

흰쥐 적출 대동맥에서 α_1 -수용체 효능약과 α_2 -수용체 효능약의 혈관수축반응에 대한 내피세포의 영향

정준기 · 홍승철 · 최수경 · 강맹희 · 구미경 · 박상일 · 윤 일*

부산대학교 약학대학, *부산대학교 치과대학

(Received March 29, 1990)

Effects of Endothelium on α_1 - and α_2 -adrenoceptor Agonist-induced Contraction in the Rat Isolated Aorta

Joon Ki Chung, Sung Cheul Hong, Su Kyung Choi, Maeng Hee Kang, Mi Geong Ku, Sang Il Park and Il Yun*

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*College of Dentistry, Pusan National University, Pusan, 602-739, Korea

Abstract—A comparison was made of the effects of selective α_1 -adrenoceptor agonist phenylephrine and selective α_2 -adrenoceptor agonist clonidine on endothelium-containing and endothelium-denuded rings of the rat aorta. In the case of phenylephrine, removal of endothelium increased sensitivity 2.5 fold at EC_{50} level and maximum contractive response 1.4 fold. In the case of clonidine, which gave only 15% of maximum contractive response given to phenylephrine on endothelium-containing rings, removal of the endothelium increased sensitivity 5.6 fold at EC_{50} level and maximum contractive response 5 fold, which was about 55% of that given by phenylephrine. In endothelium-denuded ring, phenylephrine-induced contraction tended to be more increased in tonic contraction than in phasic contraction as compared to that in endothelium-containing ring, while clonidine-induced contraction was monophasic and was increased only in tonic contraction. In the calcium-free solution or in the presence of verapamil, contraction stimulated by clonidine was almost abolished while that stimulated by phenylephrine produced only phasic contraction. The depression of sensitivity to these agonists in rings with endothelium appeared to be due to the vasodepressor action of endothelium derived relaxing factor (EDRF), because hemoglobin, a specific blocking agent of EDRF, abolished this depression. It is unlikely that the endothelium-dependent relaxation was due to stimulation of release of EDRF, because clonidine did not produce endothelium-dependent relaxation in 5-hydroxytryptamine-precontracted ring even when its contractile action was blocked by the α_1 -adrenoceptor antagonist, prazosin. When the efficacy of phenylephrine was reduced to about the initial efficacy of clonidine by pretreatment with dibenamine, the contraction-response curves for phenylephrine became very similar to the corresponding curves obtained for clonidine before receptor inactivation. In the dibenamine-treated rings, contraction of phenylephrine was abolished in calcium-free solution or in the presence of verapamil like that obtained for clonidine before receptor inactivation. These results suggest that EDRF spontaneously released from endothelium depress contraction more profoundly in a case of an agonist with low efficacy and the phenylephrine-induced contraction was totally dependent on extracellular calcium as was that obtained for clonidine when the efficacy of phenylephrine was reduced to that of clonidine by irreversible inactivation of α_1 -adrenoceptor with dibenamine.

Keywords □ Endothelium, EDRF(endothelium-derived relaxing factor), phenylephrine, clonidine, tonic contraction, phasic contraction, efficacy, intracellular calcium, extracellular calcium

Furchgott 와 Zawadzki 등이 토끼 대동맥에서 acetylcholine 이 혈관이완반응을 일으키는데 있어 서 내피세포(endothelium)의 역할을 밝힌 이래 많은 혈관이완물질들이 EDRF(endothelium-der-

ived relaxing factor)²⁾라는 내피세포 유래 이완인자를 매개로 하여 혈관이완반응을 일으킨다고 알려져 있다.³⁻¹⁰⁾ 한편 α -수용체 효능약의 혈관수축반응이 내피세포가 없는 혈관에 비하여 내피세포가 있는 혈관에서 억제된다는 많은 보고가 있다.¹¹⁻¹⁵⁾ 근래에 α -수용체 효능약의 혈관수축반응을 억제하는데 관여하는 EDRF가 내피세포의 수용체 자극으로 유리되는 것인지 또는 내피세포에서 저절로 유리되어 나오는 것인지에 대하여 논란이 되고 있다. Eglème 등^{16,17)}은 흰쥐 대동맥의 내피세포가 있는 혈관에서 clonidine의 혈관수축반응이 norepinephrine의 혈관수축반응보다 더 현저하게 억제됨을 관찰하고 개나 돼지의 관상동맥에서처럼¹⁸⁻²⁰⁾ 흰쥐 대동맥의 내피세포에서도 EDRF 유리에 관여하는 α_2 -수용체가 있으리라고 제의했으며, 이와 같은 견해는 다른 연구자들에 의해서도 제의되었다.^{15,21,22)} 그러나 이와는 반대로, Lues 및 Schümann²³⁾은 내피세포가 있는 혈관에서 α -수용체 효능약의 혈관수축반응이 α_2 -수용체 차단약인 rauwolscine 존재하에서도 내피세포를 제거했을 때와 비슷한 혈관수축반응을 나타내지 않는 점을 토대로 혈관내피세포에 α_2 -수용체가 있다는 주장에 의문을 제기하였다. 최근 Martin 등²⁴⁾은 내피세포가 있는 혈관에서 prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α})의 혈관수축에 대하여 clonidine이 이완반응을 나타내지 못하였으며, EDRF의 작용을 차단하는 hemoglobin(Hb)이 효능약이 없는 상태에서도 cGMP 양(basal level)을 감소시킨다는 것을 관찰하고, α -수용체 효능약의 혈관수축반응을 억제하는데 관여하는 EDRF는 수용체를 매개하여 유리되는 것이 아니라, 내피세포에서 저절로 유리된다고 하였다. α -수용체 효능약들이 혈관수축반응을 일으키는데 필요한 calcium은 효능약에 따라 세포외액에 있는 calcium과 세포내부에 저장되어 있는 calcium을 이용하는 방법이 다르다는 많은 보고가 있다.²⁵⁻³⁰⁾ Chiu 등³¹⁾에 의하면, 효능이 큰 α_1 -수용체 효능약(full agonist)은 세포내부에 저장되어 있는 calcium과 세포외액에 있는 calcium을 다 이용하여 수축반응을 일으키며, 효능이 낮은 α_1 -수용체 효능약(partial agonist)은 세포외액에 있는 calcium만을 이용하여 수축반응을 일으킨다고 추측하였다.

본 연구에서는 α_1 -수용체 효능약인 phenylephrine과 α_2 -수용체 효능약인 clonidine이 일으킨 흰쥐 대동맥 수축반응에 대한 혈관내피세포의 영향을 검토하고, α_1 -수용체에 대하여 효능이 큰 phenylephrine의 혈관수축반응을 대부분의 α_1 -수용체를 불활성화하여 α_1 -수용체에 대하여 효능이 낮은 clonidine의 혈관수축반응과 비슷한 반응을 일으키게 하였을 때의 혈관수축반응을 일으키는데 필요한 calcium의 이용에 대하여 검토하였다.

