β-수용체의 자궁근 이완 기전에 있어서 calcium 유입의 역할

연세대학교 대학원
의 학 과
박 진 수

β-수용체의 자궁근 이완 기전에 있어서 calcium 유입의 역할

지도 정 인 배 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 2월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 진 수

박진수의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 2월 일

감사의 글

지금껏 有形無形으로 내게 도움을 준 고마운 분들게 감사의 글을 드리고자 합니다.

지금 이 시간 제가 논문을 발표하고 학위를 받을 수 있도록 인도해 주신 정인배 교수님.
바쁘다는 핑계 하나로 불성실한 제자를 대신하여 모든 것을 꼼꼼히 챙겨주시어 이 시간까지 저를 이끌어 주신 선생님께 다신 한번 머리 숙여 감사를 드립니다.
미약한 제자의 부탁을 거절 못하시고 어려운 주제를 선택하여 기나긴 실험기간 동안 힘드셨을 약리학 교실의 고창만 선생님.
감사합니다.
약리학 교실의 진호 조교 선생님과 그 외의 약리학 교실 선생님들께도 감사드립니다.
산부인과 의사로서 필요한 자상하고 꼼꼼한 성격을 보여주신 차동수 선생님, 타고난 섬세함으로 환자들을 대하시며 환자 관리의 진수를 보여주신 한혁동 선생님, 수술은 이렇게 하는 거라는 걸 살아 있는 교과서로 몸소 보여주신 이영진 선생님.
산부인과 의사로서의 저를 있게 해주신 여러 선생님들께 감사 드립니다.

대학원의 진로를 가도록 조언해주신 부모님과 사랑하는 동생들,
마지막으로 저의 인생의 동반자이자 영원한 나의 사랑인 마은주에게 이 모든 영광을 돌립니다.

2004년 겨울 진료실에서
박 진 수

차 례

그림 차례 ····· ii
국문요약 ····· iii
제1장. 서론 ····· 1
제2장. 재료 및 방법. ····· 6
2.1. 실험동물 ····· 6
2.2. 단일 자궁 평활근 세포의 분리 ····· 6
2.2.1. 단일 자궁근 세포에서 막전류 측정 ····· 7
2.2.2. 단일 자궁 평활근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정 ····· 8
2.3. 흰쥐 자궁 평활근 절편 제작 ····· 9
2.4. 시약 ····· 9
2.5. 자료 분석 ····· 10
제3장. 결과 ····· 11
3.1. β_2-수용체 흥분에 의한 Ca^{2+} 전류의 변동 ····· 11
3.2. β_2-수용체 흥분에 의한 세포내 Ca^{2+}농도의 변동 ····· 19
3.3. β_2-수용체 흥분에 의한 자궁근 절편 수축운동의 억제 ····· 19
제4장. 고찰 ····· 22
제5장. 결론 ····· 27
참고문헌 ····· 28
영문초록 ····· 36

그림 차례

그림 1. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 L-type Ca^{2+} 전류의 확인 ····· 13
그림 2. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol이 L-type Ca^{2+} 전류에 미치는 영향 ····· 14
그림 3. 전세포 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol이 L-type Ca^{2+} 전류에 미치는 영향 ····· 15
그림 4. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 ouabain의 전처치 효과 ····· 16
그림 5. 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 ouabain 전처치 효과의 막고정 방법에 따른 비교 ····· 17
그림 6. 전세포 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 cAMP의 영향 ····· 18
그림 7. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol의 칼슘 농도에 대한 작용과 이에 대한 ouabain 전처치의 효과 ····· 20
그림 8. 자궁 절편의 자발적 수축 운동에서 isoproterenol의 농도에 비례한 이완 작용과 이에 대한 ouabain의 전처치 효과 ····· 21

국 문 요 약

β-수용체의 자궁근 이완 기전에 있어서 calcium 유입의 역할

β_2-수용체 흥분에 의한 자궁근 이완 작용은 G-단백을 매개하여 증가되는 cAMP에 의해 활성화되는 protein kinase A가 myosin light chain kinase를 인산화시켜 궁극적으로 myosin light chain이 ATPase 기능을 획득하지 못함으로 인해 나타난다. 그러나 cAMP 증가 및 그에 따른 protein kinase A의 활성화는 L-type Ca^{2+} 통로를 인산화시켜 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 증가시킬 가능성이 있으며, 이때에는 자궁 이완 작용이 상쇄될 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 흰쥐 단일 자궁근 세포 및 자궁 절편을 이용하여, 자궁근 이완 작용을 유발하는 β_2-수용체 흥분에 의한 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 변동을 추구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 단일 자궁근 세포에서 β_2-수용체 효현제인 isoproterenol은 L-type Ca^{2+} 전류에 대해 천공성 막고정(perforated patch) 상태에서는 아무런 영향을 미치지 못하나, 전세포 막고정(whole cell-mode patch) 상태에서는 용량에 비례하여 억제를 유발하였다.
2. Isoproterenol에 의한 막고정 상태에 의존적인 L-type Ca^{2+} 전류 억제 작용은 ouabain 투여로 단일 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.
3. Isoproterenol에 의한 막고정 상태에 의존적인 L-type Ca^{2+} 전류 억제 작용은 cAMP에 의해 항진되었다.
4. Isoproterenol은 단일 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키지 않았으

며, 이러한 isoproterenol의 작용은 ouabain 투여로 단일 자궁근 세포 내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.

5. 자궁 절편의 수축 운동은 isoproterenol에 의해 농도에 비례하여 억제되었으며, 이러한 isoproterenol의 자궁근 이완 작용은 ouabain 투여로 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 흰쥐 자궁근에서 β_2-수용체 흥분은 L-type Ca^{2+} 전류에 대해 별다른 영향을 나타내지 않으며, 단지 myosin light chain kinase를 매개하여 이완작용을 나타낸다고 사료된다.

핵심되는 말: 흰쥐 자궁근, β_2-수용체, Isoproterenol, L-type Ca^{2+} 통로 그리고 세포내 Ca^{2+} 농도.

β-수용체의 자궁근 이완 기전에 있어서 calcium 유입의 역할

〈지도 **정 인 배** 교수〉

연세대학교 대학원 의학과

박 진 수

제 1장 서론

생리학적으로 자궁근은 내장 평활근이며, 활동전위를 발생시키는 특성이 있다. 이러한 특성은 심장에서의 심박조율기(pacemaker)와 같은 기능을 하지만 심장과는 달리 발생부위가 이동 가능하고 주위의 자궁근 세포에 전기적으로 파급되면서 소위 "흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling)" 을 통해 자궁의 수축을 유발하게 된다(Greenspan , 1971). 이러한 현상은 임신기간 동안에도 발생되어서, 자궁근은 수축과 이완이 반복된다. 임신동안의 자궁수축은 일반적으로 그 주기나 강도는 매우 낮다. 그러나 간혹 그 주기와 강도가 상승하게 되면 자궁내 태아 사망, 포상 기태, 양수막의 조기 파열, 조산 등과 같은 중대한 산과적 문제가 발생한다. 특히 조산은 신생아 질병률과 사망률의 원인 중 70~80%를 차지하는 것으로 알려져 있다(Sawdy 및 Bennett, 1999). 이와 같은 조기 진통을 연기시키거나 방지하기 위한 목적으로 임상에서는 β_2-수용체 효현제를 위시한 자궁 이완제가 널리 쓰인다(King 등, 1988).

자궁을 위시한 대부분의 평활근 수축 역시 골격근 및 심근과 마찬가지로 세포내 Ca^{2+} 농도 증가로 인해 촉발된다. 즉 활동전압과 서파형 막전위

(slow-wave potential) 변동에 의한 막전압 탈분극과, 이로 인한 전압 민감성 Ca^{2+} 통로 개방으로 인하여 세포질내로의 Ca^{2+} 유입이 증가되어 자궁근의 수축이 일어난다. 이러한 과정을 전기-기계적 연결(electro-mechanical coupling)이라고 한다(Somlyo 및 Somlyo, 1994). 그러나 평활근에서는 골격근 및 심근에서와는 달리 전기-기계적 연결 이외에도, 세포막의 전기적 변화없이 직접적인 수용체 활성화에 의해 세포내 Ca^{2+} 증가가 초래되고 결국 수축이 유발되는 약리-기계적 연결(pharmaco-mechanical coupling)도 존재한다(Somlyo 및 Somlyo, 1968). 이 과정은 수용체가 활성화 되면 세포내 Ca^{2+} 저장소(주로는 근소포체, SR)로부터 Ca^{2+}이 유리되거나, 혹은 수용체-작동(receptor-operated) Ca^{2+} 통로를 활성화시켜, 결국 세포질내 Ca^{2+}농도를 증가시키게 된다. 이러한 과정에 관여하는 수용체들은 대개 G-단백(G_q, G_{11}, G_{14}, 또는 G_{16}) 연결 수용체들로, 이들 수용체가 활성화되면 G-단백을 매개하여 phospholipase C(PLC)가 활성화되고, inositol-1,4,5-trisphosphate(IP_3)와 diacyl glycerol(DAG)이 증가된다. IP_3는 SR의 IP_3 수용체와 결합하여 Ca^{2+}을 유리시키게 되며, 일부는 대사되어 IP_4가 되어 세포막의 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입을 촉진시키게 된다. 이러한 과정은 결국 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 초래하고 평활근을 수축시킨다. 한편 DAG의 증가는 protein kinase C(PKC)를 활성화하여 수축에 관련된 단백질을 인산화하고 PLC-β 활성화에 영향을 주어 IP_3 생성 비율을 조절하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Best 및 Bolton, 1986). 이 밖에도 성장에 관여하는 tyrosine kinase receptor의 경우에는 PLC-γ 를 활성화하여 세포내 Ca^{2+}을 증가시킨다(Rhee 및 Bae, 1997). 이렇게 증가된 평활근 세포내 Ca^{2+}은, 심근과는 달리 평활근내에는 troponin C가 없으므로, 심근과는 다른 기전을 통하여 myosin light chain(MLC)의 ATPase활성을 조절하게 된다. 즉, 평활근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면, calmodulin과 복합체를 형성하게 되고, Ca^{2+}-calmodulin 복합체는, myosin light chain kinase (MLCK)를 활성화하게 된다. 활성화된 MLCK는 평활근의 MLC

에 인산화 반응을 유발하게 되며, 평활근 MLC의 head는 비로서 ATPase 활성을 획득하게 되어 수축이 유발된다.

