

흰쥐의 방광 평활근에 미치는 NO, NO₂ Carrying Molecule 투여 후 발생하는 Photorelaxation의 효과에 대한 연구

경상대학교 의과대학 비뇨기과학교실 · 약리학교실* · 연세대학교 비뇨기과학교실**

정병하 · 장기철* · 최승강**

= Abstract =

Effect of Nitric Oxide Generated by Photolysis on the Rat Detrusor

Byung Ha Chung, Ki Churl Chang* and Seung Kang Choi**

From the Departments of Urology and Pharmacology, Gyeongsang National University College of Medicine, Chinju and Department of Urology**, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

The mechanism underlying the bladder relaxation during filling is not fully understood. Nitric oxide played an important role in mediation of relaxation in between vascular and various types of non-vascular smooth muscle. Theoretically, an increased activity of nitric oxide-releasing inhibitory nerves to the detrusor could be a factor keeping the bladder relaxed during the filling phase. The role of nitric oxide in detrusor muscle is still not fully characterized.

The objective of this study was to determine the effect and action mechanism of nitric oxide in the rat detrusor. In this experiment, nitric oxide was generated by photolysis using a long wavelength UV lamp(366nm) under nitric oxide-, NO₂-carrying molecules(streptozotocin, NG-nitro-L-arginine). This study were consisted of in vitro examination using Polygraph(Grass Model 79E, Quincy, MA, U.S.A.), radioimmunoassay for guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate and nitrite assay to identify the production of nitric oxide.

Nitric oxide was generated by photolysis from nitric oxide- and NO₂-containing compounds. The longer UV irradiated and the stronger photo energy of light source, the more produced the amount of nitric oxide. The relaxation induced by nitric oxide-containing compound (streptozotocin) is much more than that by NO₂-containing compound(NG-nitro-L-arginine). Nitric oxide was a potent but labile relaxing substance to the rat detrusor strip. The maximal relaxation under streptozotocin treatment and 60 second UV irradiation was approximately 70.0 % comparing to carbachol induced contraction. That relaxation was significantly inhibited by pyrogallol, methylene blue treatment. The photo-induced nitric oxide directly activated soluble form of guanylate cyclase resulting in increased concentration of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in detrusor strips.

From the above results, it was confirmed that nitric oxide relaxed the detrusor muscle, which means that L-arginine/nitric oxide pathway may be present in the mechanism of relaxation. Therefore, new therapeutic approach using exogenous nitric oxide will be an attractive modality in treating functional voiding disturbances such as detrusor hyperreflexia and bladder instability.

Key Words: Nitric oxide, Detrusor muscle, Relaxation.

*이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

**이 논문의 요지는 The 23rd Annual Meeting of ICS에서 포스터 발표되었음.

접수일자 1994년 8월 29일

서 론

방광은 낮은 압력으로 소변을 저장하고 일정한 시간 간격으로 소변을 배출한다. 이같은 배뇨기전에는 중추성 조절기전과 말초성 조절기전이 있으며 이에 대해서는 최근에 많은 연구가 이루어져 있다¹. 그러나 방광이 소변으로 채워지는 동안 일어나는 방광배뇨근의 이완기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 이에 대한 가설로는 방광근의 물리적 특성², 부교감신경의 억제³, 혹은 교감신경의 항진⁴ 등이 주장되고 있으며 이중 교감신경계 항진, 특히 베타수용체 항진에 의한다는 가설이 가장 널리 인정되고 있다⁵. 그러나 사람에서는 베타수용체를 차단했을 때에도 정상적인 방광기능에 아무런 이상이 없었으며, 한편에서는 방광이 차는 동안 이완이 알파수용체 항진으로 이루어질 가능성도 현재는 완전히 배제할 수는 없다⁶. 이외에도 인체 하부요로에서 합성, 저장 그리고 유리되는 여러가지 신경펩티드중에서 calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide 그리고 substance P 등이 방광 이완에 관여한다고 제시되고 있으나 그 기능적인 역할은 아직 확실하지 않다⁷. 따라서 간단한 방법으로 방광을 임의로 이완시켜 방광 내압을 낮추고 적당한 양의 소변을 저장하게 함으로 상부요로에 미치는 영향을 줄일 수 있다면 배뇨증상의 호전이나 방광과반사 혹은 불안정방광등의 치료영역에서 커다란 진보가 예상될 수 있다. 최근 nitric oxide가 위장에서 음식물이나 액체가 들어왔을 때 이완되는 적응성 이완(adaptive relaxation)의 매개물질로 제시되고 있다⁸. Nitric oxide는 혈관뿐만 아니라 항문미골근⁹, 소화기 평활근¹⁰, 음경해면체근등¹¹ 여러가지 비혈관성 평활근도 이완시키는 것으로 보고되고 있다. Nitric oxide가 평활근을 이완시키는 기전은 조직내의 guanylate cyclase가 활성화되고 이에 따른 guanosine 3', 5' cyclic monophosphate(cyclic GMP) 증가로

이완된다고 보고되었다¹². 임상적으로 nitric oxide는 adult respiratory distress syndrome환자의 기관지를 확장시킬 목적으로 흡입시키거나¹³ 혹은 음경해면체에 nitric oxide가 포함된 화합물을 주사하여 발기부전환자 임상치료에 시도되고 있다¹⁴. 따라서 이론적으로 nitric oxide를 유리하는 신경 활동이 증가되면 방광을 이완시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다. 그러나 현재까지 방광근이 nitric oxide의 실질적인 표적장기인지 혹은 nitric oxide가 방광평화근에 어떠한 영향을 미치는 지 아직 뚜렷하지 않다¹⁵. 한편 Chang등¹⁶은 최근에 nitric oxide 혹은 nitric oxide synthase의 역할을 살필 수 있는 새로운 방법으로 구조식내에 nitric oxide기를 포함하는 화합물에 파장 366nm의 자외선을 조사하여 nitric oxide 발생방법을 보고하였으며 이 방법이 비교적 간편하고 정량적으로 nitric oxide를 유리시킨다고 주장하였다. 따라서 본 연구는 구조식중 nitric oxide를 함유한 화합물에 자외선을 조사함으로써 nitric oxide를 발생시켜 nitric oxide가 방광 배뇨근에 미치는 영향과 그 작용기전을 밝히고자 하였다(Fig. 1).

