

Carbon Monoxide가 토키 음경해면체 평활근 이완에 미치는 효과

Effect of Carbon Monoxide on the Relaxation of the Rabbit Corpus Cavernosal Smooth Muscle

Koon Ho Rha, Young Deuk Choi, Hyung Ki Choi, Moo Sang Lee

From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine,
Seoul, Korea

Purpose: Carbon monoxide (CO) is produced during the degradation of hemoglobin to heme (iron protoporphyrin) and biliverdin, and present in various tissues including brain. CO is believed to activate soluble guanylate cyclase to exert its action on the smooth muscles. The effects of CO and its relationships to adrenergic or cholinergic mechanisms were studied using the isolated rabbit corpus cavernosal strips, and the effects of CO and NO were further investigated.

Materials and Methods: Using adult New Zealand rabbits, the corpus cavernosal strip was carefully prepared from rabbit penis and was suspended in an 10ml organ bath containing Tyrode solution. When a stable tension level of the strip had been attained, drugs were added to the organ bath and the change of motility of the strip was recorded on a computerized polygraph.

Results: The NO donor, sodium nitroprusside (SNP) and CO caused a dose-dependent relaxation of the cavernosal strip of the rabbit penis. Pretreatment of SNP and CO had no effect on contraction induced by adrenergic drugs and the effects of SNP and CO was not affected by atropine. The relaxation effects of SNP were inhibited by NO scavenger pyrogallol, inhibitor of soluble guanylate cyclase 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) and methylene blue. The relaxation effects of CO were significantly inhibited by ODQ and methylene blue. The relaxation effects by acetylcholine were inhibited by NO synthase inhibitor L-nitroarginine methyl ester (NAME) and deendothelialization, but not affected by zinc protoporphyrin (ZnPP), the heme oxidase inhibitor. On the immunostaining of heme oxidase (HO) in corpus cavernosal smooth muscle strip, the positive staining for HO was observed in the perivascular nerve fibers.

Conclusions: The relaxation effect of NO was confirmed, and CO exerts an endothelium dependent relaxing effect on the cavernosal strip of the rabbit penis similar to NO. This action is seem to be mediated by soluble guanylate cyclase, and the actions of CO is also mediated by similar guanylate cyclase system. (Korean J Urol 2001; 42: 23~31)

Key Words: Nitric oxide, Carbon monoxide, Relaxation, Corpus cavernosal muscle

대한비뇨기과학회지
제42권 제1호 2001년

연세대학교 의과대학
비뇨기과학교실, 남성의학연구소
나군호·최영득·최형기·이무상

접수일자 : 2000년 6월 7일
채택일자 : 2000년 10월 18일

교신저자 : 최영득
영동세브란스병원
비뇨기과
서울시 강남구 도곡동
146-92 ☎ 135-720
전화 : 02) 3497-3474
e-mail : urology@ymc.yonsei.ac.kr

서 론

음경발기는 풀린성과 아드레날린성 발기기전을 모두 봄 쇄하더라도 유발되는 것으로 미루어 보아 비아드레날린성 비콜린성 (nonadrenergic noncholinergic; NANC) 신경전달

물질이 존재하는 것으로 추정되었고,¹ 이중 해면체 소공의 내피세포에서 분비되는 이완물질 (EDRF; endothelium derived relaxing factor)이며 nitric oxide (NO)가 가장 유력한 비아드레날린성비콜린성 신경전달물질로 알려져 있다. NO의 이러한 작용은 혈관 및 신경계의 생리적 연구에서 먼저 생체적으로 중요한 전령임이 밝혀졌고, 이러한

연구는 심혈관 분야에서 시작되어 다른 분야, 특히 혈관으로 이루어진 음경해면체 조직에서도 NO의 기전이 밝혀졌다. 이러한 기전은 NO가 guanylate cyclase의 heme moiety의 iron-sulfur 구조체에 결합하여 cyclic GMP를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

Carbon monoxide (CO)는 hemoglobin이 대사되는 과정에서 생체적으로 발생하는 미량의 불안정한 기체이다. CO는 heme oxidase라는 효소에 의해 생성되며 (Fig. 1), 최근 신경계 및 다양한 장기에서 발견되고 있다. NO와 같은 heme moiety에 반응하리라고 생각되는 CO도 다양한 효소체계에 영향을 미칠 개연성이 있으며, 실제로 신경계² 및 다른 장기에서는 이러한 기전이 연구되고 있다.^{3,4} 그러나 아직까지 음경해면체에서는 CO의 역할이 규명되지 않았기 때문에 본 연구에서는 토끼 음경해면체 평활근 조직을 이용하여 생체외에서 CO에 대한 해면체 평활근 조직의 반응을 관찰하고 음경발기에 있어서 CO의 역할을 규명해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

생후 4-6개월된 수컷 New Zealand 토끼 (몸무게 3.0-3.5kg) 64마리를 대상으로 하였다. NO 실험군과 CO 실험군으로 나누어 각각을 실험 당 8마리 이상을 사용하였다.

2. 해면체 절편 표본 작성

토끼 이각정맥을 통해 sodium pentobarbital (30-50mg/kg) 을 주사하여 마취시키고, 음경 전체를 조심스럽게 절제하였다. 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합기체가 공급되는 저온의 Tyrode 용액 (Na^+ (153.6), K^+ (5.3), Ca^{++} (3.0), Mg^{++} (1.2), Cl^- (157.2), $\text{H}_2\text{PO}_4^{--}$ (0.6), SO_4^{--} (1.2), HCO_3^- (7.1), glucose (11.4); 단위: mM/L) 내에서 해부용 현미경 하에 결체조직 및 지방조직을 제거하였고, 배막으로부터 해면체 평활근을 분리하여 2x2x6mm 크기의 절편을 만들고 Tyrode 용액이 들어있는 10ml organ bath에 고정하였다. 절편의 한쪽 끝은 organ bath의 아래 부분에 실로 고정하고 다른 끝은 같은 방법으로 동력성 수축 기록계에 연결하여 해면체 평활근의 운동 상태를 force-displacement transducer (TSD 105, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA)를 MP100 data acquisition system과 Biopac's Acknowledge software version 3.1을 이용하여 기록하였다. 절편 준비시의 모든 과정은 평활근의 내피세포가 파괴되지 않도록 주의하였다. Organ bath내의 Tyrode 용액은 bath의 이중벽 사이로 보온된 물을 계속 순환시켜 37°C로 유지하고, 산소 혼합기체를 계속 공급하며 pH 7.4로 유지하였다.

