

돼지 분만 시기의 조절에 관하여
IV. 자궁 평활근의 운동성에 대한 ATP의 영향

박상은·황보원·변유성·조광제
경상남도가축위생시험소중부지소

Control of Parturition Time on Pig

IV. Effect of ATP on Uterine Smooth Muscle Motility

Sang-Eun Park, Bo-Won Hwang, Yu-Seong Byuyn, Kwang-Je Cho

Central Branch of Kyongnam Veterinary Service Laboratory

Abstract

The effects of adenosine 5'-triphosphate(ATP) were investigated on the uterine smooth muscle motility in the pig.

The results were summarized as follows:

1. The effects of the porcine uterine smooth muscle and the contractile responses increased between the concentration of ATP 10^{-5} and 10^{-3} M with a dose-dependent manner.
2. The contractile response induced by ATP(10^{-4} M) was not blocked by pretreatment with cholinergic receptor blocker, atropine(10^{-6} M).
3. The contractile response induced by ATP(10^{-4} M) was not blocked by pretreatment with α -adrenergic receptor blocker, phentolamine(10^{-6} M) and β -adrenergic blocker, propranolol (10^{-6} M).
4. The contractile response induced by ATP(10^{-4} M) was not appeared in Ca^{++} -free medium. As the concentration of Ca^{++} in Ca^{++} -free medium was increased, the contractile response induced by ATP(10^{-4} M) was enhanced but was completely inhibited by pretreatment with Ca^{++} -channel blocker, papaverine(10^{-6} M) or verapamil(10^{-6} M).

From these results, it was concluded that the effects of ATP were the contraction mediated by purinergic receptor in uterine smooth muscle of pig.

Key Word : ATP, Porcine uterine smooth muscle, Purinergic receptor.

서 론

돼지 자궁은 일반 유강장기와 같이 평활근으로 이루어져 있으며, 다른 부위의 평활근과 같이 자율신경계의 지배를 받고 있다. 그들의 기능은 교감신경과 부교감신경의 길항작용에 의해 조절되어지는 것으로 알려져 있다.^{1,2,3)}

Burnstock 등⁴⁾이 기니픽의 결장뉴에서 adrenergic receptor와 cholinergic receptor를 차단시킨 후 직접 결장 평활근을 자극했을 때, 그 자극에 대한 반응이 생긴다는 것을 관찰하였다. 이와 같은 반응은 자극 자체에 의해 생길 가능성이 있기 때문에 평활근의 활동전위(action potential)에는 영향을 주지 않고 신경 전도작용의 차단에만 관계되는 tetrodotoxin을 처리하게 되면 나타났던 그 반응이 사라지는 것으로 보아, 분명히 자율신경계의 전형적인 adrenergic, cholinergic이 아닌 제3의 신경섬유가 존재하고 있음을 시사하였다. 그래서 그들은 이 신경섬유를 noncholinergic, nonadrenergic 신경섬유라고 명명하였으며,⁵⁾ 이러한 신경섬유는 기니픽 결장에서 뿐만 아니라 포유류와 조류의 위 그리고 토끼, 기니픽, 고양이와 랫트의 소장에서도 그 존재가 확인되었다.⁶⁻¹⁰⁾

Nonadrenergic, noncholinergic 신경섬유의 신경전달물질로는 serotonin,¹¹⁻¹³⁾ histamine,^{14,15)} prostaglandin¹⁶⁾과 adenosine triphosphate^{17,19)} 등으로 추정되고 있으나, 이들중 purine nucleotide계 물질이 가장 유력한 신경전달물질로 인정되고 있다.

그래서 Burnstock은 nonadrenergic, noncholinergic 신경섬유를 purinergic 신경섬유라고 명명하였다. 자궁 평활근에서는 이들 섬유의 존재에 대한 가능성이 추측되었을뿐,¹⁸⁾ 이들 신경섬유

에 대한 연구나 전달물질에 대해서는 별로 알려진 바가 없다.

한편, 근수축에 필수요소인 Ca^{++} 의 동원기전은 평활근의 있어서는 아직 확실한 이론이 정립되어 있지 않다. 그러나 Bolton²⁰⁾에 의하면 평활근의 수축에 있어서 Ca^{++} 동원 과정은 막전위에 민감한 ion channel을 통하든지, receptor에 조절되어지는 ion channel을 통하든지, 세포내에 저장되어 있는 Ca^{++} 을 어떠한 방법을 통해서든지 유리시킴으로써 일어날 것이라고 추측하고 있다.