재료 및 방법

1. 방광근 절편 표본작성

실험동물로는 몸무게 250-300g의 건강한 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다. 우선 머리 부분을 든기로 강타하여 실신시킨 후 복부를 절개하여 방광을 적출하였다. 적출된 방광을 Krebs-Ringer bicarbonate 완충용액내에서 결체 조직 및 지방조직을 제거한 후 1×1×5mm 크기의 방광근 절편을 만들었다. 이때 삼각근부분이 포함되지 않도록 적출한 방광에서 요도쪽으로 횡으로 중간부위에서 방광을 자른 후 요도쪽은 버리고 방광정부(bladder dome)쪽을 이용하여 절편을 만들었다.

절편은 Krebs-Ringer bicarbonate 완충용액

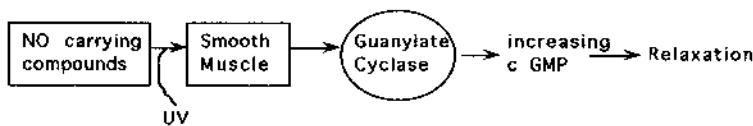


Fig. 1. Scheme of hypothesis. Nitric oxide was generated by photolysis from nitric oxide-carrying compounds. The photo-induced nitric oxide directly activated soluble form of guanylate cyclase resulting in increased concentration of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in detrusor strips, followed by relaxation of detrusor.

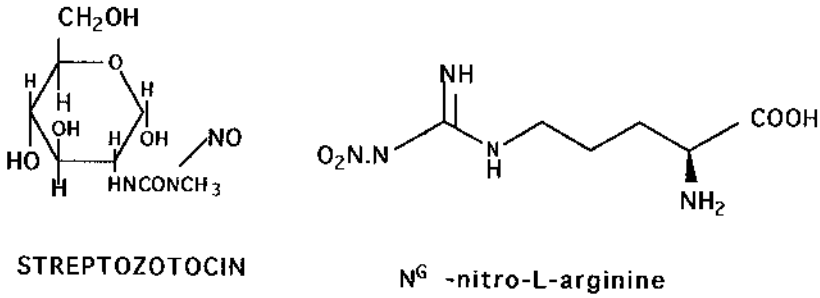


Fig. 2. Chemical structures of nitric oxide donors(streptozotocin, N⁶-nitro-L-arginine). Those compounds had nitric oxide-carrying moiety of their own structures. So nitric oxide were released after UV irradiation.

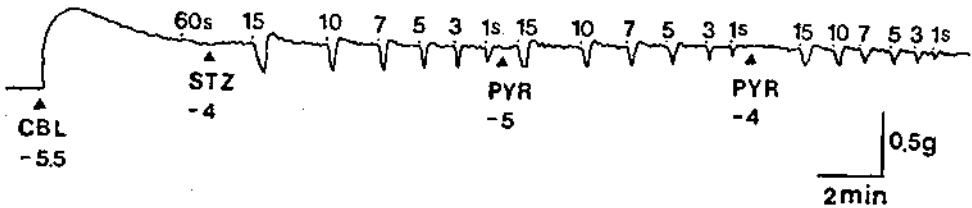


Fig. 3. Influence of UVR(UV irradiation) and STZ(streptozotocin) on rat detrusor strip. Strip was submaximally precontracted with CBL(carbachol chloride). Cumulative additions of pyrogallol (PYR) was significantly inhibited of relaxation. CBL-5.5: carbachol 5×10^{-5} M, 60s: UV irradiation for 60 seconds, STZ-4: streptozotocin 10^{-4} M, PYR-5: pyrogallol 10^{-5} M, PYR-4: pyrogallol 10^{-4} M.

이 들어 있는 10ml 이중벽 organ bath 밑부분에 한쪽 끝을 고정하고 다른 한쪽 끝은 force displacement transducer (FT 03, Grass, Quincy, MA, U.S.A.)에 연결하여 배뇨근 절편의 수축 운동을 Polygraph(Grass model 7E, Quincy, MA, U.S.A.)에 기록하였다. Organ bath의 이중벽 사이를 보온된 물로 계속 순환시켜 bath 내의 Krebs-Ringer bicarbonate 완충용액을 37°C로 유지시키고 95%의 산소와 5%의 탄산가스의 혼합기체를 계속 공급하여 pH를 7.4로 유지하였으며 bath내에 약물을 부여하고 나타나는 수축곡선 변동을 관찰하였다. 이 실험에 사용한 Krebs-Ringer bicarbonate 완충용액의 조성은 다음과 같다(mEq/L). Krebs-Ringer bicarbonate solution; NaCl, 118.5; KCl, 4.74; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.18; NaHCO₃, 24.9; glucose, 10.0; EDTA, 0×3.

2. Nitric oxide 생성 방법

Chang 등³²의 방법에 따라 nitric oxide기 함유 화합물로 streptozotocin, N⁶-nitro-L-arginine등을 organ bath에 넣고 자외선 조사를 하여 nitric oxide가 유리되도록 하였으며(Fig.

2), 자외선 광원은 파장이 254-375nm, 최고 파장 366nm인 Mineralight model UVGL-58 (UVP Inc, San Gabriel, CA, U.S.A.)을 사용하였다. 이 광원을 가능한 organ bath에 가까이 접근시켜 자외선강도가 커지도록 하였다.

