

흰쥐 정관 운동에 대한 Nitric Oxide의 역할

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이택 · 최영득 · 이무상

=Abstract=

Role of Nitric Oxide in the Motor Activity of Rat Vas Deferens

Tack Lee, Young Deuk Choi and Moo Sang Lee

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

Many physiologic studies have been carried out to identify the neurotransmitters involved in regulating the motility of the smooth muscle in the vas deferens, but the transmitter of a non-adrenergic and non-cholinergic inhibitory nerves has not been clearly identified. We investigated the role of nitric oxide in response to sympathetic motor activity in the rat vas deferens.

1. Nitroprusside and L-NAME had neither contractile nor relaxing effects directly.

On the stabilized muscle strips of rat vas deferens, norepinephrine induced a phasic contraction for 10 seconds followed by the sustained tonic contraction. The phasic contraction of norepinephrine was increased by the pretreatment of nitroprusside($p > 0.05$) and decreased by L-NAME($p < 0.01$). This tonic contraction was decreased dose-dependently by the pretreatment of nitroprusside($p < 0.01$), and increased by L-NAME($p < 0.01$).

On the muscle strips of rat vas deferens, submaximally precontracted with norepinephrine, nitroprusside potentiated the contraction, followed by the delayed, sustained relaxation, which was blocked by L-NAME.

2. On the muscle strips of rat vas deferens, electrical field stimulation induced an initial phasic contraction for 2-3 seconds, followed by the tonic contraction, which was blocked by L-NAME dose-dependently.

The phasic contraction of electrical field stimulation was increased by the pretreatment of nitroprusside($p > 0.05$) and decreased by L-NAME($p < 0.01$). This tonic contraction was decreased by the pretreatment of nitroprusside dose-dependently($p < 0.01$), and increased by L-NAME($p < 0.01$).

With these results, nitric oxide has the excitatory effect at the phasic contraction, and the inhibitory effect at the tonic contraction in response to sympathetic motor activity in the rat vas deferens partially.

Key Words: Vas deferens, Nitric oxide, Electrical field stimulation, Rat.

서론

정관은 부고환에서 사정관까지 연결되는 관상 구조의 평활근으로, 내측에 횡방향의 평활근과 외측에 종방향의 평활근이 두껍게 구성되어 있

접수일자 : 1996년 8월 21일

다. 정관의 역할은 정자를 부고환에서 사정관으로 이동시키는 것으로 그 기전은 연동운동이나, 섬모의 작용, 압력차의 이동 등 아직까지 확실하지 않다. 정자의 부고환내 이동 기전은 연동운동으로서^{1,3}, 부고환의 두부에서는 6~10초마다 국소적으로 발생하는 연동운동의 수축이 생체의 실험에서 관찰되고 있다^{1,4}. 그러나 부고환의 마

부 및 정관부위에서는 이러한 운동이 약해진다. 부교환 및 정관의 연동운동과 자율신경계의 관계는 확실치 않다. 쥐에서 연동운동이 자주 일어나는 부교환의 두부에서는 자율신경계의 분포는 거의 없고, 정관의 미부쪽으로 갈수록 교감신경과 부교감 신경이 드물게 나타나며, 부교환 미부와 정관에서는 아드레날린성 신경과 콜린성 신경이 존재하게 된다^{5,6}.

정관의 신경분포는 교감 신경과 부교감 신경 모두에 지배를 받고 있다. 교감신경은 흉요부의 교감 신경계에서 전천추 신경총을 거쳐 하복 신경을 경유하여 매우 풍부하게 정관으로 분지하며, 근육의 모든 층에 존재하는데, 그 중 바깥의 길이방향 근육층에 가장 풍부하게 존재한다⁶⁻⁸.

정관의 운동은 대부분 교감 신경계에 분포된 아드레날린성 신경에 의하여 지배를 받아 이루어지고 있으며, 상대적으로 콜린성 신경의 역할은 적은 것으로 알려져 있다^{4,9}. 이러한 정관의 운동성에 있어 정관의 수축 작용은 아드레날린성 신경 작용 및 상대적으로 미비한 콜린성 신경 작용 등 다양한 작용과 반응에 의하여 이루어지나, 정관 수축의 억제 혹은 정관의 이완에 관한 기전에는 아드레날린성 β_2 수용체의 작용 외에는 확실히 밝혀진 바 없다.

