

자궁평활근의 Carbachol 및 Oxytocin 수축에 있어서의 세포내 Ca^{2+} 동원

건국대학교 수의학과, 동경대학 수의약리학교실¹

김보경 · 정동수 · 김윤선 · 이윤희 · 용준환
이원창 · H. Ozaki¹, H. Karaki¹ · 이상목*

= Abstract =

Intracellular Ca^{2+} Movement in Contraction Induced by Carbachol and Oxytocin in Rat Myometrium

Bo-Kyung Kim, Dong-Su Chung, Yoon-Sun Kim, Yoon-Ho Lee, Jun-Hwan Yong,
Won-Chang Lee, Hiroshi Ozaki¹, Hideaki Karaki¹ and Sang-Mog Lee*

Department of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University,

93-1 Mojin-dong, Kwangjin-ku, Seoul 133-701, Korea

*¹Department of Veterinary Pharmacology, Graduate School of Agriculture
and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Yayoi 1-1-1, Tokyo 113, Japan*

The properties of cytosolic Ca^{2+} level ($[Ca^{2+}]_i$) movement of high KCl, carbachol and oxytocin were examined with myometrium isolated from non-pregnant rat (estrus cycle). High concentration of KCl (≤ 23.3 mM) induced rhythmic increases in $[Ca^{2+}]_i$ and muscle contraction. However, sustained $[Ca^{2+}]_i$ and contraction were obtained at higher KCl concentration (≥ 30.3 mM). The rhythmic and sustained contraction closely associated with changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced by high KCl. Carbachol ($3\sim 30$ μ M) generated rhythmic increases with tonic component in $[Ca^{2+}]_i$ and muscle contraction. Myometrial contraction stimulated by carbachol was also closely correlated with change in $[Ca^{2+}]_i$. And the $[Ca^{2+}]_i$ /contraction relationships were similar when muscle strips were stimulated by high KCl and carbachol.

Maximal concentration of carbachol (10 μ M) and oxytocin (100 nM) increased $[Ca^{2+}]_i$ and contraction which were slightly greater than that of high KCl in non-pregnant myometrium, respectively. However, the $[Ca^{2+}]_i$ and contraction were strongly inhibited by verapamil (10 μ M), a l-type Ca^{2+} channel blocker, as in the case of high KCl. Additionally, although carbachol further increased $[Ca^{2+}]_i$ and contraction induced by high KCl, these changes also strongly inhibited by application of verapamil. These results suggest that uterotonic agents, carbachol and oxytocin, induced contraction by increase in $[Ca^{2+}]_i$ through Ca^{2+} influx than by a regulation of Ca^{2+} -sensitization in non-pregnant myometrium.

Key Words: Intracellular Ca^{2+} , Myometrium, Ca^{2+} sensitivity, Smooth muscle contraction

*Corresponding author: Sang-Mog Lee, Department of Veterinary Physiology, Kon-Kuk University, 93-1 Mojin-dong, Kwangjin-ku, Seoul 133-701, Korea.

**본 연구는 한국과학재단 연구비에 의한 동물자원연구센터 지원으로 수행되었음.

서 론

자궁은 임신의 유지 및 성공적인 분만을 위해서 필수적인 역할을 하는 장기이다. 자궁은 임신기간 중 대부분을 이완 상태로 유지하며, 임신말기의 아주 짧은 시기에서만 수축을 일으켜 분만을 초래한다. 이러한 임신 조절에 중요한 자궁은 생체 hormone 또는 neurotransmitter 등에 의해 영향을 받게되며, 자궁의 구성성분 중 수축 또는 이완을 담당하는 자궁평활근도 이들에 의해 조절을 받게된다. 자궁평활근은 신경의 지배를 받지않고도 자발적인 수축(spontaneous contraction)을 일으키는 특징을 가지며, hormone의 상태나 임신의 경과와 동물종에 따라서 외부자극에 대한 수축특성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Wray, 1993). 그러나 자궁평활근의 수축과 이완의 조절이나, 이들에 관여하는 인자들의 역할 등에 대해서는 불명확한 바가 많다.

혈관 등 평활근에서와 같이, 자궁평활근 수축과 이완을 담당하는 중요한 인자는 세포내 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)이다. 또한 자궁평활근의 대표적인 수축 agonist인 oxytocin, prostaglandin류, endothelin, platelet activating factor등은 자궁평활근의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Anwer & Sanborn, 1989; Kim 등, 1995b). 자궁평활근의 수축 agonist에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 동원은 세포막을 통한 유입(influx)과 세포막 phosphoinositide의 분해 산물인 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP_3)에 의한 sarcoplasmic reticulum(SR)으로 부터의 유리(release)가 있다(Marc 등, 1986; Inoue 등, 1990). $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 Ca^{2+} 결합단백질인 calmodulin과의 결합을 가져오며 이는 myosin light chain kinase(MLCK)를 활성화한다. 활성화된 MLCK는 20 kDa인 myosin light chain을 인산화하고 actin과 cross bridge를 형성하여 수축을 발생시킨다. 한편 수용체 agonist에 의해 활성화된 GTP-binding protein은 어떤 pathway를 통해 contractile element를 자극하고 동일한 $[Ca^{2+}]_i$ 에