3. 등장력 수축을 위한 이상적 장력 결정

음경해면체 평활근 절편의 초기장력을 2g 정도로 유지시킨 상태에서 약 90-120분 동안 Tyrode 용액을 갈아주면서 안정상태로 도달되도록 유도하였다. 안정상태에서 phenylephrine (PHE)을 투여하여 수축정도를 관찰하였다. 그 후 Tyrode 용액으로 절편을 3회 이상 씻어 안정상태로 회복시키고 장력을 0.5g씩 올리거나 내려 안정상태에서 같은 농도의 PHE에 의한 수축정도를 재관찰하였다. 이와 같은 조작을 반복하여 최대수축을 유도하고 수축정도의 차이가 3회 연속으로 이전 수축의 10% 이내일 때를 이상적 장력으로 정하고 이러한 이상적 장력 조건의 안정상태에서 약물반응 실험을 시작하였다.

4. 해면체 평활근의 약물반응

약물에 대한 반응의 실험을 시작하기 전에 PHE (5×10^{-6} M)과 acetylcholine (ACh; 10^{-4} M)의 투여로 내피세포의 존재를 확인하고 내피세포가 완벽하게 존재하는 표본만을 골라 실험에 사용하였다. 각각의 약물반응을 관찰한 후 다음 실험까지는 3회 이상 Tyrode 용액으로 씻고 약 20분 이상 안정상태를 유지한 후 진행하였다.

1) 용량의존적 이완효과 관찰

(1) Sodium nitroprusside

NO 공여물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 PHE (5×10^{-6} M)으로 수축시킨 토끼 음경해면체 평활근 절편에 10^{-7} M 부터 10^{-4} M까지 10배수씩 투여하여 평활근의 긴장도 변화를 관찰하였다.

(2) Carbon monoxide

순도 99.9%의 CO gas를 37°C에서 10분간 bubbling시켜서 만든 CO gas가 용해된 생리식염수를 0.72×10^{-6} M의 농도로 투여하여 토끼 음경해면체 평활근 절편의 이완효과를 관찰하였다. 아울러 동량의 CO가 포함되지 않은 생리식염수를 투여하여 이완효과를 비교하였다. 99.9%의 CO gas를 상기 조건에서 식염수에 포화시킨 경우 농도는 gas chromatography로 측정한 결과 3.6mM이었다.⁵

2) NO 및 CO가 아드레날린성 작용에 미치는 효과

NO 및 CO가 아드레날린성 작용에 미치는 효과는 SNP 및 CO 투여한 경우와 하지 않은 경우에서 PHE (5×10^{-6} M)의 수축정도를 비교하였다.

3) NO 및 CO가 콜린성 작용에 미치는 효과

SNP 및 CO에 의한 이완효과는 콜린성 봉쇄제인 atropine (10^{-6} M)로 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)으로 수축시킨 토끼 음경해면체 평활근 절편에 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M) 및 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 평활근의 긴장도 변화를 관찰하였다.

4) NO에 의한 이완효과의 기전

NO에 의한 음경해면체 평활근 절편의 이완이 cyclic GMP를 생성하는 효소인 guanylate cyclase에 의한 것인지

확인하기 위해 soluble guanylate cyclase의 비특이적 억제제인 methylene blue (Mallinckrodt Chemical Co., St. Louis, USA; 10^{-6} - 10^{-3} M) 및 특이적 억제제인 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; Tocris Cookson Ltd., UK; 10^{-8} - 10^{-5} M)로 전처치하고 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 NO 공여물질인 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다. NO 제거제인 pyrogallol (10^{-7} - 10^{-4} M)을 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 NO 공여물질인 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다.

5) CO에 의한 이완효과의 기전

CO에 의한 음경해면체 평활근 절편의 이완이 cyclic GMP를 생성하는 효소인 guanylate cyclase에 의한 것인지 확인하기 위해 soluble guanylate cyclase의 비특이적 억제제인 methylene blue (10^{-6} - 10^{-3} M) 및 특이적 억제제인 ODQ (10^{-8} - 10^{-5} M)로 전처치하고 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다. NO 제거제인 pyrogallol (10^{-7} - 10^{-4} M)을 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다.

6) ACh의 이완효과

EDRF에 의한 음경해면체 평활근 절편의 이완효과를 확인하기 위해서 Ach (10^{-4} M)를 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 투여하였다. 내피의존적 이완이 NO 혹은 CO에 의해 이루어지는 것을 확인하기 위해 heme oxygenase의 억제제인 zinc protoporphyrin IX (ZnPP; Porphyrin Products Inc., Utah, USA, 10^{-6} - 10^{-3} M) 및 nitric oxide synthase의 억제제인 L-nitroarginine methylester (NAME; 10^{-6} - 10^{-3} M)를 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 Ach (10^{-4} M)을 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다. 마지막으로 ACh에 의한 이완이 내피의존적 현상인지 여부를 확인하기 위해서 토끼 음경해면체 평활근 절편을 조심스럽게 비벼서 탈내피화를 유도한 후 Ach (10^{-4} M)의 이완효과의 변화를 관찰하였다.