그래서 본연구자들은 인위적 분만시기의 조절을 위한 연구의 일환으로 돼지 자궁 평활근의 운동성에 대한 ATP의 효과와 그 효과시 Ca^{++} 의 동원이 어디로 부터 이루어지는지를 밝힘으로써 분만생리 연구에 대한 기초자료를 제공코져 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 임상적으로 건강하다고 인정되는 Landrace종 암돼지 50두(체중 80 ± 5 kg)를 사용하였다.

자궁 평활근 절편의 제작 : 실험동물을 타격에 의해 실신시킨 후 복강을 열고 자궁을 적출하여 95% O_2 와 5% CO_2 의 혼합 가스가 공급되는 4°C의 냉한 정상 생리적 영양액에서 길이 1.5cm, 폭 0.5cm되게 자궁 평활근 절편을 제작하였다.

영양액의 조성 : 정상생리적 영양액은 NaCl, 120;KCl, 4.75;CaCl₂, 1.7;MgSO₄, 1.20;NaHCO₃, 25;KH₂PO₄, 1.2;Glucose, 6.4mM로 조정된 Kreb's용액(pH 7.4)을 사용하였으며, Ca^{++} -free 영양액은 정상생리적 영양액에서 Ca^{++} 만을 제거하고 1.0mM ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA)를 첨가하여 사용하였다.

운동성의 기록 : 제작한 자궁 평활근 절편을 20ml용 organ bath에 옮겨서 한쪽 끝은 organ bath 밑바닥에 고정시키고 다른 쪽 끝은 상하 높이를 조절할 수 있도록 준비된 근수축변환기(Force transducer, D-1, Bioscience)에 연결하여 Physiograph(MD4, Bioscience)를 통하여 자궁 평활근의 등척성 수축(isometric contraction)을 기록하였다.

약물처리 방법과 사용된 약물 : 약물처리는 20ml organ bath에 200 μ l이하의 약물을 처리하여 100배 이상 희석되도록 하였으며, 약물처리 후 정상 생리적 영양액으로 3번 이상 세척하여 1시간 이상 평형시킨 후 다음 실험을 실시 하였다. 본 실험에 사용된 약물은 adenosine triphosphate disodiumsalt(ATP, Sigma), atropine sulfate(Sigma), phentolamine mesylate(Ciba), propranolol hydrochloride(Sigma), papaverine(Sigma), verapamil(Sigma)등을 사용하였다.

결 과

• ATP농도변화에 따른 자궁 평활근의 운동성에 대한 영향

돼지 자궁 평활근 절편을 ATP로 한번 처리했을 때 즉시 수축이 일어나서 그 수축은 대개 5분 이내에 감소되어 기초 장력으로 되돌아갔다. ATP농도변화에 따른 수축의 정도는 10^{-5} M에서 수축을 나타내기 시작하여 10^{-3} M에서 최대의 수축반응을 나타내었으며 ATP농도 변화에 따른 수축정도는 농도증가에 비례하여 수축 현상이 증가하는 곡선이 타나났다.(그림 1.) ATP의 ED₅₀은 5×10^{-5} M 이었다.

ATP에 의해 나타난 수축현상은 정상 생리적 영양액으로 3번 이상 세척하면 즉시 본래의 장력으로 되돌아가는 가역적 반응이 관찰되었다.

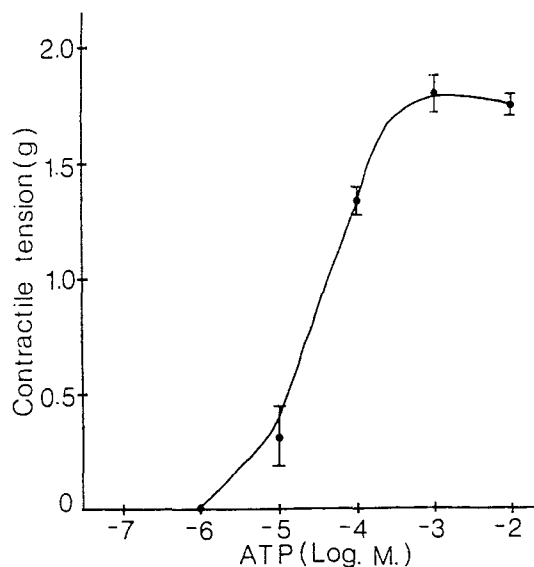


Fig 1. Dose-responses of ATP on motility in uterine smooth muscle of pig.

