약학회지 제35권 제3호 216~221(1991)
Yakhak Hoeji Vol. 35, No. 3

Rat에서 Cromakalim에 의해 유발된 혈관이완 및 혈압강하작용에 대한 Glipizide의 억제작용

허인회 · 안형수* · 윤성훈
중앙대학교 약학대학, *동덕여자대학교 약학대학

(Received May 6, 1991)

Inhibitory Effects of Glipizide on Cromakalim-induced Vasorelaxative and Hypotensive Action in the Rats

In Hoi Huh, Hyung Soo Ann*, Seong Hun Yoon
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
**College of Pharmacy, Dong-Duk Woman University, Seoul 136-714, Korea*

Abstract—The inhibitory effects of glipizide on cromakalim-induced relaxation of aortae and hypotension in the anesthetized rats was examined. In rat thoracic aortic rings pre-contracted with norepinephrine, cromakalim produced a relaxation sustainedly. This relaxation was completely inhibited by pre- or post-treatment of glipizide. In the anesthetized rat, cromakalim produced a rapid and sustained fall in the arterial blood pressure. This hypotensive action of cromakalim was abolished by pre- or post-treatment of glipizide. It is suggested that glipizide is the potent inhibitor of cromakalim, K^+ channel opener, in the rats.

Keywords □ Glipizide, cromakalim,

최근 영국의 Beecham사에서 합성한 cromakalim (BRL 34915)[1,2]은 K^+ channel opening에 의해 평활근을 이완시킨다고 보고되었다.[3,4] Cromakalim은 K^+ channel opening에 의해 K^+의 유출을 증가시키고, 그 결과 평활근의 세포막을 과분극시켜 rat,[4-8] rabbit[9]의 대동맥평활근을 이완시킨다고 보고되었다. 이러한 cromakalim의 이완작용은 다른 평활근보다는 혈관평활근에 대해 보다 더 선택적인 것으로 보고되었다.[10,11]

Cromakalim의 혈관평활근 이완작용은 내피세포의 영향을 받지 않았으며,[6] cromakalim의 이완작용은 (−)enantiomer(BRL 38227)의 효력이 (+)enantiomer(BRL 38226)보다 약 1000배 큰 입체이성체 선택적인 특성을 나타낸다고 보고되었다.[11] 또한 cromakalim은 SHR,[13,14] renal hypertensive cat와 dog[13]에서 혈압강하작용이 있으며, 고혈압환자에서도 혈압강하[15]를 일으킨다고 보고되었다. Cromakalim의 이러한 평활근 이완작용은 세포내 Ca^{2+} 농도감소에 기인하는 것으로 여겨지고 있다. Cromakalim은 세포내의 ATP 수준을 감소시켜 첫째, 평활근세포막의 ATP-regulated K^+ channel opening 작용에 의해 K^+ 유출의 증가로 평활근세포막을 과분극시키고, 이에 의해 voltage-operated Ca^{2+} channel(VOC)[16]이 차단되고 Ca^{2+}의 세포내 유입이 억제된다. 둘째, 세포내에서 Ca^{2+}을 저장하는 세포내소기관인 sarcoplasmic reticulum(SR)으로의 Ca^{2+} 저장을 촉진시키고, SR에서의 Ca^{2+} 유리를 억제하여 세포내의 Ca^{2+} 농도를 감소시켜 평활근세포를 이완시킨다고 보고되었다.[17,18] 그러므로 VOC와 receptor operated Ca^{2+} channel(ROC)을 통해 평활근세포내의 Ca^{2+} 수준을 증가시키는 norepinephrine에 의해 수축[19,20]된 평활근은 cromakalim에 의해서 이완될 수 있다.

한편 혈당강하제인 glibenclamide는 각종 세포막의 ATP-regulated K^+ channel(K_{ATP} channel)[17,21,22]을 차단[23-26]하며, rat,[27-29] rabbit[30,31]의 대동맥평활근에서도 K_{ATP} channel을 차단하여 cromakalim의 혈관이완작용을 억제한다고 보고되었다. 또한, glibenclamide는 마취시킨 dog[32]와 rat[33]에서, 그리고 의식상태의 rat[34]에서도 cromakalim의 혈압강하작용을 억제한다고 보고되었다.