최근 일부에서 임상적으로 특발성 불임환자에서 α -blocker를 써서 정자의 수가 증가한다는 보고 등이 있어¹⁰ 정관에서의 수축에 대한 길항 작용이 정관의 생리에 중요한 역할을 함을 시사하고 있다. 따라서 정관에서의 신경지배나 자체의 운동성에 관한 정확한 연구가 요구되고 있다.

여러 조직으로 분포하는 자율신경의 자극시

조직의 운동성을 매개하는 것은 아드레날린성이나 콜린성 신경 전달자뿐만 아니라, 비아드레날린성 비콜린성 신경전달인자(Non-adrenergic non-cholinergic; 이하 NANC)도 관여하게 되는데, 최근 이러한 NANC의 신경전달물질로 endothelium-derived relaxing factor(이하 EDRF), 즉 nitric oxide(이하 NO)에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{11,12}. NO는 많은 기관의 평활근에서 이완작용을 하는 신경전달자로 여겨지고 있는데, 이러한 NO는 arginine에서 형성되며, 형성된 NO는 평활근내에 확산되어 들어가 guanylyl cyclase에 의하여 cGMP를 증가시키고, cGMP에 의하여 평활근은 이완됨이 다양하게 증명되고 있다^{13,14}. 그러나 정관 평활근의 수축이완기전에 대한 NO의 역할에 대하여서는 거의 알려진 바 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 정관에서 수축 운동에 비교하여 상대적으로 밝혀지지 않은 이완 기전에 있어, 최근 평활근의 이완에 주로 작용하는 것으로 활발히 연구되고 있는 NO가 직접 혹은 간접적으로 관여할 것으로 여겨 정관 운동에 대한 NO의 효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

사춘기가 지난 250-350gm의 Sprague Dawley 중원쥐 수컷 35마리를 사용하였다.

실험방법

1. 동장력 수축을 위한 이상적 장력 준비
Pentobarbital sodium(30~50mg/kg, 복강내 주

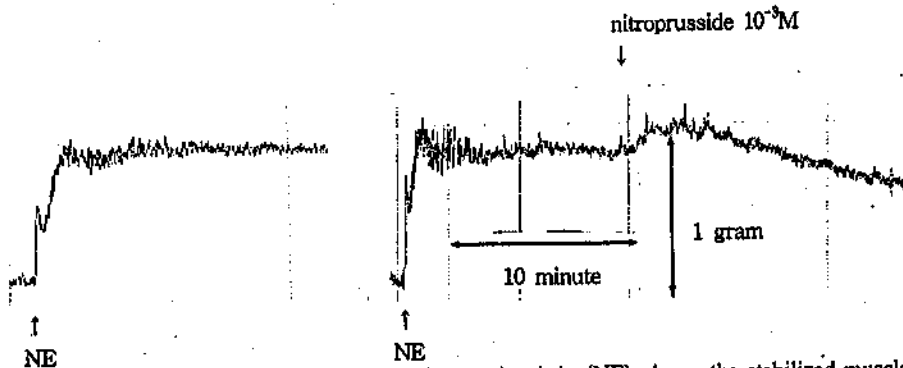


Fig. 1. Representative tracings of vas deferens with norepinephrine(NE). A, on the stabilized muscle strips of rat vas deferens(n=8), norepinephrine induced a phasic contraction for 10 seconds followed by the sustained tonic contraction. B, on the muscle strips of rat vas deferens, submaximally precontracted with norepinephrine(n=10), nitroprusside potentiated the contraction followed by delayed, sustained relaxation.