실험방법

흰쥐 대동맥 혈관표본의 제조와 장력 측정—체중 300~400g의 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley 계)의 후두부를 강타하여 출혈사시키고 개복한 후 대동맥궁과 횡격막 사이의 흉부대동맥을 적출하였다. 적출한 대동맥혈관을 주위 지방과 결체조직을 조심스럽게 제거한 뒤 길이 2.5mm의 횡단 “링”으로 잘랐다. 일부 혈관에서는 혈관내벽을 나무막대로 부드럽게 문질러 혈관내피세포를 제거시켰다.¹⁾ 혈관표본은 두 개의 L자 모양의 고리(30 gauge stainless-steel needle로써 만들었음)로 아래 위를 걸어 Krebs' solution이 담긴 20 ml 용적의 반응조(organ bath)에 장치하고, 37°C에서 1.5g의 기본장력(resting tension)을 부하하였다. Krebs' solution의 조성(mM)은 NaCl, 118; KCl, 4.8; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 24; glucose, 11; Na₂EDTA, 0.03 이었고, 이 영양액을 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 gas로 포화시켰다. Calcium이 없는 영양액은 Krebs' solution의 조성에서 calcium만을 제외시켜 만들었다. 수축반응은 physiograph 기록계(Narco MK IV)에 연결된 Myograph Force Transducer(Narco F-60)를 사용하여 isometric tension으로 측정하였다. 혈관표본을 90분간 방치하여 평형을 유지시킨 다음 효능약(clonidine, phenylephrine, 5-hydroxytryptamine) 중 하나로 최대반응을 시킨 후 세척하고 다시 60분간 방치하여 평형을 유지되게 하였다. α -수용체 효능약에 대한 누적 농도반응곡선은 각 농도에 대한 반응이 평형점에 도달했을 때 반응조의 농도를 약 3배씩 증가시킴으로써 얻었고, 최대수축반응을

일으킨 뒤에는 혈관표본을 세척하여 기본장력 (resting tension)으로 회복시킨 후 60분 간격을 두고 제 2와 제 3의 농도반응곡선을 각각 얻었다. Hb을 전처치한 실험에서는 제 2의 농도반응곡선을 그리기 10분 전에 Hb(2×10^{-6} M)을 반응조에 가하였다.

한편, 다른 일련의 실험에서 α -수용체 효능약의 단일농도 (phenylephrine 10^{-6} M, clonidine 10^{-6} M)에 대한 수축반응을 얻었다. Calcium이 없는 영양액과 calcium 유입 차단약인 verapamil의 영향을 고찰하기 위한 실험에서는 α -수용체 효능약에 대한 수축반응을 얻은 후 세척한 다음, 60분간 평형을 유지하고 calcium이 없는 영양액 (0.2 mM EGTA 포함)으로 3회 이상 혈관표본을 세척하거나³²⁾ calcium 유입 차단약인 verapamil을 가하여 30분간 방치한 후 두번째 수축반응을 얻었다.³³⁾

Dibenamine으로 α_1 -수용체의 비가역적 봉쇄-강한 효능약인 phenylephrine의 효능 (efficacy)을 부분효능약인 clonidine의 효능과 같게 감소시키기 위하여 dibenamine으로 α_1 -수용체의 대부분을 비가역적으로 불활성화시켰다.²⁴⁻³⁴⁾ 각 실험에서는 하나의 대동맥에서 얻어진 네 개의 혈관(두 개는 내피세포가 있고, 두 개는 내피세포를 제거한 혈관)을 사용하여 phenylephrine에 대한 농도반응곡선을 얻은 후에, 각 혈관표본을 세척하고 60분간 방치하여 평형을 유지한 다음 dibenamine(2×10^{-7} M)으로 15분간 처치하고 20분 동안 세척한 뒤 다시 phenylephrine에 대한 농도반응곡선을 얻었다.

Dibenamine을 처치한 혈관과 처치하지 않은 혈관에서 같은 반응을 나타내는 phenylephrine의 농도 $[A']$ 와 $[A]$ 는 내피세포를 제거한 혈관표본에서 dibenamine으로 처치한 후에 얻은 phenylephrine의 농도반응곡선상의 값과 dibenamine으로 처치하기 전에 얻은 phenylephrine의 농도반응곡선상의 값에서 각각 구하였다. $1/[A']$ 에 대한 $1/[A]$ 에서 얻은 점 (plot)들은 다음과 같은 직선 관계식에 잘 부합되었다.

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{q[A']} + \frac{1-q}{q \cdot K_A}$$

여기서 q 는 활성상태로 남아 있는 수용체의 분획이고, K_A 는 효능약-수용체 복합체의 해리상수이

다. q 의 값은 직선의 기울기 값 (slope)의 역수로부터 구하였고, K_A 치는 기울기 -1 (slope-1)을 세로 축상의 절편값 (intercept)으로 나누어줌으로써 구하였다.

Hemoglobin의 분리-본 실험에서 사용한 Hb은 Bolton과 Clapp³⁵⁾의 방법에 따라 제조하였다. 토끼로부터 얻은 혈액 10~15 ml에 heparin을 첨가하여 6000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음, 상등액을 버린 후 남아 있는 적혈구를 2 ml 취하고 여기에 증류수 18 ml를 가하여 용혈시켰다. 각 실험에 사용된 Hb의 최종농도는 약 2×10^{-6} M이었다.

Data의 분석-수축반응은 장력의 "그램"(g)으로서 나타내었다. 최대수축반응의 50%를 나타내는 효능약의 농도 (EC_{50})는 농도반응 곡선상에서 보간법에 의하여 구하였다. 측정치는 평균값 \pm 표준오차로 나타내었고, 유의성 검정은 Student's t test로 비교하였다. p 의 값이 .05이하일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험약물-본 실험에서 사용된 약물은 다음과 같다; acetylcholine chloride, 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate, phenylephrine hydrochloride, verapamil hydrochloride (Sigma Chemical Co.); clonidine hydrochloride (Boehringer Chemical Co.); dibenamine hydrochloride (Tokyo Kasei Chemical Co.); prazosin hydrochloride (Pfizer Inc.)