서도 수축의 크기를 증가 또는 감소시킬 수 있는 Ca^{2+} -sensitization, desensitization 기전을 가진다(Kitazawa 등, 1991). 또한 IP_3 와 동일한 세포막 phosphoinositide의 분해 산물인 diacylglycerol에 의해 활성화되어지는 protein kinase C는 세포막에 존재하는 여러 protein들을 phosphorylation하게 되는데, 이에 의해서도 Ca^{2+} -sensitization이 발생한다고 한다(Sato 등, 1992). 자궁평활근에 있어서도 Ca^{2+} -sensitization에 대한 실험이 몇몇 이루어져 보고되고 있는 바, rat의 자궁평활근에서 endothelin-1은 Ca^{2+} -sensitization을 일으키지 않는다고 보고되었다(Sakata & Karaki, 1992). 그러나 Izumi 등(1995)은 permeabilized strip을 이용하여 oxytocin이 GTP dependent한 Ca^{2+} -sensitization을 일으키는 것을 보고하였다. 한편, human의 임신 자궁평활근을 이용한 실험에서 vasopressin, oxytocin은 Ca^{2+} -sensitization을 일으키지 않고, 고농도 KCl 자극시와 같은 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 상관관계를 보이는 것으로 보고되어 아직도 자궁평활근에서의 GTP binding protein에 의한 Ca^{2+} -sensitization의 명확한 존재의 증명도 없는 실정이다(Szal 등, 1994; Wray, 1993). 한편 protein kinase C를 직접 활성화시키는 phorbol ester를 이용한 실험에서 protein kinase C는 Ca^{2+} -sensitization을 일으키지 않음이 보고되었다(Kim 등, 1996). 또한 혈관, 장관을 비롯한 평활근의 수축과 이완에 있어서의 Ca^{2+} -sensitization과 desensitization의 생리적인 의미에 대해서도 불명확한 점이 많다.

본 연구에서는 자궁평활근에서 수축에 관계하는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 역할을 규명하며, Ca^{2+} -sensitization의 존재를 밝히는데 목적을 두었다. 실험 방법으로는 rat의 자궁평활근에 형광 Ca^{2+} 지시약을 부과하여 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화와 수축을 동시에 측정하였다. 또한 Ca^{2+} -sensitization의 명확한 기전을 연구하기 위하여 α -toxin으로 permeabilizing한 자궁평활근을 일정한 $[Ca^{2+}]_i$ 농도로 고정한 후 약물의 효과를 검토하였다. 본 연구결과의 일부는 abstract 형식으로 일본약리학회에 보고된 바 있다(Kim 등,

1995a).

재료 및 방법

실험동물은 약 200~300 g의 wister계 rat을 이용하였고, 질 도말검사에서 발정기로 판정된 rat을 실험에 사용하였다. Rat은 후두부를 강타하여 실신시킨 후 양쪽 경동맥을 절단하여 충분히 방혈시켰다. 방혈 후 복부를 절개하여 난소를 제외한 자궁양각을 적출했다. 적출한 자궁은 physio-logical salt solution(PSS)이 함유된 dish에서 지방조직을 제거했다. 실제 현미경하에서 자궁체부의 중간부위에서 중주근만을 분리하여 길이 6~7 mm, 폭 2 mm 정도의 근육표본을 만들었다. 절단된 자궁단편의 한쪽 끝은 근육고정기에 고정시키고, 다른 한쪽 끝은 장력변환기(Force Displacement Transducer, FT03, GRASS)에 연결하여 조직 표본용 bath(10 ml)에 옮겨 생리현상기록기(Physiograph, 7WC, GRASS)로 기록하였다.

PSS의 실험 조건은 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 가스를 공급하면서 37°C, pH 7.4에서 시행하였다. 자궁절편에는 10 mN의 resting tension을 주어 약 20분간 안정시킨 후 40 mM isotonic의 고농도 KCl과 PSS의 처치를 반복적으로 시행하였다. 고농도 KCl에 대한 수축반응이 일정하게 유지된 후 약물에 대한 실험을 시작하였다. 본 연구에 사용된 PSS의 조성은 다음과 같다(mM); NaCl 136.9, KCl 5.4, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 23.8, glucose 5.5, EDTA 0.01. 또한 고농도 KCl용액은 NaCl를 동일한 mol의 KCl로 치환하여 만들었다.

[Ca²⁺]_i과 수축의 동시 측정은 Ozaki등(1987) 및 Kim등(1992)과 같은 방법으로 Ca²⁺의 형광지시약인 fura-PE3를 이용하여 측정하였다. Fura-PE3는 fura-2의 유도체로서, 시간에 따른 fura-2의 세포막을 통한 leak를 보완할 수 있는 Ca²⁺ 지시약이다(Kim등, 1995b). 수축 측정시와 같은 방법으로 작성된 근육표본을 fura-PE3의 acetoxymethyl ester(fura-PE3/AM, 5 μM)로 실온에서 4~5시간 동안 처리하였다. 이때 fura-PE3/AM의

세포막에 대한 투과도를 증가시키기 위하여 비세포독성의 계면활성제인 cremophore EL(0.02%)이 추가되었다. 근육표본에 대한 fura-PE3의 부과가 끝난 후, 비분해형 fura-PE3(fura-PE3/AM)을 제거하기 위하여 PSS에서 20분간 순화시켰다. 그 후 근육표본의 한쪽끝을 장력변환기에 연결하여 7 ml의 organ bath에 옮기고 37°C에서 수축을 측정하면서 [Ca²⁺]_i를 기록하였다. 근육표본은 340 nm와 380 nm의 두 파장의 excitation을 48 Hz로 순차적으로 조사하였고, 이때 발생하는 500 nm의 형광(F340과 F380)을 형광광도계(CAF100, JASCO, Japan)로 분석하였다. [Ca²⁺]_i의 변화는 F340과 F380의 비율(R340/380)로서 나타내었다. 세포질에서 Ca²⁺에 대한 fura-PE3의 결합계수는 in vitro에서의 결과와 차이가 있으므로 [Ca²⁺]_i의 절대치를 구하는 것은 생략하였으며(Karaki, 1989), 본 실험에서는 resting과 각 agonist들의 자극시에 얻어진 ratio를 각각 [Ca²⁺]_i의 0%와 100%로 취했다.

Permeabilized muscle strip의 작성은 Staphylococcal α-toxin을 이용하여 Kitazawa등(1989)의 방법으로 측정하였다. Permeabilized strip용의 근육표본은 직경 0.1~0.2 mm, 길이 1~2 mm가 되도록 작성하였다. 세포막의 permeabilizing은 α-toxin을 80 μg/ml의 농도로 녹인 relaxing solution에 근육표본을 30분간 처리하여 만들었다. Relaxing solution의 조성은 다음과 같다; potassium propionate 130 mM, MgCl₂ 4.0 mM, Na₂ATP 4.0 mM, tris-maleate 20.0 mM, creatine phosphate 2.0 mM, creatine phosphokinase 10 unit/ml, carbonyl p-trifluoromethoxy phenyldrazone 1 mM, E-64 1 mM, EGTA 2 mM(pH 6.8). Ca²⁺ solution은 relaxing solution에 각 지정 농도의 Ca²⁺을 투여하여 작성하였다. 모든 실험에 사용된 solution에는 SR로부터의 Ca²⁺의 release를 차단하기 위하여 10 μM의 ionomycin을 투여하였으며, 실험은 22~24°C에서 실시하였다.