자궁근을 위시한 평활근의 이완 역시 골격근 혹은 심근에서와 마찬가지로 세포내 Ca^{2+}농도가 감소함에 따라 유발된다. 자궁근을 위시한 평활근 세포내 Ca^{2+}농도 감소는 첫째로 전압 민감성 Ca^{2+}통로가 봉쇄되어 Ca^{2+}유입이 감소하거나 (Missiaen 등, 1992), 둘째로 Na^{+}-Ca^{2+} 교환(NCX)에 의해 세포내 Ca^{2+}이 세포 외로 빠져나가고, 셋째로 cAMP의 농도가 증가하면 PKA에 의해 근 소포체 막의 phospholamban이 인산화되어 근 소포체 막의 Ca^{2+}-ATPase를 활성화시켜 세포내에 Ca^{2+}을 근 소포체내로 저장시키게 되며(Ferguson 등, 1988; Raeymaekers 및 Wuytack, 1993), 넷째로 세포막의 Ca^{2+}-ATPase 활성화로 세포내에 Ca^{2+}을 세포 밖으로 유출시킴에 따라 초래된다. 세포질내의 Ca^{2+} 농도 감소는 MLCK와 복합체 형성이 감소되는 것을 의미하게 되며, 결국 평활근의 이완을 초래하게 된다(Weber 등, 1986). 그러나 자궁근을 위시한 평활근에는, 골격근 또는 심근에서와는 달리, 세포내의 Ca^{2+} 농도와는 무관하게 이완을 유발하는 또 다른 기전들이 존재한다. 이러한 기전으로는 크게 “nitric oxide(NO)를 매개하는 이완 기전”과 “cAMP의 활성화에 의한 이완 기전”을 들 수 있다. 이들 두 기전의 공통점은 모두 MLC의 인산화를 방해하여 이완을 초래한다는 점이다. 즉 Ca^{2+}에 의한 수축이 일어난 후 NO가 증가하면 guanylyl cyclase를 활성화시키고, 이는 세포내의 cGMP를 증가시켜 protein kinase G(PKG)를 활성화시키고, myosin light chain phosphatase(MLCP)를 활성화시켜 MLC의 인산화가 저해되어서 평활근이 이완하게 된다. 한편 β_2-수용체가 흥분되면 G_S-단백을 매개하여 adenylate cyclase를 활성화하여 세포내 cAMP를 증가시키고, protein kinase A(PKA)를 통해 MLCK 자체를 인산화시키게 된다. 이와같이 MLCK 자체가 인산화되면, MKCK가 Ca^{2+}-calmodulin 복합체에 의한 활성화 조절을 받지 못하

게 되어 결국 MLC의 인산화가 저해되며 평활근은 이완하게 된다.

자궁의 조기수축에 치료목적으로 사용하는 ritodrine을 위시한 β_2-수용체 효현제는 cAMP와 PKA에 의한 MLCK 인산화에 의해 자궁근 이완을 초래하는 것은 쉽게 짐작할 수 있다. 그러나, β_2-수용체 흥분으로 인한 cAMP의 증가와 PKA의 활성화는 MLCK의 인산화 반응 이외에 또 다른 반응으로 L-type Ca^{2+} 통로를 개방할 수 있으며, 그 결과는 개방된 통로를 통해 외부로부터 세포내로의 Ca^{2+} 유입이 증가되어 calmodulin과 Ca^{2+} 그리고 MLCK의 복합체 형성이 촉진되어 평활근의 수축이 촉발될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 이러한 기전은 실제로 심근의 경우에는 β_2-수용체에 의한 수축의 핵심 기전으로 알려져 있다(Lu, 1994; El-Hayek 등, 1995; Li 등, 1999; Henrikson 등, 1999; Dulhunty 등, 1999; Gurrola 등, 1999; Zhu 등, 1999; Lamb 등, 2000). 그러나 자궁근을 위시한 평활근에서는 심근에서와는 달리 β_2-수용체에 의한 cAMP 증가로 L-type Ca^{2+} 통로는 오히려 억제된다는 것이 대다수 연구자들의 현재까지의 결론이다. 그러나 아직까지 β_2-수용체에 흥분에 따른 cAMP 증가로 인해 L-type Ca^{2+} 통로가 억제되는 정확한 기전은 알려져 있는 바가 전혀 없다. 뿐만 아니라 일찍이 일부 연구자들은 대다수 연구자들의 결과와는 달리 혈관 평활근(Xiong 및 Sperelakis, 1995; Sperelakis 등, 1994), 위장관 평활근(Muraki 등, 1993), 기관지 평활근(Welling 등, 1991; 1992)과 아울러 자궁근에서도 β_2-수용체가 L-type Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입을 오히려 증가시킨다는 연구 결과들을 제시하였었으며, 최근에도 이러한 사실은 간헐적이지만 지속적으로 보고되고 있다(Keef 등, 2001). 만약 이러한 가능성이 사실이라면 β_2-수용체 흥분은 평활근을 이완시키기도 하며 동시에 수축시킬 수도 있다는 것을 의미하며, 자궁근에서도 조기진통을 억제하기 위하여 투여한 β_2-수용체 효현제가 오히려 조기진통을 더 촉진시킬 가능성이 있음을 시사하며 최소한 자궁근 이완능력을 상쇄시켜 완전한 이완 작용을 나타내지 못하게 할 수도 있을 것이다. 그러나

이러한 측면에 대해서는 아직 알려진 바가 전혀 없는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 자궁근에서 β_2-수용체 흥분이 L-type Ca^{2+} 통로에 미치는 영향을 명확히 규명하여 보고자 하였다. 이러한 목표를 수행하기 위하여 흰쥐 단일 자궁근 세포에서 β_2-수용체 흥분에 따른 L-type Ca^{2+} 전류(I_{CaL})와 세포내 Ca^{2+} 농도 변동을 측정하였으며, 뿐만 아니라 조기 진통에서는 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 항진되므로, 보다 확연한 반응을 확인하기위해 ouabain을 통해 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시킨 상태에서 β_2-수용체 흥분에 의한 L-type Ca^{2+} 전류(I_{CaL})와 세포내 Ca^{2+} 농도 변동을 다시 측정하여 서로 비교하였으며, 마지막으로 자궁 절편을 이용하여 정상 상태 혹은 ouabain에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도를 항진시킨 상태에서 β_2-수용체 흥분에 의한 실제 자궁 수축운동의 변동을 관찰하였다.

제 2장 재료 및 방법

2.1. 실험 동물

실험동물로는 체중 150g～200g내외의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 실험 하루 전에 estradiol 1 ㎎/㎏을 복강 내 주사하여 사용하였다.

2.2. 단일 자궁 평활근 세포의 분리

실험 하루전에 estradiol 1 ㎎/㎏을 복강내 주사한 암컷 흰쥐를 사용하여 Yamamoto(1989)의 효소 분리 방법에 따라 자궁근 세포를 분리하였다. 즉, 흰쥐를 경추 도살하여 복강을 열고 자궁을 재빨리 적출한 후 Ca^{2+}이 제거된 차가운 Tyrode용액에 담근 다음 혈액을 제거하였다. 이어서 빠른 시간 내에 자궁내막을 제거한 후 1.3 mg/ml의 collagenase(type 2, Worthington)와 1.0 mg/ml의 trypsin inhibitor(type Ⅱ-S, Sigma)를 첨가한 37℃의 Ca^{2+} 제거 Tyrode용액으로 20분간 처리함으로써 자궁내 결체조직을 분해시켰다. 정상 Tyrode 용액으로 바꾸어 3～4번 조직내 효소를 씻어내었다. 이 후 trituration을 통해 단일 자궁근 세포로 분리하였다. 분리된 자궁근 세포는 낮은 온도에서 보관하였으며, 분리 후 6시간 이내에 사용하였다. 본 실험에 사용한 Tyrode용액의 조성은 136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM CaCl2, 0.99 mM MgCl2, 10 mM HEPES, 10 mM glucose이고, 용매에 충분히 녹인 후 1 N NaOH로 pH를 7.4로 적정하여 사용하였다.