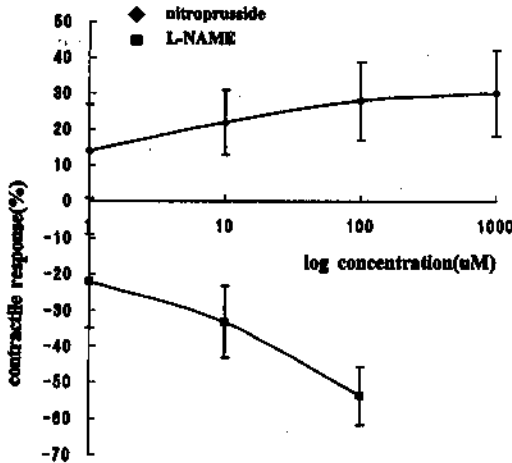


Fig. 2. Effects of nitroprusside and L-NAME on the phasic contraction of norepinephrine (5×10^{-5} M) at the stabilized rat vas deferens. The phasic contraction of norepinephrine was increased by the pretreatment of nitroprusside ($n=27$, $p>0.05$) and decreased by L-NAME ($n=24$, $p<0.01$).

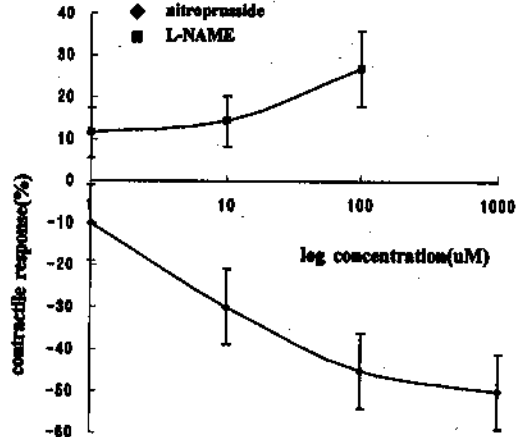


Fig. 3. Effects of nitroprusside and L-NAME on the tonic contraction of norepinephrine (5×10^{-5} M) at the stabilized rat vas deferens. The tonic contraction of norepinephrine was decreased dose-dependently by the pretreatment of nitroprusside ($n=27$, $p>0.01$) and increased by L-NAME ($n=24$, $p<0.01$).

입)으로 마취하에 복부를 절개하고 조심스럽게 정관을 제거하였다. 이후 혼합기체가 공급되는 저온(4℃)의 Tyrode 용액내에서 해부용 현미경하에 정관의 주변의 지방조직과 절체조직을 제거하였으며, 전립선부의 원위부 정관을 $2 \times 2 \times 10$ mm 크기의 절편으로 만들어 실험에 이용하였다.

절편을 Tyroide 용액이 들어있는 10ml organ chamber에 넣고 혼합기체를 투여하며, 온도 37℃, pH 7.4를 유지하였다. 정관의 절편은 초기 장력을 2gm으로 유지시키고 안정상태에 도달시킨 후 실험을 진행하였다. 정관 절편의 긴장력 변화는 등력성 수축기록계(Biopac system, Goleta, California, U.S.A.)에 연결하여 관찰하였다.

2. 정관의 약물 반응 실험

1). 안정 상태에 도달된 정관 절편에 NO가 미치는 영향을 관찰하기 위하여, NO 유사물질인 nitroprusside와 NO 생성 억제제인 N^G -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)를 직접 투여하여 긴장력 변화를 관찰하였다.

2). 안정 상태의 정관에 아드레날린성 약물인 norepinephrine(5×10^{-5} M, 이하 NE)를 투여하여 긴장력의 변화를 관찰하였다. NE에 의해 유도된 수축 절편에서 NO의 작용을 직접 관찰하기 위하여 nitroprusside를 농도별로 투여하여 긴장력의 변화를 관찰하였으며, 이러한 nitroprusside의 작용에 있어 길항제인 L-NAME로 5분간 전처리하고

nitroprusside의 작용을 관찰하였다.

3. 정관의 전기장 자극 실험

전기장 자극 실험을 위하여 10ml organ bath 내의 정관절편의 양쪽에 10mm 간격의 백금판을 설치하였으며, 전기장 자극은 electric stimulator (STM100A, Biopac system, Goleta, California, U.S.A.)를 사용하였다. 전기장 자극의 강도는 threshold; 50V, frequency: 5Hz, duration: 20ms, delayed: 0.5ms을 적용하고 정관의 긴장력 변화를 관찰하였다. 이러한 전기장 자극의 변화에 대해 NO가 미치는 효과를 관찰하기 위해 nitroprusside 및 L-NAME를 농도별로 투여하고, 전기장 자극의 변화를 관찰하였다. 실험간 반복된 전기장 자극은 20분 이상의 안정상태를 취한 후 자극을 적용하였다.