3. 방광근 절편에 약물투여후 광이완 효과 측정

약 1시간동안 organ bath내의 Krebs-Ringer bicarbonate 완충용액을 반복하여 갈아주면서 방광절편을 약 1g의 크기로 긴장시킨 상태에서 운동 상태가 안정된 다음 carbachol을 10^{-6} M 내지 10^{-5} M 이 되도록 투여하여 배뇨근을 적절한 장력으로 수축시켰다. 이때 방광근이 상기 약물에 반응하여 수축이 일어나지 않거나 혹은 자율성이 심하여 안정상태에 도달하지 않는 절편 그리고 수축 후에 다시 심하게 자율성이 생겨서 판독이 힘든 절편은 실험대상에서 제외하였다. 수축이 일어난 절편에 streptozotocin 10^{-5} M과 N⁶-nitro-arginine 10^{-5} M이 되도록 각각 투여하고 약 5분이 경과한 후 자외선 조사를 시작하였다. 자외선 조사 시간이 이완에 미치는 영향을 검색하기 위하

여 각각 1초, 3초, 5초, 7초, 15초, 30초, 60초 동안 조사하였다. 이후에 약물용량에 따른 이완강도의 변동을 알기 위하여 측정용량으로 추가로 투여하고 자외선 조사를 시행하였다. 그리고 이완 기전이 guanylate cyclase 활성화에 의존인지를 검색하기 위하여 guanylate cyclase억제제인 methylene blue를 $10^{-4}M$ 투여하고 충분히 반응할 수 있도록 약 30분이 경과한 후 자외선을 조사하여 이완강도의 변동을 관찰하였다. 또한 이러한 이완반응이 산소유리기(oxygen free radicals)의 영향을 받는지를 검색하기 위하여 산소유리기 발생제인 pyrogallol을 $10^{-4}M$ 투여한 후 자외선을 조사하여 이완강도의 변동을 관찰하였다. 이완 정도는 carbachol 유발수축에 대한 백분율로 평균(%)±표준오차로 나타내었다.

4. 광원 자외선강도측정

광원의 자외선강도는 Waldmann UV-Meter® (Medizin-Technik, Villingen-Schwenningen, Germany)를 이용하여 계측하였다. Mineralight®의 자외선 강도는 실험거리이내에서 $1.72mW/cm^2$ 이었고, 상대적인 크기를 비교하기 위한 파장 315-400nm, 최고파장 365nm인 Waldmann UV-PUVA 180®(Medizin-Technik, Villingen-Schwenningen, Germany)의 자외선 강도는 $10.5mW/cm^2$ 이었다. 백열전구 및 일반 형광등의 자외선강도는 Mineralight®에 비하면 미미하였다.

5. Nitrite생성량 측정

Chang등¹⁶의 방법이 실제로 nitric oxide를 유리시키는 지를 nitrite assay로 검색하였다¹⁷. Nitrite의 농도는 nitric oxide 공여자로 사용한 streptozotocin $10^{-4}M$, NG-nitro-L-arginine $10^{-4}M$ 에 자외선을 조사하고, 이 용액 100 μ l에 발색제로 Griess reagent를 100 μ l 섞은 후에 상온에서 약 5분간 방치한 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 μM 단위로 표시하였다.

자외선 조사 시간에 따라, nitric oxide공여자의 농도 변화에 따라 그리고 자외선강도에 따라 nitrite발생량 변화를 검색하였다. 즉 자외선을 10분 내지 60분동안 조사한 용액을 10분간격으로 채취하여 계측하였고, streptozotocin $10^{-4}M$ 에서도 측정하였으며 그리고 광원을 본 실험에서 사용한 광원이외에도 백열 전구, 형광등을 일정시간 조사한 용액에서 nitrite생성

량을 측정하였다. Griess reagent의 구성은 다음과 같다(0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride를 같은 양의 H₂O와 섞은 용액에, 5% H₃PO₄ 용액에 1% sulfonilamide를 섞은 용액을 동량으로 섞음).

6. Cyclic GMP농도 측정

절편 이완이 용해성 guanylate cyclase의 활성화에 따른 cyclic GMP증가에 의존인가를 검색하기 위하여 조직내 cyclic GMP농도 측정을 방사면역측정법으로 시행하였다. 자외선 조사 시간을 변화 시킴에 따라, nitric oxide공여자인 streptozotocin의 농도를 변화함에 따라 그리고 methylene blue를 병용처치함에 따라 변하는 조직내의 cyclic GMP농도를 측정하였다.

방광절편조직을 carbachol로 수축만 시킨 대조군과 수축후 자외선만 조사한 군, carbachol로 수축 시킨 군, streptozotocin $10^{-4}M$ 에 자외선을 각각 15초, 30초, 60초, 180초 조사한 군, carbachol로 수축시키고 streptozotocin $10^{-6}M$, $10^{-4}M$, $10^{-3}M$ 에 자외선을 15초간 조사한 군, carbachol로 수축시키고 streptozotocin $10^{-4}M$ 에 자외선을 15초간 조사한 후 methylene blue $10^{-4}M$ 병용처치하고 자외선을 15초간 조사한 군으로 나누었다.

각군별로 방광 배뇨근절편 4개씩을 생리측정기에 현수하였고 일정시간이 경과하여 평형을 이룬 후 상기의 방법대로 조작을 하였다. 자외선 조사가 끝나서 이완 반응이 끝날 때 액체 질소에 담가두었던 스테인리스 스틸 감자로 방광절편을 재빨리 잡아서 액체 질소에 담가 급속동결(-196℃)시킨 후에 6% trichloroacetic acid를 섞고 조직을 균질화시킨 후에 4℃, 2500g로 약 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리후 상층액은 시판 cyclic GMP(¹²⁵I) assay kit(Amersham, London, United Kingdom)를 이용하여 측정하였고, pellet은 Bradford방법¹⁸로 단백질량을 측정하였다.

7. 사용약물

Carbachol chloride, streptozotocin, N^G-nitro-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine methyl ester, N^G-nitro-D-arginine methyl ester, pyrogallol 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였으며 methylene blue는 Mallinckrodt Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 이중에서 strepto-

Table. Influence of streptozotocin and N^G-nitro-L-arginine on relaxation in the strips of detrusor

Group	No. strips	Percent Relaxation		
		10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
Streptozotocin	14	21.2±11.7	63.4±7.5	65.1±9.4
N ^G -nitro-L-arginine	12	0	0	12.5±4.7

Value represent means±SEM(%) comparing to the carbachol induced contraction. Rat detrusor strips were submaximally precontracted with carbachol(1-10μM). Streptozotocin or NG-nitro-L-arginine were added at the time of peak contractile responses to carbachol and UV lamp (Mineralight®) were applied for 15 seconds.