• ATP의 작용에 대한 cholinergic receptor차단제의 영향

돼지 자궁 평활근 절편에서 ATP의 수축효과에 대한 cholinergic receptor차단제의 영향을 관찰하기 위해서 cholinergic receptor 차단제인 atropine 10^{-6} M을 처리하고 5분 후에 ATP 10^{-4} M을 첨가한 결과 atropine처리로서 ATP의 수축현상이 차단되지 않았다.(그림 2.)

• ATP의 작용에 대한 adrenergic receptor차단제의 영향

α -adrenergic receptor 차단제인 phentolamine과 β -adrenergic receptor차단제인 propranolol을 영양액에 각각 처리하고 5분 후에 ATP를 첨가하여 ATP의 수축효과에 대한 α -adrenergic 및 β -adrenergic receptor차단제의 영향을 관찰 하였다.

혈관에서 norepinephrine의 작용을 완전히 차단할 수 있는 10^{-6} M의 phentolamine과 10^{-6} M의

propranolol을 각각 처리시킨 결과 ATP에 의해 생긴 수축현상이 phentolamine과 propranolol처리로써 차단되지 않았다.(그림 3.)

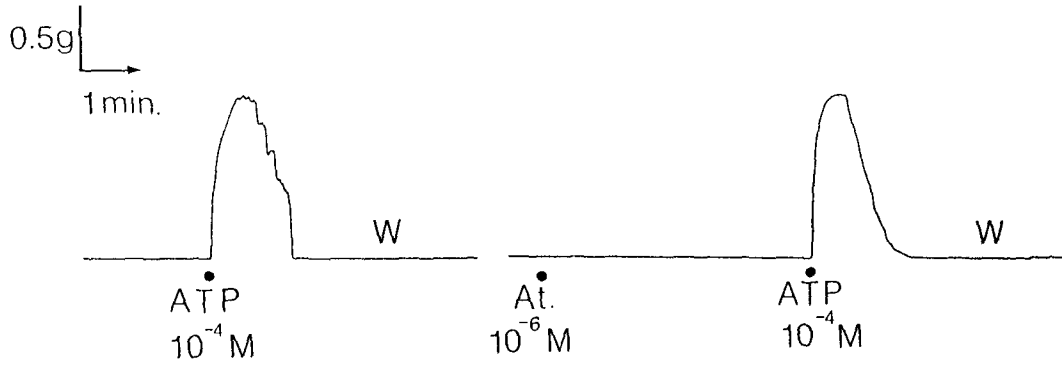


Fig 2. Effect of atropine (At. 10^{-6} M) on contractile response induced by ATP (10^{-4} M) in uterine smooth muscle of pig. cholinergic-receptor blocker, atropine (10^{-6} M), does not block the contractile response induced by ATP (10^{-4} M)