사용 약물과 용액

Norepinephrine hydrochloride, nitroprusside, L-NAME는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을, methylene blue는 Mallinckrodt Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다.

실험에 사용된 정상 Tyrode 용액의 조성은 Na^+ (153.6), K^+ (5.3), Ca^{++} (3.0), Mg^{++} (1.2), Cl^- (157.2), $H_2PO_4^-$ (0.6), SO_4^{--} (1.2), HCO_3^- (7.1), glucose (11.4) 이었다(mEq/L).

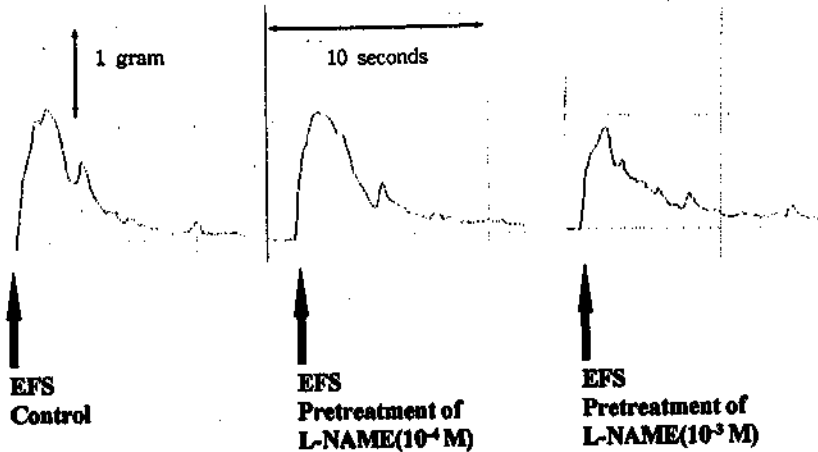


Fig. 4 Representative tracings of vas deferens with electrical field stimulation(EFS). On the muscle strips of rat vas deferens(n=9), electrical field stimulation induced an initial phasic contraction for 2~3 seconds followed by the tonic contraction. This effect was blocked by L-NAME dose-dependently(n=8).

자료분석

결과는 개인용 컴퓨터의 Stat Works 프로그램으로 처리하였다. 각 측정군간의 유의 판정은 Mann-Whitney U test나 Student's t test를, 약물농도별 평활근 장력의 변화는 simple regression test를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 정관의 약물반응실험

1) 안정 상태의 정관 절편에서 nitroprusside (10^{-7} - 10^{-3} M), L-NAME (10^{-6} - 10^{-4} M)는 직접 투여시 수축이나 이완작용은 없었다.

2) 안정 상태의 정관 절편에서 NE를 투여한 결과 10여초간의 위상 수축반응이 있는 후 긴장성 수축반응이 지속되었다(Fig. 1).

정관 절편에서 NE 투여에 의한 위상수축 반응은 L-NAME 전처리 후 NE 투여시 유의있게 감소하였다($p < 0.01$). NE의 위상 수축반응은 nitroprusside를 전처리한 결과 일부 증가되었으나 통계학적 의의는 없었다(Fig. 2, $p > 0.05$). NE 투여에 의한 긴장성 수축반응은 nitroprusside전처리에 의해 농도의존적으로 일부 감소되었고($p < 0.01$), L-NAME를 전처리후 유의있게 증가되었다(Fig. 3, $p < 0.01$).

3) NE에 의하여 수축된 정관의 절편에서 nitroprusside를 투여시 초기 수축이 일어났으며, 이

후 서서히 진행되는 이완을 보였다(Fig. 1). 이러한 nitroprusside의 수축력은 L-NAME에 의하여 억제되었다(Fig. 2).

2. 정관의 전기장자극 실험

정관의 절편은 전기장 자극에서 초기 2~3초간의 위상 수축반응이 있는 후 긴장성 수축반응이 나타났다(Fig 4). 전기장 자극에 의한 정관 절편의 수축에서 nitroprusside를 투여시 위상 수축반응은 일부 증가되었으나, 통계학적 의의는 없었고 ($p > 0.05$), L-NAME 투여시 감소되었다(Fig. 5, $p < 0.01$). 긴장성 수축반응은 nitroprusside에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며($p < 0.01$), L-NAME 투여시 증가하였다(Fig. 6, $p < 0.01$).