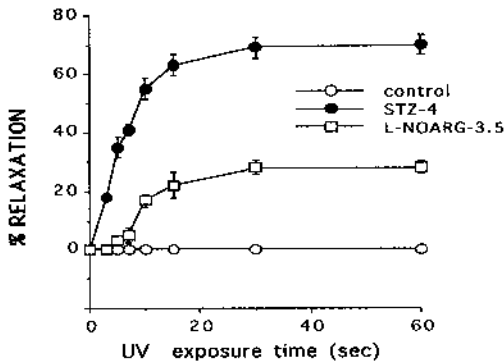


Fig. 4. Comparison of relaxation responses between streptozotocin(n=20) and N^G-nitro-L-arginine(n=16) treatment on rat detrusor strips. Values represent means±SEM(%) comparing to the carbachol induced contraction. control: strips contracted by carbachol only., STZ-4: streptozotocin 10⁻⁴M treatment group, L-NOARG-3.5: N^G-nitro-L-arginine 5×10⁻⁴M treatment group.

zotocin은 시약을 만든 후에 자연광에 의한 nitric oxide생성을 최소로 하도록 은박지로 포장하여 사용하였다.

8. 통계분석

실험 결과는 개인용컴퓨터에 입력하여 Stat Works 프로그램으로 처리하여 평균과 표준오차를 구하였으며 각 측정군간의 결과에서 유의 판정은 Student's t-test 및 Mann-Whitney U test를 이용하였고, 통계적으로 p값이 0.05 이하일때 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 자외선 조사가 방광근 절편에 미치는 영향

생리측정기로 실험한 총 128개의 절편중 진동과 진폭이 일정한 심한 자율운동이 있어서

판독이 불가능한 절편을 실험대상에서 제외하였고 80례(62.5%)를 본 실험에 사용하였다.

방광근 절편을 carbachol로 수축시키고 60초간 자외선을 조사하여도 절편의 운동상태는 변동이 없었다. Streptozotocin 10⁻⁴M에 자외선을 조사하면 절편은 곧 이완 되었으며 자외선 조사를 중단하면 이완된 절편은 급격히 원래의 수축상태로 되돌아갔다. 자외선을 15초, 10초, 7초, 5초, 3초 그리고 1초간 각각 조사하였을 때 이완강도는 자외선 조사시간이 짧을수록 더 약해짐을 관찰할 수 있었다. Pyrogallol 10⁻⁶M 병용 처치후 자외선 조사를 하면 현저한 이완강도 변동은 없었으나 축적용량으로 10⁻⁴M 투여후에는 같은 자외선 조사시간대별로 이완강도가 현저히 감소하였다(Fig. 3).

1) Streptozotocin, N^G-nitro-L-arginine에 의한 방광근 절편 이완 효과

15초간 자외선 조사를 기준으로 streptozotocin 10⁻⁵M에서 21.2±11.7% 이완되었다. Streptozotocin 10⁻⁴M 에서는 63.4±7.5%로 이완강도가 커졌으며 축적 용량으로 투여한 10⁻³M에서는 65.1±9.4%로서 10⁻⁴M 과는 차이가 없었다. N^G-nitro-L-arginine 10⁻⁵M, 10⁻⁴M 에서는 이완이 되지 않았고 10⁻³M 용액에서 비로소 12.5±4.7% 이완되었다(Table).

Streptozotocin 10⁻⁴M 과 N^G-nitro-L-arginine 5×10⁻⁴M 에서 이완 강도는 자외선 조사시간이 길어짐에 따라 커지는 경향을 보였다. 이완강도는 streptozotocin 10⁻⁴M, 30초 조사에서 69.1±7.5%로 거의 최고치에 이르러 60초 동안 조사하여도 70.0±5.8%로 더이상 이완강도는 증가되지 않았으며, N^G-nitro-L-arginine 5×10⁻⁴M, 30초 조사에서는 22.1±4.7%, 60초 조사에서 23.2±5.2% 이완되었다. 같은 자외선 조사시간대별로 비교한 이완강도는 streptozotocin 10⁻⁴M에서 N^G-nitro-L-arginine

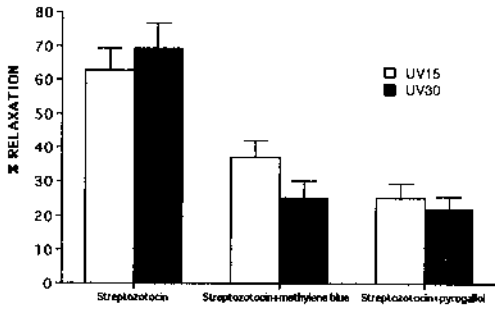


Fig. 5. Influence of pyrogallol and methylene blue on relaxation elicited by streptozotocin. Value represent mean±SEM (%) comparing to carbachol induced contraction. streptozotocin: streptozotocin $10^{-4}M$ (n=20), streptozotocin+ pyrogallol: streptozotocin $10^{-4}M$ +pyrogallol $10^{-4}M$ (n=8), streptozotocin+ methylene blue: streptozotocin $10^{-4}M$ +methylene blue $10^{-4}M$ (n=10). UV 15: UV irradiation for 15 seconds, UV 30: UV irradiation for 30 seconds.

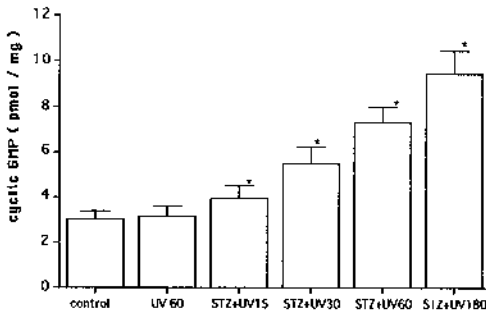


Fig. 6. Cyclic GMP (guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate) formation in detrusor strips according to the changes of UV irradiation. Values are means±SEM (pmol/mg) using 4 strips (for each test condition). control: strips were submaximally contracted by carbachol, UV 60: UV irradiation for 60 seconds, STZ+UV15: streptozotocin $10^{-4}M$ +UV irradiation for 15 seconds, STZ+UV30: streptozotocin $10^{-4}M$ +UV irradiation for 30 seconds, STZ+UV60: streptozotocin $10^{-4}M$ +UV irradiation for 60 seconds, STZ+UV180: streptozotocin $10^{-4}M$ +UV irradiation for 180 seconds, *: $p < 0.05$.

