

흰쥐 흉부 하행성 대동맥에서 Uridine 5'-triphosphate가 혈관장력에 미치는 영향*

연세대학교 원주의과대학 생리학교실
박규상 · 공인덕 · 이중우

= Abstract =

Effects of Uridine 5'-triphosphate on the Vascular Tone of Rat Thoracic Aorta

Kyu Sang Park, M.D., In Deok Kong, M.D., Joong Woo Lee, Ph.D.

Department of Physiology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background : Uracil nucleotides are stored in platelets and all other cells, and are released into the extracellular space upon stimulation. They show various biological responses but their actions and mechanism are not well understood. This study was conducted to investigate the effects of uridine 5'-triphosphate(UTP) on vascular tone and to identify the characteristics of their receptors.

Methods : Aortic ring preparation were made from the rat descending thoracic aorta. Endothelial cells were preserved or removed by gentle rubbing. The basal tension of aortic ring was 1gm and isometric contraction were recorded on polygraph using force transducer.

Results : In aortic ring precontracted by 100nM norepinephrine, UTP induced dual effect with various concentrations. UTP elicited endothelium-dependent relaxation at low concentrations(100nM~10 μ M), and endothelium-independent contraction at high concentrations(more than 30 μ M). Among uracil nucleotides, UDP was as much effective as UTP in vascular tone, but UMP and uridine were not. UTP(pA₅₀ 6.15) was more potent than ATP(5.17), ITP(4.75) and other nucleotides(TTP, GTP, CTP). At basal tension, UTP induced relaxation at low concentrations and contraction at high concentrations in endothelium-intact ring. But in endothelium-removed ring, UTP elicited only contraction.

Prior treatment of aortic ring with suramin, a non-selective P₂-purinoceptor blocker, inhibited UTP-induced relaxation and contraction. Reactive blue-2, a P_{2Y} purinoceptor blocker, inhibited relaxation only, but α , β -methylene ATP, a P_{2X} purinoceptor blocker, enhanced contractile response. ATP inhibited the UTP-induced relaxation, but 2-methylthio ATP did not alter the effects of UTP. It means that UTP and ATP act at the same receptor but 2-methylthio ATP does not.

Conclusion : These results suggest that UTP-induced relaxation is mediated by nucleotide

*본 연구논문은 "94년도 대한의학협회 기초의학진흥기금"의 지원보조금으로 이루어졌음.

receptors on endothelium and the contraction is mediated by pyrimidinoceptors on vascular smooth muscle.

KEY WORDS : Uridine 5'-triphosphate(UTP) · Aorta · Nucleotide receptor · Pyrimidinoceptor.

서 론

ATP가 세포외액에 존재하여 생물학적인 작용을 나타낸다는 것이 처음 밝혀진 것은 1929년 Drury와 Szent-Györgyi에 의해서이다. 그 이후로 adenine nucleotides의 작용에 관해 많은 연구가 계속되어 왔으며, 이들은 세포막 투과도의 변화¹⁾, 심근이나 여러가지 평활근의 수축 또는 이완²⁾, 혈소판 응집³⁾, 신경세포의 흥분성 조절⁴⁾ 및 종양세포의 성장억제⁵⁾ 등 다양한 반응을 나타내는 것으로 알려졌다. 이러한 반응들은 세포외액에 존재하는 수용체를 통하여 매개될 것이라 추측하여서, 이들의 수용체를 퓨린 수용체(purinoceptor)라고 명명하였다⁶⁾.

퓨린 수용체의 특성에 관한 연구가 지속됨에 따라 1978년 Burnstock은 이를 adenosine과 AMP의 작용이 우세한 P₁ 수용체와, ADP 및 ATP의 작용이 우세한 P₂ 수용체로 나누었다. 그 후 수용체에 대한 여러가지 효현제의 효과 및 길항제의 선택성 등을 기준으로 P₁은 A₁, A₂, A₃로, P₂는 P_{2X}, P_{2Y}, P_{2Z}, P_{2T} 등으로 세분하게 되었다⁶⁾.

근자에는 adenine nucleotides 뿐 아니라 pyrimidine기를 가진 uracil nucleotides 역시 세포외액에 존재하며, 다양한 생물학적 반응을 나타냄이 일부 밝혀져 관심을 모으고 있다. 이들은 혈소판내 저장소기관에 고농도로 존재하고 있다가⁷⁾ 여러 자극에 의해 세포외액으로 방출되며⁸⁾, 간, 신장, 뇌 등의 조직에서도 세포내 풍부히 존재하고 있어서⁹⁾, 외상, 화상, 염증, 저산소증(hypoxia), 괴사 등이 생기면 유리되어 국소적으로 혈장내 농도를 높일 수 있다¹⁰⁾. 세포외액에 존재하는 UTP를 비롯한 uracil nucleotides는 혈관 내피세포¹¹⁾ 및 평활근세포¹²⁾, 간세포¹³⁾, 기관지 평활근세포¹⁴⁾, 뇌하수체세포¹⁵⁾, 대식세포¹⁶⁾, 호중구¹⁷⁾, 종양세포¹⁸⁾ 등과 같이 다양한 세포에서 작용을 나타낸다고 알려져 있다.

그러나 UTP의 역할에 관해서는 아직 구체적으로 밝혀지지 못한 상태이며, 이들이 작용하는 수용체

또한 많은 논란을 가져왔다. 예를들어 혈관에서의 UTP 작용은 내피세포 의존성 이완을 유발한다고 알려져 있으나¹⁹⁾, 부위에 따라서는 오히려 혈관을 수축시킨다고 보고되고 있다²⁰⁾. 특히 두개내 혈관(int-racranial vessels)의 경우는 수축 반응이 두드러져서 뇌혈관 연축(vasospasm)을 유발하는 원인의 하나로 제시되기도 하였다²¹⁾. 또 UTP가 작용하는 수용체 역시 일부에서는 purine nucleotide인 ATP와 pyrimidine nucleotide인 UTP가 같은 수용체에 작용한다고 하여 nucleotide 수용체^{22,23)} 또는 P_{2U} 수용체²⁴⁾로 명명하였으나, 어떤 조직에서는 UTP가 ATP의 작용과 차이가 있다하여 UTP-sensitive receptor 혹은 pyrimidinoceptor라고 구분되기도 하였다²⁵⁾. 하지만 선택적 차단제의 부재로 인해 수용체에 대한 명확한 규명이 어려운 상태이다.

