

# 토끼 홍채괄약근에서 퓨린수용체의 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

최 용 준

# 토끼 홍채괄약근에서 퓨린수용체의 역할

지도 이 중 우 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함


2001년 6월 일


연세대학교 대학원


의 학 과

최 용 준

# 최용준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원           李 亨 祐           

심사위원           백 정 선           

심사위원           공 인 령           

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 나오기까지 연구여건을 제공해 주시고 세세한 지도를 아끼지 않으신 이종우 교수님께 진심으로 감사를 드리며 논문의 내용에 많은 지도와 조언을 주신 공인덕 교수님과 정성우 교수님, 실험에 대한 조언과 방법을 지도해 주신 정해숙 선생님께 감사를 드립니다. 안과 의사의 길을 열어주시고 사랑으로 지도와 격려를 주신 이종혁 교수님, 라상훈 교수님과 이석준 교수님께 감사를 드립니다.

오늘날의 저를 위해 희생하시고 사랑을 베풀어주신 양가 부모님, 기쁨과 슬픔을 함께 나누어주며 친구가 되어준 사랑하는 아내, 휴식 같은 안식처가 되어준 분신인 딸 원이와 함께 이 작은 기쁨을 나누고 싶습니다.

2001년 6월

저자 씀

# 차 례

그림 차례 .....	ii
국문 요약 .....	iii
제1장 서론 .....	1
제2장 재료 및 방법 .....	3
2.1. 실험 동물 .....	3
2.2. 실험용액 및 약물 .....	3
2.3. 홍채팔약근 적출 및 장력측정 .....	3
2.4. 퓨린수용체 활성화에 의한 장력변화 측정 .....	4
2.5. ATP의 수축작용에 대한 칼슘차단제의 효과 .....	4
2.6. 퓨린수용체 차단제에 의한 영향 .....	5
2.7. 자료 분석 .....	5
제3장 실험 결과 .....	7
3.1. 홍채팔약근에서 ATP에 의한 수축반응 .....	7
3.2. 여러 뉴클레오티드 및 adenosine에 의한 홍채팔약근 수축 반응 .....	7
3.3. ATP에 의한 홍채팔약근 수축에서 칼슘이온통로 차단제의 효과 .....	10
3.4. ATP에 의한 홍채팔약근 수축에서 ryanodine, caffeine 및 세포외액의 칼슘제거 효과 .....	10
3.5. 퓨린수용체 차단제에 의한 영향 .....	11
제4장 고찰 .....	15
제5장 결론 .....	19
참고 문헌 .....	20
영문 요약 .....	26

# 그림 차례

그림 1. 장력 측정 장치 모식도 .....	6
그림 2. 홍채팔약근에서 ATP에 의한 기초장력 변화 .....	8
그림 3. 기초장력 상태에서 여러 뉴클레오티드 및 adenosine이 홍채팔약근의 장력에 미치는 영향 .....	9
그림 4. 칼슘차단제가 홍채팔약근 수축에 미치는 영향 .....	12
그림 5. Ryanodine, caffeine 및 세포외액의 칼슘제거시 홍채팔약근 수축에 미치는 영향 .....	13
그림 6. 퓨린수용체 차단제 및 효현제들이 홍채팔약근 수축에 미치는 영향 ..	14

## 국문요약

### 토끼의 홍채괄약근에서 퓨린수용체의 역할

세포외액의 뉴클레오티드는 혈소판, 신경말단 등으로부터 유리되는 세포외의 신호전달물질로서 세포막에 존재하는 P2수용체의 활성화를 통해 생체내의 다양한 생리작용에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 왔다. 이러한 퓨린수용체 효현제들은 실험동물의 조직과 기관에서 다양한 반응을 나타내지만, 지금까지 홍채괄약근에서 퓨린수용체의 특성이나 효과에 대한 연구는 거의 진행되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 토끼의 홍채괄약근에서 여러 뉴클레오티드에 의한 반응을 관찰하고, 이에 대한 작용기전과 수용체의 특성을 규명하기 위하여, 토끼의 안구를 손상되지 않도록 적출하여 홍채괄약근을 분리한 뒤, 등척성 조건하에서 변화하는 홍채괄약근의 장력을 force transducer로 측정하여 polygraph에 기록하였다.

홍채괄약근에서 ATP는 농도의존적으로 수축을 유발시켰으며 EC<sub>50</sub>가 1.2 mM이었다. 이와 같은 수축효과는 ATPP (EC<sub>50</sub>; 0.13 mM)의 효과보다 작았으며, EC<sub>50</sub> (mM)값은 UTP (0.95) > ATP (1.2) > ITP (2.32) >> UDP 순으로 나타났고, AMP와 adenosine은 효과가 거의 없었다. 이와 같은 효현제의 수축효과는 쥐에서 보고된 기존의 P2Y<sub>4</sub> 효력비교와 유사하였다. 정상 KRB용액에서, L-type 칼슘통로차단제와 칼슘이온통로 차단제인 CdCl<sub>2</sub>는 ATP에 의한 홍채괄약근의 수축에 영향이 없는 반면, KCl에 의한 수축효과는 CdCl<sub>2</sub>에 의해 90.2% 이상 차단하였다. 한편 세포외액에 칼슘제거시 ATP에 의한 홍채괄약근 수축효과는 시간 의존적으로 감소하였다. 이와 같은 수축효과는 ryanodine에 의해서는 의의 있는 영향이 없었지만 세포내 칼슘저장소를 고갈시키는 caffeine의 경우에는 85.9%이상 현저하게 감소시켰다. ATP의 수축효과는 비선택적 P2 차단제인 suramin 및 P2X 수용체 탈감작에 의한 차단효과를 갖는  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP, P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> 수용체 탈감작에 의한 차단효과를 갖는 UTP에 의해서는 오히려 항진되었지만, PPADS에 의해서 거의 영향이 없

었다.

위의 실험결과로 볼 때, ATP는 홍채괄약근에 존재하는 P2Y<sub>4</sub>-like 수용체 활성화를 통해 수축을 일으키는 것으로 추측되며 이와 같은 수축효과는 세포막을 통한 칼슘유입보다는 세포내에 존재하는 caffeine-sensitive 칼슘저장소로부터 방출된 칼슘에 의해 매개되는 것으로 사료된다.