$5 \times 10^{-4}M$ 보다 항상 컸다($p < 0.05$)(Fig. 4).

2) Pyrogallol, methylene blue 병용 처치가 방광근 절편 이완에 미치는 영향

자외선 조사 15초, 30초를 기준으로 이완강도는 pyrogallol $10^{-4}M$ 병용 처치하면 각각 $25.4 \pm 5.1\%$, $21.9 \pm 3.7\%$ 이었으며, methylene blue $10^{-4}M$ 병용 처치 후에는 $37.5 \pm 4.9\%$, $25.1 \pm 4.1\%$ 로서 streptozotocin $10^{-4}M$ 단독투여 시 $63.0 \pm 6.7\%$, $69.0 \pm 7.5\%$ 와 각각 비교하면

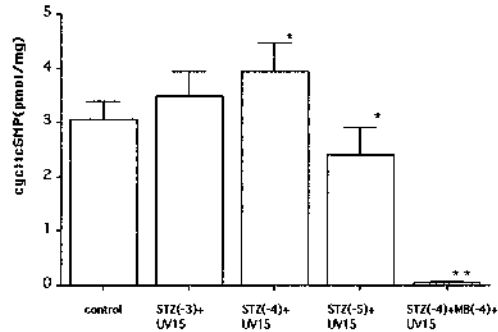


Fig. 7. Cyclic GMP formation in detrusor strips according to the dosage of streptozotocin and methylene blue treatment. Values are means±SEM (pmol/mg). control: strips were submaximally contracted by carbachol, STZ(-3)+UV15: streptozotocin $10^{-3}M$ +UV irradiation for 15 seconds, STZ(-4)+UV15: streptozotocin $10^{-4}M$ +UV irradiation for 15 seconds, STZ(-5)+UV15: streptozotocin $10^{-5}M$ +UV irradiation for 15 seconds, STZ(-4)+MB(-4)+UV15: streptozotocin $10^{-4}M$ +methylene blue $10^{-4}M$ +UV irradiation for 15 seconds, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

자외선 조사 시간대별로 이완강도가 유의하게 감소($p < 0.05$)하였다(Fig. 5).

2. 방광근 절편 조직내 cyclic GMP농도 측정

절편조직내 cyclic GMP농도는 carbachol수축만 시킨 대조군과 수축후 자외선만 조사한 군에서는 각각 3.05 ± 0.33 pmol/mg, 3.14 ± 0.45 pmol/mg 이었다. Streptozotocin $10^{-4}M$ 투여후 자외선을 각각 15초, 30초, 60초, 180초 동안 조사한군에서는 각각 3.93 ± 0.55 pmol/mg, 5.45 ± 0.75 pmol/mg, 7.32 ± 0.64 pmol/mg, 9.46 ± 1.02 pmol/mg이었다. Streptozotocin $10^{-4}M$ 에서는 자외선 조사시간이 길어질수록 조직내 cyclic GMP농도가 의미있게 증가($p < 0.05$)하였다(Fig. 6).

15초의 자외선 조사를 기준으로 streptozotocin $10^{-3}M$, $10^{-4}M$ 투여후 각각 3.48 ± 0.45 pmol/mg, 3.93 ± 0.55 pmol/mg로 대조군에 비해 유의한 증가($p < 0.05$)가 있었고, $10^{-5}M$ 투여군에서는 2.41 ± 0.50 pmol/mg으로 의미있게 감소($p < 0.05$)하였다. Methylene blue $10^{-4}M$ 병용처치 후에는 0.04 ± 0.04 pmol/mg로서 현저히 감소($p < 0.01$)하였다(Fig. 7).

3. Nitric oxide첨유 화합물에서 자외선강도에 따른 nitrite 생성량의 변동

Streptozotocin $10^{-4}M$ 에서 10분, 20분, 30분

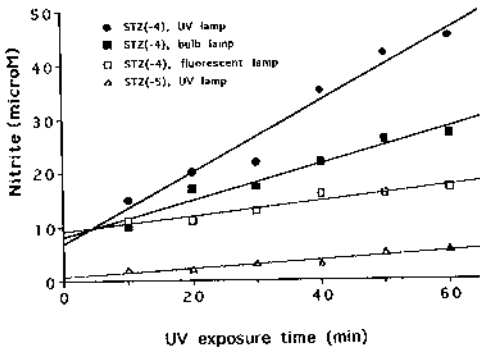


Fig. 8. Influence of nitrite production in streptozotocin solution according to the intensity of UV light. Values are concentration of nitrite (mM). STZ(-4), UV lamp: streptozotocin 10^{-4} M+UV lamp, STZ(-4), bulb lamp: streptozotocin 10^{-4} M+bulb lamp, STZ(-4), fluorescent lamp: streptozotocin 10^{-4} M+fluorescent lamp, STZ (-5), UV lamp: streptozotocin 10^{-5} M+UV lamp.

및 60분간 자외선 조사에 의하여 생성된 nitrite 양은 각각 $15\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $22\mu\text{M}$ 및 $45\mu\text{M}$ 이었다. 또한 자외선강도가 약한 백열구등이나 일반형광등하에서도 10분간 조사에서 각각 $10\mu\text{M}$, $12\mu\text{M}$ 60분조사에서도 각각 $25\mu\text{M}$, $18\mu\text{M}$ 의 nitrite가 생성되었다. Nitrite생성량은 streptozotocin 10^{-5} M에서는 10^{-4} M보다 적었다. 같은 조사시간대 별로는 광원의 자외선강도가 클수록, 그리고 nitric oxide함유 화합물의 농도가 높을 수록 nitrite생성량이 많았다(Fig. 8).

N^{G} -nitro-L-arginine 10^{-4} M에서는 10분, 30분 및 60분간 조사후에 생성된 nitrite는 각각 $5\mu\text{M}$, $15\mu\text{M}$, $18\mu\text{M}$ 이었다. N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester 10^{-4} M과 광학성 이성체인 N^{G} -nitro-D-arginine methyl ester 10^{-4} M에서도 일정시간 자외선 조사후에 nitrite가 생성되었다. 10분간 조사후에 각각 $3\mu\text{M}$, $7\mu\text{M}$ 이었고 60분후에는 각각 $17\mu\text{M}$, $18\mu\text{M}$ 를 생성하였지만 streptozotocin에서의 nitrite생성량 보다는 현저히 적었다. Nitrite생성량은 상기의 여러가지 nitric oxide함유 화합물중 streptozotocin이 가장 많았다(Fig. 9).