2.2.2 단일 자궁근 세포에서 막전류 측정

분리한 자궁근 세포를 도립현미경 위에 설치된 patch chamber로 분주한 후 약 10분 정도 세포를 안정시킨 다음에 2 mM Ca^{2+}이 포함된 Tyrode용액으로 분당 3 ml의 속도로 실험 전 과정 동안 관류시켰다. 막전류 측정에 사용하는 미세유리전극은 microelectrode puller(P-97, Sutter Inc, Novato, CA, USA)를 사용하여 직경 1.5 mm 유리관(BF150-117-15, Sutter Inc, Novato, CA, USA)의 첨끝을 직경이 1.5 μm 정도가 되게 제작하였다. 이때 미세전극의 거칠은 첨끝은 microfuge(MF-83, Narishige, Japan)을 사용하여 매끈하게 열처리하였다. 미세전극의 전극저항은 1~3 MΩ 정도 되는 것을 사용하였고 3 MΩ 이상 되는 전극은 전극용액의 확산에 영향을 미칠 수 있으므로 사용하지 않았다. 미세전극에 전극용액을 채우고 patch clamp amplifier (Axopatch 200B, Axon instrument, Foster city, USA)의 headstage에 연결하였다. 전기적 자극을 주기 위해 patch clamp amplifier와 연결된 컴퓨터에서 Pclamp 9 software(Axon instrument, Foster city, USA)을 이용하여 막전압을 0 mV로 유지하고 10 mV크기의 과분극의 전기적 자극을 주면서 수력식 미세조작기(Hydraulic micromanipulator MHW-3, Narishige, Japan)를 사용하여 미세유리전극을 자궁근 세포에 접촉시켰다. 접촉시킨 후 전극내부에 가벼운 음압을 가하여 giga seal를 형성하여 약 1분간 안정시킨 후 막전압을 -40 mV로 유지하고 10 mV 크기의 과분극의 전기적 자극을 주면서 가벼운 음압을 가하여 미세유리전극과 접촉된 근세포막을 파열시켜 전세포 막고정 상태(whole cell-mode patch)를 형성하였다. 측정된 전류를 세포크기에 따라 보정하기위해 근세포의 축전전류(capacitance current)를 10 mV 크기로 과분극을 시킨 상태에서 Pclamp 9 software로 측정하였다. 막전류의 변동을 측정하기 위해 사용한 전극 용액은 세포내 Ca^{2+}의 확산을 제한하기 위하여 고농도의 Ca^{2+} 완충용액을 사용하였고,

K^+ 전류의 간섭을 배제하기위해 K^+을 Cs^+으로 대치하고 TEA를 첨가한 전극용액(10 mM NaCl, 105 mM CsCl, 1 mM CaCl2, 10 mM EGTA, 5 mM ATP-Mg, 20 mM TEA-Cl, pH7.2 with CsOH)을 사용하였다.

천공성 막고정(perforated patch)법의 경우에는 전극내 용액을(mM) 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl2, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 높은 농도로 녹인 gramicidin을 최종 농도가 50 ㎍/㎖가 되도록 첨가하여 사용하였다.

약물의 투여는 perfusion valve control system(VC-6M, Warner Instruments, CT, USA)을 이용하였으며, 그 끝을 신경세포의 100 ㎛이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2.3 단일 자궁 평활근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

분리한 자궁근 세포의 Ca^{2+} 변화는 Ca^{2+}-indicator인 fura-2/AM(Molecular Probe, Eugene, OR, USA)를 이용하여 세포질내의 Ca^{2+} 변동을 검출하였다. 먼저 분리한 자궁근 세포를 2 ml 용량의 배양접시(culture dish)에 분주한 후 30분간 세포가 안정되기를 기다렸다. 0.2 mM Ca^{2+}이 첨가된 Tyrode용액에 fura-2/AM을 첨가하여 최종농도를 4 uM로 만든 다음, 배양접시의 용액과 바꾸어 빛을 차단한 상태로 2시간 동안 실온에 방치하였다. 2시간 후 0.2 mM Ca^{2+}이 첨가된 Tyrode용액으로 두 번정도 씻어주어 fura-2/AM의 흡수를 종결하였다. 다시 자궁근 세포를 patch chamber로 분주하여 10 분정도 안정화 시킨 후 2 mM Ca^{2+}이 포함된 정상 Tyrode 용액으로 관류시켰다. 그리고 whole-cell mode를 형성한 후 세포질내로 전극용액이 확산되도록 10분 정도

기다린 다음 막전압을 -40 mV로 고정한 상태에서 세포질내의 Ca^{2+} 변동을 형광측정장치(photon technology International Inc, Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하여 340 nm와 380 nm의 두개의 흥분파장을 번갈아 가며 Ca^{2+}과 결합한 fura-2를 여기(excitation) 시키고 이때 방출하는 에너지를 510 nm의 방사파장에서 Felix software(photon technology International Inc, Lawrenceville, NJ, USA)로 검출하여 340 nm/380 nm 비율의 형광세기를 측정하였다.

2.3. 흰쥐 자궁 평활근 절편 제작

암컷 흰쥐를 경추도살하여 희생시킨 후 즉시 복부를 정중 절개하여 자궁을 적출하고, 95% O_2 및 5% CO_2 혼합개스를 계속 공급하는 Tyrode용액내로 옮겼다. 지방 조직 등을 제거하고 절편으로 나누었다. 보온시킨 물로 계속 순환시킴으로 37℃로 유지시키는 8 ml 용량의 이중벽 muscle chamber내로 자궁근 절편을 옮겨 한쪽 끝은 저부에 고정시키고 다른 한 끝은 Force displacement transducer를 통해 자궁근 절편의 자발운동을 Poly graph(Mode 7, Grass, Quincy MA, USA)로 기록하였다.

2.4. 시약

β-수용체 효현제인 isoproterenol 과 Na/K-ATPase 봉쇄제인 ouabain은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 결체조직 분해효소인 collagenaseⅡ는 Worthington사의 제품을 사용하였고, trypsin inhibitor typeⅡ-S는 Sigma사 제품을 사용하였다. Tyrode 용액의 제조에 사용한 제품은 모두 Sigma사의 제품이였다. 효과를 최대화 하기위하여 모든 시약은 사용하기 직전에 녹여 사용하였다.

2.5. 자료 분석

자료의 획득 및 처리는 Pclamp 9(Axon instrument, Foster city, USA)와 Origin(version 6, Microcal, Northampton, USA)를 이용하였고 모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 자료의 분석은 paired t-검정과 unpaired t-검정으로 확인하였고 이 때 p값은 0.05이하 일 때 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

제 3장 결과

3.1. β_2-수용체 흥분에 의한 Ca^{2+} 전류의 변동

흰쥐 단일 자궁근세포에 천공형 막고정(perforated patch)법을 시행한 후에 막전압을 -85 mV로 고정시킨 상태에서 10 mV까지 500 ms 동안 사다리형 전기 자극으로 탈분극 시킴에 따라 최대 -2.86±1.33 pA/pF (n=7)이 내향전류가 발생하였다 (그림 1A). 전기 자극을 -100 mV에서 +100 mV까지 상향성 경사형 자극으로 바꾸어도 내향 전류는 발생되었다. 그러나 이 경우에는 막전압이 극도로 탈분극됨에 따라 외향성 전류로 바뀌었다 (그림 1B). 내향 전류들은 Ca^{2+} 통로 봉쇄제인 nifedipine 1 μM에 의해 완전히 봉쇄되었을 뿐만 아니라 (그림 1A 및 B), -85 mV로 고정한 상태에서 막전압을 -100 mV 부터 +80 mV까지 10 mV씩 300 ms에 걸쳐 10초 간격으로 올리면서 전기 자극을 시행함에 따라 -40 mV에서 내향 전류가 커지기 시작하여 0 mV에서 최대를 이룬 후 다시 감소하기 시작하여 +40 mV에서는 역전되는 전류-전압 상관관계(I-V relationship)를 나타내는 것으로 보아 (그림 2A) 전형적인 L-type Ca^{2+} 전류임을 확인할 수 있었다. 그러나 천공형 patch 상태에서 얻어진 내향성 L-type Ca^{2+} 전류는 β_2-수용체 효현제인 isoproterenol을 10^{-9} M부터 10^{-6} M까지 증가시키며 투여하여도 그 전류-전압 상관관계에는 별다른 변동이 나타나지 않았다 (그림 2B와 C). 반면, 자궁근 세포에 대한 patch 양상을 전세포 양상(whole cell-mode)으로 바꾸어 시행할 경우에는 isoproterenol이 L-type Ca^{2+} 전류를 현저하게 억제하였다 (그림 3A, B 및 C). 이러한 결과는 적어도 천공형 막고정 상태에서는 자궁근 세포에서 발생되는 L-type Ca^{2+} 전류가 β_2-수용체 흥분으로 아무런 영향을 받지 못함을 시사하고 있다.