본 실험에서는 oxytocin, carbachol, creatine phosphate, creatine phosphokinase, carbonyl p-

trifluoromethoxy phenyldrazone(Sigma, USA), EGTA, EDTA(Dojindo Laboratories, Japan), fura-PE3/AM(Tafalbs, USA), cremophore EL (Nacalai Tesque, Japan), E-64(Peptide Institute, Japan), ionomycin(Hoechst Japan, Japan) 을 사용하였으며, α -toxin은 Kato Iwao박사 (Chiba University, Japan)로 부터 기증받았다.

각 실험성적은 평균 \pm SE로 나타내었고, 통계처리는 student's t-test를 이용하여, $p < 0.05$ 일때 유의한 차가 있는 것으로 보았다.

결 과

Rat에서 적출된 자궁평활근 조직에 고농도 KCl (40 mM)을 처리하여 수축을 발생시켰다. 자궁평활근에서의 고농도 KCl에 의한 수축은 지속적으로 유지되었으며, 고농도 KCl을 PSS로 대체하면 수축은 이완되어 원래의 장력을 유지하였다(data not shown). 동일한 실험을 형광 Ca^{2+} 지시약인 fura-PE3를 부과한 rat의 자궁평활근을 이용하여 검토하였다. 고농도 KCl(40 mM)를 resting 상태의 rat 자궁평활근 조직에 처리하면, 신속한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 발생하였고, 이에 뒤따른 수축의 발생이 관찰되었다. 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 수축의 발생은 지속적이었다(Fig. 1). 수용체 agonist인 carbachol을 저농도에서 고농도로 cumulative하게 투여하여 자궁평활근의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 변화를 관찰하였다. Carbachol 1 μ M을 투여하면 적은 양의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 관찰되었으며 수축도 약간 발생하였다. Carbachol의 농도가 3 μ M로 증가함에 따라 $[Ca^{2+}]_i$ 은 현저히 증가되어, tonic성분을 포함한 phasic성 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 연속되어 울동적으로 나타났으며, 이와 동시에 수축 발현 역시 울동적으로 나타났다. Carbachol에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 tonic성분은 carbachol 농도가 상승함에 따라 증가되었고, 반면에 phasic성분은 감소하였다. 이와같은 carbachol에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 수축의 발생을 동반하였고, $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 변화는 좋은 일치를 보였다(Fig. 1).

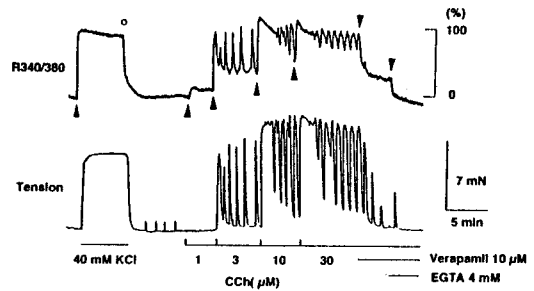


Fig. 1. Effects of high KCl and carbachol on $[Ca^{2+}]_i$ and contraction in myometrium isolated from non-pregnant rat. Traced from result typical five experiments.

Rat 자궁평활근의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축에 미치는 고농도 KCl 및 carbachol의 효과를 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 상관관계로 나타내었다. 각각의 농도를 cumulative하게 증가시키고 이에 따른 변화를, 본 실험 전에 처리된 40 mM KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 변화를 100 %로 계산하였다. 저농도의 KCl (10.8 mM)은 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축을 유의하게 변화시키지 않았으나, 23.3, 30.3, 41.2 mM로 상승함에 따라 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축이 증가하였다. 23.3 mM KCl에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 에서 tonic 성분을 포함한 phasic성분의 증가가 관찰되었고, 30.3 mM KCl부터는 현저한 tonic성 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 관찰되었다. 고농도 KCl에 의한 모든 수축 반응은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 반응과 항상 일치되어 나타났다. 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축 변화의 상관관계에서 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축은 동일한 증가경향을 보였으나, 직선적인 상관관계가 아닌 약간 $[Ca^{2+}]_i$ 쪽으로 치우친 곡선적인 관계를 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 carbachol에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 상관관계에서도 KCl과 동일한 경향이 관찰되었다(Fig. 2B). 자궁평활근의 수축시 발생하는 수축의 변화와 $[Ca^{2+}]_i$ 과의 상관관계를 면밀히 조사하기 위하여 Ca^{2+} channel agonist인 Bay k 8644를 투여하여 Ca^{2+} channel만이 open되었을 때의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 움직임과 수축의 상관관계를 관찰하였다. Bay k