5. Heme Oxygenase 면역염색

동결된 토끼의 음경조직을 $3\mu\text{m}$ 두께로 절편하여 공기중에서 30분 건조시키고 methanol과 acetone을 동량 회석하여 냉동상태하에서 5분 동안 고정시켰다. 다시 공기중에서 10분간 건조시키고 Tris buffered saline (TBS)에 침적하였다. 20분간 3% H_2O_2 에 처리하여 내인성 peroxidase를 차단하였다. 5분간 중류수로 세척하고 10mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에 담구어 microwave oven에서 5분간 끓인 후 1분간 침적하였다. 이후 15분간 냉장고에서 식하고 중류수로 씻은 후 TBS으로 5분간 세척하였다. Heme oxidase의 일차항체로 polyclonal rabbit HO-2 항체 (StressGen Biotechnologies, Toronto, Canada)를 1 : 200으로 회석하여

실온에서 1시간 반응시킨 후, 통상적인 ABC 방법으로 biotin이 부착된 이차항체에 30분간 반응시켰다. TBS로 세척하고 streptavidin에 30분간 부착시킨 후 TBS로 반응을 정지시킨 후 3-aminoethyl carbozole (AEC)로 발색하였다. Harris hematoxylin으로 대조염색하였다.

6. 자료 분석

개인용 컴퓨터의 Biopac 프로그램에서 평균과 표준오차를 구하고, 실험 결과에 대한 분석 중 각 측정군간의 의의 판정은 Student's T test, 약물 농도별 평활근 장력의 변화는 simple regression test를 이용하였으며 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 최대이완의 50%를 나타내는 EC₅₀은 linear regression analysis를 이용해서 계산하였다.

결 과

1. 용량의존적 이완효과 관찰

1) Sodium nitroprusside

안정화된 토끼 음경해면체 평활근에서 약물에 대한 반응의 실험을 시작하기 전에 PHE (5×10^{-6} M)과 Ach (10^{-4} M)의 투여로 내피세포의 존재를 확인하고 내피세포가 완벽하게 존재함을 확인하였다. NO 공여물질인 SNP를 PHE (5×10^{-6} M)으로 수축시킨 토끼 음경해면체 평활근 절편에 10^{-7} M부터 10^{-4} M까지 10배수씩 투여하여 평활근의 긴장도 변화를 관찰한 결과 SNP의 이완작용은 용량의존적으로 증가하였다 (SNP의 이완효과; 10^{-7} M: $15.07 \pm 5.87\%$, 10^{-6} M: $41.25 \pm 6.82\%$, 10^{-5} M: $74.49 \pm 7.49\%$, 10^{-4} M: $98.67 \pm 9.18\%$) ($p < 0.01$). SNP에 의한 이완의 정도는 같은 농도의 CO의 투여에 의한 토끼 음경해면체 평활근의 이완정도를 비교한 결과 EC₅₀은 SNP가 $2.1 \mu\text{M}$ 이었고 CO가 $53 \mu\text{M}$ 로 평활근 이완에서 약 25배 강하였다 ($p < 0.001$).

2) Carbon monoxide

PHE으로 수축된 토끼 음경해면체 평활근 절편에 대한 CO의 이완효과를 관찰한 결과 CO의 농도가 증가할수록 용량의존적인 평활근의 이완이 관찰되었다 (CO의 이완효과; 18×10^{-6} M: $15.32 \pm 4.98\%$, 36×10^{-6} M: $35.44 \pm 5.57\%$, 54×10^{-6} M: $59.45 \pm 6.38\%$, 72×10^{-6} M: $71.54 \pm 9.93\%$) ($p < 0.01$). 아울러 동량의 CO가 포함되지 않은 생리식염수를 투여하여 이완효과를 비교한 경우 PHE으로 수축된 토끼 음경해면체 평활근 절편에 이완을 일으키지 않았다.

2. NO 및 CO가 아드레날린성 작용에 미치는 효과

NO 및 CO가 아드레날린성 작용에 미치는 효과를 알아보기 위해 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M) 및 CO (0.72×10^{-6} M) 투여한 경우와 투여하지 않은 경우에서 PHE (5×10^{-6} M)의 수축정도를 비교한 결과 PHE에 의한 수축효과의 감소는 관

찰되지 않았다.

3. NO 및 CO가 콜린성 작용에 미치는 효과

SNP 및 CO에 의한 이완효과는 콜린성 봉쇄제인 atropine (10^{-6} M)로 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)으로 수축시킨 토끼 음경해면체 평활근 절편에 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M) 및 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 평활근의 긴장도 변화를 관찰한 결과 대조군과 비교시 차이가 없었다 (atropine 전처치한 후 SNP의 이완효과; 10^{-7} M: $13.26 \pm 6.26\%$, 10^{-6} M: $38.91 \pm 7.95\%$, 10^{-5} M: $76.29 \pm 8.52\%$, 10^{-4} M: $97.21 \pm 9.46\%$) ($p > 0.05$) (atropine 전처치한 후 CO의 이완효과; 18×10^{-6} M: $18.45 \pm 5.65\%$, 36×10^{-6} M: $35.21 \pm 6.87\%$, 54×10^{-6} M: $57.83 \pm 7.43\%$, 72×10^{-6} M: $69.42 \pm 9.12\%$) ($p > 0.05$).

4. NO에 의한 이완효과에 대한 기전

NO에 의한 음경해면체 평활근 절편의 이완이 cyclic GMP를 생성하는 효소인 guanylate cyclase에 의한 것인지 확인하기 위해 soluble guanylate cyclase의 특이적 억제제인 ODQ (10^{-8} - 10^{-5} M)로 전처치하고 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 NO 공여물질인 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰한 결과 ODQ에 의해 SNP의 음경해면체 평활근 절편 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 2) ($p < 0.05$). 비특이적 soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue를 농도별로 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 methylene blue에 의해 CO의 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 4) ($p < 0.05$). NO 제거제인 pyrogallol을 농도별로 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 CO로 포화된 생리식염수를 농도별로 투여한 경우, NAME나 pyrogallol에 의해 CO의 평활근 이완작용은 영향받지 않았다 ($p > 0.05$).