따라서 본 실험에서는 UTP를 비롯한 여러가지 nucleotide들이 적출된 혈관장력에 미치는 효과를 관찰함으로써, 대동맥혈관에서 UTP의 작용과 UTP 수용체 특성의 일부를 규명하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물

실험동물로는 300gm 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley) 수컷을 사용하였다.

2. 배양액 및 약물

배양액으로는 Krebs Ringer bicarbonate(KRB)용액을 사용하였는데, 이의 조성은 NaCl 117, KCl 4.7, CaCl₂ 1.91, KH₂PO₄ 1.19, MgSO₄ 1.44, NaHCO₃ 24.8 및 glucose 5.5mM이며, 95% O₂~5% CO₂의 혼합 가스를 주입하여 pH 7.4로 평형을 이루게 하였다.

Uridine 5'-triphosphate(UTP), uridine 5'-diphosphate(UDP), uridine 5'-monophosphate(UMP), uridine, adenosine 5'-triphosphate(ATP), inosine 5'-triphosphate(ITP), thymidine 5'-triphosphate(TTP),

guanosine 5'-triphosphate(GTP), cytidine 5'-triphosphate(CTP), α , β -methylene adenosine 5'-triphosphate(APCPP), reactive blue-2(RB-2), 2-methylthio adenosine 5'-triphosphate(2-MeSATP), acetylcholine (Ach) 및 norepinephrine(NE)은 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, suramin은 Bayer제품(Leverkusen, Germany)을 사용하였다. 모든 시약은 생리식염수에 녹였으며, nucleotide들은 1 N NaOH로 pH가 7.0이 되게 적정한 뒤 사용하기 직전까지 영하 20°C의 냉동고에 보관하였다.

3. UTP가 혈관장력에 미치는 영향

1) 흉부 대동맥 적출

쥐의 후두부를 강타하여 희생시킨 후 즉시 복강을 열어 하대정맥으로 heparin(500IU/kg)을 주입하고, 흉곽을 열어 하행성 흉부 대동맥을 조심스럽게 적출하였다. 해부 현미경하에서 혈관 주위의 지방 및 결체조직을 제거하였고 혈관 내피세포가 손상되지 않도록 주의하여 너비 3~4mm의 환을 만들었다. 내피세포를 제거할 경우 KRB용액으로 적셔진 여과지(filter paper)위에 혈관환을 올려놓고, 혈관강내에 가는 forcep을 넣어 부드럽게 문질러 내피세포를 제거하였다.

2) 장력측정

분리한 대동맥환의 한쪽 끝은 KRB용액이 들어있는 incubation bath 바닥에 L자형 가는 stainless steel 고리로 고정시키고 다른 한쪽은 force transducer(Grass FT03C)에 연결하여 등척성 조건하에서 변화하는 혈관의 장력을 polygraph(Grass Model 7E)에 기록하였다. KRB용액은 37°C로 유지하고 혼합가스(95% O₂~5% CO₂)를 계속 공급하였다. 대동맥환에 1gm의 기초장력을 부하하고 60분 정도 기다려 평형이 되도록 하였다. 그 기간 동안 KRB용액을 3~4회 바꾸어 주었으며, Furchgott 및 Zawadzki의 방법으로 내피세포의 존재유무를 확인하였다. 즉 100nM NE으로 혈관을 수축시켜 평형에 이르게 한 후 가해준 1 μ M Ach에 의하여 약 80% 이상 이완하면 내피세포가 존재하는 것(E+)으로, 수축된 혈관이 이완하지 않거나 오히려 수축하면 내피세포가 제거된 것(E-)으로 간주하였다.

3) UTP를 비롯한 여러 nucleotide가 혈관장력에 미치는 영향

내피세포가 존재하거나 혹은 제거된 혈관에서 100 nM NE을 전처치하여 수축을 유도한 후 UTP를 100 nM에서부터 100 μ M이 되도록 점진적으로 가하여 혈관의 장력변화를 기록, 비교하였다. 이때 이완된 정도는 NE에 의해 전수축된 장력에 대한 백분율로 나타내었다. 또한 NE으로 수축시키지 않은 기초장력(1 gm)에서 같은 방법으로 UTP를 투여하여 그 효과를 관찰하였다. 그리고 uracil nucleotides인 UDP와 UMP, nucleoside인 uridine 및 다른 nucleotides인 ATP, ITP, TTP, GTP, CTP를 UTP와 같은 농도로 가하여 UTP의 효과와 비교하였다. 이때 이완효과의 50%에 해당되는 효현제의 농도(ED₅₀)를 구한 뒤, -log(ED₅₀)의 값을 pA₅₀으로 나타내어 이를 통해 각 효현제 간의 효능을 비교하였다.