다음 단계로 β_2-수용체 흥분에 의한 자궁근의 L-type Ca^{2+} 전류의 변동에 대한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가의 영향을 검색하기 위하여, Na^+, K^+-ATPase 봉쇄제인 ouabain을 투여하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 높인 상태에서 같은 실험을 반복하여 보았다. 그러나 이 경우에도 isoproterenol 투여가 천공형 막고정 상태에서는 L-type Ca^{2+} 전류에 대해 아무런 영향을 미치지 못하는 반면(그림 4A, B 및 C), 전세포 막고정 상태에서는 isoproterenol의 용량에 비례하여 L-type Ca^{2+} 전류가 억제되었다 (그림 5A및 B). 이러한 결과로 보아 β_2-수용체 효현제인 isoproterenol은 L-type Ca^{2+} 전류를 억제하며, 이러한 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류를 억제는 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도 증가와는 무관하나, 막고정법 양상의 차이에는 크게 영향받고 있음을 의미한다. 이러한 사실은 전세포 막고정 상태에서는 천공형 막고정 상태와는 달리 전극 내액이 자궁근 세포내로 확산되어 자궁근 세포내액의 조성을 변동시킨다는 점으로 미루어 보아 전극 내액 중에 isoproterenol의 작용을 항진시키는 성분이 존재할 것이라는 추측을 가능하게 한다.

그러므로 다음 단계에서는 이러한 영향을 초래할 수 있는 가능성을 가지고 있는 전극 내액 중 중요 성분의 하나인 cAMP의 영향 여부를 확인하여 보았다. 그림 6에서 볼 수 있는 바와 같이 천공형 막고정을 시행한 자궁근 세포에서도 전극 내액의 농도와 같은 농도인 0.1 mM의 cAMP를 투여할 경우에는 isoproterenol 용량 증가에 따른 L-type Ca^{2+} 전류를 억제 작용이 항진되는 것을 확인할 수 있었다(그림 6A, B 및 C). 그러나 이와같은 cAMP의 항진 작용이 ouabain을 전처한 상태에서도 지속되는 것을 보아 (그림 6D), 세포내 Ca^{2+} 농도 항진과는 무관한 것을 알 수 있다.

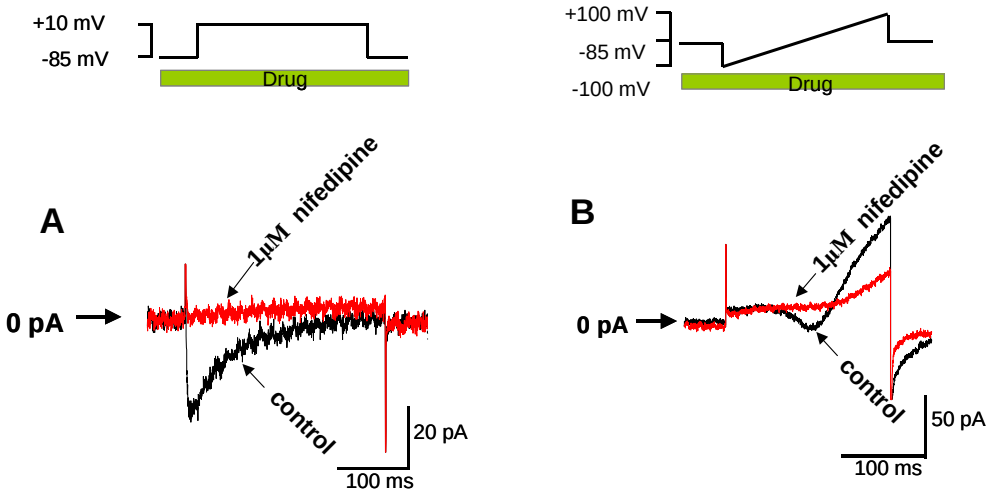

그림 1. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 L-type Ca^{2+} 전류의 확인. A: -85 ㎷에서 +10 ㎷로 사다리형 자극(step pulse), B: -100 ㎷에서 +100 ㎷까지 경사형 자극(ramp pulse). 안정 막전압은 -85 mV에 고정하였다.

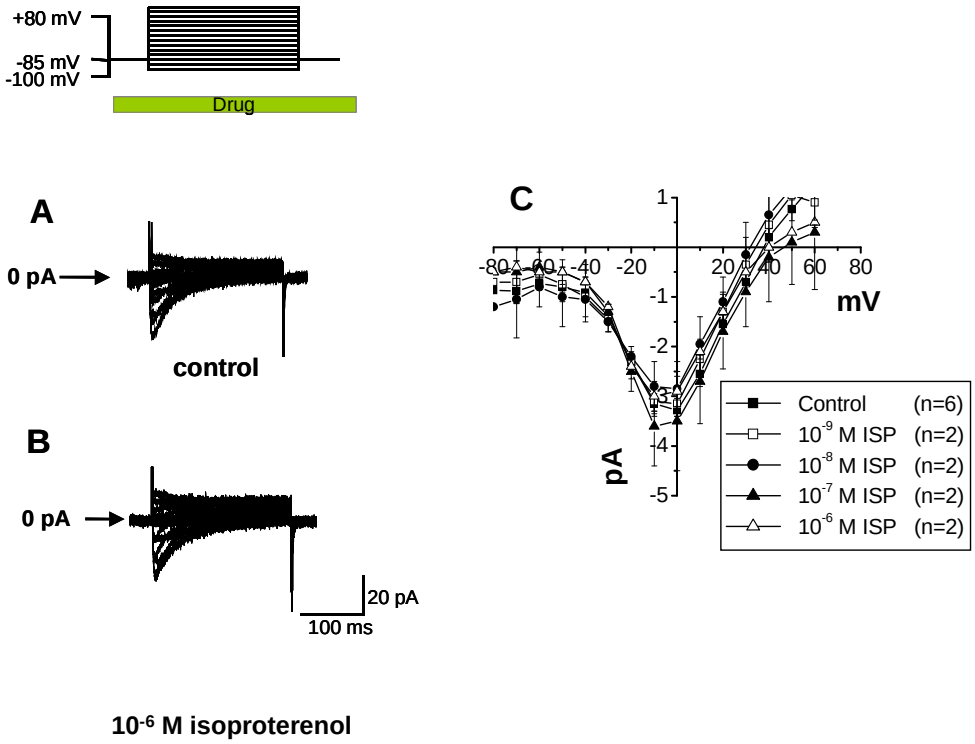

그림 2. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol이 L-type Ca^{2+} 전류에 미치는 영향. A: normal tyrode, B: isoproterenol 10^{-6} M, C: L-type Ca^{2+} 전류의 전류-전압 상관관계(I-V relationship)에 대한 isoproterenol의 용량-반응. Abbreviation: ISP, isoproterenol. 모든 실험은 천공성 막고정을 시행한 후 안정 막전압을 -85 mV로 고정한 상태에서 시행하였다. 데이터는 평균±표준오차이며, 괄호는 예 수이다.

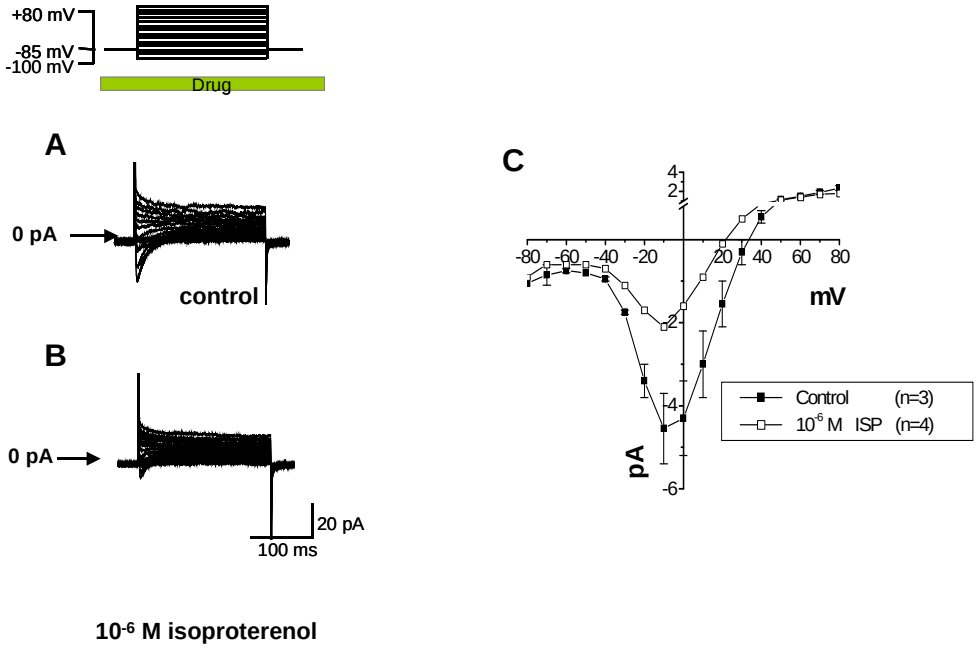

그림 3. 전세포 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol이 L-type Ca^{2+} 전류에 미치는 영향. A: normal tyrode, B: isoproterenol 10^{-6} M, C: L-type Ca^{2+} 전류의 전류-전압 상관관계(I-V relationship)에 대한 isoproterenol 10^{-6} M의 영향. Abbreviation: ISP, isoproterenol. 모든 실험은 전세포 막고정을 시행한 후 안정 막전압을 -85 mV로 고정한 상태에서 시행하였다. 데이터는 평균±표준오차이며, 괄호는 예 수이다.