고 찰

Nitric oxide는 화학적으로 불안정하며, 반감기가 약 수초 정도이고, 분자량 30.006 인 유리기(free radical)성상을 띄며 단순 기체상태로 존재한다¹⁹. 생체내에서 nitric oxide synthase

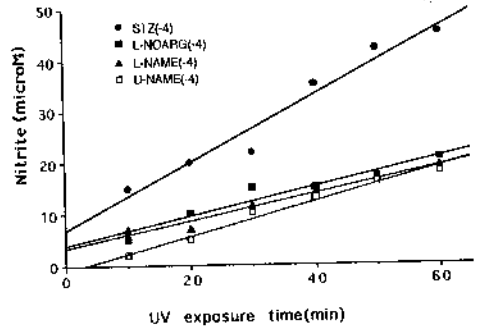


Fig. 9. Responses of nitrite production to various structural analogues of streptozotocin (STZ), L-NOARG(N^{G} -nitro-L-arginine), STZ (-4): streptozotocin 10^{-4} M, L-NOARG(-4): N^{G} -nitro-L-arginine 10^{-4} M, L-NAME(-4): N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester 10^{-4} M, D-NAME (-4): N^{G} -nitro-D-arginine methyl ester 10^{-4} M.

에 의해서 L-arginine의 guanidino nitrogen으로 부터 nitric oxide와 L-citrulline으로 변환되어 생성된다²⁰. 이러한 nitric oxide synthase에는 적어도 두가지 형태가 존재한다. 즉 하나는 세포내에 존재하며 calcium/calmodulin 의 존재적인 형태로서 자극이나 수용체를 통해서 단시간내에 nitric oxide를 유리시키는 효소(constitutive nitric oxide synthase)이고 다른 하나는 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되거나 cytokine에 의해서 여러가지 세포에서 유도되는 형태(inducible nitric oxide synthase)로서 주로 장시간에 걸쳐 nitric oxide를 생성한다²¹. Nitric oxide의 구체적인 생리학적 역할로는 세균에서 질소고정에 관여 하고, 포유류에서는 대식세포에서 항암효과나 살균작용을 나타내는 매개물질로 작용하며 혈소판 응집억제 작용이 있다고 보고되고 있다²². 이러한 작용이외에 평활근 이완작용이 최근에 주목을 받고 있다. Nitric oxide는 혈관 평활근의 이완에 대한 생리학적 전령이며 혈관을 이완시키는 자극들이 내피세포의 수용체에 작용하면 소위 내피성 의존인자의 분비를 자극하여 주위의 평활근으로 확산되어 결과적으로 이완이 된다²³. 현재로서는 내피성 의존 이완인자가 nitric oxide와 동일물질이거나 혹은 nitric oxide기를 유리하는 화합물이라는 주장이 널리 받아들여지고 있다²⁴. 그러나 nitric oxide는 고전적인 의미의 신경전달물질 정의에서 관련된 신경원에 생성 효소가 존재하고, 생리적인 신경 자극이 nitric oxide에 의한 현상과 유사하

나, nitric oxide 생성 억제제에 신경 자극으로 인한 효과가 억제된다는 점에서 일부를 만족시키지만, 그럼에도 불구하고 수용체를 통한 작용이 아니라 세포내로 작용한다는 면과 신경말단의 낭포에 저장될 수 없다는 점에서 전통적인 조건을 일부 만족시키지는 못한다²⁵.

Nitric oxide는 guanylate cyclase의 heme iron과 아주 높은 친화력으로 결합하여 효소가 촉매능력을 나타낼 수 있도록 구조적인 변화를 야기한다²⁶. 조직내 cyclic GMP 농도가 증가되었을 때 혈관이 이완되는 기전은 아직 확립되지는 않았지만 cyclic GMP의존 단백질인 산화효소에 의해서 myosin light chain의 cyclic GMP 의존단백질이 인산화됨으로써 이완한다는 주장이 지배적이다²⁷. 그러나 cyclic GMP가 근세포 외부로부터 칼슘 유출을 증가시킨다는 주장²⁸과 내피성 의존이완인자가 세포질내로 칼슘유입을 감소시킨다는 보고도 있다²⁹.

이와 같이 생체내 L-arginine/nitric oxide pathway의 존재는 여러가지 세포 및 조직에서 다양한 생리조절기능을 나타내고 있고 특히 최근에 주된 신호변환기전 어디에나 존재하고 있다는 사실이 밝혀져 nitric oxide에 대한 연구는 활발하다³⁰. 그러나 현재까지 방광근에 대한 nitric oxide의 영향에 대해서는 아직 확립된 바가 없다. 하지만 James 등³¹은 atropine으로 전처치한 인체 방광근이 전기장 자극으로 이완되고 tetrodotoxin 처리 후 전기장 자극에도 이완강도에 변동이 없으며 N^G-nitro-L-arginine 부여 후 이완강도가 약해지는 현상이 있어 방광근 이완현상에도 L-arginine/nitric oxide pathway 관련가능성이 있다고 보고하였고 이 pathway의 장애가 불안정방광을 유발하는 기전이라고 주장하였다. 한편 전기장 자극을 이용하여 흰쥐나 돼지의 요도 및 방광근을 대상으로 한 연구에서는 nitric oxide가 방광근에 매우 미약한 이완효과를 보이며 주로 요도의 이완에 관련되어 있다고 보고하였다¹⁵. 이와같이 생리적인 nitric oxide 유리에 의한 방광근 이완은 미약하더라도 대량의 nitric oxide를 외부에서 투여했을 때 방광근 이완강도를 크게 할 수 있다면 치료목적으로 nitric oxide를 사용할 수 있다고 할 것이다.

