

토끼 기관평활근 수축에서 G Protein의 역할

부산대학교 의과대학, 치과대학* 생리학교실

정 진 섭 · 황 태 호* · 이 상 호

(1990년 11월 1일 접수)

= Abstract =

Role of G-protein in the Contraction of Rabbit Trachealis Muscle

Jin Sup Jung, Tae Ho Hwang* and Sang Ho Lee

*Department of Physiology, Pusan University School of Medicine and Dentistry**

Fluoride (F^-), a known stimulator of G-protein, induced strong contraction in rabbit trachealis muscle. $AlCl_3$ ($5 \sim 20 \mu M$), which is required for G-protein stimulation by F^- , potentiated the contractile response to F^- . Ca^{2+} -removal and verapamil, a calcium channel blocker, inhibited the fluoroaluminate-induced contraction. Fluoroaluminate increased ^{45}Ca influx in the absence and presence of verapamil. In heparin-loaded muscle high K^+ -induced contraction was not affected, but acetylcholine and fluoroaluminate-induced contractions were inhibited. The fluoroaluminate-induced contraction was partially relaxed by isoproterenol, a stimulator of adenylate cyclase. Pertussis toxin partially inhibited fluoroaluminate-induced contraction and potentiated isoproterenol-induced relaxation in the presence of fluoroaluminate, but had no effect on acetylcholine-induced contraction and the isoproterenol-induced relaxation in the presence of acetylcholine. These results suggest that fluoroaluminate has the ability to stimulate at least two putative G-proteins in rabbit trachealis muscle; One causes Ca^{2+} influx through the potential-operated Ca^{2+} channel and the other induces intracellular Ca^{2+} release by the increase of inositol-1, 4, 5-triphosphate.

Key Words: Fluoroaluminate, G-protein, Acetylcholine, Trachealis muscle

서 론

Guanine nucleotide regulatory protein(G-protein)은 여러가지 생체활성물질의 작용에 있어서 수용체와 세포내 effector 사이의 정보전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Gilman, 1987). 이러한 G-protein에는 adenylate cyclase의 활성화에 관여하는 것으로 알려진 G_s - 및 G_i -protein, 아직 기능이 불확실한 G_o -protein, 망막세포에 존재하는 transducin 등이 있으며 최근에는 Ca^{2+} mobilizing receptor와 phospholipase C(PLC) 사이의 정보전달에 관련된

새로운 G-protein(G_p)의 존재가 강력히 시사되고 있다(Berridge, 1987; Claro et al, 1989; Rana & Hokin, 1990). 이러한 G-protein은 여러가지 평활근 수축물질의 작용에도 중요한 역할을 하는 것으로 시사되었으며(Kitazawa et al, 1989; Murray et al, 1989) 최근 혈관 평활근에 G-protein이 존재하는 것이 증명되었다(Katawa et al, 1989).

NaF 는 $AlCl_3$ 존재시 AlF_4^- (fluoroaluminate)의 형태로 G-protein의 α -subunit에 위치한 guanosine 5'-diphosphate와 상호작용하여 여러가지 G-protein을 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져(Sterweiss & Gilman, 1982) 여러 종류의 세포에서 G-protein의

작용을 연구하는데 이용되고 있다. Fluoroaluminate는 쥐의 이하선에서 carbachol과 유사한 기전으로 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키고(Mertz et al, 1990) 쥐의 간세포에서 vasopressin이나 glucagon 같은 Ca^{2+} -mobilizing hormone과 유사한 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있으며(Blackmore et al, 1985) 여러가지 평활근에서 수축작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Marc et al, 1988; Zeng et al, 1989; Hall et al, 1990). 그러나 fluoroaluminate는 같은 혈관평활근에서도 종에 따라 수축에 관여하는 Ca^{2+} 동원기전이 다른 것으로 보고되었으며(Nguyen-Duong, 1985; Zeng et al, 1989) 기관평활근에서는 그 작용이 명확히 밝혀져 있지 않다.

기관평활근에서 acetylcholine은 muscarinic receptor중 m_2 와 m_3 receptor를 통하여 작용을 나타내며(Meda et al, 1988; Lucchesi et al, 1990) 그 주요한 작용으로는 inositol phospholipid 대사에 관여하는 기전과 cAMP 농도를 감소시키는 기전등이 있으며 ionic channel에 작용하여 막전위의 탈분극을 일으키는 기전도 있는 것으로 알려져 있다(Coburn & Baron, 1990). 이러한 다양한 acetylcholine의 작용들 중 inositol phospholipid 대사 활성화에 의한 기전이 acetylcholine의 수축작용에 중요한 역할을 하며 이에 G-protein이 관여하는 것으로 밝혀졌으나(Rasmussen et al, 1990) 그의 다른 작용들이 acetylcholine의 기관평활근 수축에 어떻게 관여하는지 이들 기전이 G-protein의 자극을 통하여 일어나는 지는 명확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 토끼의 기관평활근에서 G-protein activator로 알려진 fluoroaluminate와 acetylcholine의 작용을 상호비교함으로써 fluoroaluminate에 의한 기관평활근의 수축기전을 밝히고 나아가 acetylcholine의 작용에 대한 G-protein의 역할을 보다 명확히 밝히고자 하였다.