4) 여러가지 퓨린 수용체 차단제가 UTP에 의한 혈관장력변화에 미치는 영향

UTP의 이완작용에 대한 차단효과를 관찰하기 위하여 내피세포가 존재하는 혈관을 NE으로 수축시킨 뒤 10 μ M의 UTP를 투여하여 그 이완의 정도를 대조군으로 하였다. 이어서 비선택적 P₂ 수용체 차단제로 알려진 suramin(100 μ M), P_{2X} 수용체 차단제인 APCPP(50 μ M), 혹은 P_{2Y} 수용체 차단제인 RB-2(100 μ M)를 10분간 전처치한 뒤 다시 NE으로 전수축 후 같은 농도의 UTP를 가하여 그 효과를 대조군과 비교하였다. 그리고 ATP(10 μ M)와 강력한 P_{2Y} 수용체 효현제인 2-MeSATP(10 μ M)를 전처치한 뒤 UTP의 반응을 관찰하여 수용체 공유여부를 확인하고자 하였다. 한편 UTP의 수축작용에 대한 차단효과를 관찰하기 위하여 내피세포가 제거된 혈관에 100 μ M UTP를 투여하여 수축한 정도를 대조군으로 하고, 위의 여러 차단제 및 효현제를 전처치한 후 UTP를 재투여하여 그 크기를 대조군과 비교하였다. 차단효과는 모두 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

4. 자료 분석

결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 차단제의 효과 검정은 Student의 paired t-test에 의하여 p값이 0.005 이하일 때 유의한 차이의 한계로 삼았다.

결 과

1. Norepinephrine으로 전수축된 혈관장력에 미치는 UTP의 효과

일정시간 incubation후 100nM의 NE를 투여하여 혈관을 전수축시켰다. 수축이 평형상태에 이르렀을때

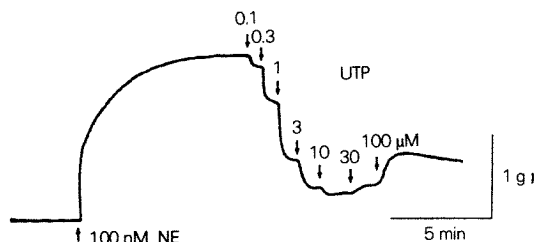


그림 1. Norepinephrine(NE)으로 전수축된 혈관에서 UTP에 의한 장력변화. 내피세포가 존재하는 혈관에서 100nM의 NE으로 수축시킨 뒤 평형을 이룰때 UTP를 100nM에서 100μM까지 점진적으로 가하여 이에 의한 장력변화를 기록하였다. UTP는 10μM 이하의 낮은 농도에서는 이완반응을 나타낸 반면, 그 이상의 높은 농도에서는 수축반응을 나타내었다.

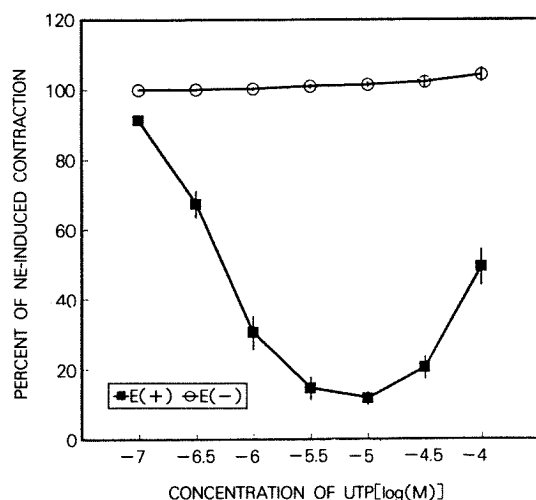


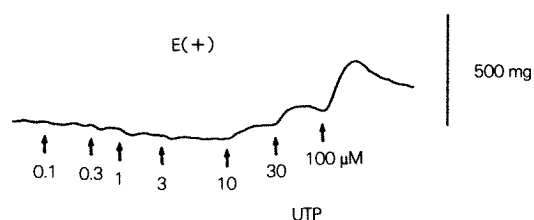
그림 2. UTP가 norepinephrine(NE)으로 전수축된 혈관장력에 미치는 영향. NE으로 유도된 수축의 크기를 기준으로 하여 UTP투여시 변화되는 장력을 백분율로 계산한 뒤 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 내피세포 존재시(E+), 실험례 수는 8)에는 농도에 따라 이완 및 수축의 이중효과를 나타내었으나, 내피세포 제거시(E-), 실험례 수는 7)에는 이완반응이 완전히 소실되었다.

UTP를 점진적으로 가하여 농도를 증가시켰으며 그때 생기는 혈관장력의 변화를 그림 1에 도시하였다. 혈관 내피세포 존재시(E+) UTP(100nM~10μM)는 농도에 비례하여 혈관을 이완시켰으나, 높은 농도(30μM 이상)에서는 오히려 수축시키는 이중효과를 보였다. 반면 혈관 내피세포 제거시(E-)에는 수축반응은 유지되었으나, 이완반응은 완전히 소실되었다(그림 2).

2. 기초장력하에서의 혈관장력에 미치는 UTP의 효과

그림 4는 1gm 기초장력하에서 UTP를 점진적으로 농도를 높여 투여 하였을때 나타나는 혈관장력의 변화이다. UTP는 내피세포 존재시(E+) 10μM 미만에서 기초장력이하로 이완시키다가 10μM 이상 부터는 수축을 나타내는 이중효과를 보였는데(그림 3-A), 이는 앞의 NE으로 전수축시킨 경우와 유사하였다. 반면 내피세포 제거시(E-)는 수축반응만을 나타내었는데(그림 3-B), 수축의 정도도 내피세포 존재시 보다 크게 나타났다(그림 4).

A.



B.

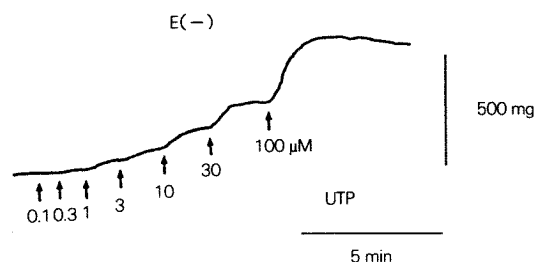


그림 3. 내피세포 존재시 및 제거시 UTP에 의한 기초장력 변화, 혈관에 1gm의 기초장력을 부하하였으며, 내피세포 존재시(A) 및 제거시(B)에 UTP를 100nM에서 100μM까지 점진적으로 가하여 이에 의한 장력 변화를 기록하였다.