Glibenclamide와 같은 sulphonylurea계 혈당강하제인 glipizide도 췌장 β세포에서 K_{ATP} channel을 차단[35]하며, glipizide를 rat에 전처치하면 cromakalim의 혈압강하작용이 발현되지 않는다[27]고 보고되었다. 이에따라 rat의 적출대동맥에서 glipizide가 cromakalim의 혈관평활근 이완작용을 억제할 수 있는지, 그리고 마취시킨 정상혈압의 rat에서 glipizide가 cromakalim의 혈압강하작용을 억제할 수 있는지를 검토하였다.

실험방법

약물 및 기기－약물은 (±)Cromakalim(Beecham Co.), Glipizide(유한양행), Glibenclamide(종근당), (－)Norepinephrine·HCl(Sigma Co.), Urethane (Aldrich Co.), α-Chloralose(Sigma Co.), Heparin (Sigma Co.)을 사용하였다. 실험기기로는 Polygraph (Grass, Model 7E), D.C. Pre-Amplifier(Grass, Model 7P14), EKG·Tachograph Pre-Amplifier(Grass, Model 7P4), Force-Displacement Transducer(Grass, Model FT03), Physiological Pressure Transducer (Spectramed, Model P10EZ), Constant Temperature Circulating Water Bath(Jeio, Model MC-31)를 사용하였다.

실험동물－Organ bath 실험(*in vitro*)에서 체중 200～250g의 SD계 rat 수컷을, 혈압측정실험(*in vivo*)에서 체중 270～330g의 SD계 rat 수컷을 사용하였다.

시약조제－Cromakalim은 70% ethanol을 용매로 10^{-2} M의 stock 용액을 만들어 실험 때마다 필요한 농도로 희석하여 사용하였으며, 혈압측정실험에서는 tween 80을 0.5% 가한 생리식염액에 현탁시켜 투여하였다. 이 때 ethanol의 최종농도는 0.1%(v/v)를 넘지 않았다. Glipizide는 먼저 0.1 N NaOH 1 part에 녹인 다음 sonication 시키면서 5% glucose 용액 4 part를 천천히 가하여 완전히 용해시켰으며, 혈압측정실험에서도 같은 방법으로 제조하였다. 이 때 용매의 최종농도는 0.1%(v/v)를 넘지 않았다. 실험에 사용한 약물은 실험농도보다 100배 액으로 제조하여 organ bath내의 영양액 20 ml에 단일용량법이나 누적법에 따라 0.2 ml씩 가하였다. Urethane은 생리식염액에 녹였으며, α-chloralose는 tween 80을 0.5% 가한 생리식염액에 현탁시켜 제조하였다.

대동맥의 반응성 측정－rat를 ether 마취하에 개복하여 문맥절단으로 사혈시키고, 즉시 흉곽대동맥을 적출하였다. 적출한 대동맥은 Krebs-Henseleit 용액(K-H용액)속에서 부착지방조직과 결합조직을 제거하고 길이 5 mm의 ring 모양으로 절단하였다. 이 ring을 28 gage 주사바늘로 만든 hook에 걸어서 organ bath내의 muscle holder와 transducer에 연결하여 K-H용액 속에 현수하였다. Organ bath 내에는 K-H용액(단위 mM : NaCl 118, $NaHCO_3$ 27.2, KCl 4.8, KH_2PO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, glucose 11.1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.75, EDTA·2Na 0.03) 20 ml를 채우고, organ bath 외부의 water jacket을 통해 항온수를 순환시켜 영양액의 온도를 37℃로 유지시키면서 95% O_2, 5% CO_2의 혼합가스를 송기시켰다. 대동맥 ring은 2g의 resting tension을 주고 1g tension에 의해 1 cm 상승하게 조정한 다음 base line을 조정하면서 90분 동안 안정시켰으며, 30분마다 K-H용액으로 세척하였다. 그 다음에 norepinephrine 10^{-6} M로 대동맥 ring을 수축시켜 평형을 이룬 후에 약물을 가하여 실험하였고, glipizide를 전처리하는 경우에는 cromakalim을 투여하기 30분 전에 전처치하였다. 실험결과는 isometric tension의 변화를 Force-Displacement transducer와 연결된 polygraph상에 기록하여 혈관의 수축·이완반응을 평가하였다.