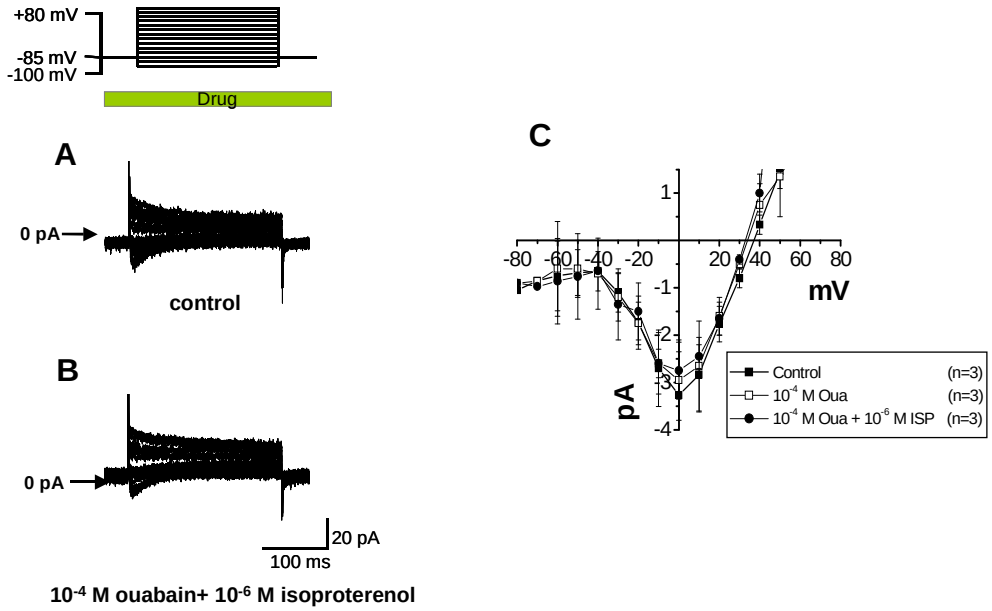

그림 4. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 ouabain의 전처치 효과. A: normal tyrode, B는: ouabain 10^{-4} M과 isoproterenol 10^{-6} M C: L-type Ca^{2+} 전류의 전류-전압 상관관계 (I-V relationship)에 미치는 isoproterenol 10^{-6} M의 영향에 대한 ouabain 10^{-4} M 전처치 효과. Abbreviations: ISP, isoproterenol; Oua, ouabian. 모든 실험은 천공성 막고정법하을 시행한 후 안정 막전압을 -85 mV로 고정한 상태에서 시행하였다. 데이터는 평균±표준오차이며, 괄호는 예 수이다.

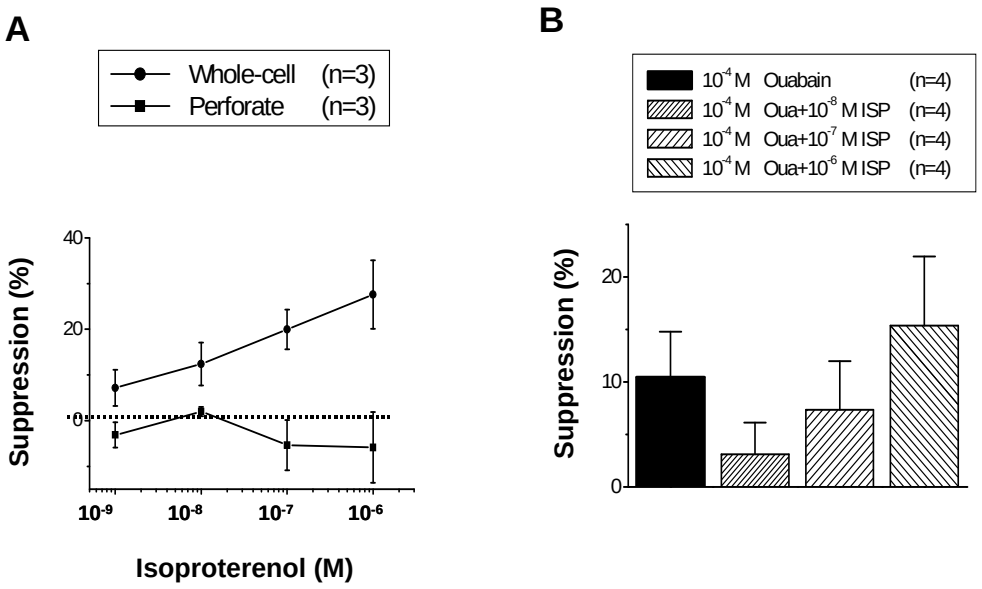

그림 5. 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 ouabain 전처치 효과의 막고정 방법에 따른 비교. A: ouabain 10^{-4} M 전처치 후 isoproterenol의 용량에 따른 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 작용의 막고정 방법에 따른 비교. B: 전세포 막고정 시 isoproterenol 용량에 따른 L-type Ca^{2+} 전류의 실제 봉쇄 비율. Abreviations: Whole-Cell, 전세포 막고정; Perforate, 천공성 막고정; ISP, isoproterenol; Oua, ouabain. 모든 값들은 평균±표준오차이며, 괄호는 예 수이다.

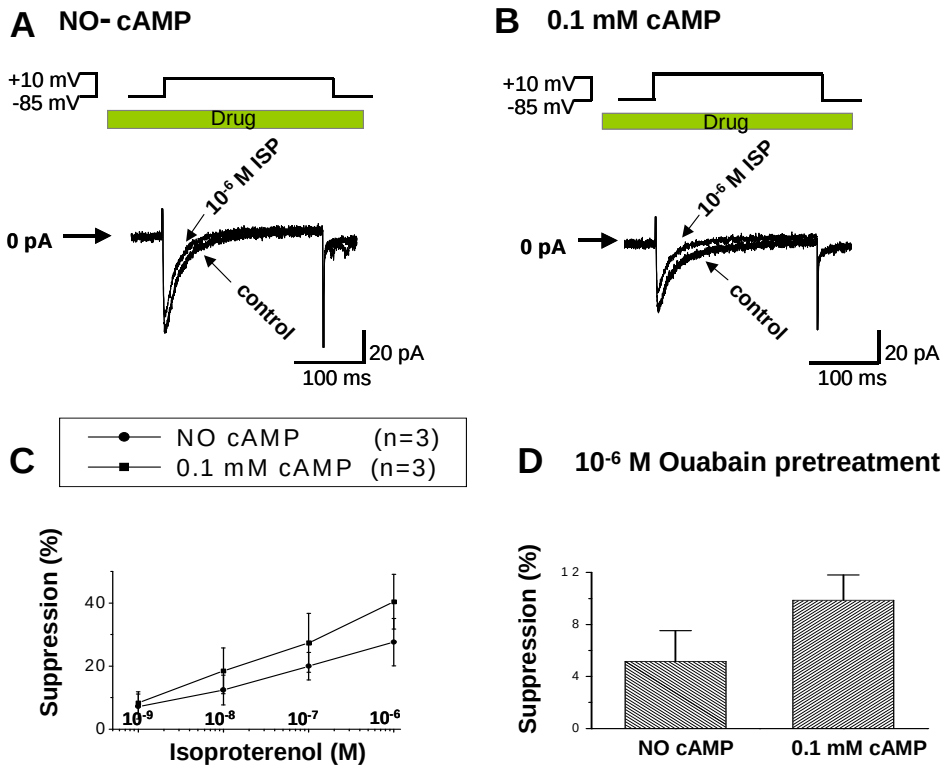

그림 6. 전세포 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 변동에 미치는 cAMP의 영향. A: No cAMP, B: cAMP 0.1 mM, C: isoproterenol의 용량에 비례한 L-type Ca^{2+} 전류 봉쇄 작용과 이에 대한 cAMP 0.1 mM의 항진 작용. D: ouabain 10^{-6} M 전처치한 상태에서 isproterenol 10^{-6} M의 L-type Ca^{2+} 전류 봉쇄 작용에 대한 cAMP 0.1 mM의 항진 작용. Abbreviation: ISP, isoproterenol. 모든 실험은 전세포 막고정 하에서 시행되었으며, 안정 막 전압은 -85 mV에 고정하였다.

3.2. β_2-수용체 흥분에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동

β_2-수용체 흥분에 의한 L-type Ca^{2+} 농도의 변동을 확인하기 위하여 막전압을 -40 mV로 고정시킨 상태에서 직접 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동을 검색하여 보았다. 그러나 그림 7에서 보는 바와 같이 isoproterenol은 10^{-7} M에서부터 10^{-4} M까지 농도를 증가시켰음에도 불구하고 세포질내의 Ca^{2+} 농도에는 아무런 변동을 유발하지 못하였다. 뿐만 아니라 isoproterenol은 10^{-4} M ouabain을 전처치하여 세포질내의 Ca^{2+} 농도를 상승시킨 상태에서도 세포질내의 Ca^{2+} 농도에 대해 아무런 변동을 초래하지 못하였다.

3.3. β_2-수용체 흥분에 의한 자궁근 절편 수축운동의 억제

자궁 절편의 수축 운동을 이용하여 β_2-수용체 흥분에 의한 실제 자궁근 수축 억제 작용에 미치는 세포내 Ca^{2+} 농도 증가의 영향을 검색하여 보았다. 흰쥐 자궁근 절편은 규칙적인 수축 운동을 나타내었으며, 이러한 자발적인 수축 운동은 isoproterenol 투여로 인하여 농도 의존적인 억제를 나타내어 isoproterenol 농도가 10^{-7} M에 이르러서는 완전히 봉쇄되었다(그림 8A). 뿐만 아니라 isoproterenol에 의한 실제 자궁근 수축 운동에 대한 농도 의존적 억제 작용 역시 10^{-4} M의 ouabain을 투여하여 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도를 항진시킨 상태에서도 별 차이 없이 계속 발현됨을 확인할 수 있었다 (그림 8B).