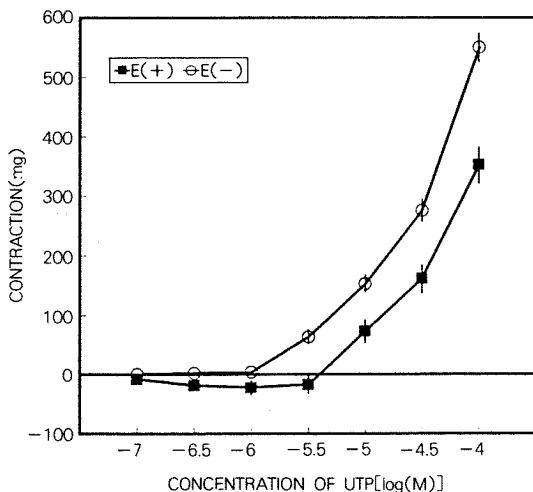


그림 4. UTP가 혈관 기조장력에 미치는 영향. 내피세포가 존재하는(E(+), 실험레 수는 11) 혹은 제거한(E(-), 실험레 수는 7) 기조장력하의 혈관에 UTP를 점진적으로 가하여 그 변화를 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. UTP는 내피세포 존재시 농도에 따라 이중효과를 나타내었으나 제거시에는 수축반응만을 나타내었다.

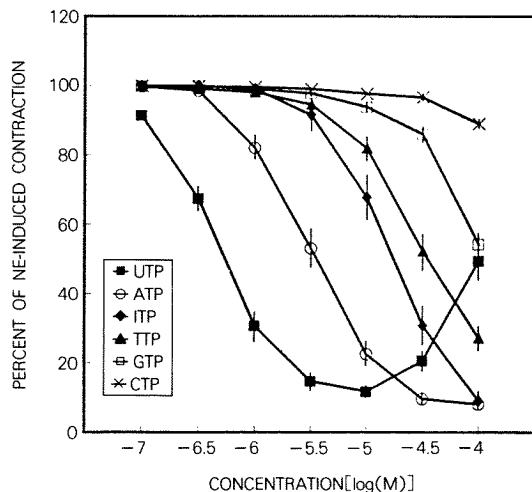


그림 6. 여러가지 triphosphate nucleotides가 혈관장력에 미치는 영향. 그림 6과 같은 조건에서 UTP, ITP, GTP, CTP(이상의 실험레 수는 8), ATP, TTP(이상의 실험레 수는 7)를 각각 점진적으로 가할때의 장력변화를 기록하였으며, NE으로 유도된 수축 크기에 대한 백분율로 나타내었다.

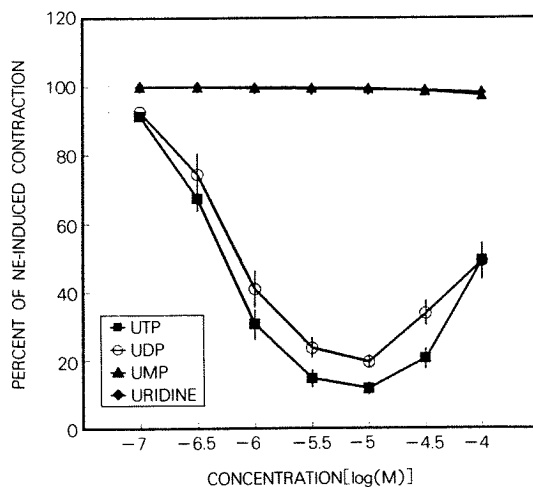


그림 5. Uracil nucleotides 및 uridine이 혈관장력에 미치는 영향. 내피세포가 존재하는 혈관에서 100nM의 NE으로 전수축 시킨 뒤 UTP, UDP, UMP, uridine을 각각 점진적으로 가하여 장력변화를 기록하였으며, NE으로 유도된 수축 크기에 대한 백분율로 나타내었다. 실험레 수는 모두 8례임.

3. Uracil nucleotides 및 uridine이 혈관장력에 미치는 효과

UDP 역시 UTP와 동일하게 저농도에서는 이완, 고농도에서는 수축반응을 나타내었으며, 그 효능도 UTP와 거의 유사하였다(그림 5). 하지만 UMP나 uridine의 경우는 혈관장력에 거의 영향을 주지 않았다.

4. 여러가지 nucleotides가 혈관장력에 미치는 효과

UTP를 비롯한 다른 여러 nucleotides의 효과를 비교하였다(그림 6). 혈관이완작용에 대한 효능은 UTP>ATP>ITP>TTP>GTP>CTP순이었으며, UTP를 제외한 다른 어느 nucleotides도 주어진 농도내에서 이중효과를 나타내지 않았다. 특히 UTP의 이완작용에 대한 pA_{50} 이 6.15로서, ATP(5.17)나 ITP(4.75)보다 10배 이상 강력하였다.

5. 퓨린 수용체 차단제가 UTP에 의한 혈관장력변화에 미치는 영향

UTP에 의한 혈관이완작용과 수축작용은 여러가지

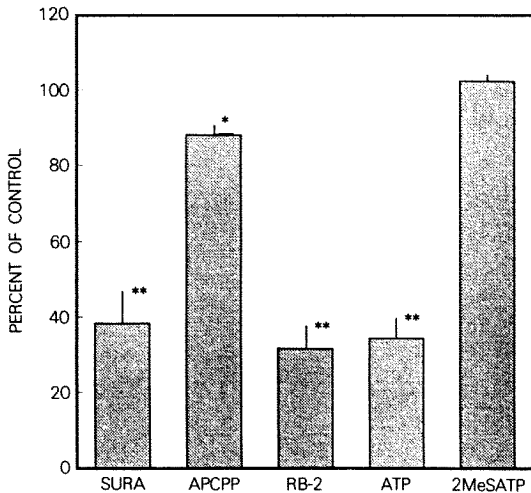


그림 7. 퓨린 수용체 차단제들이 UTP에 의한 혈관이완에 미치는 영향. 내피세포가 존재하는 혈관을 NE으로 전수축시킨 뒤 10 μ M UTP에 의한 이완의 정도를 대조군으로 하였으며, suramin(SURA; 100 μ M), α , β -methylene ATP (APCPP; 50 μ M), reactive blue-2(RB-2; 100 μ M)(이상의 실험례 수는 6), ATP(10 μ M), 2-methylthio ATP(2MeSATP; 10 μ M)(이상의 실험례 수는 7)를 각각 10분간 전처리한 후 10 μ M UTP에 의한 이완정도를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. *은 $p < 0.005$, **은 $p < 0.001$ 임.