실 험 방 법

1. 수축력의 측정

체중 2~2.5 kg의 New Zealand White 토끼의 두 부를 강타하여 희생시킨후 상방 1/2의 기도를 분리하여 결합조직과 지방조직을 제거하고 기관의 주행

방향을 따라 복측부위를 절개하였다. 기도상피세포는 기관평활근의 수축에 이완작용을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문에(Morrison et al, 1990) 배측 부위에 종으로 형성되어 있는 기관평활근의 상피를 솜으로 가볍게 문질러 제거하고 2개의 기관환에 걸쳐있는 평활근을 분리하여 평활근에 인접한 연골부위를 묶어서 절편을 만들었다. 평활근 절편을 실험 용기에 옮겨 한쪽 끝을 근육고정기에 연결하고 다른 끝을 근수축 변환기(Glass FT .03)에 연결하여 생리 기록기(Grass 7E)로 등척성 수축을 기록할 수 있도록 한 다음 1g의 최초장력을 가한 후 37°C에서 100% 산소를 공급하면서 1시간 이상 평형시킨 후 실험을 시작하였다. 실험에 사용한 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 136; KCl, 5; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1.0; dextrose, 5.5; Tris, 24 (pH 7.4 at 37°C) (단위 : mM).

2. ^{45}Ca influx 측정

^{45}Ca influx의 측정은 Aaronson과 van Breeman의 방법(1981)으로 하였다. 생리적 식염수에서 1시간 동안 평형시킨 후 조직을 5 mM NaF, 20 μ M $AlCl_3$ (fluoroaluminate)이 들어있는 생리적 식염수로 옮겨서 5분간 처리한 후 2 μ Ci/ml의 ^{45}Ca 을 포함하고 위와 조성이 같은 생리적 식염수로 옮겨 3분간 두었다. verapamil의 효과를 관찰할 때는 fluoroaluminate 투여 5분전에 10 μ M verapamil을 가하였다. 조직을 꺼내어 6.5 mM $CaCl_2$, 5 mM EGTA가 포함된 생리적 식염수에 넣어 4°C에서 25분간 처리하여 세포막에 결합되어 있는 ^{45}Ca 을 제거하였다. 조직의 물기를 제거하고 무게를 단후 5 mM EDTA 용액 3 ml에 넣고 12시간 이상 처리한 후 여기에 7 ml scintillation cocktail을 넣고 liquid scintillation counter(Tricarb 300C)로 측정하였다.

3. 세포내 heparin loading

세포내부에 heparin을 loading 시키기 위해 Kobayashi등(1989)이 사용한 reversible permeabilization 방법을 사용하였다. 아래 용액으로 각각 20 분, 90분, 30분, 30분씩 차례로 처리한후 15분 간격으로 $CaCl_2$ 을 0.001, 0.01, 0.1, 1.6 mM씩 가하고 근수축기에 걸어서 1시간 이상 평형시킨 후 등척성

수축을 측정하였다. 용액의 조성은 다음과 같으며 단위는 mM 이다.

- 1) EGTA 10, KCl 120, ATP 5, MgCl₂, TES 20, (2° C에서 pH 6.8)
- 2) KCl 120, ATP 5, MgCl₂ 2, TES 20 (2° C에서 pH 6.8)
- 3) KCl 120, ATP 5, MgCl₂ 10, TES 20 (2° C에서 pH 6.8)
- 4) NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 10, glucose 5.6, HEPES 2 (22° C에서 pH 7.1)

세포내부에 heparin을 loading 할때는 2), 3), 4)의 용액에 1 mg/ml heparin을 첨가하여 사용하였다.

실험성적은 mean ± S.E.M. 으로 나타내었고 두 결과를 비교할 필요가 있을 때는 student's t-test로 검정하였으며 p 값이 0.05 미만일때 유의한 것으로 하였다.

실험에 사용한 시약으로 ⁴⁵Ca (1.78 mCi/ml)은 New England Nuclear 제품을, SITS는 Pierce 제를, acetylcholine, atropine, EDTA, EGTA, heparin, HEPES, histamine, isoproterenol, pertussis toxin, serotonin, TES 및 verapamil 등은 Sigma 제품을 사용하였다.

Abbreviation: EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EGTA, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N,N'-tetraacetic acid; InsP₃, inositol 1, 4, 5-triphosphate; HEPES, N - 2 - hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; SITS, 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid; TES, N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid; Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane

실 험 결 과

1. NaF의 수축효과

Fig. 1는 토끼 기관평활근에서 NaF를 부가적으로 가했을 때 나타나는 수축양상을 나타낸 것이다. 토끼 기관평활근에서 NaF는 0.6 mM부터 수축을 나타내었다. Fluoride에 의한 G-protein의 자극에 미량의 aluminium이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 (Sterweiss & Gilman, 1982) NaF에 의해

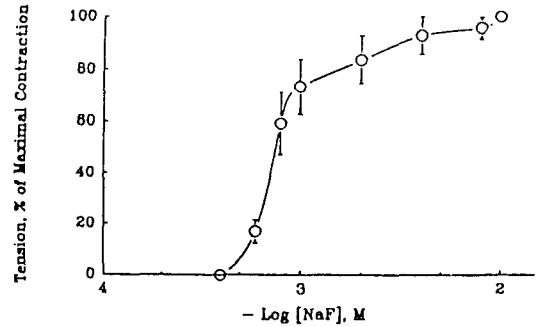


Fig. 1. Dose-response curve of NaF in rabbit trachealis muscle. Data, which are expressed as a percentage of the contraction induced by 10 mM NaF, represent means ± S.E.M. of 4 strips.