혈압 측정실험－정상혈압의 rat를 urethane(600 mg/kg, i.p.)과 α-chloralose(60 mg/kg, i.p.)의 병용투여로 마취시킨 다음, 마취하에서 rat의 경부를 전기칼로 절개하고 좌측 경동맥을 노출시킨 다음 생리식염액(heparin 300 U/ml 함유)을 채운 23 gage의 polyethylene catheter를 사용하여 한쪽은 transducer에 연결하고 반대쪽은 경동맥에 cannulation하였다. Cromakalim 0.075 mg/kg은 정맥주사나 복강주사 둘다 작용발현시간이 비슷하게 빨랐고 효력도 비슷하였으므로 본 실험에서는 복강으로 투여하였고, glipizide

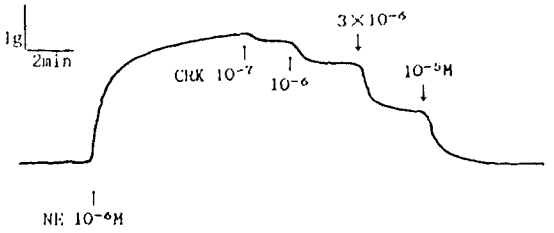

Fig. 1—Concentration-dependent relaxation of rat aortic rings by cromakalim(n=6).
NE: norepinephrine, CRK: cromakalim

20 mg/kg은 정맥으로 투여하였다. 혈압과 심박수는 Physiological Pressure transducer를 통해 Polygraph상에 기록하여 평가하였는데, cannulation한 후 혈압이 안정되었을 때를 normal치로 하였고 cromakalim 투여 10분 후와 glipizide 투여 50분 후의 측정치로 통계 처리하였다.

실험결과 및 고찰

대동맥 평활근 이완에 대한 억제작용—Norepinephrine 10^{-6} M로 미리 수축시킨 rat 대동맥 ring에서 cromakalim 10^{-7}, 10^{-6}, 3×10^{-6}, 10^{-5} M은 각각 3.4, 10.6, 63.4, 100%의 용량의존적인 이완반응을 일으켰다(Fig. 1). 이 때 cromakalim의 용매인 ethanol은 실험에 사용한 농도에서 혈관반응에 아무런 영향도 미치지 않았다.

한편 glipizide는 단독투여시 대동맥 ring의 tension에 직접적인 작용이 없었으며 norepinephrine에 의한 대동맥평활근의 수축반응에도 영향을 미치지 않았는데, 이것으로 보아 glipizide에 의해 차단된 혈관 K_{ATP} channel은 심혈관의 항상성에 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

그러나 glipizide의 전처치 또는 후처치시에는 cromakalim의 대동맥평활근 이완반응은 용량의존적으로 억제되었다. 즉, norepinephrine 10^{-6} M로 미리 수축시킨 대동맥 ring에 대해 cromakalim 3×10^{-6} M은 신속하고 지속적인 이완을 나타내어, glipizide를 처치않은 경우에 63.4%의 이완율을 보였으나 glipizide 10^{-6}, 3×10^{-6} M를 전처치시에는 cromakalim 3×10^{-6} M의 이완률이 각각 13.6%, 0%로 떨어져 용량의존적으로 cromakalim의 혈관이완반응이 억제되었다(Fig. 2). 또한 cromakalim에 의해 이완된 대동맥 ring에 대한 glipizide의 후처치시에도 농도의존적으로 재수축을 나타내었다(Fig. 3).

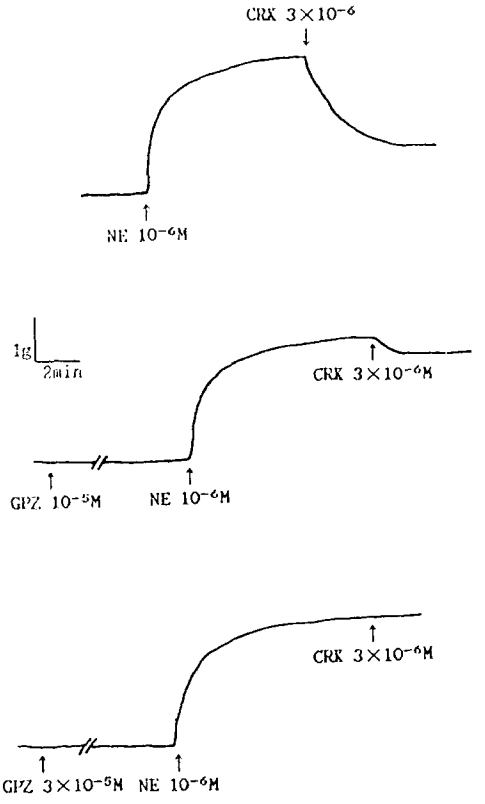

Fig. 2—Inhibitory activity of glipizide on cromakalim-induced relaxation in rat aortae(n=6).
GPZ: glipizide