고 찰

NO는 뇌, 부신, 혈소판, 평활근 등 다양한 조직에서 guanylate cyclase를 자극하는 내재성 물질로 작용하며, 또한 각종 체내 반응에 따라 분비되는 세포독성 물질(cytotoxic factor)로도 작용한다. 이런 두 가지의 다양한 성질을 지닌 생물학적 특성, 즉 세포간 교통과 세포독성은 서로 다른 방식으로 분비되어 유발되게 된다. 즉 NO는 생체 내에서 NOS에 의해서 L-arginine으로부터 NO와 L-citrulline으로 변환되어 생성된다¹³.

NO나 NO 유사물질의 평활근에서 역할은 많은 연구에서 평활근의 이완작용을 주관하는 것

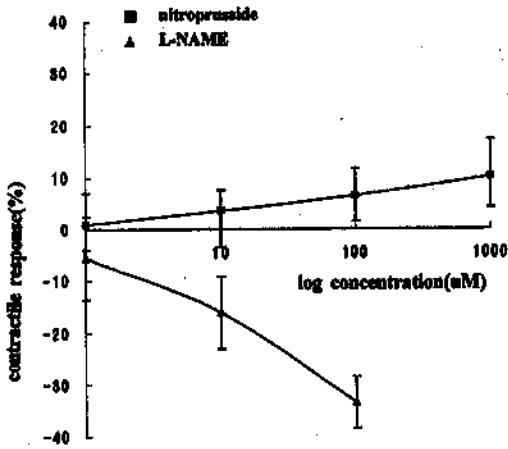


Fig. 5. Effects of nitroprusside and L-NAME on the phasic contraction of electrical field stimulation at the rat vas deferens(n=9). The phasic contraction of electrical field stimulation was increased by the pretreatment of nitroprusside(n=36, p>0.05) and decreased by L-NAME(n=27, p<0.01).

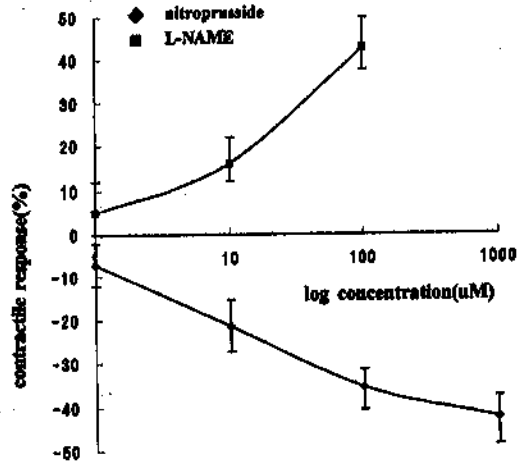


Fig. 6. Effects of nitroprusside and L-NAME on the tonic contraction of electrical field stimulation at the rat vas deferens. The tonic contraction of electrical field stimulation was decreased by the pretreatment of nitroprusside dose-dependently (n=36, p<0.01) and increased by L-NAME(n=27, p<0.01).

으로 알려져 있다^{15,16}. 이러한 NO의 이완작용은 NO의 생성억제제에 의하여 작용이 감소되며, NO 생성물질을 투여함으로써 그 작용이 회복된다고 한다. 그러나 정관에서 NO의 역할은 확실하지 않다. 따라서 본 연구에서는 정관의 수축 및 이완에 미치는 NO의 영향을 살펴보고자 하였다.