면에서 차이가 많으므로 다른 수용체를 사용할 것이라 생각되어, 두가지 작용을 분리하여 각각에 대한 차단제의 영향을 살펴보았다. 먼저 혈관이완작용은 suramin(100 μ M)과 RB-2(100 μ M)의 전처치에 의해 각각 대조군의 38.3 \pm 8.0%, 31.6 \pm 6.5%로 크게 감소하였으며, APCPP(50 μ M)에 의해서는 88.0 \pm 2.1%로 감소하였다(그림 7). 10 μ M ATP를 전처리 하였을 때 탈감작현상에 의해 UTP의 혈관이완이 34.3 \pm 6.0%로 크게 감소하였으나, 이와 달리 2-MeSATP(10 μ M)는 영향을 미치지 않았다(102.3 \pm 2.0%). 혈관 수축작용에 대해서는 suramin에 의해 39.3 \pm 8.0%으로 억제되었으나, APCPP에 의해서는 194.7 \pm 12.5%로 오히려 수축이 증가되었다. 한편 RB-2는 다소 증가시키는 양상을 나타낸 반면, ATP나 2-MeSATP는 유의한 영향을 미치지 않았다(그림 8).

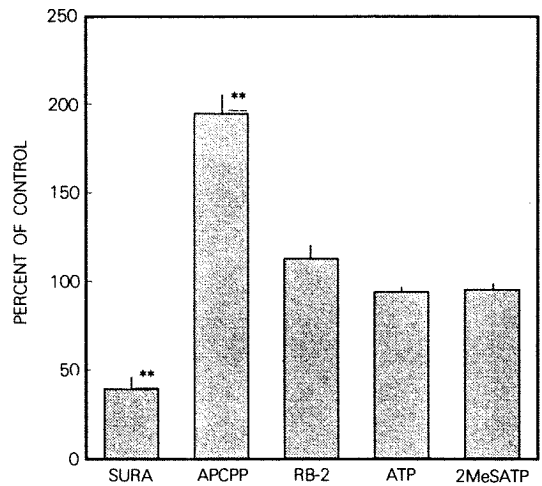


그림 8. 퓨린 수용체 차단제들이 UTP에 의한 혈관수축에 미치는 영향. 내피세포가 제거된 혈관에 100 μ M의 UTP를 투여하여 수축한 크기를 대조군으로 하였으며, suramin(SURA; 100 μ M, 실험례 수는 8) α , β -methylene ATP(APCPP; 50 μ M), reactive blue-2(RB-2; 100 μ M)(이상의 실험례 수는 6), ATP(10 μ M, 실험례 수는 8), 2-methylthio ATP(2MeSATP; 10 μ M, 실험례 수는 7)를 각각 10분간 전처리한 후 100 μ M UTP에 의한 수축크기를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. **은 $p < 0.001$ 임.

고 안

Pyrimidine nucleotides는 1980년경 부터 세포외액에서 여러가지 효과를 나타냄이 밝혀지기 시작하였으나, ATP나 adenosine과 같은 purine nucleotides에 비해서는 폭넓게 연구되지 못하였다. 일부에서는 이들이 뇌혈류 순환에 중요한 역할을 담당하고 있다고 제시하였는데²¹⁾, 뇌혈관에서는 특히 강력한 수축반응을 유발한다고 보고하였다²⁶⁾. 따라서 뇌 지주막하출혈이 있을때 나타나는 치명적인 뇌혈관 연축에도 UTP나 UDP등이 관여할 것이라 추측하였다¹⁹⁾. 그 외에도 UTP는 단핵구(monocyte)의 adhesion을 자극, superoxide생성의 증가²⁷⁾, arachidonic acid의 유리 증가 등을 유발하여 염증반응에도 관여하고 있다고 밝혀졌다²³⁾. 최근에는 낭성 섬유증(cystic fibrosis)환자에게 UTP나 ATP를 nasal superfusion하여 치료에

도움을 얻는다고 보고된 바 있다²⁸⁾. 이 외에도 더 많은 생리적 역할이나 임상적 활용의 가능성이 있으나, 아직 이들의 작용에 관해서 구체적으로 밝혀지지 못한 상태이다.