편에서 SNP를 농도별로 투여하여 이완의 억제정도를 관찰한 결과, methylene blue에 의해 SNP의 음경해면체 평활근 절편 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 3) ($p < 0.05$). NO 제거제인 pyrogallol (10^{-7} - 10^{-4} M) 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 SNP (10^{-7} - 10^{-4} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰한 결과, pyrogallol에 의해 SNP의 음경해면체 평활근 절편 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 3) ($p < 0.05$).

5. CO에 의한 이완효과에 대한 기전

Guanylate cyclase의 특이적 억제제인 ODQ (10^{-8} - 10^{-5} M)로 전처치하고 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰한 결과 ODQ에 의해 CO의 음경해면체 평활근 절편 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 4) ($p < 0.05$). 비특이적 soluble guanylate cyclase inhibitor인 methylene blue를 농도별로 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 CO (0.72×10^{-6} M)를 투여하여 이완의 억제정도를 관찰한 결과, methylene blue에 의해 CO의 음경해면체 평활근 절편 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 4) ($p < 0.05$). NO 제거제인 pyrogallol을 농도별로 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 CO로 포화된 생리식염수를 농도별로 투여한 경우, NAME나 pyrogallol에 의해 CO의 평활근 이완작용은 영향받지 않았다 ($p > 0.05$).

6. ACh에 의한 이완효과에 대한 기전

내피의존적 이완이 NO 혹은 CO에 의해 이루어지는

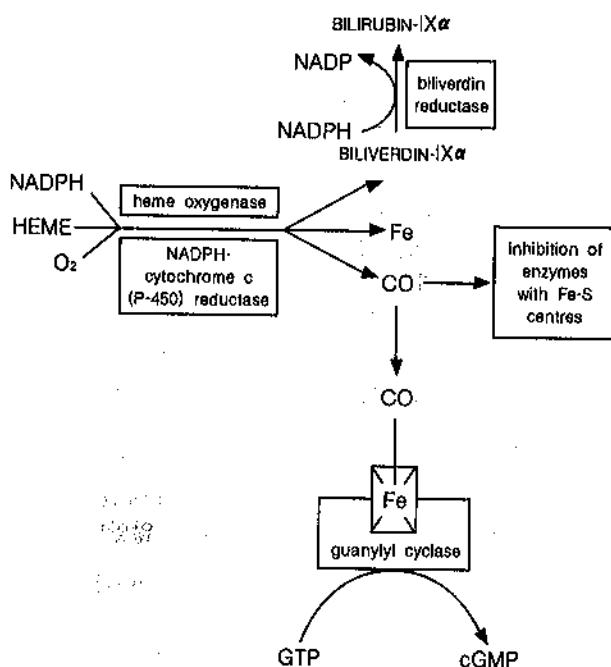


Fig. 1. The formation of biliverdin-IX, iron (Fe) and carbon monoxide (CO) following heme metabolism, catalyzed by heme oxygenase in concert with NADPH-cytochrome c (P-450) reductase.

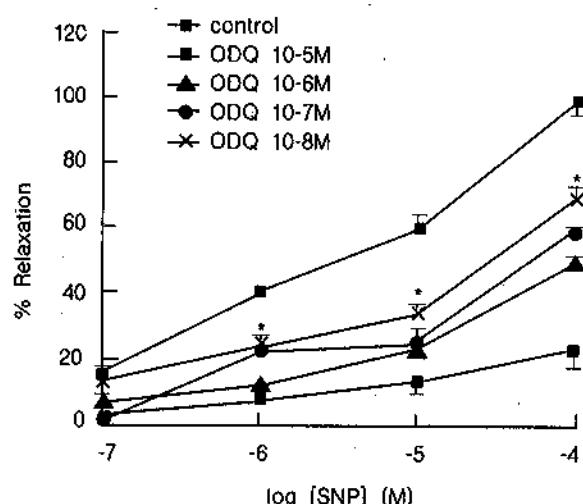


Fig. 2. Effects of various concentrations of soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) on sodium nitroprusside (SNP) induced relaxations on the sub-maximally precontracted rabbit cavernosal smooth muscle strips by phenylephrine (5×10^{-6} M) ($*$: $p < 0.05$).

것을 확인하기 위해 heme oxygenase의 억제제인 ZnPP 및 NO synthase의 억제제인 NAME를 전처치한 후 PHE (5×10^{-6} M)로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 Ach (10^{-4} M)을 투여하여 이완의 억제정도를 관찰하였다. NAME (10^{-6} - 10^{-3} M)를 전처치한 후 PHE로 수축시킨 음경해면체 평활근 절편에서 Ach (10^{-4} M)을 투여한 경우 NAME에 의해 ACh의 음경해면체 평활근 이완작용은 용량의존적으로 억제되었다 (Fig. 5) ($p < 0.05$). ZnPP (10^{-6} - 10^{-3} M)을 농도별로 전처치한 경우에는 ACh에 의한 음경해면체 평활근 이완이 억제되지 않았다 (Fig. 6) ($p > 0.05$).