실험결과

α -수용체 효능약의 혈관수축반응에 대한 내피세포와 hemoglobin의 영향-내피세포가 있는 흰쥐 대동맥과 내피세포를 제거한 흰쥐 대동맥에서 α_1 -수용체 효능약인 phenylephrine과 α_2 -수용체 효능약인 clonidine의 효과를 비교하였다. Phenylephrine은 농도를 증가함에 따라 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 농도의 의존적인 수축반응을 나타내었다 (Fig. 1). Phenylephrine의 EC_{50} 값과 최대반응은 각각 내피세포가 있는 혈관에서는 6.5×10^{-8} M과 $1.87 \pm 0.1g$ ($n=6$)이며, 내피세포가 없는 혈관에서는 2.6×10^{-8} M과 $2.52 \pm 0.19g$ ($n=6$)이었다. 따라서 혈관의 내피세포를 제거하였

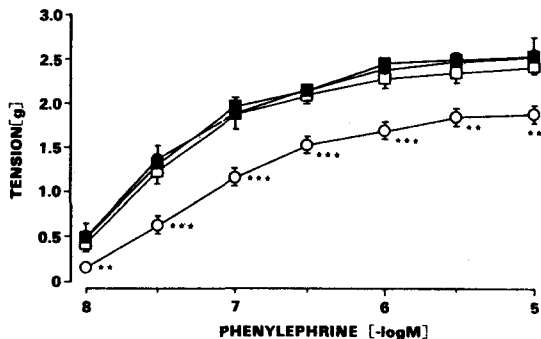


Fig. 1 — Effects of the endothelium and hemoglobin (Hb) on the contraction-response curve to phenylephrine. Curves are for phenylephrine on endothelium-containing rings (○, n=6) and endothelium-denuded rings (●, n=6), and for phenylephrine after pretreatment for 10 min with Hb (2×10^{-6} M) on endothelium-containing rings (□, n=6) and endothelium-denuded rings (■, n=6). Each point is the mean and vertical bars indicate the S.E. Statistical difference between endothelium-containing and endothelium-denuded rings: **p < .05, ***p < .01.

을 때 phenylephrine에 대한 혈관의 감수성 (sensitivity)은 약 2.5배 증가되었으며 최대반응은 약 1.4배 증가되었다 (Fig. 1). 그러므로 내피세포가 있는 혈관은 내피세포를 제거한 혈관에 비하여 혈관 수축반응을 일으키는데 더 많은 phenylephrine 농도가 필요함을 나타내고 있다. 내피세포 유래 이완 인자 (EDRF)의 선택적인 차단약인 Hb (2×10^{-6} M)을 10분간 전처치하였을 때, 내피세포가 있는 혈관에서는 phenylephrine의 반응이 현저히 증가되어 내피세포를 제거한 혈관에서의와 비슷한 반응을 나타내었으나 (EC_{50} , 3.0×10^{-8} M; maximum tension, 2.41 ± 0.08 g, n=6), 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine의 반응은 영향을 받지 않았다 (EC_{50} , 2.9×10^{-8} M; maximum tension, 2.52 ± 0.01 g, n=6) (Fig. 1). Hb의 EDRF 억제효과는 혈관표본을 1시간 동안 세척함으로써 완전히 소실되었다 (실험성적은 표시 않았음).

한편, clonidine도 역시 농도를 증가함에 따라 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 농도 의존적인 수축반응을 나타내었다 (Fig. 2). Clonidine의 EC_{50} 값은 내피세포가 있는 혈관에서는 2.0×10^{-7} M (n=6)이었고, 내피세포를 제거한

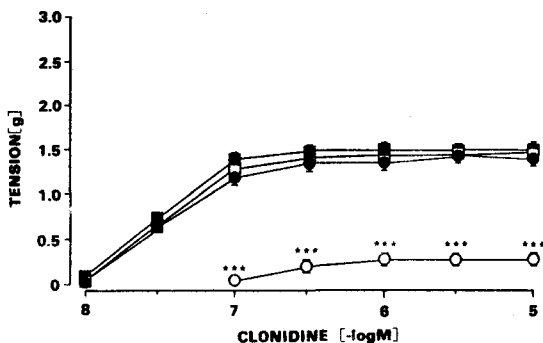


Fig. 2 — Effects of the endothelium and hemoglobin (Hb) on the contraction-response curve to clonidine. Curve are for clonidine on endothelium-containing rings (○, n=4) and endothelium-denuded rings (●, n=4), and for clonidine after pretreatment for 10 min with Hb (2×10^{-6} M) on endothelium-containing rings (□, n=4) and endothelium-denuded rings (■, n=4). Each point is the mean and vertical bars indicate the S.E. Statistical difference between endothelium-containing and endothelium-denuded rings: ***p < .01.

혈관에서는 3.6×10^{-8} M (n=6)이었다. 따라서 내피세포를 제거함에 따라 clonidine에 대한 혈관평활근의 감수성 (sensitivity)이 약 5.6배 증가되었다. 그리고 clonidine의 최대반응은 내피세포가 있는 혈관에서는 0.28 ± 0.03 g이었으며, 내피세포를 제거한 혈관에서는 1.39 ± 0.06 g (n=6)이었으므로 내피세포를 제거함에 따라 수축반응은 약 5배 증가되었다 (Fig. 2). 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 clonidine의 최대수축반응은 각각 phenylephrine의 최대수축반응의 약 15% 및 약 55% 정도였다. 따라서 clonidine은 흰쥐 대동맥 수축반응에서 부분효능약 (partial agonist)로 작용함을 알 수 있다.^{34,36)} Hb을 전처치하였을 때 내피세포가 있는 혈관에서는 clonidine의 반응이 현저히 증가되어 내피세포를 제거한 혈관에서의와 비슷한 반응을 나타내었으나 (EC_{50} , 3.8×10^{-8} M; maximum tension, 1.46 ± 0.03 g, n=6), 내피세포를 제거한 혈관에서의 clonidine의 반응은 영향을 받지 않았다 (EC_{50} , 3.2×10^{-8} M; maximum tension, 1.5 ± 0.06 g, n=6).

-hydroxytryptamine의 수축반응에 대한 clonidine의 효과—Clonidine (10^{-8} M에서 10^{-6} M)은 내피세포가 있는 혈관에서 5-Hydrox-

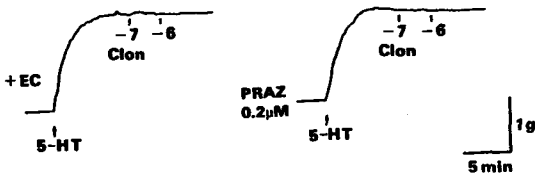


Fig. 3—Effects of clonidine on 5-hydroxytryptamine-induced contractions in the endothelium-containing rings with and without being exposed to prazosin. Rings were first contracted with 5-hydroxytryptamine (1×10^{-5} M) and then clonidine was added. Clonidine failed to induce relaxation (left). After pretreatment with prazosin (2×10^{-7} M), clonidine still failed to induce endothelium-dependent relaxation (right). EC, endothelial cell; Clon, clonidine; PRAZ, prazosin; 5-HT, 5-hydroxytryptamine

tryptamine (5-HT)으로 미리 수축시킨 혈관을 이완시키지 못하였다 (Fig. 3). 또한 clonidine은 α_2 -수용체 효능약이지만, α_1 -수용체에 작용하여 흰쥐 대동맥을 수축한다고 보고되고 있으므로³⁶⁾ α_1 -수용체 차단약인 prazosin (2×10^{-7} M)을 전처치하여 clonidine에 의한 수축반응을 차단한 후에도, clonidine은 5-HT에 의한 혈관수축반응을 이완시키지 못하였다 (Fig. 3).