---

핵심되는 말 : Adenosine 5'-triphosphate (ATP), Uridine 5'-triphosphate (UTP),  
홍채 괄약근, 퓨린수용체, 근수축



# 토끼 홍채괄약근에서 퓨린수용체의 역할

<지도 이 중 우 교수>

연세대학교 대학원 의학과

최 용 준

## 제1장 서론

세포내에서 ATP (adenosine triphosphate)의 주작용은 근수축, 막을 통한 물질 이동 및 고분자물질합성 등과 같은 능동적과정의 에너지원으로 이용되는 것이다. ATP는 적은 양이기는 하나 세포외액에도 존재하여 다양한 생물학적 작용을 나타낸다(Burnstock, 1990). 예를 들면 신경전달물질, 효소분비 및 면역학적반응 등과 같은 비교적 짧은 기간 동안에 일어나는 생리작용뿐만 아니라 세포성장, 분화 및 증식과 같은 장시간을 요하는 생리작용에서도 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Abbraccio 및 Burnstock, 1998). 세포외액의 뉴클레오티드와 뉴클레오사이드에 의해 매개되는 이러한 작용들은 세포막에 존재하는 퓨린수용체를 통해 cAMP나  $IP_3$  등의 세포내 신호전달물질을 매개하거나 혹은 세포막의 이온통로를 직접 조절함으로써 다양한 생물학적 효과를 나타내며(Ralevic 및 Burnstock, 1998) 나타내는데, 그 수용체를 활성화시키는 효현제(agonist)들의 종류에 따라 adenosine에 의하여 활성화되는 P1수용체와 ATP를 비롯한 뉴클레오티드에 의하여 활성화되는 P2수용체로 대별된다(Burnstock, 1990; Ralevic 및 Burnstock, 1998). P1수용체보다 P2수용체는 더 다양한 특성을 나타내는데 이온통로와 연관되어 있는 P2X수용체와 G-protein을 매개로 하는 P2Y수용체가 있다(Burnstock 및 Warland, 1987; Ralevic 및 Burnstock, 1998). 최근에는 새로운 효현제의 개발과 분

자생물학적 기법에 의하여 P2X<sub>1-7</sub>, P2Y<sub>1-11</sub> 등으로 세분화되고 있다(Abracchio 및 Burnstock, 1994; Ralevic 및 Burnstock, 1998; von Kugelgen 및 Wetter, 2000).

안구의 홍채는 괄약근(sphincter muscle)과 방사근(radial muscle)으로 이루어져 있으며 괄약근과 방사근에는 콜린성 수용체(cholinergic receptor)와 아드레날린성 수용체(adrenergic receptor)가 각각 존재하여 홍채의 축동현상(miosis)과 산동현상(mydriasis)을 조절하는 것으로 알려져 있다(Goodman 및 Gilman, 1991). 그 외에도 히스타민 수용체(histamine receptor), 무스카린성 수용체(muscarinergic receptor)가 홍채의 수축 및 이완반응에 관여하는 것으로 밝혀져 있다(Kamei, 1996, Honkanen 및 Abdel-Latif, 1988). Adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> 효현제는 토끼의 분리된 홍채와 모양체(iris/ciliary body)에서 A<sub>1</sub>수용체를 통해 norepinephrine 방출을 저해하고, cAMP 축적을 일으킨 결과 눈의 안압을 낮추는 것으로 알려져 있다(Crosson, 1995; Crosson 및 Gray, 1997). 또한 adenosine 효현제는 carbachol로 전수축시킨 홍채괄약근을 이완시키는 반면 adenosine 길항제는 epinephrine에 의한 안압의 감소를 차단하는 것으로 보고되었다(Hourani 등, 1997; Crosson 및 Petrovich, 1999). 토끼의 홍채에서, 홍채괄약근은 자율신경과 감각신경의 지배를 받으며, adenosine은 신경근육접합 전에 존재하는 adenosine A<sub>1</sub>수용체를 통해 자극되는 콜린성신경에 대한 반응을 저해하거나 신경근육접합 후에 존재하는 adenosine A<sub>1</sub>수용체를 통해 콜린성반응을 항진시킬 뿐 아니라, 신경근육접합 전에 존재하는 adenosine A<sub>2</sub>수용체를 통해 감각성의 비아드레날린성 비콜린성 반응을 항진시키는 것으로 알려져 있다(Hall 등, 1993; Gustafsson 및 Wiklund, 1986).

그러나 지금까지의 이러한 연구들은 주로 P1수용체 중심으로 연구되었으며, 홍채괄약근에서 P2 퓨린수용체의 분포 및 특성들은 선택적인 효현제 및 길항제의 부족으로, 이와 관계된 다양한 작용기전에 대해 아직 명확히 알려지지 않았다. 따라서 본 실험에서는 토끼의 홍채괄약근에서 퓨린과 피리미딘 뉴클레오티드 및 adenosine에 의한 반응을 관찰하고 이러한 작용을 매개하는 퓨린수용체의 종류 및 활성화 기전을 규명하고자 하였다.

## 제2장 재료 및 방법

### 2.1. 실험 동물

실험동물로는 1-1.5 Kg 의 토끼(New Zealand white rabbit )를 사용하였다.

### 2.2. 실험용액 및 약물

실험용액으로는 Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) 용액을 사용하였는데, 이의 조성은 NaCl 117, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.91, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.19, MgSO<sub>4</sub> 1.44, NaHCO<sub>3</sub> 24.8 및 glucose 5.5 mM 이며, 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>의 혼합개스를 주입하여 pH 7.4로 평형을 이루게 하였다. Adenosine (AD), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-tetrphosphate (ATPP),  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene adenosine 5'-triphosphate ( $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP), uridine 5'-diphosphate (UDP), uridine 5'-triphosphate (UTP), inosine 5'-triphosphate (ITP), reactive blue-2 (RB-2), acetylcholine (ACh), ryanodine, caffeine, verapamil, diltiazem, nifedipine, CdCl<sub>2</sub>은 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, suramin과 pyridoxal-5'-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonate (PPADS)는 RBI 제품(Research Biochemicals International, MA, USA)을 사용하였다. Adenosine, suramin과 PPADS은 DMSO에 녹였고, 그 외의 모든 시약은 삼차 증류수에 녹여 사용하였다. 사용된 뉴클레오티드들은 1 N NaOH로 pH가 7.0이 되게 적정한 뒤 사용하기 직 전까지 영하 20℃의 냉동고에 보관하여 활성도를 유지하게 하였다.

### 2.3. 홍채괄약근 적출 및 장력측정

성숙한 토끼(1-1.5 Kg)를 ether로 마취시킨 다음, 안구를 적출하였다. 적출한 눈은 해부 현미경 하에서 홍채근이 손상되지 않도록 각각의 떼어낸 후 팔약근을 조심스럽게 equator를 따라 분리하였다. 분리된 ring 형태의 홍채팔약근 한쪽 끝은 10 ml의 KRB용액이 들어있는 organ bath 바닥에 L자형 가는 stainless steel 고리로 고정시키고 다른 한쪽은 force transducer (Grass FT03C)에 연결하여 등척성 조건 하에서 변화하는 홍채팔약근의 장력을 polygraph (Grass Model 7E)에 기록하였다(그림 1). KRB 용액은 37°C로 유지하고 혼합가스(95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>)를 지속적으로 공급하였다. 홍채팔약근에는 약 0.1 gm의 기초장력을 부하하였고, 60분 정도 기다려 평형이 되도록 하였다. 그 기간 동안 KRB 용액을 3~4회 바꾸어 주었으며, 100  $\mu$ M ACh 으로 홍채팔약근을 수축시켜 콜린성수용체에 의한 홍채팔약근의 정상유무를 확인하였다.