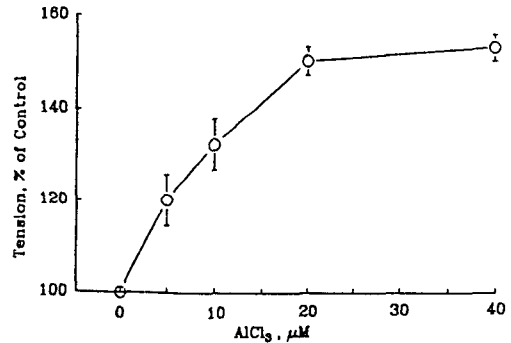


Fig. 2. Effect of aluminium on 5 mM NaF-induced contraction. Data, which are expressed as a percentage of the control tension by 5 mM NaF, represent means ± S.E.M. of 4 strips.

유발된 수축에 대한 AlCl₃의 효과를 관찰하였다. AlCl₃는 단독으로는 기관평활근의 수축을 유발하지 못하였으나 5 mM NaF에 의한 수축은 첨가된 AlCl₃의 농도에 따라 증가하였으며 20 μM에서 최대효과를 나타내었다 (Fig. 2). 따라서 앞으로의 실험에서는 5 mM의 NaF와 20 μM의 AlCl₃를 사용하였다.

Fluoroaluminate는 phosphate와 유사한 구조를 가지므로 세포막을 통해 음이온 교환기전에 의해 세포내로 이동되어 작용을 나타낼 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여 음이온교환기전의 억제물질인 (Cabantchik & Rothstein, 1982) SITS의 효과를 관찰한 결과 1 mM SITS로 20분 전처치시 fluoroaluminate에 의한 수축은 완전히 억제되었다. 여기에 5 μM의 acetylcholine을 첨가한 결과 acetyl-

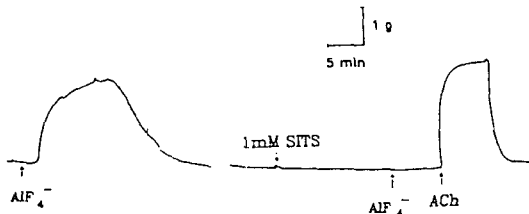


Fig. 3. Effect of SITS on fluoroaluminate (AlF_4^-)-induced contraction. After a 20-min preincubation with 1 mM SITS in PSS, fluoroaluminate was administered to elicit contraction and then 5 μM acetylcholine (ACh) was added.

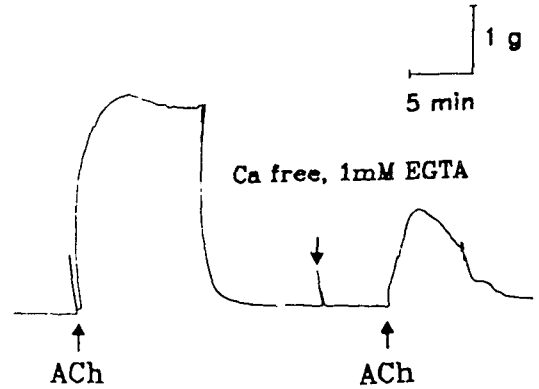


Fig. 5. Effect of Ca^{2+} removal on the contraction induced by 5 μM acetylcholine (ACh) and fluoroaluminate (AlF_4^-).

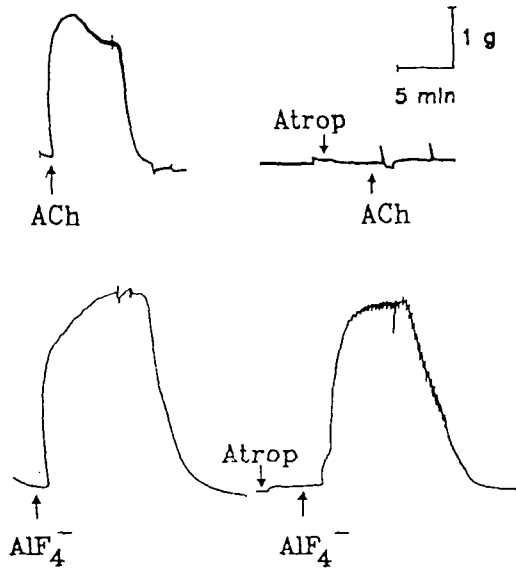


Fig. 4. Effect of 30 μM atropine (Atrop) on 5 μM acetylcholine (ACh) and fluoroaluminate-induced contraction.

choline에 의한 수축은 전혀 영향을 받지 않으므로서 SITS가 평활근에 대한 비특이적 효과에 의해 fluoroaluminate에 의한 수축을 억제한 것이 아니라는 것을 나타내었다(Fig. 3). Fluoroaluminate에 의한 수축이 신경말단에서 acetylcholine의 유리와 관련이 있는지를 알기 위하여 fluoroaluminate 수축에 대한 atropine의 효과를 관찰한 결과 30 μM 의 atropine 전처치시 acetylcholine에 의한 수축은 완전히 억제되었으나 fluoroaluminate에 의한 수축은 영향을 받지 않았다(Fig. 4). 따라서 fluoroaluminate에 의한

수축은 신경말단에서의 acetylcholine 유리와 무관하게 나타남을 알 수 있다.

2. Ca^{2+} 대사에 대한 영향

Fluoroaluminate에 대한 수축에 어떤 경로를 통한 Ca^{2+} 의 동원이 중요한 역할을 하는지 알기 위하여 Ca^{2+} 이 없고 1 mM EGTA를 처리한 용액에 5분간 처리한 후 fluoroaluminate의 수축양상을 관찰한 결과 정상용액에 비하여 수축이 나타나는데 걸리는 시간이 현저히 증가되었고 수축의 크기도 현저히 억제되었으며 정상용액으로 바꾸면 수축이 일시적으로 현저히 증가하였다(Fig. 5).