Phenylephrine과 clonidine의 단일 농도에 의한 혈관수축반응의 비교—Phenylephrine (10^{-6} M)은 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 초기 빠른 phasic 반응에 뒤이어 느리고 지속적인 tonic 반응으로 이루어진 이상성 (biphasic) 수축반응을 일으켰다. 내피세포가 있는 혈관에서 초기의 phasic 반응은 총 수축반응의 약 47%이었으며, 뒤따라 일어나는 tonic 반응은 총 수축반응의 약 53%에 해당하였다 (n=9). 내피세포를 제거한 혈관에서는 내피세포가 있는 혈관의 반응에 비해 총 수축반응은 약 66%, phasic 반응은 약 61%, tonic 반응은 약 71% 각각 증가되었다 (n=9) (Fig. 4). 이 결과를 살펴보면 내피세포가 있는 혈관에서 phenylephrine의 혈관수축반응은, tonic 반응이 phasic 반응에 비하여 더 많이 억제되는 경향을 보이고 있다. 한편 clonidine (10^{-6} M)은 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 모두 tonic 반응으로만 이루어진 단상성 (monophasic) 혈관수축반응을 일으켰으며, 내피세포를 제거한 혈

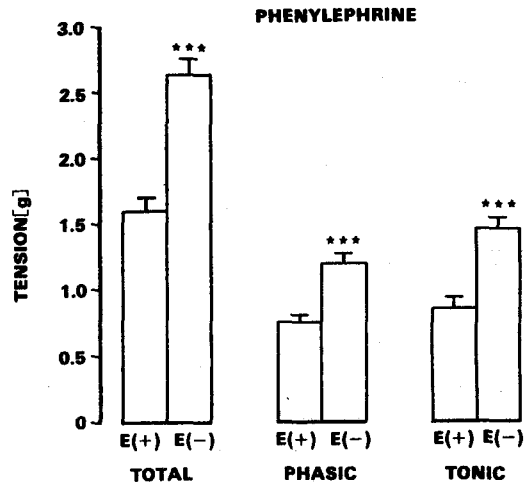


Fig. 4—Total, phasic and tonic component of phenylephrine (1×10^{-6} M)-induced contraction in the endothelium-containing rings and endothelium rings. Columns present the mean (n=9) and vertical bars indicate S.E. Statistical difference between endothelium-containing and endothelium-denuded rings: ***p < .01. E(+), the endothelium-containing rings; E(-), the endothelium-denuded rings.

관에서의 최대반응은 내피세포가 있는 혈관에서의 최대반응에 비해 약 5배 증가되었다 (n=8) (Fig. 5).

Phenylephrine과 clonidine의 수축반응에 대한 calcium이 없는 영양액의 효과 및 calcium 유입 차단약인 verapamil의 효과—내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서, phenylephrine (10^{-6} M)에 의한 혈관수축반응은 정상 영양액에서는 이상성 반응이었으나, calcium이 없는 영양액에서는 tonic 반응은 거의 완전히 소실되고 phasic 반응만을 나타내었다. 이 phasic 반응은 정상 영양액에서의 총 수축반응을 100%로 하였을 때, 내피세포가 있는 혈관에서는 $39.6 \pm 4.1\%$ 이었고, 내피세포를 제거한 혈관에서는 $38.1 \pm 3.8\%$ 이었다. 또한 정상 영양액에 calcium 유입 차단약인 verapamil (3×10^{-6} M)을 가하여 30분간 전처치하였을 때에도 phenylephrine에 의한 수축반응 중 tonic 반응은 거의 소실되었고, phasic 반응만을 나타내었으며, 이 phasic 반응은 정상 영양액에서의 총 수축반응을 100%로 하였을 때 내피세포가 있는 혈관에서는 $38.1 \pm 4.0\%$ 이었고, 내피세포를 제거한 혈관에

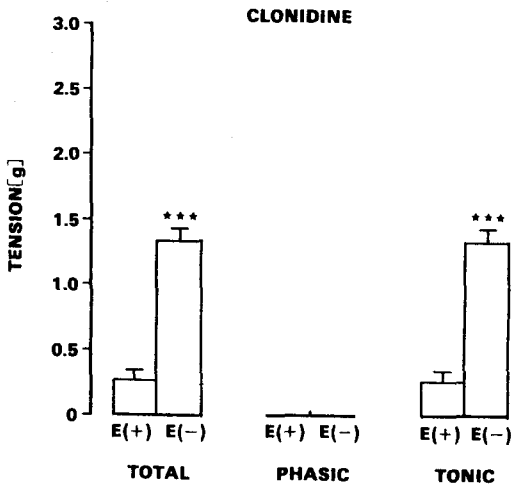


Fig. 5.—Total, phasic and tonic component of clonidine (1×10^{-6} M)-induced contraction in the endothelium-containing rings and endothelium-denuded rings. Columns represent the mean ($n=6$) and vertical bars indicate S.E. Statistical difference between endothelium-containing and endothelium-denuded rings: *** $p < .01$. E(+), the endothelium-containing rings; E(-), the endothelium-denuded rings.

서는 $35.3 \pm 3.4\%$ 에 달하였다 (Fig. 6). 한편, 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 clonidine (10^{-6} M)에 의한 혈관수축반응은 calcium 이 없는 영양액에서나, 정상 영양액에 verapamil (3×10^{-6} M)을 가했을 때에도 완전히 소실되었다 (Fig. 7).