UTP가 흉부대동맥의 장력변화에 미치는 영향은 농도에 따라 이중효과를 나타내었다(그림 1). 대동맥에서의 UTP의 작용은 주로 이완작용만 나타난다고 보고되었으나²⁹⁾, Hardebo등¹⁹⁾은 뇌연막 혈관(pial vessel)에서 본 실험과 유사한 이중효과를 보고한 바 있다. UTP에 의한 이완 작용은 내피세포 제거시 사라졌으므로(그림 2), 이를 매개로 하는 수용체는 내피세포에 존재함을 알수있다. 특히 100nM 이하의 낮은 농도에서도 이완효과가 나타나므로 이 수용체는 UTP에 대해 높은 친화력을 가지고 있다고 생각된다. UTP의 이완작용은 endothelium derived relaxing factor(EDRF)를 매개로 하리라 생각되는데, UTP가 내피세포에 위치한 수용체에 결합하면 내피세포에서 EDRF를 유리하게 되고, 이 EDRF는 평활근 세포에 가서 이완작용을 나타내기 때문이다. 이러한 EDRF의 실체는 혹은 prostacyclin의 관여를 보고하기도 하였으나³⁰⁾, nitric oxide 생성 억제제에 의해 차단되는 점 등을 볼 때 주로 nitric oxide(NO)일 것이라 알려져 있다³¹⁾. NO는 nitric oxide synthase(NOS)로 인해 L-arginine으로 부터 생성되는데, 일반적으로 NOS의 작용이 활성화 되기에는 Ca^{++} 을 필요로 한다³²⁾. 즉 UTP는 ATP와 마찬가지로 내피세포내 Ca^{++} 을 증가시켜 NO를 생성 및 유리케 한다고 볼 수 있다³³⁾. UTP에 의해 내피세포의 Ca^{++} 이 증가하는 기전은 G-protein을 매개로 한 phospholipase-C의 활성화로 DAG과 IP_3 의 생성이 증가되고, 특히 IP_3 에 의해 세포내 저장된 Ca^{++} 이 유리되기 때문일 것으로 생각하고 있다^{15,13)}.

UTP에 의한 수축작용은 내피세포를 제거하였을 때 오히려 증가되었으므로(그림 4), 이에 대한 수용체는 평활근 세포에 존재하리라 추측된다. 여기서 내피세포 제거시 수축작용이 더 증가되는 이유는 내피세포에서 생성되는 EDRF에 의한 이완작용이 사라지기 때문일 것이다. 특히 EDRF는 아무런 자극이 없는 상태에서도 적은 양이 계속 유리되어 수축작용을 일부 상쇄시키므로, 이를 제거시 여러 효현체의 수축효과는 더욱 증가한다. 예를 들어 NE에 의한 전수축의 크기도 내피세포가 존재하는 경우보다 제거했을 때 더욱 증

가하는데, 이도 같은 이유라고 할수 있겠다³⁴⁾. 한편 UTP에 의한 수축작용은 이완작용에 비해 높은 농도가 필요하므로, 이들의 수용체는 UTP에 대해 비교적 친화력이 낮을 것으로 생각된다.

Uracil nucleotides 및 nucleoside중에서 UTP와 UDP는 거의 유사한 작용을 나타내는데 반해, UMP나 uridine은 혈관장력에 아무런 효과도 미치지 못하였다. 이는 UTP의 작용이 uridine으로 분해되어서 나타나는 것이 아님을 시사해 준다. UDP의 경우는 여러 차단제에 대한 효과들도 UTP와 거의 유사하므로(결과에 나타내지 않았음), UTP와 같은 수용체를 사용하리라 추측할 수 있다. 한편 다른 nucleotide들 간의 작용을 비교한 결과 UTP가 가장 효과가 컸는데, ATP나 ITP보다 10배 이상 강력하였다(그림 6). 일반적으로 혈관 이완작용을 매개하는 수용체로는 P_{2Y} 수용체가 잘 알려져 있는데, 이 수용체에서는 UTP가 ATP에 비해 매우 낮은 효과를 나타낸다고 한다^{22/23)}. 하지만 본 실험에서는 이와 상반된 결과를 나타내므로, UTP에 의한 혈관이완작용이 P_{2Y} 수용체를 매개로 한다고 보기 어렵다.

여러가지 수용체 차단제의 영향을 통해 그 작용을 매개로 하는 수용체를 규명하고자 하였는데, 앞에서 UTP에 의한 이완작용과 수축작용이 다른 수용체를 사용한다는 증거를 얻었으므로 각각을 분리하여서 실험하였다. 먼저 suramin은 UTP의 이완작용과 수축작용을 모두 크게 억제하였지만, suramin자체가 여러 수용체를 비선택적으로 차단하기 때문에 이것만으로는 수용체를 구체적으로 분류하기 어렵다. 한편 APCPP의 경우 이완작용은 다소 감소시켰지만, 수축작용은 오히려 크게 증가시켰다. 일반적으로 ATP를 비롯한 adenine nucleotides는 혈관 평활근에서 P_{2X} 수용체를 매개로 하여 수축을 유발한다고 알려져 있으며, APCPP를 전처리 하였을 경우 이들의 수축반응이 탈감작(desensitization) 되는 것을 특징으로 하고 있다³⁵⁾. 하지만 본 실험에서는 오히려 APCPP에 의하여 수축이 증가 하였으므로, 따라서 UTP의 수축작용은 ATP와는 달리 pyrimidine nucleotides에 국한된 특성이라고 할 수 있다²⁰⁾. 이러한 특성을 지닌 일군의 수용체를 pyrimidinoceptor 혹은 UTP-sensitive receptor라고 불리워지고 있다^{25/22)}. 또 UTP에 의한 이완반응이 APCPP에 의하여 다소 감소된 이유는 수축반응의 항진으로 인해 나타난 현상이라 생각된다.

즉 APCPP가 이완반응은 크게 영향을 주지 않지만 수축반응을 증가시킴으로 인해서 전체적으로는 이완의 정도가 줄어든다는 것이다. 이와 반대로 ATP의 경우는 APCPP에 의해 이완작용이 증가되는데, 이는 P_{2X} 수용체를 매개로 한 수축작용이 APCPP에 의해 차단되므로 결국 전체적인 이완정도가 증가하는 것이다. 따라서 UTP에 의한 이완작용이 APCPP에 의해 감소되었다는 점은 UTP의 수축작용이 P_{2X} 수용체를 매개로 하지 않는다는 간접적인 증거 중 하나라고 할 수 있다.

