.A.: *Comparison of vanadate and ouabain effects on liver hemodynamics and bile production in the perfused rat liver. J. Pharmacol. Exp. Ther., 221(1):197, 2982, 1982.*
- 38) Ueda, F., Kishimoto, T., Ozaki, H. and Urakawa, N.: *Dual actions of vanadate on high K-induced contraction in guinea-pig taenia coli. Jap. J. Pharmacol., 32:149, 1982.*
- 39) Vassort, G.: *Voltage-clamp analysis of transmembrane ionic currents in guinea-pig myometrium: evidence for an initial potassium activation triggered by calcium influx. J. Physiol., 252:713, 1975.*
- 40) Wang, T., Tsai, L., Solaro, R.J., Grassi de Gende, A.O. and Schwartz, A.: *Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Comm., 91(1):356, 1979.*
- 41) Webb, R.C. and Bohr, D.F.: *Potassium-induced relaxation as an indicator of Na⁺-K⁺-ATPase activity in vascular smooth muscle. Blood Vessels, 15:198, 1978.*