## 2.4. 퓨린수용체 활성화에 의한 장력변화 측정

기초장력 상태에서 홍채팔약근에 ATPP, ATP, ADP, AMP, adenosine, UTP, UDP, ITP등의 여러 뉴클레오티드를 10  $\mu$ M 에서부터 5 mM이 되도록 점진적으로 가하여 이들에 의한 홍채팔약근의 장력변화를 기록하였다. 이때 수축된 정도는 고농도 ATP (3 mM)의 최고 수축 효과에 대한 백분율로 나타내어 비교하였다. 최대 수축효과의 50%를 수축시키는데 필요로 하는 효현제의 농도(EC<sub>50</sub>)를 구하여 이를 서로간에 비교하였다.

## 2.5. ATP의 수축작용에 대한 칼슘차단제의 효과

먼저 뉴클레오티드들에 의하여 홍채팔약근이 수축할 때 수축에 관여하는 칼슘이 세포외액에서 유입되는지 또는 세포내에서 유리되는지를 확인하고자 하였다. 즉 대표적인 퓨린수용체 효현제의 하나인 ATP (300  $\mu$ M)를 가하여 그 수축도를 대조군으로 하고, 칼슘통로 차단제를 전처치(20분간)하거나 세포내 칼슘저장소를

고갈시킨 후 같은 농도의 ATP를 가하여 그 수축도를 대조군과 비교하였다. 이때 사용한 칼슘통로차단제로는 diltiazem (10  $\mu$ M), verapamil (10  $\mu$ M), nifedipine (10  $\mu$ M)과 같은 L-type 칼슘통로차단제와 비선택적으로 모든 칼슘통로를 봉쇄하는 CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M)을 사용하였고, sarcoplasmic reticulum (SR)내의 칼슘을 고갈시키기 위해서는 caffeine (5 mM)을, SR로부터 칼슘유리를 억제하는 물질로는 ryanodine (10  $\mu$ M)을 이용하였다(Meissner 등, 1986; Kim 등, 1998). 약물에 의한 차단효과 정도를 대조군의 효과에 대한 백분율(%)로 나타내어 비교하였다.

## 2.6. 퓨린수용체 차단제에 의한 영향

ATP의 수축작용에 대한 차단효과를 관찰하기 위하여, 먼저 300  $\mu$ M의 ATP를 투여하여 그 수축의 정도를 대조군으로 하였다. 이어서 P2 수용체 비선택적 차단제인 suramin (100  $\mu$ M)과 PPADS (100  $\mu$ M), P2X 수용체의 효현제이나 수용체 탈감작에 의한 차단제 효과도 갖는  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP (100  $\mu$ M) 등을 20분전에 미리 처치한 다음 다시 ATP의 반응을 비교·관찰하여, 그 수축크기를 대조군과 비교하므로써 이들의 작용을 매개하는 수용체의 특성을 확인하였다. 또 위와 동일한 방법으로 P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> 수용체 효현제인 UTP (100  $\mu$ M)를 전처치 한 후 ATP의 이완효과를 대조군과 비교하여 수용체 공유에 따른 탈감작(desensitization) 현상이 나타나는지 확인하였다. 모든 차단효과는 차단된 정도를 대조군의 효과에 대한 백분율로 나타내어 비교하였다.

## 2.7. 자료 분석

결과는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였으며, 약물 효과의 검정은 Student의 paired t-test에 의하여 p값이 0.05 이하일 때를 통계적으로 유의한 차이의 한계로 삼았다.

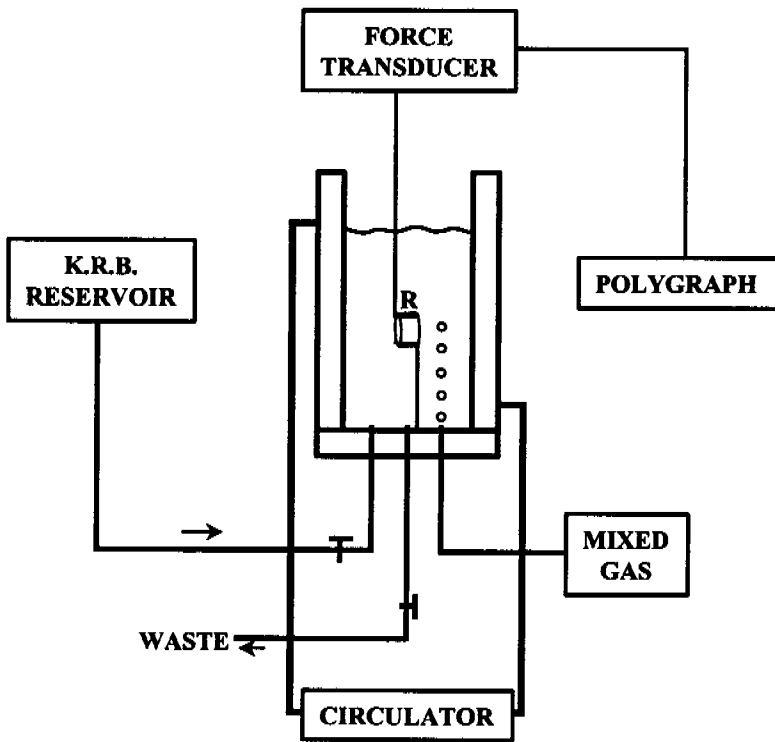


그림 1. 장력 측정 장치 모식도. L 자형의 가는 stainless steel 고리를 사용하여 한 쪽 끝은 bath 바닥에 고정하고, 다른 한쪽은 force transducer에 연결하여 흥채팔 약근의 장력 변화를 polygraph에 기록하였다. Circulator를 통하여 organ bath의 온도를 37℃로 유지하였으며, 화살표는 KRB 용액의 이동방향을 나타내고 있다.

## 제3장 실험 결과

### 3.1. 홍채괄약근에서 ATP에 의한 수축반응

평형을 이룬 기초장력 상태의 혈관에 ATP를 10  $\mu$ M에서 3 mM까지 점진적으로 가하여, 이에 의한 혈관장력의 변화를 그림 2에 나타내었다. ATP에 의한 홍채괄약근 수축효과는 30  $\mu$ M에서 나타나기 시작하여 3 mM에서 최대로 수축되었으며, 3 mM이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

### 3.2. 여러 뉴클레오티드 및 adenosine에 의한 홍채괄약근 수축 반응

기초장력 상태의 홍채괄약근에 ATPP, ATP, UTP, ITP, ADP, UDP, AMP 및 adenosine을 10  $\mu$ M에서부터 5 mM까지 점진적으로 가하여 이에 의한 홍채괄약근 수축효과를 비교하였다. 그 중 ATPP ( $EC_{50}$   $0.13 \pm 0.03$ )가 가장 큰 수축효과를 보였으며, AMP 및 adenosine은 거의 영향을 미치지 않았다(그림 3A). 홍채괄약근 수축작용에 대한 효능은  $UTP > ATP > ITP \gg UDP$ 순이었고, UTP의 수축작용에 대한  $EC_{50}$ 는  $0.95 \pm 0.07$  mM로, UTP의 효과는 ATP ( $1.27 \pm 0.26$ )와 유사하였으며, ITP ( $2.32 \pm 0.15$ )보다는 2배 정도 큰 효과를 나타냈다. 특히 UTP와 ATP의 이와 같은 작용은  $P2Y_6$ 수용체에 가장 강력한 표현제인 UDP보다 훨씬 더 강력하였다(그림 3B).