RB-2의 경우 UTP의 이완작용을 현저히 감소시켰으나, 수축반응은 약간 증가하는 양상을 나타내었다. Pyrimidinoceptor를 매개로 한 수축반응이 RB-2에 의해 증가된다는 점은 이미 보고된 바 있으며²⁵⁾, 본 실험의 결과와도 일치한다. 그러나 이완작용이 억제된 것은 P_{2Y} 수용체의 관여를 의미하는데, UTP는 P_{2Y} 수용체에 대해서 효능이 아주 낮으므로²²⁾, 본 실험의 결과들이 이에 잘 부합되지 않는다. 이는 두가지 가능성을 생각해 볼 수 있는데, 첫째는 UTP를 비롯한 여러 효현제의 효능은 기존과 차이가 있으나 P_{2Y} 수용체의 일부로 간주하는 것이고, 둘째는 RB-2가 P_{2Y} 수용체만 선택적으로 차단하는 것이 아니라 다른 수용체들도 비선택적으로 차단할 수 있으므로 다른 수용체로 간주하는 것이다. 이에 대한 구체적인 증거를 얻기 위하여 다른 효현제들과 수용체 공유여부를 확인하였다. 즉 P_{2Y} 수용체의 강력한 효현제인 2-MeSATP($10\mu M$)를 먼저 전처리하여 충분히 P_{2Y} 수용체의 탈감작이 일어난 뒤¹²⁾, UTP를 투여하여 이완 및 수축반응을 비교하였다. 이때 2-MeSATP의 ED_{50} 에 비해 20배 가량 높은 농도를 투여하였음에도 불구하고³⁶⁾²²⁾ UTP의 이완반응은 아무런 영향을 받지 않았으므로, P_{2Y} 수용체를 매개하지 않으리라고 추측할 수 있다. 이에 반해 ATP($10\mu M$)를 전처리 하였을 때는 UTP에 의한 이완반응이 크게 감소하였는데, 이것은 ATP와 UTP가 같은 수용체를 매개로 한다는 증거라고 할 수 있다. 1990년 Davidson 등¹⁵⁾은 pyrimidine nucleotide인 UTP와 purine nucleotide인 ATP가 유사한 효능을 가지는 반면 2-MeSATP 및 APCPP의 효과는 미약한 수용체를 nucleotide 수용체²²⁾ 혹은 P_{2U} 수용체²⁴⁾로 명명하였는데, 본 실험에서 UTP에 의한 이완 효과 역시 여러가지 특성이 이와 일치하였다. 따라서 UTP는 nucleotide 수용체를 매개로 하여 혈관을 이

완시키며, RB-2는 P_{2Y} 뿐 아니라 nucleotide 수용체까지 비선택적으로 차단한다고 생각된다.

본 실험을 통하여 UTP가 혈관 내피세포 및 평활근 세포에 있는 수용체들을 매개로 하여 나타나는 작용들을 확인하였다. 특히 UTP는 다른 nucleotides에 비해 작용이 다르거나 혹은 보다 강력하므로 더 많은 관심을 모을 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 이들의 세포내 전달체계 규명이나 우리 몸에서 담당하는 생리적 역할들을 밝혀 낸다면 UTP의 작용 이해와 더불어 임상적 활용의 폭을 넓힐 수 있으리라 기대한다.

요 약

연구배경 :

Uridine 5'-triphosphate(UTP)를 포함한 uracil nucleotides는 혈소판 및 각종 세포내에 고농도로 저장되어 있다가, 자극시 세포외액으로 방출되어 다양한 생리적 작용을 나타낸다고 알려져 있다. 하지만 이들의 작용들은 아직 구체적으로 밝혀지지 못하였으며, 이들이 작용하는 수용체 역시 명확히 규명되지 못한 상태이다. 따라서 본 실험에서는 UTP가 흰쥐의 대동맥 혈관의 장력변화에 미치는 영향을 관찰하고 UTP에 대한 수용체의 특성을 여러가지 수용체 차단제를 사용하여 확인하였다.

방 법 :

흰쥐의 흉부 하행성 대동맥을 적출한 뒤 내피세포가 손상되지 않도록 주의하여 혈관환을 만들었으며, 일부는 혈관강내를 부드럽게 문질러 내피세포를 제거하였다. 기초장력 1gm을 가한 뒤 등척성 조건하에서 변화하는 혈관의 장력을 force transducer로 측정하여 polygraph에 기록하였다.

결 과 :

100nM norepinephrine으로 전수축시킨 대동맥 혈관에서 UTP는 농도에 따른 이중효과를 보였는데, 저농도($100nM \sim 10\mu M$)에서는 내피세포 의존성 이완반응을, 고농도($30\mu M$ 이상)에서는 내피세포와 무관하게 수축반응을 나타내었다. Uracil nucleotides중 UDP는 UTP와 작용이 유사하였으나, UMP나 uridine은 효과가 없었다. 여러가지 다른 nucleotides의 효과를 비교하였을 때, UTP는 pA_{50} 이 6.15로, ATP(5.17)나 ITP(4.75)에 비해 혈관이완효과가 강력하였다. 기초장력하에서 UTP는 내피세포 존재시 저농도에서

는 이완하고 고농도에서는 수축하였으나, 내피세포를 제거하면 수축반응만을 나타내었다.

UTP에 의한 혈관이완 혹은 수축반응에 대한 수용체를 규명하기 위하여 비선택적 P_2 수용체 차단제인 suramin, P_{2X} 수용체 차단제인 α , β -methylene ATP, 그리고 P_{2Y} 수용체 차단제인 reactive blue-2를 전처리한 후 수축과 이완반응의 변화를 관찰하였다. 그 결과 suramin을 전처리한 경우 수축과 이완이 모두 억제되었고, reactive blue-2는 이완반응만을 억제하였으나, α , β -methylene ATP는 수축반응을 오히려 증가시켰다. 수용체에 대한 공유여부를 확인하기 위하여 ATP를 전처리한 결과 UTP에 의한 이완반응이 억제되었으나, P_{2Y} 수용체의 효현제인 2-methylthio ATP 전처리 때에는 아무런 영향이 없었다.