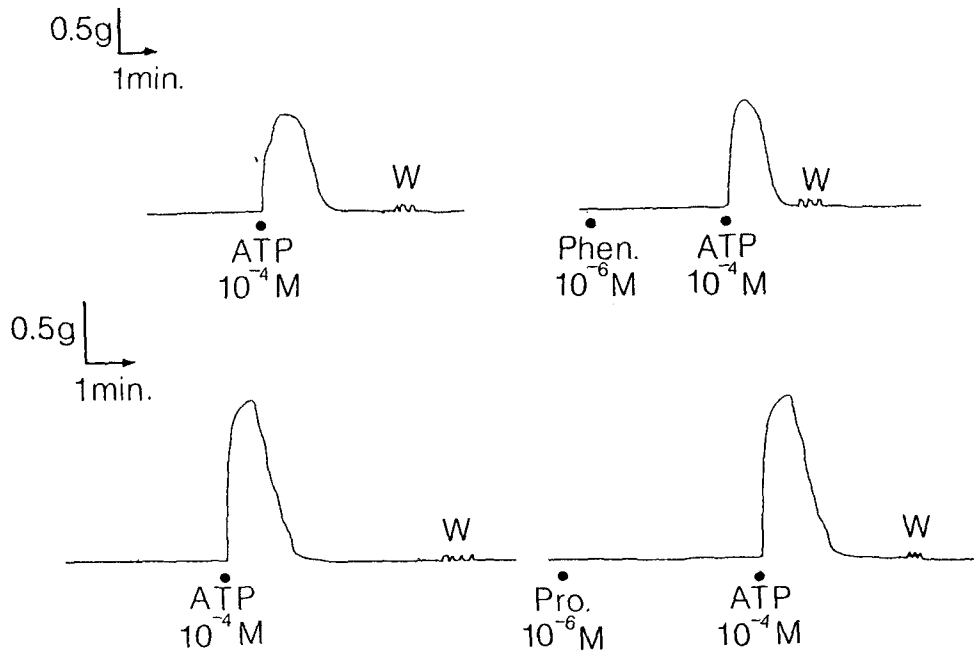


Fig 3. Effects of phentolamine (Phen. 10^{-6} M) and propranolol (Pro. 10^{-6} M) on contractile response induced by ATP (10^{-4} M) in uterine smooth muscle of pig. adrenergic-receptor blockers, phentolamine (10^{-6} M) or propranolol (10^{-6} M), do not block the contractile response induced by ATP (10^{-4} M).

• ATP의 작용에 대한 외부 Ca^{++} 의 영향

돼지 자궁 평활근 절편이 ATP에 의해 수축반응을 일으킬 때 Ca^{++} 의 동원이 어디로 부터 이루어지는 지를 관찰하기 위하여, 자궁 평활근 절편을 1.0mM EGTA가 첨가된 Ca^{++} -free영양액에서 60분간 평형시킨 후 ATP(10^{-4} M)를 처리한 결과 수축반응이 전혀 나타나지 않았으며, Ca^{++} -channel차단제인 papaverine(10^{-6} M), 또는

verapamil(10^{-6} M)를 각각 전처리한 후 ATP(10^{-4} M)를 첨가 처리했을 때도 전혀 수축반응이 나타나지 않았다.(그림 4.) 그러나 Ca^{++} -free영양액에 Ca^{++} 을 농도별로 각각 전처리하여 평형시킨후 ATP(10^{-4} M)를 처리한 결과, 외부 Ca^{++} 농도가 점점 증가함에 따라 ATP에 대한 수축반응도 증가하는 양상을 보였다.(그림 5.)