그러나 nitric oxide를 사용하려면 상품화된 기체를 이용할 수 있으나 현재 국내에서는 용이하지 않다. 상품화된 기체는 sodium nitrite에 산을 함하여 화학적으로 합성하거나 혹은

NO₂⁻와 denitrifying enzyme을 결합시켜서 생성한다³². 이외에도 nitric oxide가 평활근의 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질로 밝혀져 있으므로 항아드레날린제 및 항콜린제 병용처치 후 전기장 자극하거나, 조직내 nitric oxide synthase를 면역조직화학적 방법으로 증명하거나 이와 동일한 물질로 밝혀진 NADPH diaphorase를 조직화학적 방법으로 국재화(colocalization)함으로써 nitric oxide가 관여하는 신경지배를 간접적으로 증명하는 방법들이 있다^{33,34}. 그러나 상기의 방법들은 생리적인 nitric oxide의 유리나 존재를 증명하는 방법으로 본 실험의 목적에 적절하지 않은 방법이다. 이에 본 연구자는 Chang 등¹⁶의 방법으로 nitric oxide를 발생시켰다. 이 방법은 본 실험의 결과에서도 확인했듯이 nitric oxide 산화산물인 nitrite 생성이 확실할 뿐만 아니라 그 발생강도 자외선 조사 시간에 따라 또는 자외선강도에 따라 비교적 정량적으로 발생시킬 수 있다는 장점이 있다. 또한 nitrite 생성량이 비록 적었지만 nitric oxide synthase 억제제인 N^G-nitro-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine methyl ester, N^G-nitro-D-arginine methyl ester 등 구조내에 nitric oxide기를 함유하는 물질들도 자외선 조사로 nitric oxide를 발생시킬 수 있는 것이 증명되어 이 방법은 실험실 수준에서는 유용하다고 생각된다. 하지만 nitric oxide기 함유 화합물중 가장 생성량이 많았던 streptozotocin이 당뇨 유발약제이기 때문에 실제 치료용으로는 사용이 어렵다는 점³⁵과 nitric oxide 자체의 특성상 매우 짧은 반감기로 생체내 실험이 어렵고 또한 자외선 조사의 생체내 전달이 어렵다는 점은 향후 연구가 필요하다.

본 실험에서 자외선 조사만으로 방광근은 이완되지 않았으며 조직내 cyclic GMP 농도도 대조군과 차이가 없었다. 그러나 혈관에서는 내피세포 존재와 관계없이 자외선 조사만으로 이완하는 현상이 있다. 이에 대한 기전은 아직 확실하지 않지만 자외선 조사가 혈관에서 nitric oxide를 유리시키며 이 현상은 용해성 guanylate cyclase 활성화에 따른 cyclic GMP 농도 증가로 나타난다고 보고하고 있다³⁶. 또한 혈관에서 자외선만을 반복조사하면 이완강도가 감소하는 현상이 있는데 이를 자외선 조사로 활성화되는 조직내 nitric oxide 저장기전의 고갈로 설명하고 있다³⁷. 그러나 방광근은 혈관과 달리 자외선 조사만으로는 이완되지 않

으므로 자외선 조사로 nitric oxide를 유리하는 기전이 없거나 혹은 저장하는 기전이 존재하지 않는다고 생각할 수 있다.

방광근은 nitric oxide에 용량의존적으로 이완되는 경향이 있었다. 그러나 streptozotocin 투여 후 60초 조사에서 70.0% 이완되어 최고치에 도달하여 그이상 자외선을 조사해도 이완강도의 증가는 없었다. 상기의 경향은 N^G -nitro-L-arginine 투여후에도 비슷하였다. 그리고 streptozotocin $10^{-4}M$ 투여후 이완강도는 $10^{-6}M$ 보다 강했으나, $10^{-3}M$ 과는 차이가 없었다. Streptozotocin 투여후 방광근 조직내 cyclic GMP 농도는 자외선 조사시간에 따라 증가함을 나타내었는데 60초 조사군에 비해 180초 조사군에서 cyclic GMP 농도가 증가하였으나 실제 이완의 강도는 60초이상 조사하여도 변동이 없었다. 따라서 이러한 현상은 방광근이 nitric oxide에 반응을 나타내는 데 한계가 있음을 시사한다고 하겠다. 그리고 streptozotocin 용량의존적으로 조직내 cyclic GMP 농도가 증가하는 경향은 관찰할 수 없었다. 이러한 이유를 정확하게 설명할 수는 없으나 $10^{-3}M$ 에서 $10^{-4}M$ 보다 적었음은 실험에서 오류의 가능성과 고농도의 streptozotocin에 의한 조직내 독작용 그리고 방광근이 nitric oxide에 반응을 나타내는 한계가 있다고 생각할 수 있다.

Nitric oxide기 함유 화합물인 streptozotocin과 N^G -nitro-L-arginine 투여후 이완강도에서 차이를 나타내는 이유를 확실하게 설명할 수는 없다. 하지만 화학구조에서 보듯이 Streptozotocin에서는 nitric oxide가 유리되고 N^G -nitro-arginine에서는 NO_2 가 유리된다. 이때 NO_2 는 nitric oxide와 O_2^- 로 분리되므로 nitric oxide의 이완작용이 O_2^- 로 인해서 약해진다고 실험할 수 있다. 이와같이 O_2^- 가 nitric oxide작용을 억제한다는 증거로는 혈관에서 nitric oxide에 의한 이완강도가 산소유리기 제거제인 superoxide dismutase나 catalase 병용 처리후 증강되는 현상으로 증명되었다³⁸. 본 실험에서 산소 유리기발생제인 pyrogallol 병용 처리 후에 이완강도가 약해지는 현상도 상기의 주장을 뒷받침할 수 있다. 또한 이완기전을 밝히는 데 용해성 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue 처리후 이완강도 변동이 매우 중요하다³⁹. 본 실험에서 methylene blue를 병용처리후 이완강도가 약해짐과 조직내 cyclic GMP 농도가 현저하게 감소함은 nitric

oxide에 의한 방광근 이완현상에는 guanylate cyclase의 활성화에 따른 조직내의 cyclic GMP가 증가가 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다고 하겠다. 아직은 생리적인 이완 현상에 nitric oxide의 관련 여부를 단정할 수는 없지만 외부에서 투여한 대량의 nitric oxide에 방광근이 이완된다는 본 연구 결과를 기초로 하여 향후에 반드시 생체내 실험이 필요하다고 생각한다.