이상의 결과로 세포내 ATP의 농도에 의해 개폐가 조절되는 K_{ATP} channel의 차단제로써 지난 수년간 집중적으로 연구된 glibenclamide의 경우와 비교하여 glipizide도 대략 비슷한 수준의 차단작용을 나타냄을 확인하였다. 이로써 glipizide도 glibenclamide와 함께 약물학적으로 이형 K^+ channel 매개반응을 일으키는 약물의 검색에 유용한 약물로 사용될 수 있을 것이다.

혈압강하에 대한 억제작용—Cromakalim(0.075 mg/kg i.p.)은 urethane과 α-chloralose의 병용투여로 마취시킨 정상혈압 rat에서 혈압을 신속하게 저하시키며 지속적인 혈압강하를 나타내었는데 수축기혈압은 111 mmHg에서 92 mmHg로 약 19 mmHg 강하되

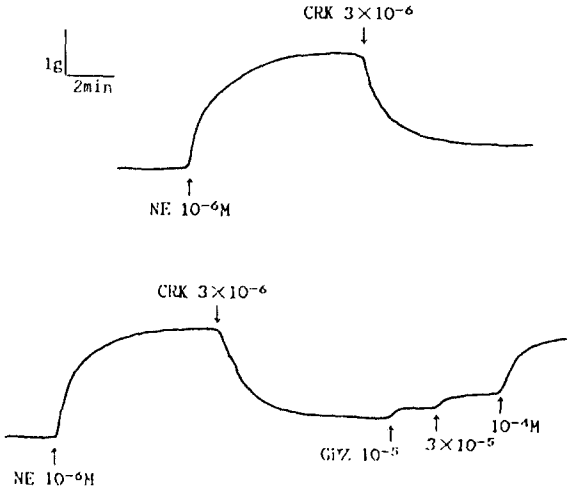

Fig. 3—Inhibitory activity of glipizide on relaxative action by cromakalim in rat aortae.

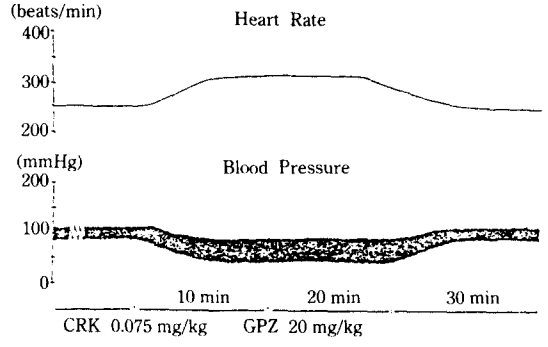

Fig. 4—Inhibitory effect of glipizide on hypotensive action of cromakalim in normotensive rats.

었고 이완기혈압은 76 mmHg에서 48 mmHg로 약 28 mmHg 강하되어 이완기혈압 강하작용이 더 컸으며, 심박수는 257 beats/min에서 308 beats/min로 증가되었다(Fig. 4). 수축기혈압은 주로 심장의 심박출량에 영향을 받는데 비해 이완기혈압은 혈관의 말초저항에 연관되므로 cromakalim에 의한 이완기혈압강하는 K^+ channel opening에 의한 직접적인 혈관이완작용으로 총말초혈관 저항성의 저하로 인한 것이며, 심박수 상승작용은 정상 rat에서는 나타났으나 pithed rat에서는 나타나지 않는 것으로 보아 cromakalim의 저혈압반응에 대한 반사작용이다. 그러나 이 반응은 정맥주사한 glipizide(20 mg/kg)의 전처치나 후처치에 의해 억제되어 정상으로 회복되었다. 즉, glipizide의 전처치로 cromakalim의 혈압강하작용의 발현이 완전히 차단되었으며, 심박수의 증가도 완전히 억제되었다. 또한 cromakalim의 혈압강하가 안정된 후에 glipizide를 후처치시에는 투여 후 약 20분경부터 혈압이 서서히 상승되어 투여 후 50분경에 정상혈압으로 회복되었고, cromakalim에 의해 상승되었던 심박수도 glipizide 투여로 감소되어 혈압이 회복된 것과 같은 때에 정상으로 회복되었다(Fig. 4). 한편, glipizide나 glibenclamide를 경구나 복강주사로 대량(100 mg/kg)을 투여한 경우에는 cromakalim의 저혈압작용을 억제하지 못하였는데 이것으로 보아 이를 약물들의 작용은 생화학적 작용이 아닌 특이적 길항작용임이 입증되었고, 이것은 organ bath에서의 대동맥 ring의 tension 실험결과와도 일치하였다.