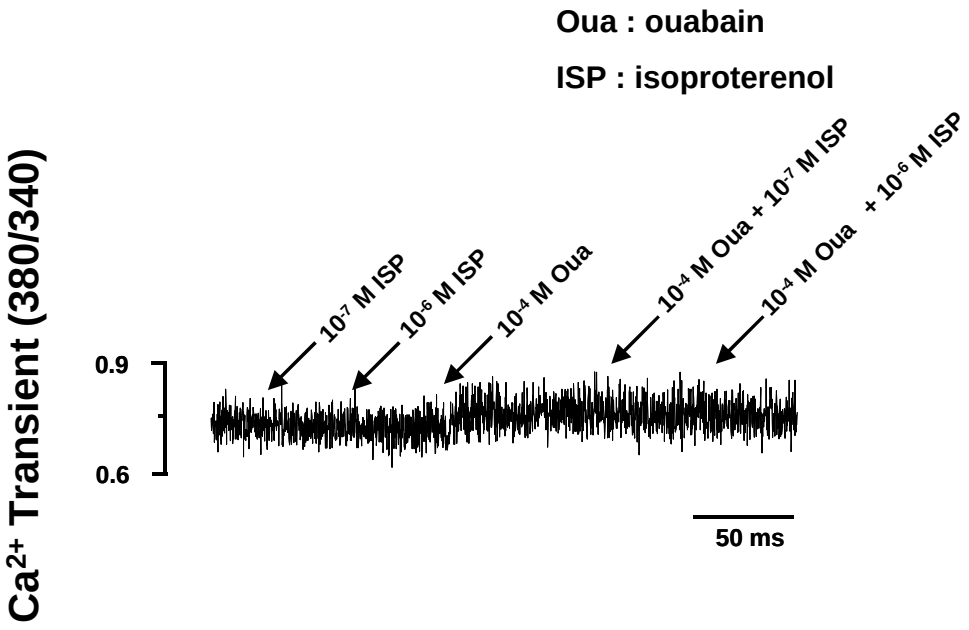

그림 7. 천공성 막고정을 시행한 단일 자궁근 세포에서 isoproterenol의 칼슘 농도에 대한 작용과 이에 대한 ouabain 전처치의 효과. Ca^{2+} 농도는 fura-2/AM을 전처치한 단일 자궁근 세포에 천공성 막고정을 시행하고 막전압을 -40 mV로 고정한 상태에서 측정하였다.

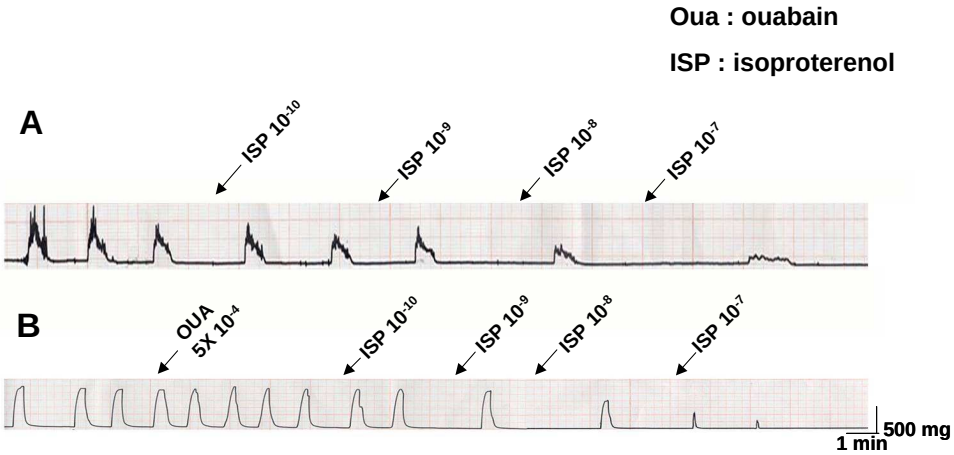

그림 8. 자궁 절편의 자발적 수축 운동에서 Isoproterenol의 농도에 비례한 이완 작용과 이에 대한 ouabain의 전처치 효과. A: No pretreatment, B: ouabain 10^{-4} M pretreatment.

제 4장 고찰

β-수용체는 β_1, β_2, 그리고 β_3-수용체로 세분되나(Bylund 등, 1994), 자궁에서는 β_2-수용체가 80% 이상을 차지하고 있다 (Pennefather 및 Molenaar, 1986). 뿐만 아니라 자궁내 β_2-수용체의 분포는 종에 따른 차이가 별로 없어 사람과 흰쥐 및 해명(guinea pig)에서 서로 일치하는 것으로 알려져 있다(Breuiller 등, 1987; Handberg 등, 1988). β_2-수용체는 Gs-단백을 통하여 adenylate cyclase를 활성화하여 세포내 cAMP를 증가시키며, 증가된 cAMP는 PKA를 활성화시키게 되고 PKA는 다시 MLCK를 인산화시켜 Ca^{2+}-calmodulin에 의한 활성화를 억제하므로 결국 MLC의 인산화가 저해되어 MLC의 ATPase 활성이 소실되고 결국 자궁근의 이완을 초래하는 것으로 잘 알려져 있다(Robison 등, 1967). β_2-수용체 흥분에 의한 세포내 cAMP증가는 이외에도 평활근에서 다음과 같은 작용들을 나타내는 것으로 알려져 있다. (1) 기도평활근에서는 PKA(protein kinase A)를 활성화시킴으로써 세포내 Ca^{2+}저장소로부터 Ca^{2+}의 유리를 방해하거나, (2) 세포내 Ca^{2+}을 제거시켜 이완을 초래할 수 있고, (3) 소의 기관평활근에서는 cAMP와 관계없이 Gsα-단백을 매개하여 직접 K^+-통로를 개방시켜 막전압 탈분극 억제에 의한 이완작용을 나타내기도 하며(Chiu 등, 1993), (4) 세포내 Ca^{2+} 유입을 감소시킨다고 한다. 이러한 작용들은 대부분 그 명확한 기전이 알려져 있지 않으나, 궁극적으로는 평활근의 이완을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다(Johnson, 1993).

여기에서 중요한 사실은 cAMP 증가가 평활근의 Ca^{2+} 유입을 감소시킨다는 사실이다. 그러나 평활근을 제외한 대부분의 조직 장기에서 L-type Ca^{2+} 통로에 미치는 β_2-수용체의 작용에 대해 현재까지 알려져 있는 일반적인 사실은 이와는 정반대이다. 즉 β_2-수용체 흥분에 의한 cAMP 증가와 그에 따른 PKA 활

성은 L-type Ca^{2+} 통로의 Ca^{2+} 이동 통로(pore)를 직접적으로 형성하는 α-분획에 인산화 반응을 초래하여 L-type Ca^{2+} 통로를 개방하여 Ca^{2+} 유입을 증가시키게 되는 것으로 알려져 있다 (Keef 등, 2001). 이와 같은 β_2-수용체 흥분에 의한 Ca^{2+} 유입 증가 작용은 특히 심근의 경우에는 수축 항진의 핵심 기전으로 잘 알려져 있다. 그러므로 평활근에서 β_2-수용체가 Ca^{2+} 유입을 감소시킨다는 사실은 다른 여타 조직 장기와는 정반대되는 작용이며, 아직까지 β_2-수용체 흥분으로 Ca^{2+} 유입이 감소되는 명확한 기전은 뚜렷이 알려져 있지 않다. 하지만 이러한 작용은 자궁 평활근을 연구하는 대다수 연구자들 역시 보편적인 현상으로 받아들이고 있는 것이 사실이다. 물론 대다수의 이러한 주장에 대한 반박도 존재하고 있다. 즉, 자궁을 위시한 평활근에서도 다른 여타 조직 장기에서와 마찬가지로 β_2-수용체 흥분이 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입을 오히려 증가시킨다는 반박이 일부 소수의 연구자들에 의해 지속적으로 제시되고 있다 (Fukumitsu 등, 1990; Ishikawa 등, 1993; Koh 및 Sanders, 1996; Marks 등, 1990; Ruiz-Velasco 등, 1998; Shi 및 Cox, 1995; Taguchi 등, 1997; Muraki 등, 1993; Sperelakis 등, 1994; Xiong 및 Sperelakis, 1995; Welling 등, 1991; 1992). 이러한 정반대되는 결과의 차이를 유발하는 이유로는 몇 가지 가설이 제시되고 있다. 첫 번째는 cAMP의 증가 시 평활근에서는 PKA 보다는 오히려 PKG가 활성화되어 L-type Ca^{2+} 통로를 억제한다는 것이다(Lincoln 등, 1990; White 등, 2000). PKG의 작용은 이미 앞에서 NO에 의한 이완 작용과 연관하여 언급한 바 있으나, PKA 와 공존하고 있는 상태에서도 PKG는 동일한 작용을 나타낼 수 있으며(Sausbier 등, 2000), 특히 자궁근을 위시한 평활근에서 cAMP의 증가로 인한 PKG의 활성이 PKA보다 10배는 강하다는 사실이 이러한 가설을 뒷받침하고 있다(Dhanakoti 등, 2000). 두 번째 가설로는 Ca^{2+}-activated K^+ 전류의 항진이 있다(Guia 등, 1999). 평활근에서는 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가함에 따라 발생되는 외향성 K^+ 전류가 잘 발달되어 있음은 주지의 사실이다. 그러므로 평활근에서도 β_2-수용체 흥분으로 인해 Ca^{2+} 유입이 증가되지만 바로

Ca^{2+}-activated K^+ 전류의 항진을 초래하게 된다. 그리하여 실험적으로는 Ca^{2+} 유입에 따른 내향 전류가 Ca^{2+}-activated K^+ 전류 활성화에 따라 발생되는 외향 전류와 서로 상쇄될 가능성이 있으며, 동시에 Ca^{2+}-activated K^+ 전류 활성화 정도에 따라 막전압이 재분극되어서 Ca^{2+} 통로의 개방을 억제하게 되어 Ca^{2+} 유입이 감소될 수 있다는 설명이다.