정관의 수축운동은 크게 두 형태로 나타난다. 정관은 자극에 의해서 초기에는 순간적으로 급격히 연축(twitch)으로 불리는 위상 수축반응이 나타나고, 이어 지속적으로 유지되는 긴장성 수축반응이 나타난다. 위상 수축반응은 ATP에 의하여 관장을 받는 것으로 되어 있다. 정관의 퓨린 수용체는 두 가지로 분류되며, 하나는 P₁ 퓨린 수용체로 adenosine과 AMP에 민감하며 theophylline이나 caffeine에 의해 억제 받는다. P₂ 퓨린 수용체는 ATP와 ADP에 가장 민감하며, arylazidoaminopropionyl-ATP(ANAPP3)에 길항되고, α,β-methylene ATP에 의해 선택적으로 탈감작된다. 정관은 주로 P₂ 퓨린 수용체를 포함하고 있어 P₂ 퓨린 수용체의 길항제인 α-methyl ATP에 그 작용이 길항되지만 정확한 기전은 확실치 않다^{17,18}. 정관의 퓨린 수용체는 ATP에 의하여 자체적인 수축이 일어난다는 보고와 NE의 분비를 증가시켜 수축이 이루어진다는 보고도 있고, NE의 분비와 관계없이 다른 작용에 영향을 주어

작용이 나타난다는 다양한 보고가 있다^{17,18}. 긴장성 수축반응은 NE뿐만 아니라 콜린성 자극에 의해서도 일어난다^{17,18,19}. 이완작용을 관장하는 것으로는 현재 밝혀진 것으로는 β₂ 수용체가 있다. 정관의 β₂ 수용체를 자극시에는 이완작용이 나타나¹⁹, 본 연구결과에서는 NO가 정관에서 두 가지 효과(dual effect)를 나타내었다.

안정 상태의 정관 절편에서 nitroprusside를 10⁻⁷M에서부터 10⁻³M까지 투여한 결과, 수축이나 이완 작용은 없었다. 그러나 정관에서 이러한 nitroprusside를 NE로 수축시킨 정관에 투여시 초기에 수축작용이 있었다. 이러한 초기 수축작용은 L-NAME에 의해 의외있게 감소되었으며, 전기장 자극을 주는 정관 절편에서도 nitroprusside는 위상 수축반응을 증가시킴으로서 흥분성으로 작용함을 알 수 있었다. 그러나 이 현상은 완전히 일어나지 않았고, 일부에서만 나타남을 보아 NO는 정관에서 직접적인 흥분성 작용은 없으나 간접적으로 다른 약물이나 신경 전달자의 작용에 초기에 흥분성으로 작용함을 알 수 있다.

일부 저자들의 정관 절편의 전기장자극실험에서 위상 수축반응은 theophylline에 의하여 일부 억제되었으며 이러한 정도는 L-NAME에 의한 억제와 비슷한 양상이었다. 이러한 위상 수축반응도 theophylline에 의하여 완전히 억제되지 않는 이유는 정관은 주로 P₂ 퓨린 수용체에 의하여

작용을 받기 때문인 것으로 여겨지나 theophylline에서도 일부 영향을 받으며, 그 양상이 L-NAME와 유사하여 NO는 퓨린 수용체에 일부 영향이 있다는 것을 알 수 있었다. NO의 흥분성 작용은 NO가 직접적인 흥분 효과를 나타내는 것은 아니고 간접적인 작용, 즉 신경자극 동안 교감신경계에서 다른 흥분성 신경 전달자의 분비를 증가시키거나 교감신경계의 신경말단에서 신경전달자의 적당한 휴식기 농도를 유지하도록 함으로써 흥분작용이 있는 것으로 생각된다. Vladimirova¹⁴등도 쥐의 정관에서 저자들과 유사한 결과를 보고하고 있으며, NO가 흥분성으로도 작용함을 뒷받침할 수 있는 실험적 근거로는 NO가 부신수질에서 catecholamine 분비를 증가시킨다는 것²⁰과 NO 생성 억제제가 전기적으로 수축이 유발된 평활근에서 수축력을 감소시킨다는 보고가 있으며, 생체내 실험의 경우 하복신경을 자극하였을 때 NO 생성 억제제에 의해 내항문 괄약근의 압력이 감소됨을 관찰한 경우도 있다²¹.