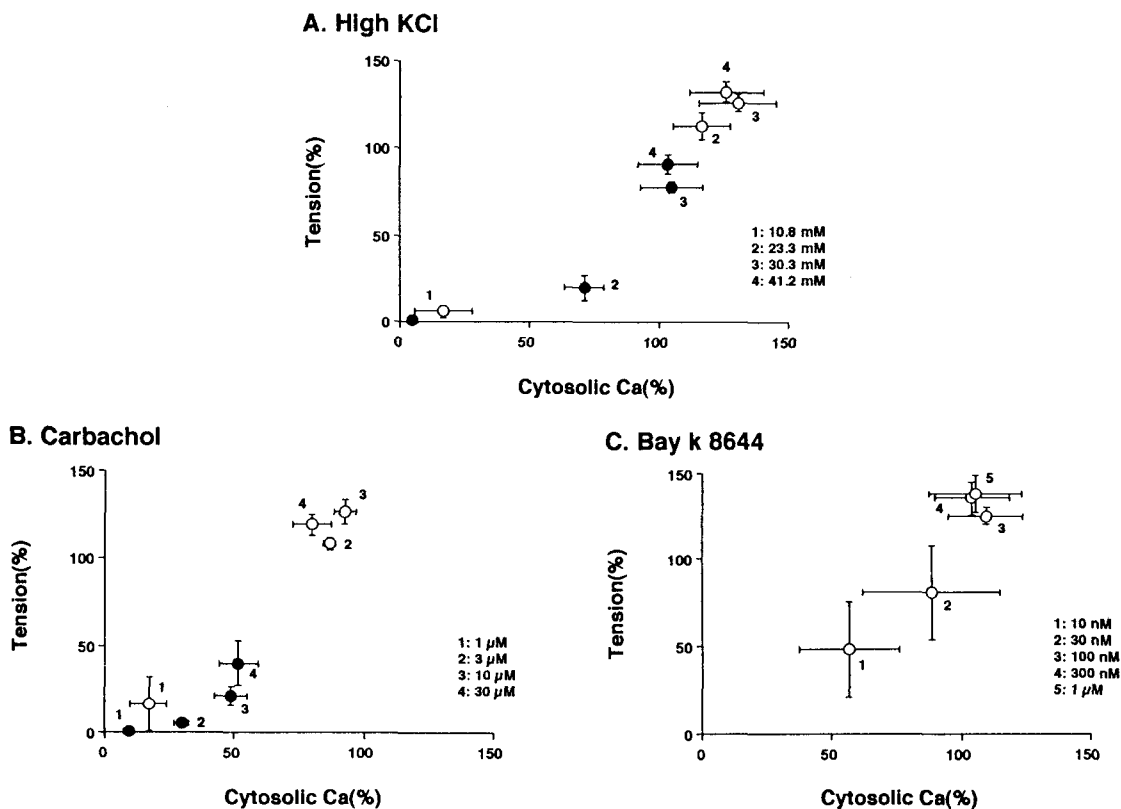


Fig. 2. $[Ca^{2+}]_i$ /contraction relationships in cumulative application of high KCl(A), carbachol(B) and Bay k 8644(C) in non-pregnant rat myometrium. Filled circles indicate the levels of sustained response and opened circles indicate the levels of phasic component in panel A and B.

8644를 10.8 mM KCl로 전처리한 자궁평활근에 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 수축의 발생이 관찰되었다. Bay k 8644는 10 nM부터 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가를 유발하여 농도가 증가됨에 따라 phasic 성의 울동적 반응이 상승하였다. 그러나 Bay k 8644에 의해 tonic성 반응은 나타나지 않았다. Bay k 8644에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 변화의 상관관계를 그래프로 나타내면 KCl에서의 상관관계와 동일한 경향을 나타내었다(Fig. 2C).

본 실험에서는 각 agonist 및 KCl 자극시에 발생하는 $[Ca^{2+}]_i$ 동원 기전을 관찰하기 위하여 l-type Ca^{2+} channel의 blocker인 verapamil을 이용하여 관찰하였다. l-type Ca^{2+} channel blocker는 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축을 완전히

억제하는 것으로 알려져 있다(Kim등, 1996). 또한 본 실험에서도 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축은 verapamil($10 \mu M$)로 거의 억제되었다(data not shown). 고농도의 carbachol($10 \mu M$)을 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가가 발생하여 carbachol 처치전의 고농도 KCl에 대해 각각 $96.7 \pm 6.5\%$, $131.7 \pm 17.1\%$ ($n=5$)를 나타내었다. Carbachol에 대한 반응이 일정하게 유지된 후, carbachol 존재하에서 verapamil $10 \mu M$ 을 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축이 억제되어 각각 고농도 KCl의 $21.0 \pm 5.5\%$, $7.1 \pm 1.5\%$ ($n=5$) 수준까지 감소하였다. 또한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 제거를 위해 EGTA 4 mM을 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 은 정지 수준이하로 감소되었고, 수축은 carbachol 처치전의 정지수준까

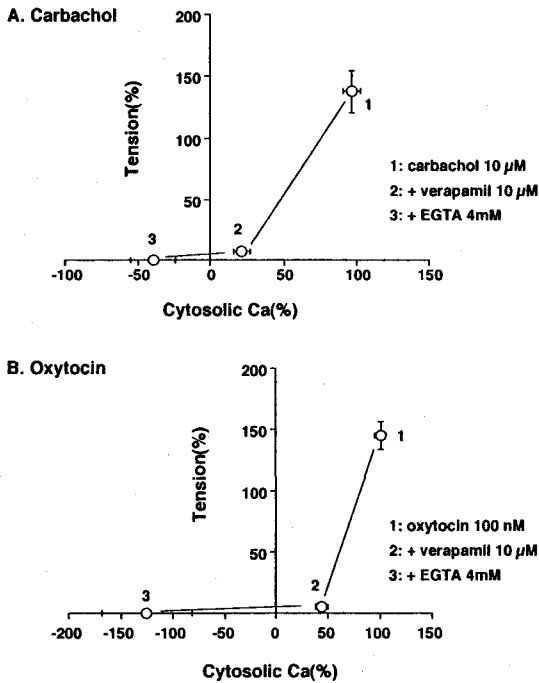


Fig. 3. Effects of verapamil and EGTA on $[Ca^{2+}]_i$ and contraction induced by carbachol(A) and oxytocin(B) in non-pregnant rat myometrium. After observation of control response to 40 mM KCl, carbachol(10 μ M) and oxytocin(100 nM) was added. After the $[Ca^{2+}]_i$ and contraction reached maximum, verapamil 10 μ M and EGTA 4 mM were sequentially added.

지 억제되었다. EGTA의 투여에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 억제는 KCl에 대해 각각 $-39.9 \pm 15.6\%$ ($n=5$)를 나타내었다(Fig. 3A).