평활근에서 β_2-수용체 흥분에 따른 Ca^{2+} 통로와 Ca^{2+} 유입의 변동이 관심을 끌게 되는 이유는 β_2-수용체 흥분이 직접적으로 평활근 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동을 초래하게 되며 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동은 바로 평활근의 수축 혹은 이완으로 이어지기 때문이다. 즉, β_2-수용체 흥분시 Ca^{2+} 통로 및 Ca^{2+} 유입이 억제된다면 평활근은 이완이 초래될 것이며, MLCK를 경유한 이완 작용에 부가적인 역할을 담당하게 될 것이다. 반면, β_2-수용체 흥분시 Ca^{2+} 통로및 Ca^{2+} 유입이 오히려 항진된다면 그 결과는 평활근의 수축으로 이어질 것이며, 이러한 작용은 MLCK를 경유한 이완 작용을 상쇄하게 되거나 오히려 수축을 유발할 수도 있게 될 것이다. 만약 자궁근에서 후자의 반응이 일어나게 된다면, 조기 진통 치료 목적으로 투여한 β_2-수용체 효현제의 작용을 상쇄하여 약화시키게 되거나 예기치 않게 조기 진통의 항진이 초래될 수도 있을 것이다.

이러한 대립에 대해, 본 연구 결과는, 흰쥐 자궁근에서는 β_2-수용체 흥분이 Ca^{2+} 유입 전류에 미치는 영향이 미미하다는, 중립적인 견해를 제시하고 있다. 즉 그림 2, 그림 4 및 그림 5에서 세포 내액의 조성에 변동이 초래되지 않는 천공성 막고정하에서는 isoproterenol 투여 시 대량인 10^{-6} M에서 조차 Ca^{2+} 유입 전류에 대한 작용이 미미하였으며, 그림 7에서 볼 수 있는 바와 같이 isoproterenol을 대량인 10^{-6} M까지 용량을 증가시켜도 자궁근 세포내의 Ca^{2+} 농도는 변동이 없었기 때문이다. 이러한 결과는 β_2-수용체 흥분이 자궁근의 Ca^{2+} 유입에 대해서는 별다른 영향이 없음을 시사하는 것이다. 이것은 β_2-수용

체 흥분은 L-type Ca^{2+} 통로에 아무런 영향을 주지 않는다는 사실을 또다시 지지하고 있다 하겠다. 물론 이번 실험에서도 전세포 막고정 상태에서는 isoproterenol에 의한 Ca^{2+} 유입 전류의 억제가 나타나기는 하였다(그림 3). 그러나 추가적인 실험 결과는 이러한 Ca^{2+} 유입 전류 증가가 cAMP의 증가에 비례함을 보여주고 있으며(그림 5 및 그림 6), 그때의 cAMP의 농도 수준은 생리학적인 수준을 벗어난 대단히 높은 농도임을 보여주고 있기 때문이다. 물론 이러한 추가 실험 결과는 본 연구를 착수하게 된 의문점, 즉, β_2-수용체 흥분에 의한 cAMP 증가가 Ca^{2+} 유입을 억제하는가 하는 질문에 대한 대답으로 생각할 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서 전세포 막고정 시행시 사용하는 내액 내의 cAMP는 0.1 mM 이며, Ca^{2+} 유입 전류의 억제가 초래되는 농도 역시 0.1 mM 이상이었다. 이러한 농도는 생체 내에서는 고농도의 isoproterenol 투여시 조차도 도달될 수 없는 대단히 높은 농도이다. 그러므로 이러한 두 가지 본 실험의 결과들은 결국 cAMP는 Ca^{2+} 유입을 억제시킬 수는 있으나, 실제 이러한 현상은 생체 내에서는 생리학적 상태 뿐 만아니라 약리학적인 상태에서 조차도 나타날 수 없다는 사실을 시사하고 있다 하겠다.

한편, 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면 Ca^{2+} 통로를 억제하는 것은 잘 알려진 사실이다(Adach-Akahane 등, 1996; 1997; Sham, 1997). 그러므로 β_2-수용체 흥분에 의한 Ca^{2+} 유입 변동 역시 세포내 Ca^{2+} 농도의 영향을 받을 수 있을 것이다. 그리하여 본 연구에서는 Na^+, K^+-ATPase를 억제하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 ouabain을 투여하여 자궁근 세포내의 Ca^{2+} 농도 증가시킨 상태에서 isoproterenol의 작용을 반복하여 보았다. 그러나 그림 5 및 그림 6에서 볼 수 있는 바와 같이 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 항진되어도 isoproterenol의 Ca^{2+} 유입에 대한 작용은 정상 Ca^{2+} 농도 상태와 별다른 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도에 대해서도 마찬가지 이었다(그림 7). 뿐만 아니라 자궁 절편을 이용한 실제 수축 운동에 있어서도 ouabain

투여로 세포내 Ca^{2+} 농도가 항진된 상태에서도 isoproterenol의 이완 작용에는 별다른 변동이 나타나지 않았다. 특히 이와 같이 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시킨 상황에서 얻어진 결과들은, 조기 진통 발생시에도 자궁근 세포내의 Ca^{2+} 농도가 항진될 것이므로, 실제 임상적 상황하에서도 그대로 적용될 것이라는 의의를 가질 수 있을 것이다. 결론적으로 이러한 일련의 본 실험 결과들을 종합하여 볼 때 흰쥐 자궁근에서 β_2-수용체가 흥분되어도 Ca^{2+} 유입에는 별다른 변동이 초래되지 않는 다는 사실을 알 수 있다. 그러므로 흰쥐 자궁근에서 β_2-수용체가 흥분되면 Ca^{2+} 유입에는 별다른 영향이 없이, 단지 myosin light chain kinase를 인산화 시키게 되어 자궁근의 이완을 초래한다는 사실을 알 수 있다.

제 5장 결론

흰쥐 단일 자궁근 세포 및 자궁 절편을 이용하여, 자궁근 이완 작용을 유발하는 β_2-수용체 흥분에 의한 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 변동을 추구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 단일 자궁근 세포에서 β_2-수용체 효현제인 isoproterenol은 L-type Ca^{2+} 전류에 대해 천공성 막고정(perforated patch) 상태에서는 아무런 영향을 미치지 못하나, 전세포 막고정(whole cell-mode patch) 상태에서는 용량에 비례하여 억제를 유발하였다.
2. Isoproterenol에 의한 막고정 상태에 의존적인 L-type Ca^{2+} 전류 억제 작용은 ouabain 투여로 단일 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.
3. Isoproterenol에 의한 막고정 상태에 의존적인 L-type Ca^{2+} 전류 억제 작용은 cAMP에 의해 항진되었다.
4. Isoproterenol은 단일 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키지 않았으며, 이러한 isoproterenol의 작용은 ouabain 투여로 단일 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.
5. 자궁 절편의 수축 운동은 isoproterenol에 의해 농도에 비례하여 억제되었으며, 이러한 isoproterenol의 자궁근 이완 작용은 ouabain 투여로 자궁근 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되어도 아무런 변동이 초래되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 흰쥐 자궁근에서 β_2-수용체 흥분은 L-type Ca^{2+} 전류에 대해 별다른 영향을 나타내지 않으며, 단지 myosin light chain kinase를 매개하여 이완작용을 나타낸다고 사료된다.

참고문헌

Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. Cross-signaling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1996;108:435-454.

Adachi-Akahane S, Lu L, Li Z, Frank JS, Philipson KD, Morad M. Calcium signaling in transgenic mice overexpressing cardiac $Na^{(+)}$-Ca^{2+} exchanger. *J Gen Physiol.* 1997;109:717-729.

Best L, Bolton TB. Depolarization of guinea-pig visceral smooth muscle causes hydrolysis of inositol phospholipids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1986;333:78-82.

Breuiller M, Rout B, Leroy MJ, Blot P, Kaplan L, Ferre F. Adrenergic receptors in inner and outer layers of human myometrium near term: characterization of beta-adrenergic receptor sites by [^{125}I]-iodocyanopindolol binding. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1987;24:28-37.

Bylund, DB, Eikenberg DC, Heible JP, Langer SZ, Lefkowiz RJ, Minneman KP, et al. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994;46:121-136.

Chiu P, Cook SJ, Small RC. β-Adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K^{+}-channels in bovine tracheal muscle: studies of mechanical activuty and ion fluxes. *Br J Pharmacol.* 1993;109:1149-1156.

Dhanakoti SN, Gao Y, Nguyen MQ, Raj JU. Involvement of cGMP-dependent protein kinase in the relaxation of ovine pulmonary arteries to cGMP and cAMP. *J Appl Physiol* 2000;88:1637-1642.