비가역적 α_1 -수용체 차단약인 dibenamine 처치 후 phenylephrine 의 혈관수축반응 - α_1 -수용체를 비가역적으로 불활성화시키는 dibenamine (2×10^{-7} M)을 15분간 처치한 후에는 내피세포를 제거한 혈관에서의 phenylephrine 의 최대반응은 dibenamine 을 처치하지 않았을 때의 phenylephrine 의 최대반응의 약 50%로 감소되었으며, 내피세포가 있는 혈관에서의 phenylephrine 의 반응은 더욱 현저하게 감소되었다 (Fig. 8). Fig. 8에서 내피세포를 제거한 혈관에서 dibenamine 을 처치하였을 때와 처치하지 않았을 때 같은 반응을 일으키는 phenylephrine 의 농도에 따른 double-reciprocal plot 에 적합한 직선도표 (linear curve)의 기울기와 절편의 값으로부터 계산하면, dibenamine 처치 후에도 활성상태로 남아있는 α_1 -수용체의 비율을 나

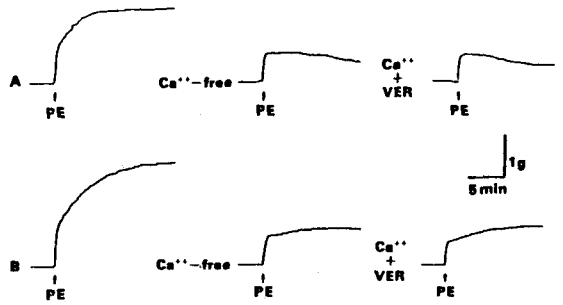


Fig. 6—Effects of Ca^{++} -free solution and verapamil on phenylephrine (1×10^{-6} M)-induced contraction in the endothelium-containing rings (A) and endothelium-denuded rings (B). Phenylephrine produced biphasic responses, initial rapid phasic response followed by the slow tonic response in the endothelium-containing rings and endothelium-denuded rings. The tonic response in the presence of phenylephrine were completely abolished in Ca^{++} -free solution or by verapamil (3×10^{-6} M). PE, phenylephrine; VER, verapamil

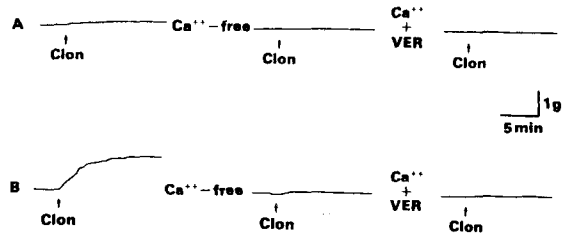


Fig. 7—Effects of Ca^{++} -free solution and verapamil on clonidine (1×10^{-6} M)-induced contraction in the endothelium-containing rings (A) and endothelium-denuded rings (B). Clonidine produced only tonic responses in the endothelium-containing rings and endothelium-denuded rings. Clonidine-induced contraction was completely abolished in Ca^{++} -free solution or in the presence of verapamil (3×10^{-6} M). VER, verapamil; Clon, clonidine

타내는 q 값은 약 0.03이었다. 따라서 dibenamine (2×10^{-7} M)을 처치한 후에는 α_1 -수용체가 약 97% 불활성화되었다고 사려된다. 또한 phenylephrine-receptor complex 의 해리상수 K_A 는 1.3×10^{-6} M 이었다 ("실험방법" 참고). 이와 같이 dibenamine 을 처치한 후의 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine 의 농도반응곡선은 dibenamine 을 처치하지 않은 clonidine 의 농도반응곡선과 매우 비슷하게 되었다

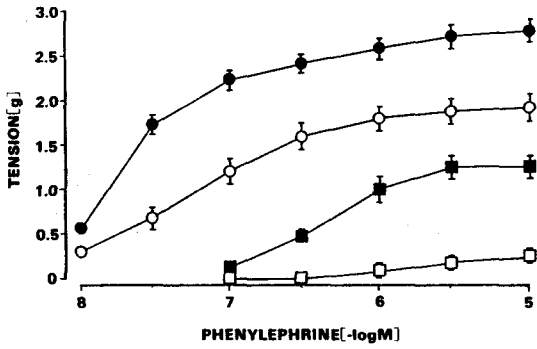


Fig. 8—Effects of pretreatment with dibenamine on concentration-response curves for phenylephrine in the endothelium-containing and endothelium-denuded rings. Curves are for untreated endothelium-containing rings (\circ , $n=4$) and endothelium-denuded rings (\bullet , $n=4$), and for dibenamine-treated (2×10^{-7} M for 20 min) endothelium-containing (\square , $n=4$) rings and endothelium-denuded rings (\blacksquare , $n=4$). Each point is the mean and vertical bars indicate the S.E.

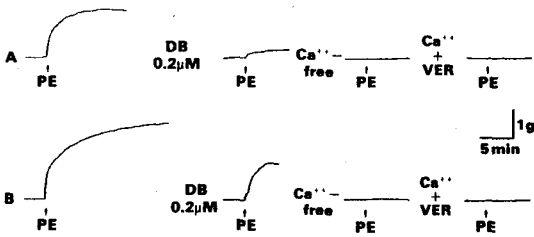


Fig. 9—Effects of Ca^{++} -free solution and verapamil on phenylephrine (1×10^{-6} M)-induced contraction after pretreatment with dibenamine (2×10^{-7} M) in the endothelium-containing rings (A) and endothelium-denuded rings (B). After pretreatment with dibenamine phenylephrine-induced contractions were markedly depressed as compared to those before pretreatment with dibenamine in the endothelium-containing rings and endothelium-denuded rings and were completely abolished in Ca^{++} -free solution or in the presence of verapamil (3×10^{-6} M). PE, phenylephrine; DB, dibenamine; VER, verapamil.

(Fig. 2와 8의 비교).

Dibenamine 처리 후의 phenylephrine의 혈관 수축반응에 대한 calcium이 없는 영양액의 효과 및 calcium 유입 차단약인 verapamil의 효과—내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서,

phenylephrine (10^{-6} M)에 의한 혈관수축반응은 이상성 (biphasic) 반응을 나타내었으나, dibenamine (2×10^{-7} M)을 처리하였을 때는 반응이 현저하게 억제되어 단상성 (monophasic)인 tonic 반응만을 일으켰다 (Fig. 9). 이와 같은 tonic 반응은 calcium이 없는 영양액에서 완전히 소실되었고, 정상 영양액에 calcium 유입 차단약인 verapamil을 가하였을 때에도 완전히 소실되었다 (Fig. 9). 이와 같은 결과는 clonidine에 의한 수축반응에 대한 calcium이 없는 영양액의 효과와 verapamil의 효과에서 얻은 결과 (Fig. 7)와 비슷하였다.