Fluoroaluminate에 의한 Ca^{2+} 의 유입이 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 통한 것인지를 알기 위하여 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+}

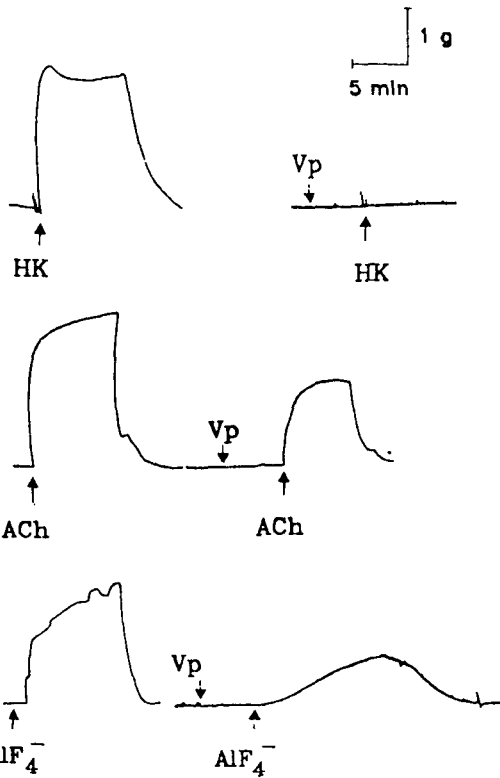


Fig. 6. Effect of 10 μ M verapamil (Vp) on the contraction induced by 100 K⁺ (HK), 5 μ M acetylcholine (ACh) and fluoroaluminate (AIF₄⁻).

의 이동을 억제하는 것으로 알려진 (Triggle & Swamy, 1980; Goodman, 1981) verapamil의 효과를 관찰하였다. 10 μ M verapamil 처리시 resting tension은 영향을 받지 않았고 100 mM K⁺에 의한 수축은 완전히 억제되었다. 이는 voltage-dependent Ca²⁺ channel을 통한 Ca²⁺의 유입이 resting tension의 유지에 큰 기여를 하지 못함을 의미한다. 10 μ M verapamil 존재시에 acetylcholine에 비하여 fluoroaluminate에 의한 수축의 크기가 더욱 민감하게 억제되었으나 Ca²⁺ 없는 용액에서보다는 수축이 크게 나타났다(Fig. 6). Verapamil이 acetylcholine에 의한 수축을 억제하는 것은 acetylcholine에 의한 수축에 potential-operated Ca²⁺ channel을 통한 Ca²⁺의 유입이 일부 관여함을 의미하며 이는 acetylcholine이 기관평활근에서 탈분극을 유발한다는 보고 (Farley & Miles, 1977; Coburn, 1979)와 일치한다.

Table 1. Effect of fluoroaluminate and verapamil on ⁴⁵Ca influx in rabbit trachealis muscle. The experimental conditions were in detail explained in the method. Data represent means \pm S.E.M. of 4 strips.

Condition	⁴⁵ Ca influx (μ mole/g tissue/min)
1. Control	0.152 \pm 0.024
2. Verapamil (10 μ M)	0.116 \pm 0.011
3. Fluoroaluminate	0.436 \pm 0.092*
4. Fluoroaluminate + Verapamil (10 μ M)	0.222 \pm 0.016*.*

*, significantly different from control; **, significantly different from 2 (p < 0.05)

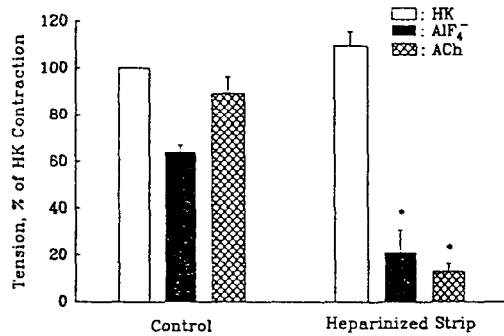


Fig. 7. Effect of intracellular heparin on the contraction induced by 100 K⁺ (HK), 5 μ M acetylcholine (ACh) and fluoroaluminate (AIF₄⁻). Heparin was loaded intracellularly by the reversible permeabilization. Control tissues were also treated by the same procedure without heparin. Data, which are expressed as a percentage of HK-induced contraction in the control strips, represent means \pm S.E.M. for 4 strips.

*, significantly different from respective control value (p < 0.05)

⁴⁵Ca를 이용하여 Ca²⁺ 유입에 대한 fluoroaluminate의 효과를 관찰한 결과 fluoroaluminate는 ⁴⁵Ca의 유입을 현저히 증가시켰고 10 μ M verapamil 존재시에도 fluoroaluminate에 의한 ⁴⁵Ca의 유입증가는 관찰되었다(Table 1). 이상의 결과는 fluoroaluminate에 의한 수축에 외부용액으로부터의 Ca²⁺의 유입이 중요한 역할을 하며 Ca²⁺의 유입경로로 voltage-dependent Ca²⁺ channel이 중요한 역할을 하나 이

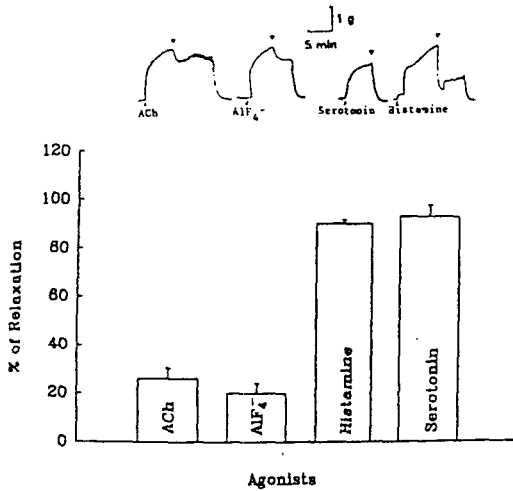


Fig. 8. Relaxant effect of 10 μ M isoproterenol. The tension was elicited by the addition of fluoroaluminat (AIF_4^-), 5 μ M acetylcholine (ACh), 1 μ M serotonin or 10 μ M histamine and subsequently 10 μ M isoproterenol was administered. The magnitude of relaxation by isoproterenol was expressed as a percentage of the contraction before the addition of isoproterenol. Data represent means \pm S.E.M. for 5 strips.