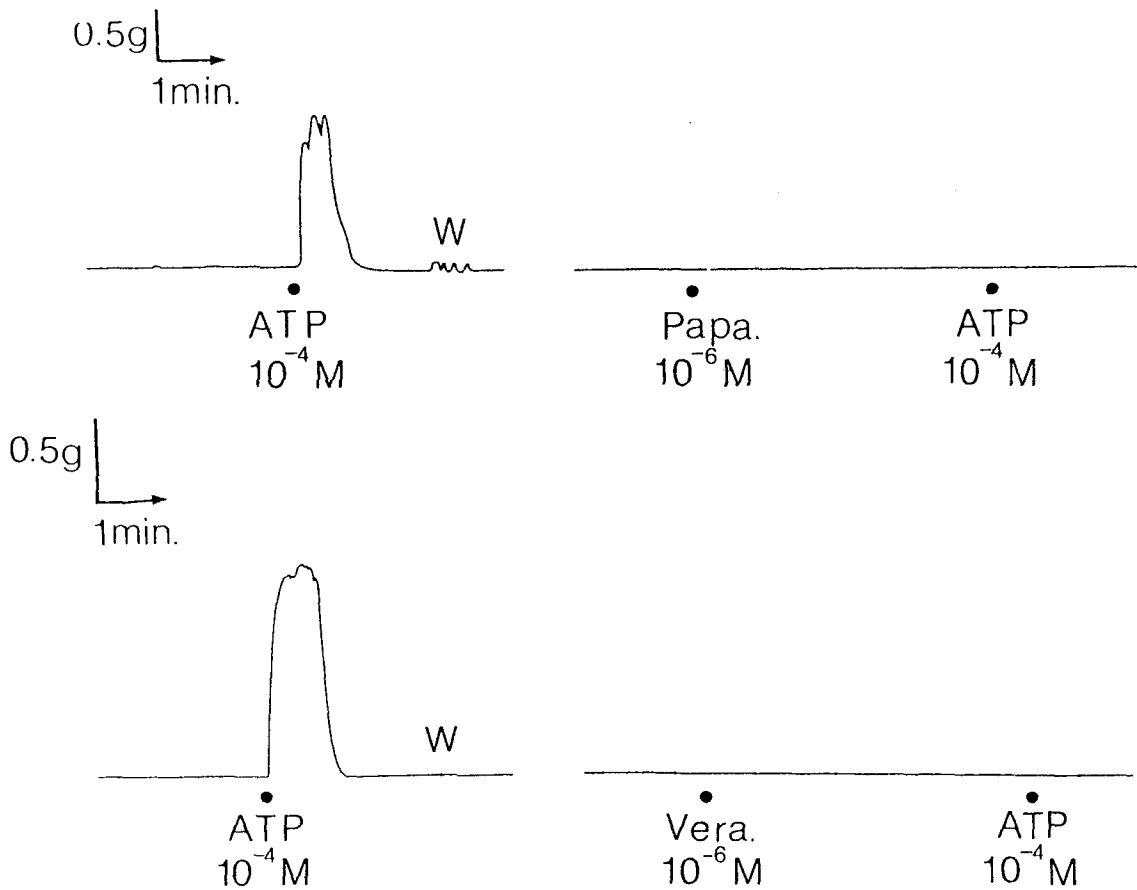


Fig 4. Effects of papaverine(Papa. 10^{-6} M), or verapamil(Vera. 10^{-6} M) on contractile response induced by ATP(10^{-4} M) in uterine smooth muscle of pig.

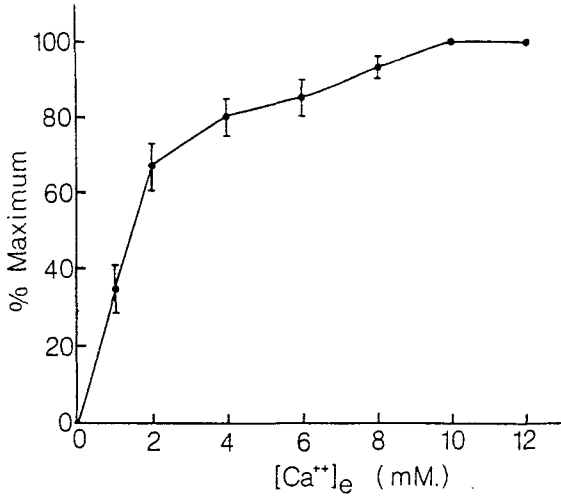


Fig 5. Ca^{++} contraction-response relationship contractile responses induced by ATP (10^{-4} M) in uterine smooth muscle of pig.

고 찰

생체내 중요한 에너지원의 하나인 ATP는 근육수축시 수축기구에 존재하는 myosin-ATPase에 의해 분해되어 근육수축에 필요한 에너지를 공급하는 데도 사용되지만, 본 실험에 사용된 ATP는 근육수축시에는 근육세포내에서 에너지원으로써 쓰여지는 상태가 아니면 ATP가 영양액속에 주어지더라도 세포막을 통과할 수 없는 상태이기 때문에¹⁸⁾ 영양액에 주어진 ATP는 세포내 에너지로 쓰이는 것은 아니다. 또한 Moritoki등²¹⁾에 의하면 phosphate group이 존재하지 않는 adenosine, inosine도 근육수축 현상을 일으키므로 purine계의 근육수축 현상은 에너지를 가진 phosphate group이 필수적으로 요구되는 것이 아님을 밝혔다. Burnstock¹⁸⁾에 의하면 신경말단에서 발견된 ATP는 adrenergic과 cholinergic말단에서 발견된 "large granular vesicle"과는 완전히 다른 "large opaque ves-

icle"내에 존재한다고 보고하였으며, ATP는 신경말단에서 유리된 후 ATPase에 의해 분해되어지며, 분해된 adenosine은 신경말단으로 재흡수되어 다시 ATP의 재형성이 일어난다고 하였다.

본 실험에서 ATP가 dose-dependent하게 수축반응을 보였는데 이와 같은 효과는 Moritoki등²¹⁾이 기니픽 자궁근에서 ATP가 수축반응을 보인다고 한 것과 일치된 결과이다. 본 실험에서 ATP가 자궁 평활근에 일으킨 수축이 acetylcholine과 histamine에 의한 수축과는 달리 짧은 시간내에 긴장성이 떨어졌는데, 이러한 현상은 Mg-activated ATPase와 5'-nucleotidase의 작용에 의해 adenosine으로 분해되기 때문에 생긴 것으로 추측된다.²²⁾ 그리고 Ninomiya와 Suzuki²³⁾는 생쥐 자궁 근육 세포에서 ATP가 호르몬에 관계없이 세포막의 전위를 변화시킨다고 하였는데 이 때 생긴 과분극 상태는 세포막의 K^+ conductance증가로 생긴 것이며, 쉽게 tachyphylaxis현상이 생긴다고 하였다.