고 찰

근래 α -수용체 효능약의 혈관수축반응이 내피세포가 있는 혈관에서 현저하게 억제되는 것을 관찰하고, 내피세포가 혈관수축반응을 억제한다는 많은 보고가 있다.^{11,13,14,16,17,23} 본 실험에서는 흰쥐 대동맥의 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 α_1 -수용체 효능약인 phenylephrine과 α_2 -수용체 효능약인 clonidine이 농도 의존적 수축반응을 일으켰으며, 내피세포가 있는 혈관에서는 이들 α -수용체 효능약에 대한 혈관의 감수성과 최대반응이 현저하게 억제되었다 (Fig. 1 및 2). 이와 같은 α -수용체 효능약의 혈관수축반응의 내피세포 의존성 억제작용은 EDRF의 작용을 차단하는 Hb^{37,38}을 전처리하였을 때에도 완전히 소실되었으므로, EDRF가 혈관내피세포에서 유리되어 혈관수축반응을 억제하리라 사려된다. 이와 같은 결과는 Martin 등²⁴의 실험결과와 일치된다. 이 때 Hb이 내피세포를 제거한 혈관에서는 phenylephrine과 clonidine의 반응에 영향을 미치지 않았으므로 Hb은 혈관평활근의 감수성을 증가하지 않는 것으로 보며, Hb의 EDRF 억제작용은 혈관을 세척하였을 때 소실이었으므로 (실험성적 표시 없음) 내피세포 파괴에 의한 것도 아니라고 사려된다. 또한 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 clonidine이 일으킨 최대반응은 phenylephrine이 일으킨 최대반응에 비하여 매우 적고 (Fig. 1과 2의 비교), 흰쥐 대동맥에서는 α_2 -수용체 효능약들도 주로 α_1 -수용체를 매개하여 수축반응을 일으킨다고 보고되고 있으므로^{36,39} 흰쥐 대동맥 수축반응에

서 clonidine 은 α_1 -수용체에 대하여 부분효능약 (partial agonist)으로 작용함을 보여주고 있다.

또한 α -수용체 효능약들의 혈관수축반응을 억제하는 EDRF 가 내피세포의 α_2 -수용체 자극으로 유리되는 것인지 또는 내피세포에서 저절로 유리되는 것인지에 대하여 논란이되고 있다. Eglème 등^{16,17)}은 원취 대동맥의 내피세포가 있는 혈관에서 clonidine 의 혈관수축반응이 norepinephrine 의 혈관수축반응에 비하여 더욱 현저하게 억제됨을 관찰하고 혈관내피세포에는 EDRF 유리에 관여하는 α_2 -수용체가 있으리라고 제의했으며, Miller 등²¹⁾도 다른 α_2 -수용체 효능약인 B-HT 920 의 혈관수축반응이 내피세포가 있는 혈관에서 크게 억제됨을 관찰하고 이를 지지했다. 그러나 이와 반대로, Lues 및 Schümann²³⁾은 내피세포가 있는 혈관에서 α_2 -수용체 효능약인 guanfacine 의 혈관수축반응은 적게 억제되는데 비하여 α_1 -수용체 효능약인 St 587 의 혈관수축반응은 크게 억제되었고, 또한 내피세포가 있는 혈관에서 이들 α -수용체 효능약의 혈관수축반응이 α_2 -수용체 차단약인 rauwolscine 존재하에서도 내피세포를 제거했을 때와 비슷한 혈관수축반응을 나타내지 않은 사실을 토대로 혈관내피세포에 α_2 -수용체가 있다는 주장에 의문을 제기하게 되었다. Martin 등²⁴⁾은 내피세포가 있는 혈관에서 PGF_{2 α} 의 혈관수축반응에 대하여 clonidine 이 이완반응을 나타내지 못하였으며, 어떤 효능약도 없는 상태에서 Hb 이 cGMP 의 양(basal level)을 감소시키는 것을 관찰하고, α -수용체 효능약의 혈관수축반응을 억제하는 EDRF 는 내피세포의 수용체를 매개로 유리되는 것이 아니라 저절로 유리되어 혈관의 긴장도를 조절하는 역할을 하리라고 추측했다. 본 실험에서는 PGF_{2 α} 대신 5-HT 를 사용하여 일으킨 혈관수축반응에 대한 clonidine 의 영향을 검토한 결과 clonidine 은 α_1 -수용체 차단제인 prazosin 존재하에서도 내피세포가 있는 혈관에서 이완반응을 나타내지 못하였다(Fig. 3). 따라서 본 실험결과에서도 α -효능약의 수축반응은 혈관내피세포에서 저절로 유리되는 EDRF 에 의해 억제됨을 시사하고 있다.

Godfraind 등³²⁾은 내피세포가 있는 혈관에서 norepinephrine (10⁻⁶ M)과 phenylephrine (10⁻⁶ M)은 초기에 빠른 phasic 반응에 뒤이어 느리고 지

속적인 tonic 반응으로 이루어진 이상성 수축반응을 일으킨다고 하였고, clonidine (10⁻⁶ M)은 느리고 지속적인 tonic 반응으로 이루어진 단상성인 수축반응만을 일으킨다고 하였다. 또한 calcium 이 없는 영양액에서나, calcium 유입 차단약인 cinnarizine (3×10⁻⁶ M)의 존재하에서는 norepinephrine 과 phenylephrine 의 반응은 tonic 반응은 소실되고 phasic 반응만 나타내었으며, clonidine 의 반응은 거의 소실된다고 하였다. 본 실험에서는 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine (10⁻⁶ M)과 clonidine (10⁻⁶ M)의 혈관수축반응을 비교한 결과 내피세포가 있는 혈관에서는 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine 은 phasic 반응과 tonic 반응으로 이루어진 이상성반응을 일으켰으며 (Fig. 4), clonidine 은 tonic 반응으로 된 단상성 반응만을 일으켰다 (Fig. 5), 이 때 내피세포가 있는 혈관에서는 내피세포가 없는 혈관에 비하여 phenylephrine 의 수축반응은 약 40% 감소되었으며 clonidine 의 수축반응은 약 80% 감소되었고, phenylephrine 의 경우 tonic 반응이 phasic 반응에 비하여 더 많이 억제되는 경향을 보였다 (Fig. 4 및 5). 또한 calcium 이 없는 영양액에서나, calcium 유입 차단약인 verapamil (3×10⁻⁶ M) 존재하에서는 phenylephrine 의 반응은 phasic 반응만 남았으며 (Fig. 6), conidine 의 반응은 완전히 소실되었다 (Fig. 7). 이와 같은 결과는 내피세포가 있는 혈관에서는 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine 은 세포외액의 calcium 과 세포내에 저장되어 있는 calcium 을 이용하여 수축반응을 일으키며, clonidine 은 세포외액의 calcium 만을 이용하여 수축반응을 일으킴을 시사하고 있다. 따라서 혈관내피세포에서 저절로 유리되는 EDRF 는 이들 α -수용체 효능약의 세포내외의 calcium 을 이용하는 방법에는 현저한 영향을 주지 않으리라 사려되며, 내피세포가 있는 혈관에서 α -수용체 효능약의 혈관수축반응이 억제되는 것은 혈관내피세포에서 저절로 유리되는 EDRF 에 의하여 혈관수축반응에 이용되는 calcium 의 양이 감소되기 때문이라 사려된다. 또한 이 때 효능이 낮은 부분효능약인 clonidine 의 혈관수축반응이 효능이 큰 효능약인 pheylephrine 의 혈관수축반응에 비하여 더 많이

억제되는 것은 저절로 유리되는 일정량의 EDRF가 효능이 낮은 clonidine의 혈관수축반응에 이용되는 calcium 양을 효능이 큰 phenylephrine의 혈관수축반응에 이용되는 calcium 양에 비하여 상대적으로 더 큰 비율로 감소시키기 때문이라고 사려된다.