이외의 다른 경로를 통한 Ca^{2+} 의 유입도 관여함을 시사한다.

3. Heparin의 효과

그림 7은 세포내에서 InsP_3 의 작용을 특이적으로 억제하는 것으로 알려진 (Worley et al, 1987; Chopra et al, 1989) heparin을 loading 시킨 조직에서 acetylcholine과 fluoroaluminat에 의한 수축을 100 mM K^+ 에 의한 수축과 비교한 것이다. 고농도 K^+ 에 의한 수축은 heparin loading에 의해 영향을 받지 않았으나 acetylcholine과 fluoroaluminat에 의한 수축은 약물을 가한 후 수축이 일어나는데 걸리는 시간이 현저히 연장되었고 그 크기도 현저히 감소되었다.

4. cAMP와의 상관관계

Fluoroaluminat에 의한 수축에 cAMP 농도 변화가 관여하는지를 알기 위하여 adenylate cyclase의 활성을 증가시키는 것으로 알려진 isoproterenol의 효과를 관찰하였다. 10 μ M의 isoproterenol은 sero-

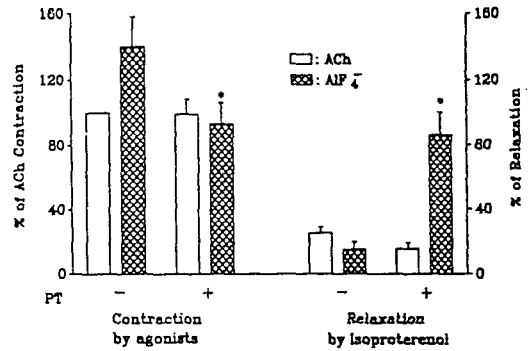


Fig. 9. Effect of pertussis toxin (PT) on the contraction induced by fluoroaluminat (AIF_4^-) and 5 μ M acetylcholine (ACh) in rabbit trachealis muscle. After a 2-hr preincubation with 0.1 μ g/ml pertussis toxin in PPS, fluoroaluminat (AIF_4^-) and 5 μ M acetylcholine (ACh) were administered to elicit tension and subsequently 10 μ M isoproterenol was added. Data, which are expressed as a percentage of ACh-induced contraction in control strips, represent means \pm S.E.M. for 5 strips.

*, significantly different from the magnitude of fluoroaluminat-induced contraction or isoproterenol-induced relaxation in control strips ($p < 0.05$).

tonin 및 histamine에 의한 수축은 완전히 이완시켰으나 acetylcholine과 fluoroaluminat에 의한 수축은 부분적으로 이완시켰으며 그 이완정도는 유사하였다 (Fig. 8).

5. Pertussis toxin의 억제효과

Fluoroaluminat에 의한 수축에 관여하는 G-protein의 종류를 알기 위하여 ADP-ribosylation을 통하여 G_i protein을 억제하는 것으로 알려진 (Gilman, 1987) pertussis toxin의 효과를 관찰하였다 (Fig. 9). 0.1 μ g/ml의 pertussis toxin을 2시간 전처치한 후 acetylcholine과 fluoroaluminat에 의한 수축효과를 관찰한 결과 fluoroaluminat에 의한 수축은 억제되었으나 acetylcholine에 의한 수축은 영향을 받지 않았고 10 μ M isoproterenol에 의한 이완효과는 pertussis toxin 전처치시 fluoroaluminat에 의한 수축에 대해서는 현저히 증가하였으나 acetylcholine에 의한 수축에 대해서는 영향을 받지 않았

다.

고 찰

Fluoroaluminate(AlF_4^-)가 phosphate analog로서 G-protein을 자극하여 간세포, 타액선, 평활근 등 여러종류의 세포에서 작용을 나타냈은 잘 알려져 있다. 본 실험에서도 기관평활근에서 NaF는 농도에 따라 수축을 일으켰고 미량의 AlCl_3 첨가에 의해 그 수축이 현저히 증가됨으로써 fluoroaluminate는 G-protein을 자극하여 수축을 일으킴을 나타내었다 (Fig. 1, 2). 그리고 fluoroaluminate에 의한 수축이 용액에 첨가한 후 2~3분뒤에 나타나고 음이온 교환 기전의 억제물질인 1 mM SITS 전처치에 의해 완전히 억제되어 (Fig. 3) fluoroaluminate가 세포내부에서 작용하여 수축을 일으킴을 나타내었다.