Dulhunty AF, Laver DR, Gallant EM, Casarotto MG, Pace SM, Curtis S. Activation and Inhibition of Skeletal RyR channels by a part of the Skeletal DHPR Ⅱ-Ⅲ Loop: Effects of DHPR Ser687 and FKBP12. *Biophys J* 1999;77:189-203.

El-Hayek R, Antoniu B, Wang J, Hamilton SL, Ikemoto N. Identification of Calcium Release-triggering and Blocking Regions of the Ⅱ-Ⅲ Loop of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor. *J Biol Chem* 1995;270:22116-22118.

Ferguson DG, Young Ef, Raeymaekers L, Kranias EG. Localization of phospholamban in smooth muscle using immunogold electron microscopy. *J Cell Biol.* 1988;107:55-62.

Fukumitsu T, Hayashi H, Tokuno H, Tomita T. increase in calcium channel current by β-adrenoceptor agonists in single smooth muscle cells isolated from porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 1990;100: 593-599.

Greespan K. Cardiac excitation conduction and the electrocardiogram. *Physiology 3rd ed. edited by Selkurt EE: Little Brown and Co;* 1971.

Guia A, Wan X, Courtermanche M, Leblanc N. Local Ca^{2+} entry through l-type Ca^{2+} channels activates Ca^{2+}-dependent K^{+} channels in rabbit coronary myocytes. *Circ Res* 1999;84:1032-42.

Gurrola GB, Arevalo C, Sreekumar R, Lokuta AJ, Walker JW, Valdivia HH. Activation of Ryaanodine Receptors by Imperatoxin A and a Peptide Segment of the Ⅱ-Ⅲ Loop of the Dihydropyridine Receptor. *J Biol Chem* 1999;274:7879-7886.

Handberg GM, Davis EA, Hall S, Molenaar P, Summers RJ, Pennefather JN. β-Adrenoceptors in circular and longitudinal myometrial membranes and in lung membranes from dioestrous and postpartum guinea-pigs. *Clin Exp Pharmacol* 1988;15:681-693.

Henrikson CA, Marx SO, LI Y, Bers R, R MA. Cardiac Ca^{2+} channel Ⅱ-Ⅲ Loop peptide reduces open probablity of isolated SR Ca^{2+} release channels and CaSpF in ferret ventricular myocytes. *Circ Res* 1999;100:1-190.

Ishikawa T, Hume JR, and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res* 1993;73:1128-1137.

Johnson M. β_2-adrenoceptor agonists: optimal pharmacological profile. In The Role of β_2-Agonists in Asthma Management. *The Medicine Group Oxford.* 1993;6-8.

Keef KD, Jume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels (Ca_v1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1743-C1756.

King JF, Grant A, Keirse MJNC, Chalmers I. Betaagonists in preterm labor: an overview of randomized controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95:211-22.

Koh SD, Sanders KM. Modulation of Ca^{2+} current in canine colonic myocytes by cyclic nucleotide-dependent mechanims. *am J Physiol Cell Physiol* 1996;271:C794-C803.

Lamb GD, El-Hayek R, Ikemoto N, Stephenson DG. Effect of dihydropyridine Receptor Ⅱ-Ⅲ Loop peptides on Ca^{2+} release in skinned Skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C891-905.

Li Y, Marx SO, Marks AR, Bers DM. Cardiac Ca^{2+} channel Ⅱ-Ⅲ Loop peptide reduces open probablity of isolated SR Ca^{2+} release channels and CaSpF in ferret ventricular myocytes. *Biophys J* 1999;76:A463.

Lincoln TM, Cornwell TL, Taylor AE. cGMP-dependent protein kinase medeates the reduction of Ca^{2+} by cGMP in vascular smooth muscle cells. *Am Physiol Cell Physiol* 1990;258:C399-C407.

Lu X, Xu L, Meissner G. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:6511-6516.

Marks TN, Dubuak GR, Jones SW. Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-defived cell line. *Pflugers Arch* 1990;417: 433-439.

Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, Himpens B, Casteels R. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol Ther.* 1992;56: 191-231.

Muraki K, Bloton TB, Imaizumi Y, Watanabe M: Effect of isoprenaline on Ca^{2+} channel current in single smooth muscle cells isolated from taenia of the guinea-pig caecum. *J Physiol* 1993;471:563-582.

Pennefather JN, Molnaar P. Beta-2 adrenoceptor binding sites incircular and longitudinalmyometrial layers of virgin guinea-pig: the influence of ovarian steroids. *J Auton Pharmacol.* 1986;6:207-213.

Raeymaekers L, Wuytack F. Ca^{2+} pumps in smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 1993;14:141-57.

Rhee SG, Bae YS. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isoenzymes. *J Biol Chem* 1997;272:15045-48.

Robison G A, Butcher RW, Sutherland EW. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1967;319:703-723.

Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume JR, Keef KD. Modulation of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res* 1998;82:557-565.

Sausbier M, Schubert R, Voigh V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanism of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Cric Res* 2000;87:825-830.

Sawdy RJ, Bennett PR. Recent advances in the therapeutic management of preterm labour. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 1999;11:131-139.

Sham JS. Ca^{2+} release-induced inactivation of Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes: evidence for local Ca^{2+} signalling. *J Physiol.* 1997;500:285-295.

Shi QY, Cox RH. GTP requirement for isoproterenol activation of calcium channels in vascular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;269:H195-H202.

Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1968;159:129-45.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth

muscle. *Nature.* 1994;372:231-36.

Sperelakis N, xion Z, Haddad G, Masuda H: Regulation of slow calcium channels of myocardial cells and vascular smooth muscle cells by cyclic necliotides and phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 1994;140(2):103-117.

Taguchi K, Ueda M, Kubo T. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteic artery cells. *Jpn J Pharmacol* 1997;74:179-186.

Weber KT, Janicki JS, Schroff SG. Measurement of ventricular function in the experimental laboratory. in the heart and cardiovascular system. *Scientific foundations vol 2 editied by Fozzard HA et al: Raven Press NY;* 1986.

Welling A, Felbel J, Peper K, Hofmann F: Beta-adrenergic receptor stimlates L-type calcium current in adult smooth muscle cells: *Blood Vessels* 1991;28(1):154-158.

Welling A, Felbel J, Peper K, Hofmann F.: Hormaonal regualation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992;262(3):L351-L359.

White RE, Kryman JP, El Mowafy AM, Han G, Carier GO. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent

protein kinase to stimulate BK_{ca} channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Cric Res* 2000;86:897-905.

Xiong Z, Sperelakis N: Reguation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(1):75-91.

Yamamoto Y, Hu SL, Kao CY. Inward current in single cells of the guinea pig taenia coli. J Gen Physiol. 1989;93:521-550.

Zhu X, Gurrola G, T. JM, Valdivia HH. Conversion of an inactive cardiac dihydropyridine Receptor Ⅱ-Ⅲ Loop segment into forms that activate Skeletal ryanodine receptors. *FEBS Letter* 1999;450:221-226.

ABSTRACT

Role of β-receptor-induced calcium influx in myometrial contraction

Park, Jin Su

Department. of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor In Bae Chung)

It has been well known that β_2-receptor relaxes uterine contraction through the cAMP and protein kinase A. Stimulation of β_2-receptor induces a cascade of cAMP increase and protein kinase A activation via mediation of G-protein. Then, protein kinase A phosphorylates and inactivates the myosin light chain kinase, which results in a loss of the ATPase activity of myosin light chain and a uterine relaxation. However, cAMP increase and protein kinase activation may also be able to increase a Ca^{2+} influx by phosphorylating the L-type Ca^{2+} channel. If the latter may actually happen in uterine myometrium then it will offset the uterine relaxation by increasing intracellular free cytosolic Ca^{2+} concentration after β_2-receptor stimulation. Therefore, this study was performed to clarify the possibility of β_2-receptor-induced stimulation of L-type Ca^{2+} channel and Ca^{2+} influx by using the enzymetically isolated single uterine myocytes and myometrial strips of the rat. The results were as follows;

1. Isoproterenol, a β_2-receptor agonist, did not inhibit L-type Ca^{2+} current after perforated patch but after whole cell-mode patch in the isolated single rat uterine myocytes.
2. This patch configuration-dependent inhibition of L-type Ca^{2+} current after isoproterenol was not affected by an increase in the cytosolic free Ca^{2+} concentration caused by ouabain.
3. This patch configuration-dependent inhibition of L-type Ca^{2+} current after isoproterenol was rather enhanced by application of cAMP.
4. Isoproterenol did not affected the cytosolic free Ca^{2+} concentration in the isolated single uterine myocytes not only during the resting state but also after the cytosolic free Ca^{2+} concentration was raised by ouabain.
5. Isoproterenol suppressed contractions of the uterine strips in a concentration-dependent manner. This isoproterenol-induced uterine relaxation was also not affected by ouabain pretreatment that raises the cytosolic free Ca^{2+} concentration.

From the above results, it was concluded that β_2-receptor stimulation induces relaxation solely through phosphorylation of the myosin light chain kinase without any influences on the L-type Ca^{2+} channel in the rat uterus.

Key words: rat uterus, β_2-receptor, Isoproterenol, L-type Ca^{2+} channel and cytosolic Ca^{2+} concentration.