흰쥐 대동맥 평활근의 α_1 -수용체에 작용하는 효능 약의 친화력과 상대적인 효능(relative efficacy)을 얻기 위하여 Furchgott 및 Bursztyn⁴⁰⁾의 식을 적용한 Martin 등²⁴⁾은 clonidine의 상대적인 효능은 phenylephrine의 상대적 효능의 약 3%에 지나지 않으므로 phenylephrine은 흰쥐 대동맥 평활근에서 clonidine과 같은 반응을 일으키는데 clonidine이 결합하는 α_1 -수용체의 약 3%만 차지하면 될 것이라고 했다. 수용체설에 의하면 적절한 분획의 α_1 -수용체를 비가역적으로 불활성화시키면 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine의 농도반응곡선은 α_1 -수용체를 불활성화하지 않았을 때 얻어진 clonidine의 농도반응곡선과 비슷하게 될 것이다. 본 실험에서는 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 dibenamine(2×10^{-7} M)으로 15분간 전처리하였을 때 phenylephrine의 농도반응곡선이 dibenamine으로 처리하지 않았을 때의 clonidine의 농도반응곡선과 비슷하게 되었다(Fig. 8과 2의 비교). 이와 같은 결과는 혈관내피세포가 EDRF를 유리하여 부분효능약인 clonidine의 혈관수축반응을 효능이 큰 효능약인 phenylephrine의 혈관수축반응보다 더 현저하게 억제한다는 것을 나타내었다. 이와 같이 α_1 -수용체를 불활성화하여 phenylephrine의 반응을 clonidine의 반응과 비슷하게 했을 때의 수축반응에 필요한 calcium의 이용방법을 검토하기 위하여, 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 dibenamine(2×10^{-7} M)을 전처리한 후 phenylephrine(10^{-6} M)의 혈관수축반응을 보았을 때 clonidine(10^{-6} M)의 반응(Fig. 7)처럼 phasic 반응은 소실되고 tonic 반응만 나타내었으며, 이와 같은 tonic 반응은 영양액을 calcium이 없는 영양액으로 바꾸거나 정상 영양액에 calcium 유입 차단약인 verapamil을 전처리하였을 때는 완전 소실되었다(Fig. 9). 위의 결과는 α_1 -수용체를 불활성화

하여 효능이 큰 phenylephrine의 반응을 효능이 낮은 clonidine의 반응과 같게 하였을 때는 clonidine의 반응처럼 세포외액의 calcium만 이용하여 혈관수축반응을 일으킨다는 것을 시사하고 있다. 따라서 α_1 -수용체를 비가역적으로 불활성화시켜 효능이 큰 효능약의 효능을 효능이 낮은 부분효능약의 효능으로 낮추었을 때는 효능이 큰 효능약의 calcium 이용방법과 혈관수축반응형이 변화됨을 시사하고 있다. 여기에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라고 사려된다.

결 론

본 연구에서는 선택적인 α_1 -수용체 효능약인 phenylephrine과 선택적인 α_2 -수용체 효능약인 clonidine이 일으킨 흰쥐 대동맥 수축반응에 대한 내피세포의 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Phenylephrine과 clonidine은 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관을 모두 수축시켰으며, 내피세포를 제거하였을 때는 phenylephrine에 대한 혈관의 감수성은 약 2.5배 증가되었고, 최대반응은 약 1.4배 증가되었다. 반면에 clonidine에 대한 혈관의 감수성은 약 5.6배 증가되었고, 최대반응은 약 5배 증가되었다. 또한 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 clonidine이 일으킨 최대반응은 phenylephrine이 일으킨 최대반응의 약 15% 및 55%를 각각 나타내었다.

2. EDRF의 선택적인 차단약인 hemoglobin은 내피세포가 있는 혈관에서는 phenylephrine과 clonidine의 수축반응을 내피세포를 제거한 혈관에서의 수축반응만큼 증가시켰으나, 내피세포를 제거한 혈관에서는 phenylephrine과 clonidine의 수축반응에는 영향을 미치지 않았다.

3. 내피세포가 있는 혈관에서 clonidine은 α_1 -수용체 차단약인 prazosin을 처리하여 α_1 -수용체를 매개한 혈관수축반응을 차단한 후에도 5-hydroxytryptamine으로 미리 수축시킨 혈관을 이완시키지 못하였다.

4. Phenylephrine(10^{-6} M)은 내피세포가 있는

혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 초기 빠른 phasic 반응에 뒤이어 느리고 지속적인 tonic 반응으로 이루어진 이상성(biphasic) 수축반응을 일으켰으며, 내피세포를 제거한 혈관에서는 내피세포가 있는 혈관에 비하여 총수축반응은 약 66%, phasic 반응은 약 61%, tonic 반응은 약 71% 각각 증가되었다.

5. Clonidine(10^{-6} M)은 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 모두 tonic 반응만으로 이루어진 단상성(monophasic) 수축반응을 일으켰으며, 내피세포를 제거한 혈관에서의 수축반응은 내피세포가 있는 혈관의 반응에 비해 약 5배 증가되었다.

6. 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine(10^{-6} M)에 의한 혈관수축반응은 calcium 이 없는 영양액에서 소실되었고, calcium 이 있는 영양액에 calcium 유입 차단약인 verapamil 을 처치하였을 때에도 tonic 반응은 거의 소실되고 phasic 반응만을 나타내었다.

7. 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 clonidine(10^{-6} M)에 의한 혈관수축반응은 calcium 이 없는 영양액에서 소실되었으며, calcium 이 있는 영양액에 verapamil 을 처치하였을 때에도 소실되었다.

8. Dibenamine 을 전처치하여 대부분의 α_1 -수용체를 비가역적으로 불활성화시켜 α_1 -수용체 효능약인 phenylephrine 의 효능(efficacy)을 clonidine 의 효능과 거의 같게 감소시켰을 때 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine 의 농도반응곡선은 clonidine 의 농도반응곡선과 비슷하였다.

9. 내피세포가 있는 혈관과 내피세포를 제거한 혈관에서 phenylephrine(10^{-6} M)은 이상성 수축반응을 일으켰으나, dibenamine(2×10^{-7} M)을 전처치하여 반응을 현저하게 억제시켰을 때는 단상성의 tonic 반응만을 일으켰으며, 이 반응은 calcium 이 없는 영양액에서 소실되었으며, calcium 이 있는 영양액에 verapamil 을 처치하였을 때에도 완전히 소실되었다.