Fluoroaluminate에 의한 수축이 외부 용액에 Ca^{2+} 제거시 현저히 억제되고 정상 Ca^{2+} 용액으로 세척시 수축이 현저히 증가되었고 (Fig. 5) potential-operated channel을 통한 Ca^{2+} 의 이동을 억제하는 verapamil에 의해 수축이 억제되나 Ca^{2+} 제거용액에서의 수축보다 크게 나타남으로서 (Fig. 6) fluoroaluminate에 의한 수축에 외부로부터의 Ca^{2+} 의 유입이 중요한 역할을 하며 Ca^{2+} 의 유입통로로 potential-operated Ca^{2+} -channel과 그 이외의 경로도 이용됨을 나타내었다. 이는 ^{45}Ca influx 실험에서 fluoroaluminate가 ^{45}Ca 유입을 현저히 증가시키고 이러한 ^{45}Ca 유입의 증가가 verapamil 존재하에서도 나타남으로서 더욱 뒷받침되었다 (Table 1). 이러한 결과는 Zeng 등 (1989)이 혈관평활근에서 관찰한 결과와 동일하였다. 그러나 Hall 등 (1990)은 소의 기관평활근에서 fluoroaluminate에 의한 수축이 외부용액의 Ca^{2+} 제거에 의해 억제되지 않는다고 하였다. 본 실험과의 차이가 species의 차이에 기인한 것인지는 확실치 않으나 Hall 등 (1990)의 실험방법에 있어서 Ca^{2+} 없는 용액에서의 처리시간이나 EGTA 첨가유무 등에 의한 언급이 없으므로 실험결과를 명확히 비교하기는 어렵다.

평활근에서 세포막을 통하여 외부로부터 Ca^{2+} 이 유입되는 경로로는 막전위에 potential-operated Ca^{2+} channel과 receptor-operated Ca^{2+} channel을

통한 Ca^{2+} 의 유입이 있다. 최근 receptor-operated Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입기전에 대한 활발한 연구가 이루어져 이에 세포막에 존재하는 phosphatidylinositol 대사물질인 InsP_3 가 막내에 저장된 Ca^{2+} 을 유리시키고 유리된 막내 저장고에 Ca^{2+} 을 보충하기 위하여 외부로부터의 Ca^{2+} 의 유입이 일어나는 것으로 알려졌다 (van Breemen, 1989; Coburn, 1990). 그리고 이 경로를 통한 Ca^{2+} 의 유입은 전형적인 Ca^{2+} channel antagonist 들의 억제작용에 대해 potential-operated channel에 비하여 덜 민감한 것으로 알려져 있다 (van Breemen, 1989). 본 실험에서 여러조직에서 세포내 InsP_3 의 작용을 선택적으로 억제하는 것으로 알려진 (Worley et al, 1987; Chopra et al, 1989) heparin이 고농도 K^+ 에 의한 수축에는 영향없이 fluoroaluminate와 acetylcholine에 의한 수축을 현저히 억제시킴으로서 acetylcholine과 fluoroaluminate에 의한 수축에 PLC의 활성화에 의해 생성된 InsP_3 에 의한 내부 Ca^{2+} 의 동원과 이에 따른 막을 통한 Ca^{2+} 의 유입이 관여함을 나타내었다 (Fig. 7). 특히 초기수축이 더욱 현저히 억제되어 InsP_3 는 fluoroaluminate에 의한 초기수축에 중요한 역할을 함을 시사하였다. 따라서 fluoroaluminate에 의한 수축에 관여하는 potential-operated Ca^{2+} channel 이외의 Ca^{2+} 유입경로로는 inositol phospholipid metabolism에 의한 InsP_3 증가와 관련된 Ca^{2+} 유입이 관여함을 알 수 있다.

Fluoroaluminate에 의한 수축에 관여하는 potential-operated Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입이 G-protein의 자극에 의한 potential-operated Ca^{2+} channel의 직접 activation에 의하여 일어나는 것인지 다른 ion channel의 activation에 의해 발생된 막전위의 탈분극에 의해 이차적으로 나타나는 것인지는 본 연구만으로는 명확히 알 수 없다. 또한 G-protein이 직접 ion channel을 activation 시키는지 다른 기전이 관여하는지는 명확하지 않으나 최근 G-protein이 직접 K^+ (Pfaffinger et al, 1985; Codina et al, 1987)이나 Ca^{2+} channel (Holz et al, 1986; Hescheler et al, 1987)을 조절할 수 있다는 보고들이 있고 acetylcholine이 회장평활근에서 G-protein을 통하여 nonspecific cation channel을 activation 하여 탈분극을 유발한다는 보고 (Inoue & Isenberg,

1990)가 있기 때문에 G-protein이 직접 작용을 나타낼 가능성이 있다.