한편 자궁평활근의 강력한 수축물질로 알려진 oxytocin을 투여하여 oxytocin이 자궁평활근의 $[Ca^{2+}]_i$ 및 수축에 미치는 효과에 대해 검토하였다. Oxytocin(100 nM)을 rat 자궁평활근에 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축이 증가하였다. Oxytocin에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가는 40 mM KCl에 대해 각각 $100.7 \pm 5.2\%$, $144.8 \pm 11.5\%$ ($n=4$)를 나타내었다. Oxytocin 존재하에서 verapamil 10 μ M을 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축이 각각 $43.6 \pm 6.0\%$,

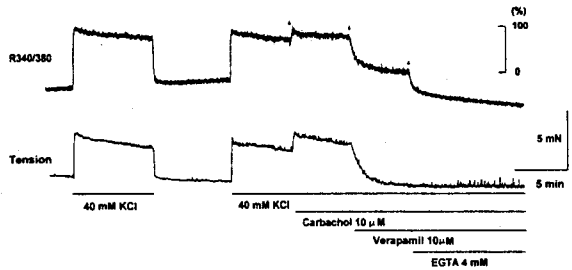


Fig. 4. Effects of carbachol and verapamil on high KCl stimulated $[Ca^{2+}]_i$ and contraction in non-pregnant rat myometrium. After the $[Ca^{2+}]_i$ and contraction induced by 40 mM KCl reached maximum, carbachol(10 μ M), verapamil(10 μ M) and EGTA(4 mM) were sequentially added.

$5.6 \pm 2.6\%$ ($n=4$) 수준까지 억제되었다. 그후 EGTA 4 mM을 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 은 감소되었으며 수축은 정지수준까지 억제되었다. EGTA의 투여에 의해 $[Ca^{2+}]_i$ 은 KCl에 대해 $124.9 \pm 43.5\%$ ($n=4$)를 나타내었다(Fig. 3B).

고농도 KCl 자극 후에 carbachol을 누적적으로 투여하여 고농도 KCl과 carbachol의 $[Ca^{2+}]_i$ 동원 기전을 비교 관찰하였다. 40 mM 고농도 KCl은 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축을 증가시켰고, 반응이 일정하게 유지될 때 carbachol 10 μ M을 투여하면 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 이 증가되었으며 수축도 증가되었다. 그러나 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가 경향에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이와같은 결과는 다른 agonist에서도 동일한 경향으로 나타났다(data not shown).

이상의 결과를 통해, carbachol 및 oxytocin은 rat 자궁평활근을 강력히 수축시키는 물질이며, 이들의 수축작용은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시키는 방법에 의해 이루어지는 것을 알 수 있었다. 그러나 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축 상관관계에서 나타난 결과에 의하면, 이들 수용체 agonist는 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축 상관관계와 유의한 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

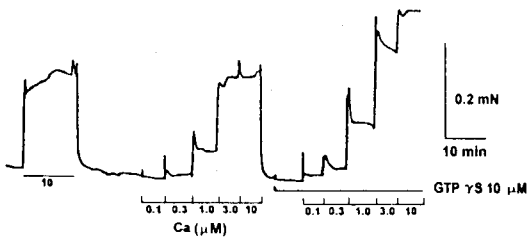


Fig. 5. Effects of GTP γ S on Ca $^{2+}$ -induced contraction in α -toxin permeabilized non-pregnant rat myometrium. After the observation of control response to 10 μ M Ca $^{2+}$, 0.1~10 μ M Ca $^{2+}$ was cumulatively added. After treatment muscle strips with relaxing solution, 0.1~10 μ M Ca $^{2+}$ was cumulatively added in presence of GTP γ S 10 μ M.

혈관 등 평활근에서 수용체 agonist는 GTP binding protein을 통해 평활근 수축을 조절하고 있는 것이 알려져 있다. 그래서 본 연구에서는 자궁평활근을 α -toxin으로 permeabilizing하여 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 clamp한 상태에서 수용체 agonist의 수축 효과를 검토하였다. α -Toxin으로 permeabilizing한 rat 자궁평활근에 Ca $^{2+}$ (0.1~10 μ M)을 투여하면 tonic 성의 수축이 농도의존적으로 증가하여, 10 μ M Ca $^{2+}$ 에서 최대 수축반응이 발생하였다. Ca $^{2+}$ 에 의한 자궁평활근의 수축은 relaxing solution의 처치에 의해 정지상태로 회복되었다. GTP와 agonist의 효과를 나타낼 수 있는 GTP γ S 10 μ M의 존재하에서 0.1~10 μ M의 Ca $^{2+}$ 을 투여하면 Ca $^{2+}$ 수축은 더욱 증가되었다(Fig. 5). 또한 각 농도의 Ca $^{2+}$ 수축시에 GTP 100 μ M과 carbachol 10 μ M을 동시에 투여하여도 Ca $^{2+}$ 수축은 더욱 증가되는 것이 관찰되었다(data not shown).

고 찰

본 연구에서 우리는 rat 자궁평활근을 수축시키는 agonist들이 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 증가시키는 기전으로 수축을 발생시키는 결과를 관찰하였다. 고농도

KCl은 자궁평활근의 세포막을 depolarization하여 voltage dependent Ca $^{2+}$ channel을 open하는 것으로 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 증가시킨다. 본 실험에서, 비교적 낮은 농도의 KCl(\leq 23.3 mM)은 자궁평활근에서 phasic성 수축을 연속적으로 발생시켰다. 이러한 율동적인 반응시에 관찰되는 수축의 변화는 [Ca $^{2+}$] $_i$ 의 움직임과 밀접한 연관성을 가지고 있었다(Fig. 1). 고농도 KCl(\geq 30.3 mM)에서는 자궁평활근은 tonic성 수축을 나타내었는데, tonic성 수축에서도 [Ca $^{2+}$] $_i$ 의 지속적인 유지가 관찰되어 [Ca $^{2+}$] $_i$ 과 수축사이에서 좋은 일치를 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 세포막의 depolarization에 의한 수축의 발생과 [Ca $^{2+}$] $_i$ 동태의 특징은 단순히 voltage dependent Ca $^{2+}$ channel을 활성화시켜 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 증가시키는 Bay k 8644에 의해서도 동일하게 나타났다(Fig. 2C). 한편 수용체 agonist인 carbachol과 oxytocin은 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 증가시켰고, 이에 따른 수축이 발생하였다. 수용체 agonist에 의한 자극시에는 저농도에서 고농도에 이르기까지 phasic성 수축이 연속적으로 발생되고 [Ca $^{2+}$] $_i$ 의 변화도 phasic성이 연속적으로 나타나 [Ca $^{2+}$] $_i$ 과 수축은 일치를 보였다. 이러한 phasic성 수축의 발생은 농도가 상승함에 따라 감소하였으나, tonic 성분은 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 자궁평활근을 수축하는 고농도 KCl, Bay k 8644, carbachol 및 oxytocin은 모두 [Ca $^{2+}$] $_i$ 을 증가시키는 기전을 통하여 수축을 발생하는 것을 알 수 있었다. 이는 phasic 및 tonic 반응시에 공통적으로 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 본 연구에서의 결과는 Szal등(1994)이 human의 자궁평활근을 이용한 spontaneous 수축과 고농도 KCl 수축에서 보고한 내용과 일치되고 있다.