동물들의 여러 신경지배 기관에서 noncholinergic-, nonadrenergic- 신경섬유를 통한 반응이 보고된 바 있는데, 기니픽 결장뉴 절편에서 guanethidine으로 adrenergic receptor를 차단하고 atropine으로 cholinergic receptor를 차단한 상태에서도 약물자극에 대한 반응이 보인다고 보고⁴⁾함으로써 noncholinergic-, nonadrenergic- 신경섬유의 존재를 시사하였다.

본 실험에서 ATP의 수축효과가 cholinergic receptor차단제나 adrenergic receptor차단제의 의해 차단되지 않는다는 것은 아마도 돼지 자궁 평활근에서 ATP는 nonadrenergic-, noncholinergic receptor를 통해 작용을 나타낼 가능성이 있는 것으로 추정할 수 있다.

한편, 모든 근육이 수축할 때에는 Ca^{++} 이 필수적으로 이용되는데, 골격근의 경우에는 근세포

내 Ca^{++} 저장소가 있어 내부 Ca^{++} 이 근수축시 이용되지만, 평활근은 형태학적으로 근장 그물의 발달이 미약해 외부 Ca^{++} 이 유입되어 수축반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 평활근에서는 근수축시 Ca^{++} 동원이 막전위에 민감한 ion channel을 통하든지, receptor에 조절되어지는 ion channel을 통하든지, 세포내 저장되어 있는 Ca^{++} 을 어떠한 방법을 통해서든지 유리시킴으로써 일어날 것이라고 보고한 바 있다.²⁰⁾ 본 실험에서 Ca^{++} -free영양액에 ATP를 처리했을 때 수축현상이 전혀 나타나지 않았으며, Ca^{++} -channel 차단제인 verapamil($10^{-6}M$), 또는 papaverine($10^{-6}M$)을 처리하고 ATP를 첨가 처리하였을 때에도 수축반응이 전혀 생기지 않았다. 그러나 Ca^{++} -free영양액에 Ca^{++} 농도를 점차적으로 증가시키면 ATP를 처리했을 때는 Ca^{++} 의 농도가 증가함에 따라 ATP의 수축효과도 증가하였다.

이상과 같은 결과로써, 돼지 자궁 평활근의 운동성에 대한 ATP의 영향은 purinergic receptor를 통한 수축현상을 일으키며, 이는 외부 Ca^{++} 의 동원에 의하여 생기는 것으로 추측할 수 있었다.

결 론

ATP를 이용한 돼지 분만시기의 조절에 대한 적용을 추정해보기 위하여 돼지 적출 자궁 평활근의 운동성에 대한 ATP의 효과와 그 효과에 대

한 여러 receptor차단제의 영향 및 외부 Ca^{++} 의 영향을 자궁평활근 절편을 제작하여 physiograph를 통한 기록으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ATP는 $10^{-5}M$ 에서 자궁 평활근의 수축이 나타나기 시작하여 $10^{-3}M$ 까지 농도증가에 비례하여 수축정도가 증가하였으며 최대의 수축 현상은 $10^{-3}M$ 에서 나타났으며, ATP의 ED_{50} 은 $5 \times 10^{-5}M$ 이었다.

2. ATP($10^{-4}M$)에 의한 수축현상은 cholinergic receptor차단제인 atropine($10^{-6}M$)에 대하여 차단되지 않았다.

3. ATP($10^{-4}M$)에 의한 수축현상은 α -adrenergic receptor차단제 phetolamine($10^{-6}M$)이나 β -adrenergic receptor차단제인 propranolol($10^{-6}M$)에 의해 차단되지 않았다.

4. ATP($10^{-4}M$)에 의한 수축현상은 Ca^{++} -free영양액에서는 전혀 수축반응이 나타나지 않았으며, Ca^{++} -channel차단제인 papaverine($10^{-6}M$), 또는 verapamil($10^{-6}M$)에 의해서는 완전히 수축현상이 차단되었고, 외부 Ca^{++} 농도에 비례하여 수축현상이 증가 하였다.