이상의 결과를 요약하면, 내피세포가 있는 혈관에서 내피세포에서 저절로 유리되는 EDRF 는 α_1 -수

용체에 대하여 효능이 큰 phenylephrine 에 의한 혈관수축반응보다 α_1 -수용체에 대하여 효능이 낮은 clonidine 에 의한 혈관수축반응을 더 현저하게 억제하였으며, 또한 dibenamine 으로 대부분의 α_1 -수용체를 불활성화시켜 효능이 큰 phenylephrine 에 의한 혈관수축반응을 효능이 낮은 clonidine 에 의한 반응과 같게 하였을 때는 clonidine 의 수축반응처럼 세포외액의 calcium 만을 이용하여 수축반응을 일으킨다고 생각된다.

문 헌

- 1) Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)*, **288**, 373 (1980).
- 2) Cherry, P.D., Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. and Jothianandan, D.: Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2106 (1982).
- 3) Chand, N. and Altura, B.M.: Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: Role in lung vascular disease. *Science (Wash. DC.)*, **213**, 1376 (1981).
- 4) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, **53**, 557 (1983).
- 5) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 175 (1984).
- 6) Gordon, J.L. and Martin, W.: Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: Relationship to stimulation of Rb efflux from isolated endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 531 (1983).
- 7) Van de Voorder, J. and Leusen, I.: Role of endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **87**, 113 (1983).
- 8) Singer, H.A. and Peach, M.J.: Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. I. Relaxation stimulated by arachidonic acid(AA). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **227**, 790 (1983).
- 9) Rubanyi, G.M., Lorenz, R.R., and Vanhoutte, P.M.: Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): Inactivation by Catecholamines. *Am. J. Physiol.*, **249**,

- H95 (1985).
- 10) Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M. and Wood, K.S.: Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle elicited by bradykinin and VIP. *Am. J. Physiol.*, **253**, H1074 (1987).
 - 11) Allan, G., Brook, C.D., Cambridge, D. and Hladk-wiskyi, J.: Enhanced responsiveness of vascular smooth muscle to vasoconstrictor agents after removal of endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **79**(suppl), 334 (1983).
 - 12) Bigaud, M. Schoeffter, P., Stoclet, J.C. and Miller, R.C.: Dissociation between endothelium-mediated increases in tissue cGMP levels and modulation of aortic contractile responses. *Naunyn-Schimiede-berg's Arch. Pharmacol.*, **328**, 221 (1984).
 - 13) Carrier, G.O. and White, R.E.: Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 682 (1985).
 - 14) Godfraind, T., Eglème, C. and Osachie, I.A.: Role of endothelium in the contractile responses of rat aorta to alpha-adrenergic agonists. *Clin. Sci.*, **68**(Suppl. 10), 65s (1985).
 - 15) Miller, B.M. and Vanhoutte, P.M.: Endothelial adrenoceptors in canine pulmonary and systemic blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.*, **118**, 123 (1985).
 - 16) Eglème, C., Godfraind, T. and Miller, R.C.: Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **81**, 16 (1984a).
 - 17) Eglème, C., Godfraind, T. and Miller, R.C.: Role of endothelium in the rat aorta response to vasoconstrictors. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **268**, 116 (1984b).
 - 18) Cocks, T.M. and Angus, J.A.: Endothelium-mediated relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature (Lond.)*, **305**, 627 (1983).
 - 19) Angus, J.A., Cocks, T.M. and Satoh, K.: α -adrenoceptors and endothelium-dependent relaxation in canine large arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **88**, 767 (1986a).
 - 20) Angus, J.A., Cocks, T.M. and Satoh, K.: The adrenoceptors on endothelial cells. *Federation. Proc.*, **45**, 2355 (1986b).
 - 21) Miller, R.C., Mony, M., Schini, V., Schoeffter, P., and Stoclet, U.C.: Endothelial mediated inhibition of contraction and increase in cyclic GMP levels evoked by the α_2 -adrenoceptor agonist B-HT 920 in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **83**, 903 (1984).
 - 22) Bullock, G.R., Taylor, S.G. and Weston, A.H.: Influence of the vascular endothelium on agonist-induced contractions and relaxations in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 819 (1986).
 - 23) Lues, I. and Schumann, H.J.: Effect of removing the endothelial cells on the reactivity of rat aortic segments to different α -adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schimiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **328**, 160 (1984).
 - 24) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D. and Furchgott, R.F.: Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 529 (1986).
 - 25) Godfraind, T. and Kaba, A.: Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and noradrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **36**, 549 (1969).
 - 26) Keatinge W.R.: Mechanical response with reversed electrical response to noradrenaline by Ca-derived arterial smooth muscle. *J. Physiol.*, **224**, 21 (1972).
 - 27) Godfraind, T., Kaba, A. and Rojas, R.: Inhibition by cinnarizine of calcium channels opening in depolarized smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **49**, 164 (1973).
 - 28) Karaki, H., Kubota, H. and Urakawa, N.: Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **56**, 237 (1979).
 - 29) Van Breeman, C. and Siegel, B.: The mechanism of α_2 -adrenergic activation of the dog coronary artery. *Cir. Res.*, **46**, 426 (1980).
 - 30) Godfraind, T., and Miller, R.C.: α_1 - and α -adrenoceptor stimulation and Ca fluxes in isolated rat aorta. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **256**, 171 (1982).
 - 31) Chiu, A.T., McCall, D.E., Thoolen, M.J.M.C. and Timmermans, P.B.M.W.M.: Ca^{++} utilization in the constriction of rat aorta to full and partial alpha-1 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 224 (1986).
 - 32) Godfraind, T., Miller, R.C. and Socrates Lima, J.:

- Selective α_1 - and α_2 -adrenoceptor agonist-induced contractions and Ca fluxes in the rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **77**, 597 (1982).
- 33) Marriott, J.F.: A comparison of the effects of the calcium entry blockers, verapamil, diltiazem and flunarizine against contractions of the rat isolated aorta and portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 145 (1988).
- 34) Ruffolo, R.R., JR., Rosing, E.L. and Waddell, J.E.: Receptor interactions of imidazolines. I. Affinity and efficacy for alpha adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 429 (1979).
- 35) Bolton, T.N. and Clapp, L.H.: Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **87**, 713 (1986).
- 36) Digges, K.G. and Summers, R.J.: Characterisation of postsynaptic α -adrenoceptors in rat aortic strips and portal veins. *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 655 (1983).
- 37) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D. and Furchgott, R.F.: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 708 (1985a).
- 38) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D. and Furchgott R.F.: Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 679 (1985b).
- 39) Macia, R.A., Matthews, W.D., Lafferty, J. and Demarinis, R.M.: Assessment of alpha adrenergic receptor subtypes in isolated aortic segments. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **325**, 306 (1984).
- 40) Furchgott, R.F. and Bursztyn, P.: Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **144**, 882 (1967).