본 연구의 carbachol 및 oxytocin 자극시에 verapamil을 고농도로 투여하였을 때에도 수축은 거의 완전히 억제되었으나, [Ca $^{2+}$] $_i$ 은 잔존하여 [Ca $^{2+}$] $_i$ 량과 수축의 발생량 사이에 불일치를 보였다(Fig. 1, 3). 이는 carbachol과 oxytocin은 voltage dependent Ca $^{2+}$ channel 이외의 Ca $^{2+}$ channel(verapamil insensitive Ca $^{2+}$ channel)을

이용하여 $[Ca^{2+}]_i$ 을 동원하는 것으로 생각할 수 있다. 자궁평활근에는 voltage dependent Ca^{2+} channel 이외에 oxytocin 등에 의해 nonselective cation channel이 open되는 것이 보고된 바 있어 (Inoue 등, 1990), 이를 통한 세포의 Ca^{2+} 의 influx의 가능성도 시사된다. 그러나, 이와같은 결과는 고농도 KCl 자극시에도 관찰되는 현상이며, 고농도 KCl의 자극으로 nonselective cation channel이 open될 가능성이 없는 것으로 보아 nonselective cation channel에 의한 Ca^{2+} influx는 아닐 것이다. 우리는 고농도 KCl에 l-type Ca^{2+} channel blocker의 submaximum 농도를 투여하면 수축은 완전히 억제되나 $[Ca^{2+}]_i$ 은 약간 잔존(40~50%)해 있는 것을 발견하였다(Kim 등, 1995b; 1996). 따라서 본 실험에서 발견된 carbachol에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 불일치는 고농도 KCl에서도 관찰되는 수축에 필요한 Ca^{2+} threshold인 것으로 사료된다. 또한 자궁평활근을 포함한 평활근에서는 inositol 1,4,5-trisphosphate에 의해 Ca^{2+} 저장고로 부터의 Ca^{2+} release가 일어난다 (Carsten & Miller, 1985). 그러나, 평활근의 Ca^{2+} 저장고인 SR로 부터의 Ca^{2+} 의 release는 phasic이며, 이에 따른 수축의 발생도 일시적인 것에 지나지않는다(Monlar & Hertelandy, 1990; Kim 등, 1995b). 세포내 Ca^{2+} 저장고로 부터의 Ca^{2+} release는 Ca^{2+} 동원의 시간적 또는 용량적 한계성으로 보아, carbachol 및 oxytocin 수축시에 발견되는 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 불일치는 Ca^{2+} release 또는 용량의존성 Ca^{2+} influx에 의한 가능성은 희박한 것으로 사료된다.

세포외 고농도 KCl의 처치로 발생하는 세포막의 depolarization은 지속적인 수축(tonic)을 유발한다. 이러한 지속적인 수축의 발생은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 정지 level 이상 수준에서의 지속적인 증가와 연관하여 나타난다는 것이 혈관평활근에서 연구되었다 (Sato 등, 1988). 또한, 고농도 KCl에 의한 자극에 의해서는 수축과 $[Ca^{2+}]_i$ 의 지속적 증가와 myosin light chain phosphorylation의 증가를 유발하는 것이 다른 평활근 조직에서 보고되어 있다(Hori

등, 1992). 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 수축의 발생은 verapamil이나 nifedipine 등과 같은 organic Ca^{2+} channel blocker에 의해 완전히 억제되어진다(Karaki & Weiss, 1984). 이상의 결과로, 고농도 KCl에 의한 지속적인 수축의 발생은 voltage dependent Ca^{2+} channel의 open에 따른 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 의한 것이며, 이것은 myosin light chain의 phosphorylation을 일으키는 것을 알 수 있다. 반대로 혈관평활근에서 α -수용체 agonist와 기관평활근에서의 muscarinic agonist는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 농도를 증가시키고 수축을 발생시킨다. 또한 이 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 organic Ca^{2+} channel blocker에 의해 크게 억제되나, 수축의 억제는 비교적 약하다(Ozaki 등, 1990). 이 결과는 receptor agonist가 voltage dependent Ca^{2+} channel을 open하여 부분적인 수축을 일으키는 것을 말하며, $[Ca^{2+}]_i$ 에 independent한 수축의 발생이 수용체 agonist에 의해 발생하는 것을 말한다. 본 실험에서는 carbachol 및 oxytocin 자극에 대해 자궁평활근은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 수축의 발생을 일으켰으나, verapamil에 의해서는 대부분의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 발생이 억제되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3, 4). 이는 자궁평활근 수축제인 carbachol과 oxytocin은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 세포내로 이동시키는 기전으로 수축을 일으키며, 특히 Ca^{2+} channel의 open을 통한 세포외의 Ca^{2+} 의 influx가 이에 관여하는 것으로 사료되었다.