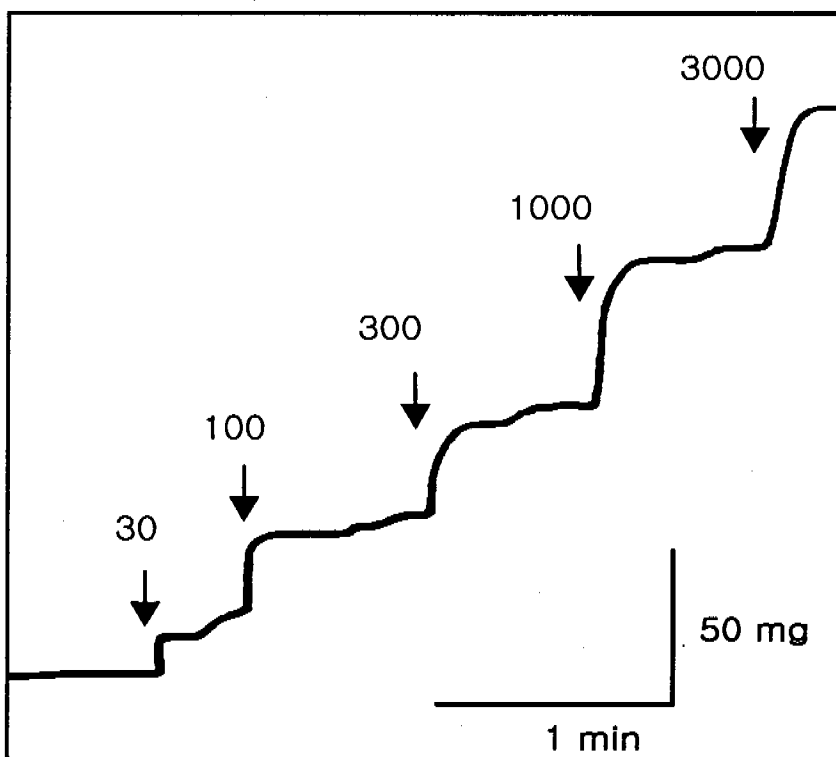


그림 2. 홍채팔약근에서 ATP에 의한 기초장력 변화. 기초장력 상태의 홍채팔약근에서 ATP를 30  $\mu$ M에서 3 mM까지 점진적으로 가하여 이에 의한 장력변화를 기록하였다.



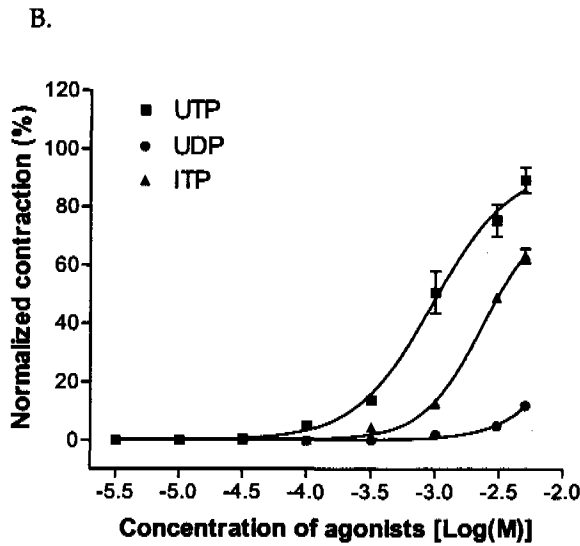
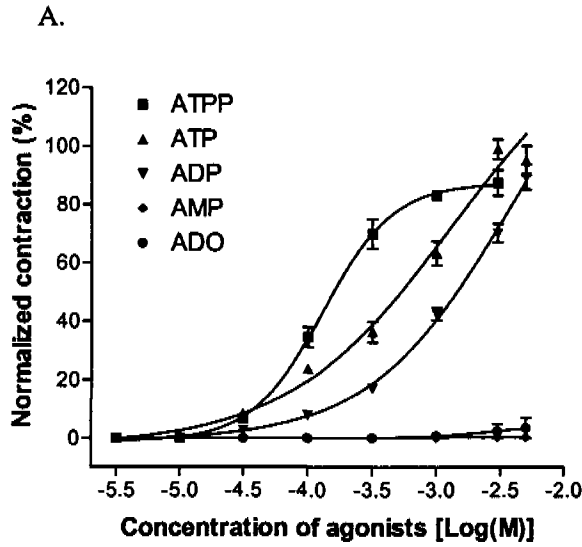


그림 3. 기초장력 상태에서 여러 뉴클레오티드 및 adenosine이 홍채괄약근의 장력에 미치는 영향. 기초장력 상태의 홍채괄약근에서 (A) adenine nucleotide (ATPP, ATP, ADP, AMP 및 adenosine) (B) 그 외 다른 퓨린수용체의 효현제(UTP, UDP, ITP)를 10  $\mu$ M에서 5 mM까지 점진적으로 가하여 이에 의한 홍채괄약근의 크기를 3 mM ATP에 의해 수축된 크기에 대한 백분율로 계산한 뒤 평균 표준오차로 나타내었다(실험예 수는 6례임).

### 3.3. ATP에 의한 홍채괄약근 수축에서 칼슘이온통로 차단제의 효과

ATP에 의한 홍채괄약근 수축작용에 관여하는 칼슘이온통로 영향을 규명하기 위하여, L-type 칼슘통로 차단제 및  $\text{CdCl}_2$ 의 전처치에 따른 영향을 확인하였다. 먼저 막전압 의존성 L-type 칼슘통로 차단제인 diltiazem ( $10 \mu\text{M}$ ), verapamil ( $10 \mu\text{M}$ ), nifedipine ( $10 \mu\text{M}$ )은 ATP에 의한 홍채괄약근 수축효과에 거의 영향을 미치지 않았다(그림 4A). 또한 세포막의 모든 칼슘통로를 봉쇄하는  $\text{CdCl}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ )에 의해서도 크게 영향을 받지 않았다. 이와 달리  $30 \text{ mM}$  KCl에 의한 홍채근의 수축반응( $46 \pm 4.18 \text{ mg}$ )은  $\text{CdCl}_2$ 에 의해  $4.5 \pm 5.61 \text{ mg}$ 으로 크게 감소하였다(그림 4B).