마지막으로 ACh에 의한 이완이 내피의존적 현상인지 여부를 확인하기 위해서 토끼 음경해면체 평활근 절편

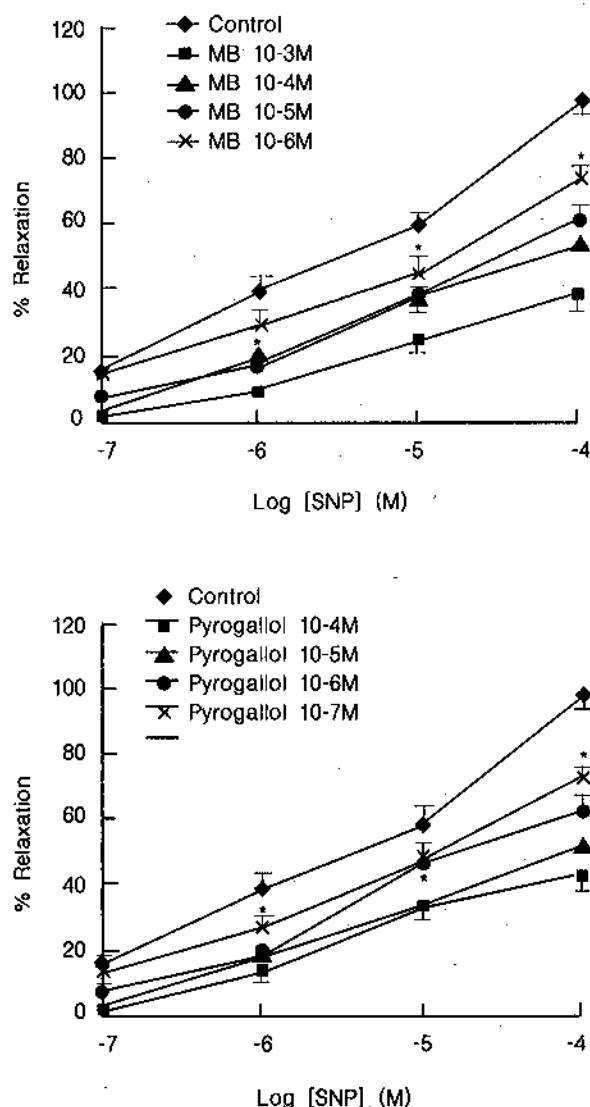


Fig. 3. Effects of various concentrations of nonspecific guanylate cyclase inhibitor methylene blue (MB) and nitric oxide scavenger pyrogallol on sodium nitroprusside (SNP) induced relaxations on rabbit cavernosal smooth muscle strips (*: $p < 0.05$).

을 조심스럽게 비벼서 탈내피화를 유도한 다음 PHE (5×10^{-6} M)으로 수축시킨 토끼 음경해면체 평활근 절편에 ACh를 10^{-7} M부터 10^{-4} M까지 10배수씩 투여하여 평활근의 긴장도 변화를 탈내피화를 시키지 않았던 절편과 비교한 경우 의미있게 이완정도가 감소하였다 (탈내피화 후 ACh의 이완효과; 10^{-7} M: $6.23 \pm 6.73\%$, 10^{-6} M: $11.36 \pm 4.37\%$, 10^{-5} M: $36.82 \pm 7.38\%$, 10^{-4} M: $61.36 \pm 8.28\%$) ($p < 0.01$).

7. Heme oxygenase 면역염색

음경해면체 조직 중 혈관주위의 부분적으로 heme oxi-

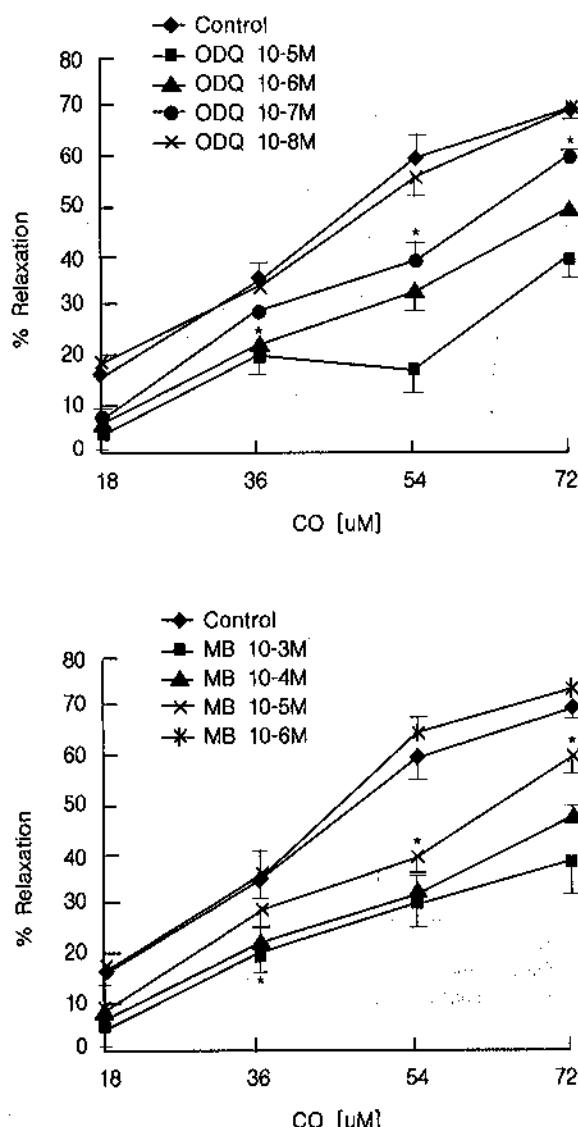


Fig. 4. Effects of various concentrations of soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) and nonspecific guanylyl cyclase inhibitor methylene blue (MB) on carbon monoxide induced relaxations on rabbit cavernosal smooth muscle strips (*: $p < 0.05$).

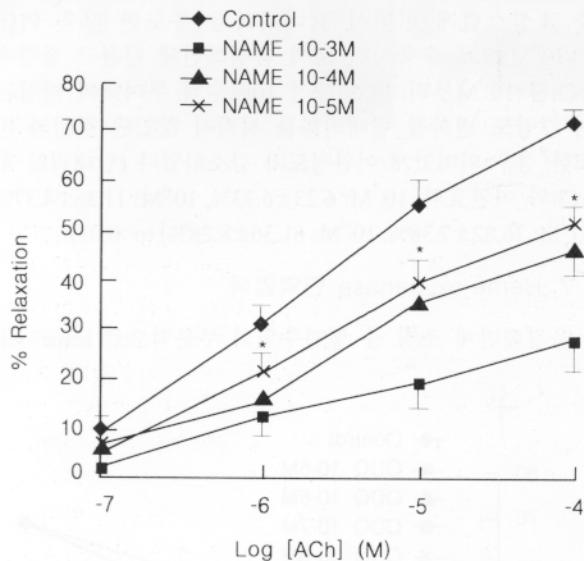


Fig. 5. Effect of various concentrations of nitric oxide synthase inhibitor L-nitroarginine methyl ester (NAME) on acetylcholine induced relaxations on rabbit cavernosal smooth muscle strips (*: p<0.05).