이상의 결과로 미루어 nitric oxide에 의한 방광 배뇨근의 이완에는 L-arginine/nitric oxide pathway가 관여하는 것으로 생각되며 따라서 이 pathway를 활성화시키는 방법이 개발된다면 방광 감각이상, 방광과반사동의 임상적인 영역에서 새로운 치료방법이 될 수 있다고 생각한다.

결 론

Nitric oxide가 방광평활근에 미치는 효과 및 작용기전을 밝히고자 흰쥐 방광평활근을 이용하여 nitric oxide기를 가지는 화합물에 자외선조사(366nm)를 하고 이러한 광분해를 이용하여 nitric oxide를 발생시켜서 검색하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Nitric oxide기 함유 화합물에 자외선 조사를 할 경우에 nitric oxide가 발생되며 자외선 조사시간이 길어질수록 그리고 자외선 강도가 클수록 nitric oxide 발생량은 증가하였다.
2. Nitric oxide기 함유 화합물중 nitric oxide 운반분자에 의한 이완강도가 NO_2 운반분자보다 의미있게 컸다.
3. Nitric oxide기를 가지는 화합물에 자외선을 조사할 경우 nitric oxide가 발생되어 즉시 흰쥐 방광평활근을 이완시키며 이 현상은 자외선 조사를 중단하면 급격히 원래의 수축상태로 돌아갔다. 이 때의 이완정도는 carbachol 유발수축에 대한 백분율로 streptozotocin $10^{-4}M$ 에서 60초간 자외선 조사를 했을 때 70.0% 정도로 이완된다. 또한 이러한 이완 현상은 methylene blue, pyrogallol 병용처리후 의미있게 감소된다.
4. Nitric oxide에 의한 흰쥐 방광 평활근을 이완현상에는 nitric oxide가 guanylate cyclase를 활성화 시키고 결과적으로 조직내 cyclic GMP 농도가 증가됨으로서 일어난다.

이상의 결과로 미루어 nitric oxide에 의한 방광 배뇨근의 이완에는 L-arginine/nitric

oxide pathway가 관여하는 것으로 생각되며 따라서 이 pathway를 활성화시키는 방법이 개발된다면 방광 감각이상, 방광과반사동의 임상적인 영역에서 새로운 치료방법이 될 수 있다고 생각한다.

REFERENCES

1. Steers WD. Physiology of the urinary bladder. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Jr, editors. *Campbell's Urology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1992; 142-76.
2. Tang PC, Ruch TC. Non-neurogenic basis of bladder tonus. *Am J Physiol* 1955;181: 249-57.
3. Klevmark B. Motility of the urinary bladder in acts during filling at physiological rats. II. Effects of extrinsic bladder denervation on intramural tension and on intravesical pressure patterns. *Acta Physiol Scand* 1977;101:176-84.
4. de Groat WC. Nervous control of the urinary bladder of the cat. *Brain Res* 1975; 87:201-11.
5. Levin RM, Ruggieri MR, Wein AJ. Identification of receptor subtypes in the rabbit and human urinary bladder by selective radio-ligand binding. *J Urol* 1988;139:844-8.
6. de Groat WC, Booth AM. Inhibition and facilitation in parasympathetic ganglia of the urinary bladder. *Fed Proc* 1980;39: 2990-6.
7. Maggi CA. The role of peptides in the regulation of the micturition reflex: an update. *Gen Pharmacol* 1991;22:1-24.
8. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex activation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991;352:477-9.
9. Gillespie JS, Liu XR, Martin W. The effects of L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J pharmacol* 1989; 98:1080-2.
10. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990;345: 346-7.
11. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:843-50.
12. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;12(suppl 5):S115-8, 1988.
13. Rossaint R, Falke KJ, Lez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993;328:399-404.
14. Stief CG, Holmquist F, Djamilian M, Krah H, Andersson KE, Jonas U. Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J Urol* 1992;148:1437-40.
15. Persson K, Igawa Y, Mattiason A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 1992;107:178-84.
16. Chang KC, Chong WS, Park BW, Seung BW, Chun GW, Lee IJ, et al. NO- and NO₂-carrying molecules potentiate photorelaxation in rat trachea and aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:509-14.
17. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989;169:1543-55.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
19. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 1984;308:645-7.

20. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
21. Moncada S, Palmer RMJ. The L-arginine: nitric oxide pathway in the vessel wall. In Moncada S, Higgs EA, editors. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Amsterdam: Elsevier, 1990;19-33.
22. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987;92:181-7.
23. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
24. Shikano K, Berkowitz BA. Endothelium-derived relaxing factor is selective relaxant of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:55-60.
25. Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science* 1992;257:494-6.
26. Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem* 1986;61:4997-5002.
27. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-6.
28. Spedding M, Schini V, Schoeffter P, Miller RC. Calcium channel activation does not increase release of endothelial derived relaxant factors(EDRF) in rat aorta although tonic release of EDRF may modulate calcium channel activity in smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8:1130-9.
29. Paul HR, Marie MG, Stephen FF. Simultaneous measurement of force and calcium uptake during acetylcholine-induced, endothelium-dependent relaxation of rabbit thoracic aorta. *Circ Res* 1987;60:31-8.
30. Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991;41:485-90.
31. James MJ, Birmingham AT, Hill SJ. Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 1993;35:366-72.
32. Pai T, Payne W, LeGall J. Use of a chemiluminescence detector for quantitation of nitric oxide produced in assays of denitrifying enzymes. *Anal Biochem* 1987;66:150-7.
33. Bredt DS, Hwang PH, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347:768-70.
34. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi, M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7797-801.
35. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969;48:2129-39.
36. Matsunaga K, Furchgott RF. Response of rabbit aorta to nitric oxide and superoxide generated by ultraviolet irradiation of solutions containing inorganic nitrite. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:1140-6.
37. Venturini CM, Palmer RMJ, Moncada S. Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide. *J Pharmacol Ther Exp* 1993;266:1497-500.
38. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-7.
39. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232:708-16.