### 3.4. ATP에 의한 홍채괄약근 수축에서 ryanodine, caffeine 및 세포외액의 칼슘제거 효과

ATP에 의한 홍채괄약근 수축작용에 세포내 칼슘저장소로부터 유리된 칼슘이 관여하는지를 확인하기 위해 ryanodine과 caffeine의 전처치에 따른 영향을 비교하였다. 먼저 ryanodine 수용체(RyR)의 open상태에서 비가역적으로 결합하여 RyR을 차단하는 ryanodine ( $10 \mu\text{M}$ )은 ATP에 의한 홍채괄약근 수축작용을  $0.2 \pm 4.97\%$  정도의 감소로 유의 있는 영향을 미치지 못하였지만, 세포내 칼슘저장소의 칼슘을 고갈시키는 caffeine ( $5 \text{ mM}$ )을 전처치한 경우에는 홍채괄약근의 수축효과를  $85.9 \pm 2.41\%$  정도로 현저하게 감소시켰다(그림 5A). 한편 정상상태의 bath KRB에서 칼슘을 제거한 KRB로 변화시켰을 때 홍채괄약근의 수축작용을  $37.3 \pm 1.8\%$ 정도 감소시켰고, 이와 같은 효과는 칼슘을 제거한 KRB에서 지속되는 시간이 길어짐에 따라 수축작용이 점차로 차단되었다(그림 5B).

### 3.5. 퓨린수용체 차단제에 의한 영향

여러 퓨린수용체 차단제 및 효현제들의 전처치에 따른 영향을 확인하였다. P<sub>2</sub> 수용체 비선택적 차단제인 PPADS (100  $\mu$ M)는 거의 영향이 없는 반면, suramin (100  $\mu$ M)은 ATP에 의한 흥채근의 수축효과를 오히려 현저하게 증가시켰다. 또한 P2X 수용체의 효현제이나 수용체 탈감작에 의한 차단제 효과도 갖는  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP (100  $\mu$ M)와 P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> 수용체 효현제인 UTP (100  $\mu$ M) 경우에도 수축효과를 더 항진시켰다.

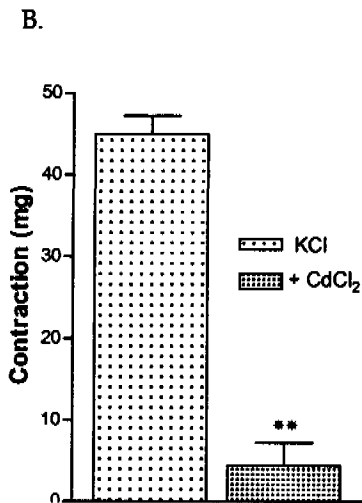
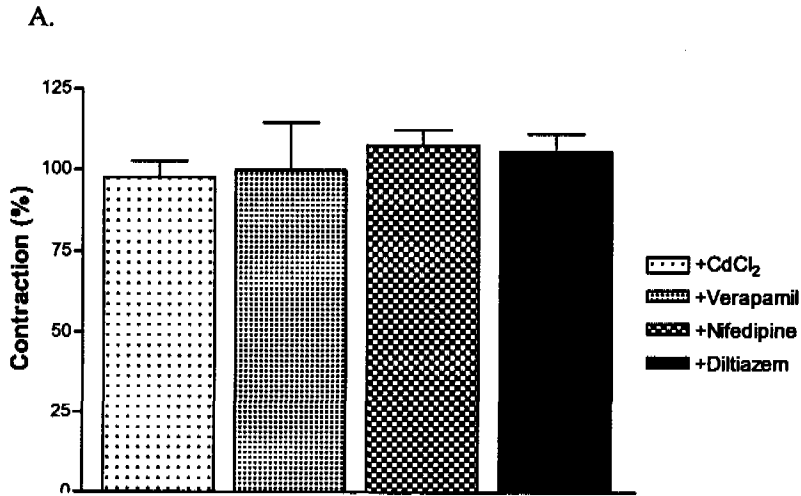


그림 4. 칼슘차단제가 흥채팔약근 수축에 미치는 영향. 흥채팔약근에 300  $\mu$ M의 ATP를 투여하여 수축한 정도를 대조군으로 하였으며, (A) 칼슘통로차단제 diltiazem (10  $\mu$ M), verapamil (10  $\mu$ M), nifedipine (10  $\mu$ M) 및 CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M)를 각각 20분간 전처리한 후 같은 농도의 ATP에 의한 수축정도를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. (B) 30 mM의 KCl을 투여하여 수축한 정도(mg)를 대조군으로 하였으며, CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M)를 20분간 전처리한 후 같은 농도의 KCl에 의한 수축정도를 나타내었다. 실험례수는 6례이었고, \*\*은  $p < 0.01$ 임

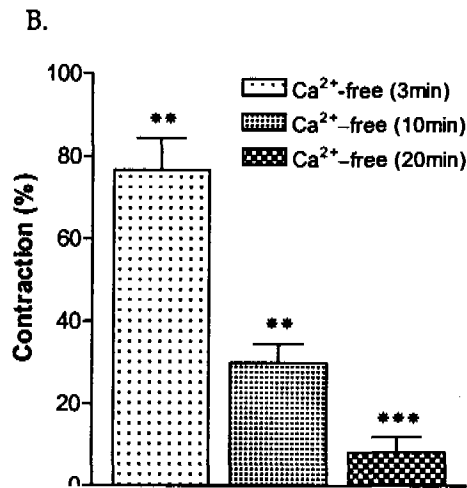
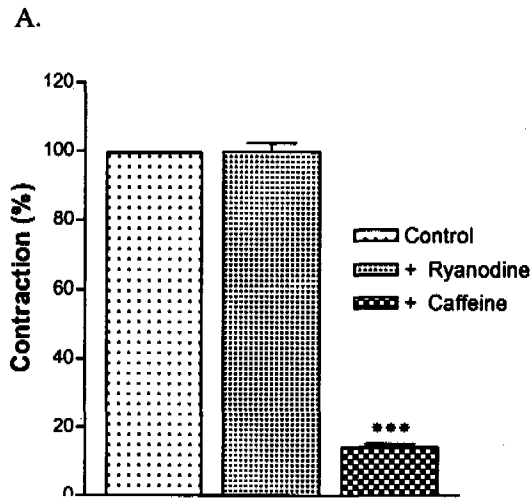


그림 5. Ryanodine, caffeine 및 세포외액의 칼슘제거시 홍채괄약근 수축에 미치는 영향. 홍채괄약근에 300  $\mu$ M의 ATP를 투여하여 수축한 정도를 대조군으로 하였으며, (A) ryanodine (10  $\mu$ M) 및 caffeine (5mM)을 각각 20분간 전처리하거나 (B) 세포외액 칼슘제거 후 같은 농도의 ATP에 의한 수축정도를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 실험례수는 6례이었고, \*\*은  $p < 0.01$ , \*\*\*은  $p < 0.001$ 임