Rat aorta 평활근에서는 noradrenaline, prostaglandin, endothelin 등은 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시키는 기전으로 수축을 일으킨다. 이들 agonist에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 은 고농도 KCl에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 비해 같거나 적으나, 수축의 발생은 고농도 KCl에 비해 유의하게 크게 나타난다. 즉, 동일량의 $[Ca^{2+}]_i$ 에 의해 고농도 KCl에 의한 수축보다 더 큰 수축을 발생시킨다(Sato 등, 1988). 이 결과는 이들 agonist에 의해 어떤 세포내 contractile element의 Ca^{2+} -sensitivity가 증가하는 것을 의미하며, l-type Ca^{2+} channel blocker에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축 상관관계의 dissociation을 일으키는 결과로 작

용한다. 그러나 장관 등의 phasic성 또는 phasic 및 tonic의 혼합형 평활근에서의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 상관관계는 혈관 등 tonic성 평활근의 형태와 큰 차이가 있다. Teania의 carbachol에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가는 고농도 KCl의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 상관관계와 거의 비슷한 관계를 보인다(Mitui & Karaki, 1990). 또한 tonic과 phasic성의 혼합형 평활근인 guinea pig의 ileum의 자발적 수축시에도 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축은 아주 친밀한 상관관계를 보인다(Himpens & Somlyo, 1988). 이 결과는 장관평활근 조직의 수축에서 $[Ca^{2+}]_i$ 이 중요한 조절자인 것을 의미한다(Ozaki & Karaki, 1993). 본 실험에서 관찰된 자궁평활근의 agonist 수축의 $[Ca^{2+}]_i$ /수축 상관관계는 고농도 KCl과 Ca^{2+} channel activator인 Bay k 8644의 $[Ca^{2+}]_i$ /수축 상관곡선과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2). 이와 유사한 결과가 endothelin 자극시의 자궁평활근에서 관찰된 바 있다(Sakata & Karaki, 1992). 이와 같은 결과로 미루어, 자궁평활근에 대한 agonist의 수축기전은, 1) $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 크게 좌우되며, 2) 혈관 또는 기관평활근과는 달리 Ca^{2+} -sensitization을 증가시키는 기전은 크게 작용하지 않는 것을 알 수 있었다.

평활근의 수축성에 관한 연구 방법으로 평활근의 세포막을 detergent로 녹여 작은 pore를 작성하는 permeabilizing법이 있다. 특히, α -toxin을 이용한 permeabilizing법은 세포막에서 만들어지는 pore가 작아 cytosolic protein의 leak가 방지되어 signal transduction system이 유지될 수 있다는 점에서 유용한 방법으로 알려져 있다(Kitazawa 등, 1989). 혈관 등에서는 같은 량의 $[Ca^{2+}]_i$ 으로 clamp된 상태에서 noradrenaline의 투여는 Ca^{2+} 에 의한 수축의 증가를 가져온다. Noradrenaline에 의한 혈관의 Ca^{2+} -sensitization의 증가는 GTP를 요구하며, 또한 $GTP\gamma S$ 의 처치에 의해서도 동일한 결과를 관찰할 수 있다. 한편 이와같은 Ca^{2+} -sensitization의 증가는 phorbol ester에 의한 protein kinase C의 활성화, 또는 small GTP-binding protein인 rho에 의해서도 조절된다(Sato 등,

1992; Kokobu 등, 1995). 본 연구에서도 GTP 존재하에서 carbachol은 Ca^{2+} -sensitization을 증가시켰고, $GTP\gamma S$ 에 의해 동일한 결과를 유도할 수 있었다(Fig. 5). 동일한 결과가 β -escin을 이용한 임신 자궁평활근 실험에서도 관찰되었다(Izumi 등, 1995). 그러나 이와같은 결과는 본 실험에서 얻은 형광 Ca^{2+} 지시약을 이용한 실험 결과와 상반되고 있다. $[Ca^{2+}]_i$ /수축의 상관관계에서 얻은 결과에 의하면, 본 실험에서 사용된 자궁평활근에서는 agonist에 의한 Ca^{2+} -sensitization의 상승은 존재하지 않았다. 본 실험에서 관찰된 결과의 차이는 intact한 평활근에서의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정과 세포막을 permeabilizing한 평활근에서의 실험적인 상태의 차이에 의한 것 등이 사료되며, 그 원인으로 α -toxin 등에 의해 세포막에 생긴 pore를 통해 Ca^{2+} -sensitization을 억제조절하는 protein의 leak 등의 가능성을 들 수 있다. 그러나, 이 문제에 대한 명확한 해명을 위해서는 금후 보충 실험이 이루어져야 하며, 더우기 앞으로 형광 Ca^{2+} 지시약 및 permeabilized fiber를 이용한 두 실험계의 복합적 분석에 있어서는 충분한 주의가 필요할 것으로 사료되었다.

한편, 우리는 α -toxin으로 permeabilizing된 자궁평활근에서 protein kinase C를 활성화시키는 phorbol ester는 자궁평활근의 Ca^{2+} 수축을 억제 또는 증가시키지 않으며, phorbol ester에 의한 수축억제의 $[Ca^{2+}]_i$ /수축 상관관계는 verapamil과 동일한 것을 보고하였다(Kim 등, 1996). 즉, 혈관 등에서 강력한 Ca^{2+} -sensitization의 대표적 증가요인인 protein kinase C pathway가 자궁평활근의 수축에는 중요한 역할을 행하지 않음을 의미한다. Szal 등(1994)의 결과와 이상의 본 실험결과로 미루어, 자궁평활근의 carbachol 및 oxytocin 수축에 있어서는 Ca^{2+} -independent 기전보다는 Ca^{2+} -dependent pathway가 중요한 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구에서는 rat 비임신 자궁평활근(발정기)

을 이용하여 고농도 KCl, carbachol 및 oxytocin에 의해 일어나는 수축의 발생과 $[Ca^{2+}]_i$ 동원의 특성에 대해 연구하였다. 낮은 농도의 KCl 용액 (≤ 23.3)은 자궁평활근의 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축을 유효적으로 증가시켰다. 그러나 고농도의 KCl (≥ 30.3)에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 및 수축의 발생이 지속적으로 유지되었다. 각 농도의 KCl에 의한 유효적 또는 지속적 수축은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화와 밀접한 연관성을 나타냈다. Carbachol을 자궁평활근에 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가가 발생하였고, 지속성을 포함한 유효적인 변화를 보였다. Carbachol에 의한 자궁평활근의 수축도 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화와 밀접한 연관성을 보였다. 이상의 결과로, 고농도 KCl과 carbachol에서 관찰되는 $[Ca^{2+}]_i$ /수축 상관관계는 비슷한 경향을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