세포막의 G-protein에는 adenylyate cyclase의 활성화조절에 관여하는 G_s-와 G_i-protein들이 있다 (Gilman, 1987). 따라서 G-protein의 activation이 세포내 cAMP 농도에 변화를 초래하여 작용을 나타낼 가능성이 있다. 그러나 본 실험에서 cAMP 농도를 증가시키는 isoproterenol에 의해 fluoroaluminate에 의한 수축이 이완됨으로서 G-protein 자극에 의한 수축을 cAMP 농도의 증가로 설명할 수는 없다 (Fig. 8). Serotonin이나 histamine에 의한 수축에 비하여 acetylcholine과 fluoroaluminate에 의한 수축에 대해 isoproterenol의 이완효과가 약했다 (Fig. 8). 이러한 결과는 fluoroaluminate가 G-protein 중의 하나인 G_i-protein을 자극하여 isoproterenol의 작용을 억제함으로써 나타날 가능성이 있으며 이는 G_i-protein을 억제하는 pertussis toxin 전처치에 의하여 isoproterenol에 의한 이완정도가 현저히 증가함으로써 확인되었다 (Fig. 9). 실제로 혈관평활근 (Zeng, 1989)에서 fluoroaluminate가 isoproterenol에 의해 자극된 adenylyate cyclase의 활성을 억제하여 cAMP 농도를 감소시킨다는 보고가 있다. 이와 대조적으로 acetylcholine의 경우 isoproterenol의 이완효과가 pertussis toxin의 전처치에 의해 영향을 받지 않았다. 기관평활근에서 고농도 acetylcholine에 의한 수축에 대해 isoproterenol의 이완효과가 미약하다는 것은 알려져 있으나 (Madison & Brown, 1988; Rasmussen et al, 1990) 그 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. acetylcholine이 G_i-protein을 자극하여 isoproterenol에 의한 세포내 cAMP의 증가를 억제시키기 때문이라는 보고도 있으나 (Rasmussen et al, 1990) Madison과 Brown은 (1988) dibutyryl cAMP를 주어 세포내 cAMP 농도를 직접 증가시키더라도 histamine의 경우와는 달리 acetylcholine에 의한 InsP₃ 함량의 증가가 영향을 받지 않아 단순히 G_i-protein의 활성화증가만으로는 acetylcholine에 의한 수축에 대한 isoproterenol의 낮은 이완효과를 설명할 수 없다고 하였고 Gunst 등 (1987)은 이를 다른 agonist들에 비하여 acetylcholine이 large receptor reserve를 가지기 때문으로 설명하였다. 본 실험에서 G_i-protein을 억제하는 pertussis toxin 전처치시

fluoroaluminate의 경우 isoproterenol에 대한 이완정도가 증가하였으나 acetylcholine의 경우 전혀 영향이 없어 (Fig. 9) acetylcholine에 대한 isoproterenol의 미약한 이완작용을 acetylcholine에 의한 G_i-protein의 활성화증가로 설명할 수는 없음을 뒷받침한다.

조직에 따라 PLC 활성화증가에 관여하는 G-protein의 종류가 다른 것으로 알려져 있고 (Cockcroft, 1987) 혈관평활근에서는 fluoroaluminate에 의한 수축이 G_i-protein의 억제물질인 pertussis toxin에 의해 억제되나 (Cushing et al, 1990) 자궁평활근에서는 pertussis toxin에 의해 억제되지 않는 G-protein이 관여하는 것으로 보고되어 있다 (Marc et al, 1988). 기관평활근에서 PLC의 활성화에 관여하는 G-protein의 종류에 대해서는 알려진 바 없으나 최근 Lucchesi 등 (1990)은 소의 기관평활근에서 muscarinic receptor와 acetylcholine의 결합이 pertussis toxin에 의해 전혀 영향을 받지 않음을 관찰하여 G_i-protein이 관여할 가능성은 적다고 하였다. 본 실험에서 G_i-protein의 작용을 억제하는 pertussis toxin에 의해 fluoroaluminate에 의한 수축과 달리 acetylcholine에 의한 수축은 억제되지 않았다 (Fig. 9). 동일한 조직에서 PLC의 활성화조절에 서로 다른 G-protein이 관여하는 것으로 생각하기는 어려우므로 기관평활근에서 PLC에 의한 inositol phospholipid 대사에 G_i-protein 이외의 G-protein이 관여할 것으로 생각되며 fluoroaluminate의 경우 G_i-protein은 inositol phospholipid 대사 이외의 기전을 통하여 수축에 관여할 것으로 생각된다.

결 론

기관평활근에서 G-protein의 자극물질로 알려진 fluoroaluminate의 수축기전을 밝히고자 하였다. Fluoride는 0.6 mM부터 기관평활근의 수축을 야기하여 5 mM에서 최대 수축을 나타내었고 AlCl₃ 첨가에 의해 수축반응이 현저히 증가되었다. fluoroalumintae에 의한 수축은 1 mM SITS에 의해 완전히 억제되어 세포내부에서 작용함을 나타내었다. Fluoroaluminate에 의한 수축은 Ca²⁺ 없는 용액, verapamil 처리, 그리고 고농도 K⁺ 존재하에서 현

저히 감소되었고 fluoroaluminate는 ^{45}Ca 의 유입을 현저히 증가시켰으며 이는 $10\ \mu\text{M}$ verapamil 존재 하에서도 나타났다. 세포내에서 InsP_3 의 작용을 특이적으로 억제하는 것으로 알려진 heparin을 loading 시킨 조직에서 고농도 K^+ 에 의한 수축은 영향을 받지 않았으나 acetylcholine과 fluoroaluminate에 의한 수축은 현저히 감소되었다.

Fluoroaluminate와 acetylcholine에 의한 수축은 isoproterenol에 의해 부분적으로 이완되었으며 fluoroaluminate에 의한 수축은 pertussis toxin에 의해 부분적으로 억제되었고 isoproterenol에 의한 이완효과는 증가하였다. Acetylcholine에 의한 수축과 이에 대한 isoproterenol의 이완효과는 pertussis toxin에 의해 영향을 받지 않았다. 이상의 결과들은 fluoroaluminate에 의한 G-protein의 자극시 potential-operated Ca^{2+} -channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입과 InsP_3 에 의한 세포내부 Ca^{2+} 의 동원이 동시에 관여하여 기관평활근의 수축을 일으킴을 나타내었다.