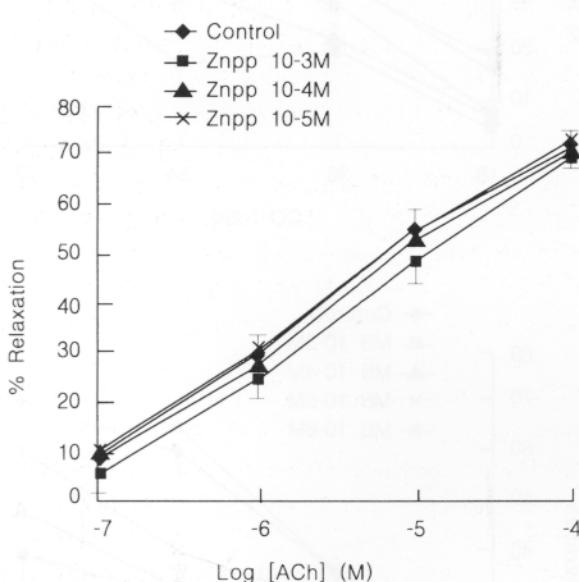


Fig. 6. Effects of various concentrations of heme oxidase inhibitor zinc protoporphyrin (ZnPP) on acetylcholine induced relaxations on rabbit cavernosal smooth muscle strips. The inhibitory effects by ZnPP were not evident (p>0.05).

dase 면역항체에 진하게 염색되는 신경다발이 관찰되었고, 혈관내피에도 약하게 항체가 염색되는 것이 관찰되었다 (Fig. 7).

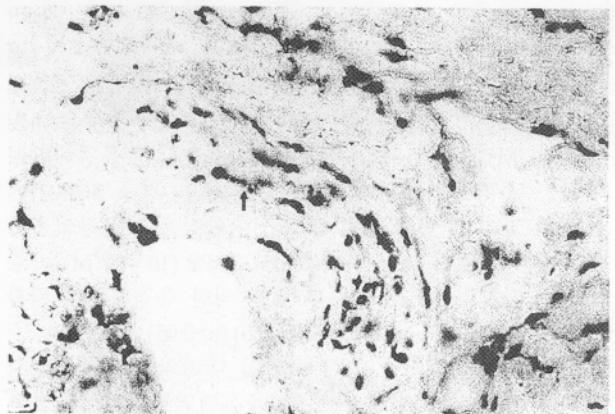


Fig. 7. Longitudinal sections of rabbit corpus cavernosum immunostained for heme oxidase (HO) protein. Microwave exposure was for 10 minutes and ABC method was used as the detection system with AEC (3-aminoethyl carbazole) as the chromogen and Harris hematoxylin as the counterstain. Positive results appear dark (arrow). (x400)

고 찰

인체조직대용으로 음경해면체 이완기전을 알아보기 위한 조직으로는 백서⁶ 및 개가⁷ 쓰이기도 하지만 사람의 해면체 조직과 유사한 작용이 확인된 토끼의 음경해면체 조직이 주로 쓰이는데 본 실험에서도 토끼의 조직을 사용하였다.⁸ 이러한 내피의존성 해면체 평활근 이완을 먼저 확인한 후 NO나 CO의 기전을 실험하였는데 이에 사용된 물질은 비특이적으로 EDRF를 분비시키는 물질로 확인된 ACh이다.⁹ ACh의 내피의존성은 내피세포를 인위적으로 파괴하였을 때 혈관조직에서 이완효과가 없어지거나 거의 소실되는 것으로 증명되었는데,¹⁰ 본 실험에서도 내피를 손상시킨 후 ACh에 의한 음경해면체 이완작용 억제되는 것으로 ACh에 의한 해면체 이완작용이 내피의존적이라는 것을 알 수 있었다.

내피의존적 이완작용이 기존의 콜린성이나 아드레날린 성 작용이 아닌 것을 확인하기 위하여 SNP나 CO에 의한 음경해면체 평활근의 이완은 콜린성 억제제인 atropine을 전처치한 경우에 영향받지 않았는데, 이를 물질에 의한 이완이 콜린성 신경계를 통하기 보다는 다른 기전을 통하는 것을 시사하였고, 이는 직접 atropine이 인체 음경해면체의 발기를 유발하지 못한다는 실험 결과와 일치하였다.¹¹ 또한 여러 조직에서 직접 ACh를 투여한 경우에도 이완, 수축, 이완 후 수축, 혹은 아무런 이완효과가 없다는 다양한 결과는 ACh이 직접 음경해면체 조직에 작용하는 것 보다는 EDRF 등을 유리시키는 신경전달체계의 전달물질이라는 가설을 뒷받침한다.^{1,12}

아드레날린성 약물인 PHE는 SNP 및 CO를 먼저 투여

한 경우에도 그 수축효과가 변화되지 않았는데 이는 이 물질들이 아드레날린성 기전과는 독립적으로 작용함을 시사한다. 기존의 연구에서도 음경해면체에서 아드레날린성 물질은 이완 보다는 수축에 관여하는 것으로 알려져 있고, 이완에 있어서는 주요 신경전달물질로 작용하기 보다는 EDRF에 의해 매개되는 작용을 조절하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서 혈관, 음경해면체 등과 같은 다양한 평활근의 이완은 따라서 비아드레날린성, 비콜린성 기전이 시사되었고, 또한 내피의존적인 기전을 가진다고 추정되어 비아드레날린성비콜린성 (NANC: nonadrenergic noncholinergic) 신경전달물질^{13,14} 혹은 혈관내파세포의존 이완인자 (EDRF: endothelium derived relaxing factor)로 일컬어지다가, 1988년 EDRF의 작용이 nitric oxide의 작용과 흡사하다는 것이 증명되었고,¹⁵ 이 업적은 1998년 노벨의학상을 수상하였다. 따라서 발기의 관건인 내피의존성 해면체 평활근 이완 역시 nitric oxide 혹은 nitric oxide를 함유하는 물질에 의해 매개되었고, 음경해면체에서 NO의 작용기전은 이미 잘 밝혀져 있다. 본 실험에서도 이러한 내피의존성 이완이 NO에 의해 매개되는 것인지 알아보기 위해 NO synthase 억제제인 NAME를 전처치한 경우 NAME에 의해서 EDRF를 분비시키는 ACh에 의한 이완효과가 억제되었다. 따라서 음경해면체 평활근에서의 내피의존성 이완은 주로 NO에 의해 매개되는 것을 알 수 있었다.