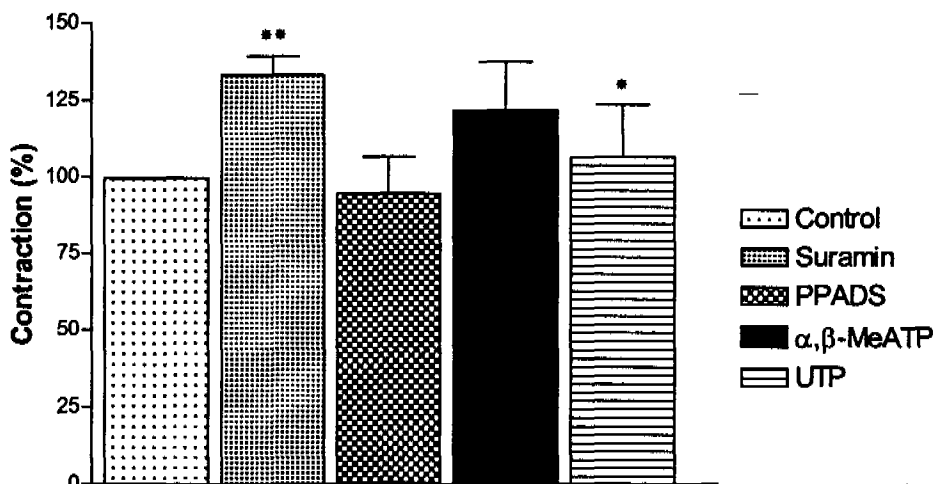


그림 6. 퓨린수용체 차단제 및 효현제들이 흥채팔약근 수축에 미치는 영향. 흥채 팔약근에 300  $\mu$ M의 ATP를 투여하여 수축한 정도를 대조군으로 하였으며 suramin (100  $\mu$ M), PPADS (100  $\mu$ M),  $\alpha, \beta$ -MeATP (100  $\mu$ M) 및 UTP (100  $\mu$ M)를 각각 20분간 전처리한 후 같은 농도의 ATP에 의한 수축정도를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 실험례수는 6례이었고, \*은  $p < 0.05$ , \*\*은  $p < 0.01$ 임

## 제4장 고찰

Non-adrenergic, non-cholinergic (NANC)신경 자극시 ATP (Burnstock, 1972)는 nitric oxide (NO) (Bult 등, 1990; Boeckxstaens 등, 1993; Sanders 및 Ward, 1992) 및 neuropeptide (Leander 등, 1981)같은 신경전달물질과 함께 유리되어 피부, 수노관 및 장관 등의 다양한 기관에서 혈류, 혈관의 투과성 및 평활근수축 등과 같은 기능을 조절한다고 보고된 바 있다(Kageyama 등, 1997). 또한 혈소판 등에 존재하는 vesicle에는 ATP가 600 mM 이상의 고농도로 존재하고 있으므로, 이들이 자극에 의해 세포외로 유리될 경우 인접부위는 생리적 작용을 나타내기에 충분한 농도에 이를 것이라 하였다(Boeynaems 및 Pearson, 1990; Gordon, 1986). 그러나 ATP의 작용은 조직마다 다양하며 복잡한 수용체 분류 등으로 인해 쉽게 이해되지 못하고 있다. 특히 토끼의 홍채팔약근에서 ATP의 수축 및 이완효과는 지금까지 보고된 바 없다. 그림 2와 같이 기초장력상태의 홍채팔약근에서 ATP는 가한 농도에 비례하여 수축효과를 나타내었으나, 3 mM 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

여러가지 아데닌 뉴클레오티드 중 ATP는 그 수축효과가 가장 컸는데 이러한 ATP의 강력한 작용은 쥐 자궁 평활근에서도 보고된 바 있다(Lee 등, 1994). 그리고 분리한 쥐 대동맥환에서 ATP는 이완시키는 것에 비하여 ATP는 수축시켜 그 작용기전이 다름을 나타내는데(Lee 등, 1995), 따라서 ATP는 앞으로 퓨린수용체 특성을 규명하는데 있어서 좋은 기준이 될 수 있지 않을까 기대된다. 홍채근의 수축반응에서 다른 뉴클레오티드 및 adenosine의 수축효과를 EC<sub>50</sub>값으로 비교해 본 결과 UTP > ATP > ITP >> UDP순으로 나타났으며, 이는 기존에 쥐의 특정 P2Y<sub>4</sub> 수용체를 발현시킨 1321N1세포에서 보고된 P2 효현제의 효력비교 결과와 부합함을 알 수 있다(Bogdanov 등, 1998; Kennedy 등, 2000).

세포내 칼슘농도의 변화는 평활근의 수축작용을 포함한 다양한 세포내 과정을 조절하는데 있어서 중요한데(Somlyo 및 Somlyo, 1994), 평활근 수축에 있어서 근육세포 내·외 칼슘원(source)의 상대적인 중요성은 근육의 종류와 자극양상에 따

라 다르게 나타난다. 본 실험에서는 먼저 L-type 칼슘통로 차단제 및 CdCl<sub>2</sub>의 전처치에 따른 영향을 통해 ATP에 의한 흥채괄약근의 수축작용에 세포외액에서 유입된 칼슘이 관여하는지 확인하였다. 우선 막전압 의존성 L-type 칼슘통로 차단제인 diltiazem, verapamil, nifedipine은 ATP에 의한 흥채괄약근 수축효과에 거의 영향을 미치지 않았으며, 또한 세포막의 모든 칼슘통로를 봉쇄하는 CdCl<sub>2</sub>에 의해서도 크게 영향을 받지 않았다. 이는 ATP에 의한 수축작용이 세포외액으로부터 칼슘유입에 의한 것이 아님을 의미한다고 하겠다. 참고로 막전압 의존성 칼슘통로를 열게 하는 KCl (30 mM)을 가할 때 칼슘유입에 따른 흥채괄약근의 수축이 일어났는데 이 수축은 CdCl<sub>2</sub>에 의해 크게(90.2 %) 억제되는 것으로 보아 세포막 칼슘통로 자체는 정상적으로 작동하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 칼슘을 제거한 KRB용액에서 흥채괄약근의 수축작용은 정상 KRB용액보다 감소되는데, 이와 같은 감소효과는 칼슘을 제거한 KRB에 처리하는 시간에 비례하였다. 이처럼 시간에 따라 수축력이 감소한 것은 세포외액의 칼슘제거로 인한 세포내의 sarcoplasmic reticulum내의 칼슘고갈이 주요한 원인이라고 할 수 있다. 따라서 흥채괄약근에서 ATP에 의한 수축작용은 세포외액의 칼슘유입이 관여하지 않는 것으로 추측되며, 이는 다양한 종류의 평활근에서 noradrenaline, acetylcholine, histamine 등과 같은 효현제에 의해 유발되는 수축작용이 세포막의 탈분극과 전혀 상관없이 일어난다는 보고(Somlyo 및 Somlyo, 1994)와 잘 부합된다.