REFERENCES

- Aaronson P & van Breeman C (1981). Effects of sodium gradient manipulation upon cellular calcium, Ca^{2+} fluxes and cellular sodium in the guinea-pig taenia coli. *J Physiol* (London) 319, 443-461
- Berridge MJ (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 56, 159-193
- Blackmore PF, Bocchino SB, Waynick LE & Exton JH (1985). Role of guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. Studies utilizing aluminium fluoride. *J Biol Chem* 260, 14477-14483
- Cabantchik ZI & Rothstein A (1972). The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. *J Memb Biol* 10, 311-330
- Chorpra LC, Twort CHC, Ward JPT & Cameron IR (1989). Effects of heparin on inositol 1, 4, 5-triphosphate and guanosine triphosphate induced calcium release in cultured smooth muscle trachea. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 262-268
- Claro E, Garcia A & Picatoste F (1989). Carbachol and histamine stimulation of guanine-nucleotide dependent phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Biochem J* 261, 29-35
- Coburn RF & Baron CB (1990). Coupling mechanisms in airway muscle. *Am J Physiol* 258, L119-L133
- Cockcroft S (1987). Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, G_p . *TIBS* 12, 75-78
- Codina J, Yatani A, Grenet D, Brown AM & Birnbaumer L (1987). The alpha subunit of the GTP binding protein G_K opens in atrial potassium channels. *Science* (Wash. DC) 236, 442-445
- Cushing DJ, Sabouni MH, Brown GL & Mustafa SM (1990). Fluoride produces endothelium-dependent relaxation and endothelium-independent contraction in coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 254, 28-32
- Gilman AG (1987). G-proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 56, 615-649
- Goodman FR (1981). Calcium channel blockers and respiratory smooth muscle. In: Weiss GB (ed) *New perspectives on calcium antagonists*. Williams and Wilkins, Baltimore, p 217-222
- Gunst SJ, Stropp JQ & Flavahan NA (1987). Analysis of receptor reserves in canine tracheal smooth muscle. *J Appl Physiol* 62, 1755-1758
- Hall IP, Donaldson J & Hill SJ (1990). Modulation of fluoroaluminate-induced inositol phosphate formation by increases in tissue cyclic AMP content in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 100, 646-650
- Herschler J, Rosenthal W & Schultz G (1987). The GTP-binding protein, G_o , regulates neuronal calcium channels. *Nature* (London) 325, 445-447
- Holz GG, Rane SG & Dunlap K (1986). The GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* (London) 319, 670-672
- Inoue R & Isenberg G (1990). Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G-protein. *Am J Physiol* 258, C1173-C1178
- Katawa U, Kawahara Y, Araki S, Sunako M, Tsuda T,

- Mizuogoshi H & Takai Y (1989). Identification of a major GTP-binding protein in bovine aortic smooth muscle membrane as SMG-P21, a GTP-binding protein having the same effect for domain as RAS-P21S. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 1418-1427
- Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AV & Somlyo AP (1989). Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. *J Biol Chem* 264, 5339-5342
- Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV & Somlyo AP (1989). Cytosolic heparine inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1, 4, 5-triphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem* 264, 17997-18004
- Lucchesi PA, Scheid CR, Romano FD, Kargacin ME, Mullikin-Kilpatrick D, Yamaguchi H & Honeyman TW (1990). Ligand binding and G-protein coupling of muscarinic receptors in airway smooth muscle. *Am J Physiol* 258, C730-C738
- Madison JM & Brown JK (1988). Differential inhibitory effects of forskolin, isoproterenol, and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on phosphoinositide hydrolysis in canine tracheal smooth muscle. *J Clin Invest* 82, 1462-1465
- Marc S, Leiber D & Harbon S (1988). Fluoroaluminate mimic muscarinic- and oxytocin-receptor-mediated generation of inositol phosphates and contraction in the intact guinea-pig myometrium. Role for a pertussis/cholera-toxin-insensitive C-proteins. *Biochem J* 255, 705-713
- Meda A, Kubo T, Mishina M & Numa S (1988). Tissue distribution of mRNA's encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett* 239, 339-342
- Mertz LM, Horn VJ, Baum BJ & Ambudkar IS (1990). Calcium entry in rat parotid acini: activation by carbachol and aluminium fluoride. *Am J Physiol* 258, C654-C661
- Morrison KJ, Gao Y & Vanhoutte PM (1990). Epithelial modulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 258, L254-L262
- Murray RK, Bennett CS, Fluharty SJ & Kotlikoff M (1989). Mechanisms of phorbol ester inhibition of histamine-induced IP_3 formation. *Am J Physiol* 257, L209-L216
- Nguuyen-Duong H (1985). Effects of vasoactive drugs of fluoride-induced contraction of vascular smooth muscle in calcium free-solution. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 358, 1246-1250
- Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NM & Hille B (1985). GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptor to a K^+ channel. *Nature* (London) 317, 537-544
- Rana RS & Hokin LE (1990). Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol Rev* 70, 115-164
- Rasmussen H, Kelly G & Douglas JS (1990). Interaction between Ca^{2+} and cAMP messenger system in regulation of airway muscle contraction. *Am J Physiol* 258, L279-L288
- Sterweiss PC & Gilman AG (1982). Aluminium: a requirement for activation of the regulatory component of adenylyl cyclase by fluoride. *Proc Natl Acad Sci* 99, 4886-4891
- Triggle DJ & Swamy VC (1980). Pharmacology of agents that affect calcium: agonists and antagonists. *Chest* 78, 174-179
- van Breemen C (1989). Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ in smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 51, 315-329
- Worley PF, Baraban JM, Supattapone S, Wilson VS & Snyder SH (1987). Characterization of inositol triphosphate receptor binding in brain. *J Biol Chem* 262, 12132-12136
- Zeng YY, Benishin CG & Pang PKT (1989). Guanine nucleotide binding proteins may modulate gating of calcium channels in vascular smooth muscle. I. Studies with fluoride. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 343-351