결 론

K^+ channel opener인 cromakalim의 대동맥평활근 이완작용과 혈압강하작용에 대한 sulphonylurea계 혈당강하제인 glipizide의 영향을 검토한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, norepinephrine으로 수축시킨 rat 대동맥 ring에서 glipizide의 전처치 또는 후처치시 cromakalim에 의한 혈관이완작용은 용량의존적으로 억제되었다. 이 작용은 이미 K^+ channel opener의 길항제로 알려진 glibenclamide와도 유사하였으나 후처치시의 작용 지속시간은 glipizide가 더 길었다.

둘째, glipizide를 정맥주사로 전처치 또는 후처치하면 정상혈압의 rat에서 cromakalim에 의한 혈압강하와 심박수증가에 대해 억제작용을 나타내었다.

이상의 결과는 SD계 rat에서 glipizide가 glibenclamide와 마찬가지로 혈관평활근에서 K^+ channel opener인 cromakalim의 길항제로 작용하여 ATP-regulated K^+ channel을 차단함으로써 K^+ channel opener인 cromakalim의 작용을 억제할 수 있음을 나타내었다.

문 헌

1) Evans, J.M., Fake, C.S., Hamilton, T.C., Poyser, R.H. and Watts, E.A.: Synthesis and antihypertensive activity of substituted trans-4-Amino-3,4-dihy-

dro-2,2-dimetyl-2H-1-benzopyran-3-ols. *J. Med. Chem.* **26**, 1582(1983).

2) BRL 34915. *Drugs of the Future* **11**, 175(1986).

3) Coldwell, M.C. and Howlett, D.R.: Specificity of action of the novel antihypertensive agent, BRL 34915, as a potassium channel activator: comparison with nicorandil. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3663 (1987).

4) Taylor, S.G., Southerton, J.S., Weston, A.H. and Baher, J.R.J.: Endothelium dependent effects of acetylcholine on membrane potential, potassium flux and cyclic GMP concentration in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and the potassium channel opener, BRL 34915. *Br. J. Pharmacol.* **94**, 853(1988).

5) Weir, S.W. and Weston, A.H.: The effects of BRL 34915 and nicorandil on electrical and mechanical activity and on ^{86}Rb efflux in rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* **88**, 121(1986).

6) Southerton, J.S., Taylor, S.G. and Weston, A.H.: Comparison of the effects of BRL 34915 and of acetylcholine-liberated EDRF on rat isolated aorta. *J. Physiol.* **382**, 50(1987).

7) Quast, U. and Baumlin, Y.: Comparison of the effluxes of $^{42}K^+$ and $^{86}Rb^+$ elicited by cromakalim (BRL 34915) in tonic and phasic vascular tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **338**, 319 (1988).

8) Doggrell, S.A., Smith, J.W., Downing, O.A. and Wilson, K.A.: Hyperpolarizing action of cromakalim on the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **174**, 131(1989).

9) Cook, N.S., Weir, S.W. and Danzeisen, M.C.: Antivasoconstictor effects of the K^+ channel opener cromakalim on the rabbit aorta: comparison with the calcium antagonist isradipine. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 741(1988).

10) Longman, S.D., Clapham, J.S., Wilson, C. and Hamilton, T.C.: Cromakalim a potassium channel activator: a comparison of its cardiovascular haemodynamic profile and tissue specificity with those of pinacidil and nicorandil. *J. Cardiol. Pharmacol.* **12**, 535(1988).

11) Grossett, A. and Hicks, P.E.: Evidence for blood vessel selectivity of BRL 34915. *Br. J. Pharmacol.* **89**, 500(1986).

12) Hof, R.P., Quast, U., Cook, N.S. and Blarer, S.: Mechanism of action of and systemic and regional hemodynamics of the potassium channel activator BRL 34915 and its enantiomers. *Cir. Res.* **62**, 679 (1988).

13) Buckingham, R.E., Clapham, J.C., Hamilton, T.C., Longman, S.D., Norton, J. and Poyser, R.H.: BRL 34915, a novel antihypertensive agent: comparison of effects on blood pressure and other haemodynamic parameters with those of nifedifine in animal models. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8**, 798(1986).