Carbachol 및 oxytocin의 최대농도인 $10 \mu M$ 과 $100 nM$ 을 각각 단독 투여하여 얻은 $[Ca^{2+}]_i$ 및 수축의 증가를 고농도 KCl ($40 mM$)에 의한 반응과 비교하면 carbachol 및 oxytocin에 의한 수축의 발생이 고농도 KCl 보다 약간 큰 것이 관찰되었다. 그러나, 고농도 KCl $40 mM$, carbachol $10 \mu M$ 및 oxytocin $100 nM$ 에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축은 l-type Ca^{2+} channel blocker인 verapamil $10 \mu M$ 에 의해 크게 억제되었다. 또한 $40 mM$ 고농도 KCl에 carbachol ($10 \mu M$)을 누적적으로 투여하면 $[Ca^{2+}]_i$ 과 수축의 증가가 관찰되었으나 $10 \mu M$ 의 verapamil에 의해 완전히 억제되었다. 이상의 결과에서, 비임신 자궁평활근에 대한 carbachol 및 oxytocin의 수축은 세포의 Ca^{2+} 의 유입을 통해 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시키는 방법으로 유발하며, Ca^{2+} -sensitization의 증가기전은 큰 역할을 하지 않는 것을 알았다.

참 고 문 헌

- Anwer H and Sanborn BM: *Changes in intracellular free calcium in isolated myometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of guanine nucleotide-sensitive protein.* *Endocrinol* 124: 17-23, 1989
- Carsten ME and Miller JD: *Ca²⁺ release by inositol triphosphate from Ca²⁺ transporting microsomes derived from uterine sarcoplasmic reticulum.* *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1027-1031, 1985
- Himpens B and Somlyo AP: *Free-calcium and force transients during depolarization and phosphorylation and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle.* *J Physiol (Lond)* 395: 507-530, 1988
- Hori M, Sato K, Sakata K, Ozaki H, Takano-Ohmuro H, Tsuchiya T, Sugi H, Kato I and Karaki H: *Receptor agonists induce myosin phosphorylation dependent contractions in vascular smooth muscle.* *J Pharmacol Exp Ther* 261: 506-512, 1992
- Inoue Y, Nakao K, Okabe K, Izumi H, Kanda S, Kitamura K and Kuriyama H: *Some electrical properties of human pregnant myometrium.* *Am J Obstet Gynecol* 162: 1090-1098, 1990
- Izumi H, Byam-Smith M and Garfield RE: *Gestational changes in oxytocin- and endothelin 1- induced contractility of pregnant rat myometrium.* *Eur J Pharmacol* 278: 187-194, 1995
- Karaki H: *Ca²⁺ localization and sensitivity in vascular smooth muscle.* *Trends Pharmacol Sci* 10: 320-328, 1989
- Karaki H and Weiss G: *Calcium channel in smooth muscle.* *Life Sci* 42: 111-122, 1984
- Kim BK, Mitsui M and Karaki H: *The long-term inhibitory effect of a Ca²⁺ channel blocker, nisoldipine, on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle.* *Eur J Pharmacol* 223: 157-162, 1992
- Kim BK, Ozaki H, Hori M, Takahashi K, Shibata N and Karaki H: *Increase in the contractility of uterine smooth muscle after gestation: possible involvement of actin-mediated regulation.* *Jap J Pharmacol* 67: 205p, 1995a
- Kim BK, Ozaki H, Lee SM and Karaki H: *Increased sensitivity of myometrium to the contractile effect of PAF before delivery.*

- Brit J Pharmacol* 155: 1211-1214, 1995b
- Kim BK, Ozaki H, Lee SM and Karaki H: *Increased inhibitory effect of phorbol ester on cytosolic Ca²⁺ level and contraction in myometrium after gestation. Jap J Pharmacol: (in press), 1996*
- Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AV and Somlyo AP: *Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. J Biol Chem* 264: 5339-5342, 1989
- Kitazawa T, Gaylinn BD, Denney GH and Somlyo AP: *G-protein-mediated sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. J Biol Chem* 266: 1708-1715, 1991
- Kokubu N, Satoh M and Takayanagi I: *Involvement of botulinum C3 sensitive GTP binding proteins in alpha 1 adrenoceptor subtypes mediating Ca²⁺-sensitization. Eur J Pharmacol* 290: 19-27, 1995
- Marc S, Leiber D and Harbon S: *Carbachol and oxytocin stimulate the generation of inositolphosphates in the guinea-pig myometrium. FEBS Lett* 201: 9-14, 1986
- Mitsui M and Karaki H: *Dual effects of carbachol on cytosolic Ca²⁺ and contraction in intestinal smooth muscle. Am J Physiol* 258: C787-793, 1990
- Monlar M and Hertelandy F: *Ca²⁺ release and IP3 production in avian uterine cells ; effects of PGF2 α and VAT. Am J Physiol* 259: E872-880, 1990
- Ozaki H, Sato K, Satoh T and Karaki H: *Simultaneous recordings of calcium signals and mechanical activity using fluorescent dye fura-2 in isolated strips of vascular smooth muscle. Jap J Pharmacol* 45: 429-433, 1987
- Ozaki H and Karaki H: *Different Ca²⁺-sensitivity in phasic and tonic types of smooth muscles. Biol Signals* 2: 253-262, 1993
- Sato K, Ozaki H and Karaki H: *Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura-2. J Pharmacol Exp Ther* 246: 294-300, 1988
- Sato K, Hori M, Ozaki H, Takano-Ohmuro H, Tsuchiya T, Sugi H and Karaki H: *Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther* 261: 497-505, 1992
- Sakata K and Karaki H: *Effects of endothelin on cytosolic Ca²⁺ level and mechanical activity in rat uterine smooth muscle. Eur J Pharmacol* 221: 9-15, 1992
- Szal SE, Repke JT, Graves EW, Parker CA and Morgan KG: *[Ca²⁺]_i signaling in pregnant human myometrium. Am J Physiol* 267: E77-87, 1994
- Wray S: *Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. Am J Physiol* 264: C1-18, 1993