한편 NE에 의하여 수축된 정관의 절편에서 nitroprusside를 투여시 초기 수축이 일어났지만, 이후 서서히 진행되는 이완작용을 보였으며, 이러한 nitroprusside의 이완작용은 L-NAME에 의하여 억제되었다. 전기장자극 실험에서도 정관의 긴장성 수축반응은 nitroprusside에 의해 농도 의존적으로 감소되고, L-NAME에 의해 증가됨으로 보아 NO는 교감신경계에 억제성으로도 작용함을 알 수 있었다. 물론 tonic phase에서의 NO의 역할은 부교감신경계의 자극에 대한 반응일 수도 있으나 본 연구에서는 밝혀지 못하고 있어 많은 보완 연구가 요구된다.

결 론

쥐의 정관 절편에서 NO는 NE나 전기장 자극에 의한 수축 작용을 초기에는 상승시키고, 그후 서서히 진행되는 이완을 보였으며, 이런 각각의 작용들은 NO 억제제인 L-NAME에 의해 억제되었다. 그러므로 NO는 교감신경계의 작용에서 초기 위상수축반응에서는 일부 흥분성으로 작용하고, 긴장성 수축반응에서는 억제작용을 일으키는 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Risley PL, Skrepetos CL. Cholinesterase distributions on the rat epididymis and vas deferens after castration and sex hormone treatments. *Anat Rec* 1964; 150: 195-6.
2. Hib J, Ponzio R, Vilar O. Contractility of the rat cauda epididymidis and vas deferens during seminal emission. *J Reprod Fertil* 1982; 66: 47-8.
3. Billups KL, Tillman S, Chang TSK. Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: Alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *J Urol* 1990; 143: 625-9.
4. El-Badawi A, Schenk EA. The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis. *Am J Anat* 1967; 121: 1-3.
5. Sjostrand NO. The adrenergic innervation of the vas deferens and accessory male genital glands. *Acta Physiol Scand* 1965; 65: 5-8.
6. Hodson N. The nerves of the testis, epididymis, and scrotum. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, editors. *The Testis*. New York: Academic Press, 1970; 47-99.
7. Alm P. On the autonomic innervation of the human vas deferens. *Brain Res Bull* 1982; 9: 673-81.
8. McConnell J, Benson GS, Wood JG. Autonomic innervation of the urogenital system: Adrenergic and cholinergic elements. *Brain Res Bull* 1982; 9: 679-80.
9. Baumgarten HG, Owan C, Sjoberg NO. Neural mechanisms in male infertility. In: Scarra JJ, editor. *Control of Male Fertility*. New York: Harper & Row, 1975; 26-27.
10. Yamamoto M, Takaba H, Hashimoto J, Miyake K, Mitsuya H. Successful treatment of oligospermic and azoospermic men with alpha 1-blocker and beta-stimulator: New treatment for idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1986; 46: 1162-4.
11. Gillespie JS, Liu X, Martin W. The effect of L-arginine and N⁰-monomethyl-L-arginine on the response of the rat anococcygeus to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1989; 98:

- 1080-2.
12. Gibson A, Mirzazadeh S, Hobbs AJ, Moore PK. L-N^G-monomethyl-arginine and L-N^G-nitro-arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 602-6.
 13. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
 14. Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A. Evidence for participation of nitric oxide in excitatory neurotransmission in rat vas deferens. *Life Sci* 1994; 55: 1123-8.
 15. Andersson KE, Persson K. The L-arginine/nitric oxide pathway and non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the lower urinary tract. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 833-9.
 16. Wiklund NP, Leone AM, Guestafsson LE, Moncada S. Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. *Neuroscience* 1993; 53: 607-11.
 17. Brown DA, Docherty JR, French AM, MacDonald A, McGrath JC, Scott NC. Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in the vas deferens. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 379-81.
 18. Vizi ES, Burnstock G. Origin of ATP release in the rat vas deferens: Concomitant measurement of [³H] noradrenaline and [¹⁴C]ATP. *Eur J Pharmacol* 1988; 158: 69-77.
 19. Diaz-Toledo A, Jurkiewicz A. Different mechanisms of action of agents acting on β -adrenoceptors in barium-stimulated and electrically stimulated rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 277-83.
 20. Dohi T, Morita K, Tsujimoto A. Effect of sodium azide on catecholamine release from isolated adrenal and on guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1983; 94: 331-5.
 21. Rattan S, Thatikunta P. Role of nitric oxide in sympathetic neurotransmission in opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* 1993; 105: 827-36.
-