14) Falotico, R., Keiser, J., haertlein, B. and Tobia, A.: Increased vasodilator responsiveness to BRL 34 915 in spontaneously hypertensive versus normotensive rats: contrast with nifedipine (42847). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**, 179(1989).

15) Vandenburg, M.J., Arr Woodward, S., Hassein, M., Stewart-Long, P. and Tasker, T.C.G.: Potassium channel activators lower blood pressure: an initial study of BRL 34915 in hypertensive patients. *J. Hypertension* **5**(suppl. 5), S193(1987).

16) Ferrante, J. and Triggle, D.J.: Drug-and disease-induced regulation of voltage-dependent calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **42**, 29(1990).

17) Cook, N.S.: The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *TIPS* **9**, 21 (1988).

18) Chiu, P.J.S., Telzloff, G., Ahn, Ho-Sam. and Sybertz, E.J.: Effects of BRL 34915, a putative K channel openers, on transmembrane ^{45}Ca movements in rabbit aortic smooth muscle, *Eur. J. Pharmacol.* **155**, 229(1988).

19) Nelson, M.T., Standen, N.B., Brayden, J.E. and Worley, J.F.: Noradrenaline contracts arteies by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* **336**, 382(1988).

20) Benham, C.D. and Tsien, R.W.: Noradrenaline modulation of Calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J. Physiol.* **404**, 767(1988).

21) Stanfield, P.R.: Nucleotides such as ATP may control the activity of ion channels. *Trends in Neurosci.* **8**, 335(1987).

22) Ashcroft, F.M.: Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Ann. Rev. Neurosci.* **11**, 97(1988).

23) Quast, U. and Cook, N.S.: Moving together: K^+ channel openers and ATP-regulated K^+ channels. *TIPS* **10**, 431(1989).

24) Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. and Nelson, M.T.: Hyperpolarizating vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**, 177(1989).

25) De Weille, J.R., Fosset, M., Mourre, C., Schmid-antomarchi, H., Bernardi, H. and Lazdunski, M.: Pharmacology and regulation of ATP-sensitive K^+ channels. *Pflugers Arch.* **414**(suppl. 1), S80(1989).

26) Sturgess, N.C., Ashford, M.L.J., Cook, D.L. and Hales, C.N.: The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* **2**, 474 (1985).

27) Cavero, I., Mondot, S. and Mestre, M.: Vasorelaxant effects of cromakalim in rats are mediated by glibenclamide-sensitive potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 1261(1989).

28) Buckingham, R.E., Hamilton, T.C., Howlet, D.R., Mootoo, S. and Wilson, C.: Inhibition by glibenclamide of the vasorelaxant action of cromakalim in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **97**, 57(1989).

29) Lebrun, P., Fang, Z.Y., Antoine, M.H., Herchuelz, A., Hermann, M. Berkenboom, G. and Fontaine, J.: Hypoglycemic sulfonylureas antagonize the effects of cromakalim and pinacidil on ^{86}Rb fluxes and contractile activity in the rat aorta. *Pharmacology* **41**, 36(1990).

30) Quast, U. and Cook, N.S.: Potent inhibitors of the effects of the K^+ channel opener BRL 34915 in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **93**, 204 (1988).

31) Bray, K.M., Duty, S. and Weston, A.H.: Effects of glibenclamide on cromakalim-induced responses in rabbit isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **98**, 806 (1989).

32) Yamada, H., Yoneyama, F., Satoh, K. and Taira, N.: Specific but differential antagonism by glibenclamide of the vasodepressor effects of cromakalim and nicorandil in spinally-anestheized dogs. *Br. J. Pharmacol.* **100**, 413(1990).

33) Cavero, I., Mondot, S., Mestre, M. and Escande, D.: Haemodynamic and Pharmacological mechanisms of the hypotensive effects of cromakalim in rats: blockade by glibenclamide. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 643(1988).

34) Wilson, C., Buckingham, R.E., Mootoo, S., Parrott, L.S., Hamilton, T.C., Pratt, S.C. and Cawthorne, M.A.: In vivo and in vitro studies of BRL 34915 and glibenclamide in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **93**, 126(1988).

35) Zunkler, B.J., Lenzen, S., Manner, K., Panten, U. and Trube, G.: Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K^+ currents in pancreatic β-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **337**, 225(1988).