이상과 같은 결과들으로써, 돼지 자궁 평활근의 운동성에 대한 ATP의 영향은 purinergic receptor를 통한 수축현상을 일으키며, 이는 외부 Ca^{++} 의 동원에 의하여 생기는 것으로 추측되어진다.

참 고 문 헌

1. marshall JM. 1973. Effects of catecholamines on the smooth muscle of the female reproductive tract. *Ann Rev Pharmacol.* 13 : 19~24.
2. Goodman LS, Gillman A. 1980. *The Pharmacological basis of therapeutics.* 6th ed. New York, MacMillan Pub. 67~74.
3. Bolton TB. 1972. The depolarizing action of acetylcholine or catecholamine in intestinal smooth muscle. *J Physiol.* 220 : 647~654.
4. Burnstock G, Campbell G, Bennett M, et al. 1963. Inhibition of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *Nature(London).* 200 : 581~582.
5. Burnstock G. 1969. Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmacol Rev.* 21 : 247~324.
6. Campbell G. 1966. The inhibitory nerve fibers in the vagal supply to the guinea-pig stomach. *J Physiol(London).* 185 : 600~612.
7. Burnstock G, Costa M. 1973. Inhibitory innervation of gut. *Gastroenterol.* 64:581~582.
8. Wood JD, Mayer CJ. 1979. Serotonergic activation of tonic-type enteric neurons in guinea-pig small bowe. *J Neurophysiol.* 42:582~593.
9. Kennedy C, Delbro D, Burnstock G. 1985. P₂-purinoceptors mediate both vasodilation and vasocontraction of the isolated rat femoral artery. *Eur J Pharmacol.* 107:106~168.
10. 김주현, 권종국, 김용근. 1987. 미성숙 돼지 자궁 평활근의 운동성에 대한 adenosine triphosphate의 작용에 있어서 수종의 receptor차단제의 영향. *대한수의학회지.* 27(2):201~206.
11. Wood, J. D. and Mayer, C. J. 1979. Serotonergic activation of tonic-type enteric neurons in guinea-pig small bowel. *J Neurophysiol.* 42:582~593.
12. Gershon, M. D. 1979. Nonadrenergic, noncholinergic, autonomic neurotransmission mechanisms. In *NRD Bulletin*(Burnstock, G., jHokfelt, T., Gershon, M. D., Iversen, L. L., Kosferlitz, H. W. and Szurszewski, J. H., editors). Cambridge, Mass;MIT. 17:414~424.
13. Furness JB, Costa M. 1980. Type of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci.* 5:1~20.
14. Satchell, D. G., Lynch, A., Bourke, P. M., et al. 1972. Potentiation of the effects of exogenously applied ATP and purinergic nerve stimulation on the guinea-pig taenia coli by dipyridamole and hexobendine. *Eur J Pharmacol.* 19:343~350.
15. Satchell DG, Burnstock G, Dann P. 1973. Antagonism of the effect of purinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on the guinea-pig taenia coli by 2-substitute imidazolines and related compounds. *Eur J Pharmacol.* 23:264~269.
16. Bennett T. 1970. Innervation of nerve-mediated excitation and inhibition of single smooth

- muscle cel of the avian gizzard. *Comp Biochem physiol.* 32:669~680.
17. Burnstock G. 1971. Neural nomenclature. *Nature(London)*. 229:282~283.
 18. Burnstock, G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24:509~581.
 19. Su, C., Bevan, J. A. and Burnstock, G. 1971. ³H-adenosine triphosphate:release during stimulation of enteric nerves. *Science.* 173:337~339.
 20. Bolton TB. 1979. Mechanisms of action transmitters and other substances smooth muscle. *Physiol Rev.* 59(3):607~718.
 21. Moritoki H, Takei M, Kasai T, et al. 1979. Possible involvement of prostaglandins in the action of ATP on guinea-pig uterus. *J Pharmacol Exp Ther.* 211:104~111.
 22. Burnstock, G. 1981. Review Lecture, neurotransmitters and tropic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol.* 313:1~35.
 23. Ninomiya, J. C. and Suzuki, H. 1983. Electrical responses of smooth muscle cells of the mouse uterus to adenosine triphosphate, *J Physiol.* 342:499~515.