NO 이외의 EDRF로는 다양한 물질이 알려져 있는데 neuropeptide인 neuropeptide Y,¹⁶ arginine vasopressin,¹⁷ somatostatin,¹⁸ 및 vasoactive intestinal polypeptide (VIP)¹⁹ 등이 있으나 이들은 NO에 비해 혈관이완작용이 미약하며 생체내에서 작용은 뚜렷하지 않다. CO가 혈관을 확장시킬 수 있다는 것은 알려져 있지만 생체내에는 존재하지 않는다고 추정되어 생리학적인 중요성이 없다고 생각되었었다.²⁰ 그러나 EDRF가 NO라는 사실이 알려지면서 NO 와 유사한 불안정한 분자인 CO도 생체내에서 작용이 있으리라는 가설이 제시되었다.³ CO는 생체내에서 hemoglobin을 heme (iron protoporphyrin) 및 biliverdin으로 대사시키는데 관여하는 효소인 heme oxidase (HO)에 의해 매개되어 생성되고 (Fig. 1), 생성된 CO는 heme을 포함하고 있는 효소 등 중요 단백질에 존재하는 철 분자에 결합하여 작용을 나타내리라고 추정된다.³ NO 활성기전에서 중요 효소인 guanylate cyclase는 활성부위로 철 분자를 가지고 있으며, CO 역시 이 효소에 결합하여 활성을 나타낼 수 있으리라고 가설이 제시되었는데, 이 가설은 여러 연구자들에 의해서 CO가 guanylate cyclase의 활성화를 통하여 대동맥, 말초동맥, 식도위장 이행부 등에서 이완작용을 나타낸다고 확인되었고,^{9,20} 뇌에서도 이미 신경전달물질로 작용하리라는 가설이 제시된 바 있다.² 그러나 guanylate cyclase-cGMP 기전이 아닌 다른 기전에 의한 이완작용이 보고되었고,²¹ 사람 및 돼지의 요관에서는 아무런

작용이 없는 것으로 보고²²되기도 하는 등 아직 일관되게 확립된 보고가 없는 상태이다.

본 실험에서는 먼저 CO를 생체내에서 생성시키는 효소인 HO에 대한 면역염색을 시행하여 음경해면체 신경 섬유에 강하게 염색되는 것을 확인하였다. 이는 HO가 음경해면체 조직내에 존재한다는 사실을 증명하며, 간접적으로 CO가 음경해면체내에서 생성되는 것을 증명하였다 (Fig. 7). 생리학적으로 CO를 검증하는 것이 보편화되지 못한 이유는 아직 생체내에서 충분한 양을 발생시키는 방법이 존재하지 않기 때문이다. 본 실험에서는 생리식 염수에 포화시킨 CO를 음경해면체에 투여하였다. PHE 전처치료 수축시키는 경우 CO에 의한 이완효과를 보기 위해 상당량의 CO가 포화된 생리식염수를 organ bath내에 투여하여야 하였다. 이로 인한 PHE의 수축효과가 감소되는 것이 우려되어, 동일한 양의 control로 동일한 양의 CO가 없는 생리식염수를 투여한 경우 PHE에 의한 수축효과의 감소는 관찰되지 않음을 확인하고 실험을 진행하였고, 기존의 CO의 영향을 알아본 실험에서도 동일한 방법을 활용하였다.^{20,23}

CO도 NO와 유사하게 guanylate cyclase의 활성화에 의해 그 작용을 나타내는지를 확인하기 위하여 억제물질로 methylene blue 및 ODQ를 사용하였다. Methylen blue 및 ODQ에 의해 토끼 음경해면체 평활근의 CO에 의한 이완작용은 억제되었고 (Fig. 4), 따라서 SNP에 의한 이완작용은 guanylate cyclase에 의해 매개됨을 알 수 있었다. 그러나 NO 제거제인 pyrogallol로 전처치한 경우 CO에 의한 음경해면체 평활근 이완이 영향받지 않았다. CO가 내피의존성 기전으로 이완효과를 나타내는지 간접적으로 확인하기 위해 내피의존성 이완인자를 분비시키는 ACh를 투여하고 heme oxidase 억제제인 ZnPP로 전처치하였다. 생체내 CO 생성의 중요 효소인 heme oxidase (HO)의 억제물질로 heme (protoporphyrin IX) 분자가 중금속으로 치환된 metalloporphyrin들이 있는데, 흔히 사용되는 물질로는 zinc protoporphyrin (ZnPP), tin protoporphyrin (SnPP) 및 Zinc deuteroporphyrin 2,4-bis glycol (ZnDPBG)가 있고 이중 ZnPP의 억제효과가 가장 강력하여 보편적으로 사용된다.²⁴ 본 연구에서는 ZnPP를 억제물질로 사용하였는데, 내피의존성 이완인자를 분비시키는 ACh를 투여하고 ZnPP로 억제시킨 경우 뚜렷한 이완억제는 관찰되지 않았다. NAME를 이용한 NO의 경우와 연관시켜 보았을 때 내피의존성 이완은 주로 NO에 의해 매개되고, CO가 실제로 내피의존성 이완물질을 분비시킨다 하더라고 생체내의 역할은 NO에 비해 적으리라고 생각된다.