그러면 ATP에 의한 흥채괄약근 수축작용에 세포내 어떤 칼슘저장소로부터 방출된 칼슘이 관여하는가? 지금까지 세포내 칼슘저장소는 기능적으로 IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release (IICR)과 세포내 칼슘농도에 따라 의존적으로 열리는 Ca<sup>2+</sup> permeable channel (ryanodine receptor, RyR)인 Ca<sup>2+</sup>-induced-Ca<sup>2+</sup>-release (CICR)로 분류되고 있다(Iino, 1990). 먼저 CICR pool을 기능적으로 제거하는 ryanodine을 전처치한 후 ATP의 효과를 관찰하였는데 ryanodine은 의의 있는 영향을 미치지 않았다. 그러나 세포내의 두 가지 칼슘저장소인 CICR pool과 IICR pool의 칼슘을 고갈시키는 caffeine을 전처치한 경우에는 ATP에 의한 흥채괄약근의 수축이 크게(85.9±2.41%) 감소되었다. 이와 같은 결과는 흥채괄약근에서 ATP에 의한 수축작용이 주로 세포내에 존재하는 caffeine에 민감한 칼슘저장소(SR)로부터 IP<sub>3</sub>를 매개로 유리



된 칼슘이 관여함을 나타내는 것이다. 이는 토끼의 뇌동맥평활근에서 noradrenaline, histamine 등과 같은 효현제가 IP<sub>3</sub>를 생성하고 SR에 존재하는 수용체에 작용하여 수축을 일으킨다는 보고 (Karaki 등, 1997)와 같은 기전으로 해석할 수 있다. 본 실험에서는 ATP의 수축반응을 매개하는 수용체를 확인하기 위하여, 여러 수용체 차단제들의 영향을 통해 그 작용을 매개로 하는 수용체를 규명하고자 하였다. P2X 수용체 차단제로 널리 쓰이는  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene adenosine 5'-triphosphate ( $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP) (Kasakov 및 Venkov, 1983; Lee 등, 1995; Bultmann 등, 1999)의해서는 ATP에 의한 홍채괄약근의 수축이 영향을 받지 않은 것으로 보아 ATP의 작용이 P2X 수용체를 매개로 하지 않음을 알 수 있다. Suramin은 P2 수용체 비선택적 차단제로 P2Y<sub>2</sub>수용체에는 민감하지만, P2Y<sub>4</sub>수용체에 대해서는 전혀 작용하지 않는 것으로 보고되었는데(Ralevic 및 Burnstock, 1998; von Kugelgen 및 Wetter; 2000, Bogdanov 등, 1998), 본 실험에서도 suramin은 ATP에 의한 홍채괄약근의 수축을 억제하지 않았다. Suramin은 ATP의 효과를 차단하기보다는 오히려 의외 있게 증가시켰는데 이와 같은 현상은 suramin이 일부조직에서 ATP의 분해를 억제하여 효현제로서의 ATP농도를 높게 유지함으로써 세포내 칼슘농도를 증가시킨 결과(van Rhee 등, 1994; Dockrell 등, 2001)와 일치한다. PPADS는 사람의 P2Y<sub>4</sub>에 대해 강력하게 작용을 차단시키기도 하지만, 클론된 쥐와 사람의 P2Y<sub>4</sub>에서는 거의 효과가 없는 것으로 보고되어 동물에 따라 다르게 나타남을 알 수 있다(Communi 등, 1996; Charlton 등, 1996; Bogdanov 등, 1998; von Kugelgen 등, 2000). 본 실험에서도 PPADS는 쥐에서의 결과처럼 ATP에 의한 토끼홍채근 수축작용에 거의 영향이 없었다. 그리고 uridine 뉴클레오티드에 특이적인 P2Y 수용체 효현제이며 수용체 탈감작에 의한 차단효과를 갖는 UTP (Sugamoto 등, 1999; Wilkinson 등, 1994)에 의해서도 오히려 수축반응이 증가하였다. 이와 같이 홍채괄약근에서 P2효현제와 차단제의 효과를 비교해 볼 때 ATP에 의한 작용은 그 수축반응이 UTP 비해 약간 작고 UDP보다 훨씬 더 크게 나타나고(UTP > ATP > ITP >> UDP), suramin과 PPADS에 의해 차단되지 않는 점으로 보아 P2Y<sub>2</sub> 나 P2Y<sub>6</sub>수용체(von Kugelgen 등, 2000)보다는 uridine 뉴클레오티드에 특이성을 갖는 P2Y<sub>4</sub>수용체를 통하여 매개될 것으로 추

측된다.

ATP에 의한 홍채괄약근의 수축이 세포내 칼슘저장소로부터 유리된 칼슘에 의한 것은 분명하지만  $IP_3$ 의 관여 여부는  $IP_3$ 수용체 차단제를 사용하여 확인할 필요가 있겠다. 또한  $P2Y$ 수용체는  $P1$ 이나  $P2X$ 수용체에 비하여 효현제나 차단제에 대한 반응이 조직마다 매우 다양하다. 본 실험에서도 토끼홍채괄약근에 있는 퓨린수용체의 효현제나 차단제에 대한 반응이 뚜렷하지 않아 어느 하나의 수용체로 결론 짓기에는 부족한 점이 있다. 따라서 앞으로 RT-PCR과 같은 분자생물학적인 방법을 통하여 홍채괄약근에 작용하는 퓨린수용체를 규명하는 것이 다음 단계의 실험이라 하겠다.

## 제5장 결론

토끼홍채팔약근에서 퓨린수용체 활성화에 의한 효과를 관찰하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 기초장력상태에서 홍채팔약근은 ATP에 의해 농도 의존적인 수축반응을 나타내었다.
2. 홍채팔약근의 수축효과는 UTP > ATP > ITP >> UDP순으로 나타났으며, ADP는 ATP보다 약간 효과가 작았으나, AMP와 adenosine은 거의 효과가 없었다.
3. ATP의 수축효과는 L-type 칼슘 이온통로차단제와 CdCl<sub>2</sub>에 의해 영향을 받지 않았다.
4. ATP의 수축효과는 ryanodine에 의해 의의 있는 효과가 없는 반면 caffeine에 의해서는 현저하게 차단되었다.
5. ATP의 수축효과는 PPADS에 의해서는 영향이 없었으며, suramin,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP, UTP에 의해서는 오히려 항진되었다.

위의 실험결과로 미루어 볼 때 ATP는 홍채팔약근에 존재하는 P2Y<sub>4</sub>-like 수용체를 매개하여 수축시키는 것으로 추측되며, 이러한 수축작용은 세포외의 칼슘유입에 의해서가 아니라 세포내의 caffeine에 민감한 칼슘저장소로부터 유리되는 칼슘에 의해 나타나는 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- Abbracchio MP, Burnstock G: Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78: 113-145, 1998
- Boeckxstaens GE, De Man JG, Pelckmans PA, Cromheeke KM, Herman AG, Van Maercke YM: Ca<sup>2+</sup> dependency of the release of nitric oxide from non-adrenergic non-cholinergic nerves. *Br J Pharmacol* 110(4): 1329-1334, 1993
- Boeynaems JM, Pearson JD: P2-purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 11: 34-37, 1990
- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G: Molecular cloning and characterization of rat P2Y<sub>4</sub> nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* 124: 428-430, 1998
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345(6273): 346-347, 1990
- Bultmann R, Klebroff W, Starke K: A contraction-mediating receptor for UTP, presumably P2Y<sub>2</sub>, in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360: 196-201, 1999
- Burnstock G, Warland JJI: P2-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue-2 selectively inhibits responses mediated via