본 실험에서 CO의 토끼 음경해면체 평활근 이완작용은 NO donor인 SNP의 작용보다 약 25배 약하였다. 다른 보고에서도 용해성 guanylate cyclase의 활성정도로 비교한 경우 CO가 NO에 비해 약 1/30 정도의 활성을 보인 결과와 유사하였고, 비특이적으로 내피의존성 이완인자를

분비시키는 ACh를 투여하고 NAME 및 ZnPP처럼 NO와 CO 각각의 생성 억제제를 투여한 결과와 종합하여 보았을 때 아마도 NO가 guanylate cyclase의 주요 효현체로, CO가 부분적 효현체나 조절자로 작용하는 것으로 추정된다.²⁵

따라서 본 연구 결과에 따라 CO를 생성시키는 HO가 음경해면체 조직내에 분포함을 관찰하였고, CO에 의한 음경해면체 평활근 이완이 guanylate cyclase에 의해 매개된다는 것이 입증되었다. 아울러 음경해면체 평활근에서 이러한 작용은 내피세포의존 이완인자가 이완을 유발한다는 것이 인정되고 있으므로^{26,27} CO에 의한 이완작용은 내피세포의존성으로서, guanylate cyclase의 활성화에 의한 cGMP의 증가에 의한 것이라 할 수 있다. CO에 의한 음경해면체 평활근의 이완작용은 NO 보다 약하며, 아마도 guanylate cyclase에 의한 이완작용에서 CO의 역할에 관한 추가적 연구가 필요하다.

결 론

토끼 음경해면체에서 CO의 이완효과는 NO와 마찬가지로 내피상피와 soluble guanylate cyclase에 의해 매개되는 cyclic GMP 기전을 통하여 나타나며, CO의 이완효과는 NO 보다는 약한 용량의 준적 음경해면체 평활근 이완작용을 나타냈다. 또한 CO 생성 효소인 heme oxidase (HO)에 대한 면역조직화학적 염색상 음경해면체 조직내 혈관 주위 신경섬유에서 HO의 분포가 확인되었다. 이로서 CO는 약하지만 NO와 유사한 작용을 수행하는 것으로 추정된다.

REFERENCES

- Tejada IS, Goldstein I, Azadzoi K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med* 1989; 320: 1025-30.
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science* 1993; 259: 381-4.
- Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. Does carbon monoxide have a physiologic function? *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 185-8.
- Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: An endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 1996; 16: 835-42.
- Ny L, Grudemar L, Larsson B, Ekstrom P, Andersson KE. Carbon monoxide as a putative messenger molecule in the feline lower oesophageal sphincter. *Neuro Report* 1995; 6: 1261-5.
- Dail WG, McGuffee L, Minorsky N, Little S. Responses of smooth muscle strips from penile erectile tissue to drugs and transmural nerve stimulation. *J Auton Pharmacol* 1987; 7: 287-93.
- Carati CJ, Goldie RG, Warton A, Henry PJ, Keogh EJ. Pharmacology of the erectile tissue of the canine penis. *Pharmacol Res Commun* 1985; 17: 951-66.
- Broderick G, Hypolite J, Levin RM. In-vitro contractile response of the rabbit corpus cavernosa to field stimulation and autonomic agonists and antagonists: a qualitative study. *Neurorol Urodyn* 1991; 10: 507-15.
- Furchtgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cyclic GMP. *Blood Vessels* 1991; 28: 52-61.
- Furchtgott RF. Studies in endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 257-70.
- Brindley GS. Pilot experiments on the actions of drugs injected into the human corpus cavernosum penis. *Br J Pharmacol* 1986; 87: 495-500.
- Wagner G, Brindley GS. The effect of atropine, α and β blockers on human penile erection: a controlled pilot study. In: Zorgniotti AW, Rossi G, editors. *Vasculogenic Impotence*. Springfield: Thomas, 1980: 77-81.
- Gillespie JS. The rat anococcygeus muscle and its response to nerve stimulation and to some drugs. *Br J Pharmacol* 1972; 45: 404-16.
- Klinge E, Sjostrand NO. Contraction and relaxation of the retractor penis muscle and the penile artery of the bull. *Acta Physiol Scand [suppl]* 1974; 420: 1-88.
- Furchtgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: The bases for the proposal that the acidactivatable inhibitory factor from retractor penis is in-organic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In Vanhoufte PM, editor. *Mechanisms of Vasodilatation*. New York: Raven Press, 1988: 401-14.
- Adrian TE, Gu J, Allen JM, Tatenoto K, Polak JM, Bloom SR. Neuropeptide Y in the human male genital tract. *Life Sci* 1984; 35: 2643-8.
- Andersson KE, Hedlund H, Mattiasson A, Sjogren C, Sundler F. Relaxation of isolated human corpus spon-giosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation. *World J Urol* 1983; 1: 203-8.
- Gu J, Polak JM, Probert L, Islam KN, Marangos PJ. Peptidergic innervation of the human male genital tract. *J Urol* 1983; 130: 386-91.

19. Polak JM, Gu J, Mina S, Bloom SR. VIPergic nerves in the penis. *Lancet* 1981; 2: 217-9.
20. Ny L, Alm P, Ekstrom P, Larsson B, Grundemar L, Andersson KE. Localization and activity of haem oxygenase and functional effects of carbon monoxide in feline lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 392-9.
21. Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E. Carbon monoxide-induced relaxation of the ductus arteriosus in the lamb: evidence against the prime role of guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 1689-96.
22. Iselin CE, Alm P, Schaad NC, Larsson B, Gruber P, Andersson KE. Localization of nitric oxide synthase and haemoxygenase, and functional effects of nitric oxide and carbon monoxide in the pig and human intravesical ureter. *Neuro Urodyn* 1997; 16: 209-27.
23. Werkstrom V, Ny L, Persson K, Andersson KE. Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 312-8.
24. Grundemar L, Ny L. Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(6): 193-5.
25. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric state. *Biochemistry* 1994; 33: 5636-40.
26. Andersson PO, Holmqvist F. Mechanisms for contraction and relaxation of human penile smooth muscle. *Int J Impot Res* 1990; 2: 209-25.
27. Kimoto Y, Kessler R, Constantinou CE. Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J Urol* 1990; 144: 1015-7.