- the P2Y- but not the P2X-purinoceptor. *Br J Pharmacol* 90: 383-391, 1987
- Burnstock G: Overview. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 603: 1-17, 1990
- Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR: Cloned and transfected P2Y<sub>4</sub> receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol* 119(7): 1301-1303, 1996
- Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Pirotton S: Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>4</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 317(2-3): 383-389, 1996
- Crosson CE: Adenosine receptor activation modulates intraocular pressure in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 273(1): 320-326, 1995
- Crosson CE, Gray T: Response to prejunctional adenosine receptors is dependent on stimulus frequency. *Curr Eye Res* 16(4): 359-364, 1997
- Crosson CE, Petrovich M: Contributions of adenosine receptor activation to the ocular actions of epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(9): 2054-2061, 1999
- Dockrell MEC, Noor MI, James AF, Hendry BM: Heterogenous calcium responses to extracellular ATP in cultured rat renal tubule cells. *Clinica Chemica Acta* 303:133-138, 2001
- Gordon JL: Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233(2):

309-319, 1986

Goodman, Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. 8<sup>th</sup> Ed (Vol 1) :  
89, 1991

Gustafsson LE, Wiklund NP: Adenosine-modulation of cholinergic and  
non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the rabbit iris sphincter.  
*Br J Pharmacol* 88(1): 197-204, 1986

Hall JM, Mitchell D, Morton IK: Tachykinin receptors mediating responses to  
sensory nerve stimulation and exogenous tachykinins and analogues in the  
rabbit isolated iris sphincter. *Br J Pharmacol* 109(4): 1008-1013, 1993

Honkanen RE, Abdel-Latif AA : Characterization of cholinergic muscarinic  
receptors in the rabbit iris. *Biochem pharmacol*, 37(13): 2575-2583, 1988

Hourani SMO, Smith NC, Nettell JJ, Hall JM: Relaxation of ovine isolated iris  
sphincter by adenosine receptor agonists: Lack of effect of adenosine A1 and  
A2 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 334: 95-98, 1997

Iino M: Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 54(4):  
345-354, 1990

Kamei CH: Effects of histamine and related compounds on the bovine iris  
dilator. *Methods Find Exp Clin pharmacol* 18(4): 273-278, 1996

Kageyama M, Fugita H, Nakata K, Shirasawa E: Involvement of both L- and  
N-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in KCl- and veratridine evoked

- transmitter release from non-adrenergic, non-cholinergic nerves in the rabbit iris sphincter muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 335: 638-644, 1997
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K: Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49(2): 157-230, 1997
- Kasakov L, Venkov L: The effect of enkephalins on the acetylcholinesterase activity in rat brain synaptosomes. *Cell Mol Biol* 29(2): 153-157, 1983
- Kennedy C, Qi AD, Herold CL, Harden TK, Nicholas RA: ATP, an agonist at the rat P2Y(4) receptor, is an antagonist at the human P2Y(4) receptor. *Mol Pharmacol* 57(5): 926-931, 2000
- Kim SJ, Kim JK, SO IS, Suh SH, Lee SJ, Kim KW: Characteristics of Ca<sup>2+</sup> stores in rabbit cerebral artery myocytes. *Koreans J Physiol Pharmacol* 2: 313-322, 1998
- Leander S, Hakanson R, Rosell S, Folkers K, Sundler F, Tornqvist K: A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation. *Nature* 294(5840): 467-469, 1981
- Lee JW, Kong ID, Chun SJ, Park KS, Lee JM. Studies on the characteristics of purinoceptors in the uterine smooth muscle. *The New Med J* 37(3): 37-43, 1994

- Lee JW, Kong ID, Park KS, Jeong SW. Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei Med J* 36: 487-496, 1995
- Meissner G: Ryanodine activation and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261(14): 6300-6306, 1986
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol rev* 50: 413-492, 1998
- Sanders KM, Ward SM: Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262(3 Pt 1): G379-392, 1992
- Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372(6503): 231-236, 1994
- Sugamoto Y, Hirai K, Tokoro T: P2Y<sub>2</sub> receptor elevates intracellular calcium concentration in rabbit eye. *J Med Dent Sci* 46: 83-92, 1999
- van Rhee AM, van der Heijden MPA, Beukers MW, Ijzerman AP, Soudjin W, Nickel P: Novel competitive antagonists for P2 purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 268:1-7, 1994
- von Kugelgen I, Wetter A: Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5): 310-323, 2000
- Wilkinson GF, Purkiss JR, Boarder MR: Differential heterologous and homologous desensitization of two receptors for ATP (P2Y purinoceptors and



nucleotide receptors) coexisting on endothelial cells. *Mol Pharmacol* 45:  
731-736, 1994

## ABSTRACT

### Role of Purinoceptor in Rabbit Iris Sphincter Muscle

Choi, Yong Jun  
Dept. of Medicine  
The Graduate School  
Yonsei University

Extracellular nucleotides released from platelets and nerve ending play significant roles in the physiological regulation as extracellular signaling molecules by activation of membrane-bound P2 purinergic (P2) receptors. Purinergic agonists are known to elicit various biological responses in the tissue and organ of experimental animals. However, it has not yet been elucidated which subtypes of P2 receptor are distributed in the rabbit iris sphincter muscle and which mechanisms are involved in purinergic regulation. In the present study, thus, we investigated the effects of purinergic agonists on the iris sphincter muscles isolated from rabbit. To this end, isometric contractions were measured using a force transducer and polygraph in iris sphincter muscle.

In the rabbit iris sphincter muscle, ATP elicited contractions in a dose-dependent manner ( $EC_{50}$ ; 1.2 mM). The ATP was less potent than ATPP ( $EC_{50}$ ; 0.13 mM) in inducing contraction. The relative potency order ( $EC_{50}$ ; mM) was UTP (0.95) > ATP (1.2) > ITP (2.32) >> UDP. In addition, some purine derivative such as AMP, adenosine were ineffective. The agonist profile was

similar to that of rat P2Y<sub>4</sub> (rP2Y<sub>4</sub>). In normal Ca<sup>2+</sup>-containing Krebs-Ringer solution (KRB), L-type Ca<sup>2+</sup> channel blockers, and a non specific Ca<sup>2+</sup>-channel blocker, CdCl<sub>2</sub> were not effective on ATP-induced contraction. In contrast, CdCl<sub>2</sub> blocked KCl-induced contraction. The peak values of ATP-induced contraction was reduced time-dependently in Ca<sup>2+</sup>-free KRB solution. ATP-induced contraction was suppressed by caffeine, which depletes the intracellular Ca<sup>2+</sup> pool. However, the ATP response was insensitive to ryanodine, indicating no involvement of ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. ATP-induced contraction was potentiated by suramin, a non-selective P2 antagonist,  $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP, a desensitizing antagonist of P2X purinoceptor, and UTP, a desensitizing antagonist of P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> but not by pretreatment with PPADS, P2X blocker.

These results suggest that ATP induces contraction of the rabbit iris sphincter muscle probably via activation of P2Y<sub>4</sub>-like purinoceptors. The contraction may be caused not by Ca<sup>2+</sup> influx across plasma membrane but by Ca<sup>2+</sup> release from caffeine-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> pool.

---

Key words : Adenosine 5'-triphosphate (ATP), Uridine 5'-triphosphate (UTP), Iris sphincter, Purinoceptor, Muscle contraction