결론:

UTP는 혈관 내피세포에 존재하는 nucleotide 수용체를 매개로 이완반응을, 혈관 평활근에 위치한 pyrimidinoceptor를 매개로 수축반응을 나타내는 것으로 생각된다.

References

- 1) Rozengurt E, Heppel LA, Friedberg I : *Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines*. J Biol Chem 252 : 4548-4590, 1970
- 2) Olsson RA, Pearson JD : *Cardiovascular purinoceptors*. Physiol Rev 70 : 761-845, 1990
- 3) MacFarlane DE, Mills DCB : *The effects of ATP on platelets evidence against the central role of released ADP in primary aggregation*. Blood 46 : 309-320, 1975
- 4) Krishtal OA, Marchenko SM, Obukhov AG : *Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons*. Neuroscience 27 : 995-1000, 1988
- 5) Rapaport E : *Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle*. J Cell Physiol 114 : 279-283, 1983
- 6) Burnstock G : *Overview : Purinergic mechanisms*. Ann New York Acad Sci 603 : 1-17, 1990
- 7) Goetz U, Da Prada M, Plotscher A : *Adenine-, guanine- and uridine 5'-phosphonucleotides in blood platelets and storage organelles of various species*. J Pharmacol Exp Ther 178 : 210-215, 1971
- 8) De Vries-Petiau GM, Leonis J : *Evidence for the presence of collagen : Glucosyl transferase in pig platelets*. Arch Int Physiol Biochem 86 : 855-856, 1978
- 9) Keppler D, Rudigier J, Decker K : *Enzymic determination of uracil nucleotides in tissues*. Anal Biochem 38(1) : 105-114, 1970
- 10) Gordon JL : *Extracellular ATP : effects, sources and fate*. Biochem J 233(2) : 309-319, 1986
- 11) Motte S, Pirotton S, Boeynaems JM : *Heterogeneity of ATP receptor in aortic endothelial cells. Involvement of P_{2Y} and P_{2U} receptors in inositol phosphate response*. Cir Res 72(3) : 504-510, 1993
- 12) Kitajima S, Ozaki H, Karaki H : *Role of different subtypes of P_2 purinoceptor on cytosolic Ca^{2+} levels in rat aortic smooth muscle*. Eur J Pharmacol 266 : 263-267, 1994
- 13) Keppens S : *The complex interaction of ATP and UTP with isolated hepatocytes. How many receptors ?* Gen Pharmacol 24(2) : 283-289, 1993
- 14) Fedan JS, Belt JJ, Yuan Lx, Frazer DG : *Contractile effects of nucleotides in guinea pig isolated, perfused trachea : Involvement of respiratory epithelium, prostanooids and Na^+ and Cl channels*. J Pharmacol Exp Ther 264(1) : 210-216, 1993
- 15) Davidson JS, Wakefield IK, Sohnius U, Anton van der Merwe P, Millar RP : *A novel extracellular nucleotide receptor coupled to phosphoinositidase C in pituitary cells*. Endocrinology 126 : 80-87, 1990
- 16) Greenberg S, Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC : *Extracellular nucleotides mediate Ca^{++} fluxes in J774 macrophage by two distinct mechanisms*. J Biol Chem 263(21) : 10337-10343, 1988
- 17) Ford-Hutchinson AW : *Aggregation of rat neutrophils by nucleotide triphosphates*. Br J Pharmac 76 : 367-371, 1982
- 18) Dubyak GR, De Young MB : *Intracellular Ca^{++} mobilization activation by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells*. J Biol Chem 260 : 10653-10661, 1985
- 19) Hardebo JE, Kährström J, Owman C, Salford LG : *Endothelium-dependent relaxation by uridine tri- and diphosphate in isolated human pial vessels*. Blood Vessels 24(3) : 150-155, 1987
- 20) von K gelgen I, H ussinger D, Starke K : *Evidence for a vasoconstriction mediating receptor for UTP, distinct from the P_2 purinoceptor, in rabbit ear artery*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 336(5) : 556-

560, 1987

- 21) Hardebo JE, K hrstr m J, Owman C : *P₁ and P₂ purinergic receptors in brain circulation. Eur J Pharmacol 144(3) : 343-352, 1987*
- 22) O' Connor SE, Dainty IA, Leff P : *Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. Trends Pharmacol Sci 12 : 137-141, 1991*
- 23) O' Connor SE : *Recent development in the classification and functional significance of receptors for ATP and UTP, evidence for nucleotide receptors. Life Sci 50(22)1657-1664, 1992*
- 24) Abbrachio MP, Cattabeni F, Fredholm BB, Williams M : *Purinoceptor nomenclature : a status report. Drug Dev Res 28 : 207, 1993*
- 25) Seifert R, Schultz G : *Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. Trends Pharmacol Sci 10 : 365-369, 1989*
- 26) Shirasawa Y, White RP, Robertson JT : *Mechanisms of the contractile effect induced by uridine 5-triphosphate in canine cerebral arteries. Stroke 14(3) : 347-355 : 1983*
- 27) Seifert R, Burde R, Schultz G : *Activation of NADPH oxidase by purine and pyrimidine nucleotides involves G-proteins and is potentiated by chemotactic peptides. Biochem J 259 : 813-819, 1989*
- 28) Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC : *Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis air way epithelium. Br J Pharmacol 103(3) : 1649-1656, 1991*
- 29) Martin W, Cusack NJ, Carletton JS, Gordon JL : *Specificity of P₂ purinoceptor that mediates endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. Eur J Pharmacol 108 : 295-299, 1985*
- 30) Demolle D, Lagneau C, Boeynaems JM : *Stimulation of prostacyclin release from aortic smooth muscle cells by purine and pyrimidine nucleotides. Eur J Pharmacol 155 : 339-343, 1988*
- 31) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : *Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43(2) : 109-142, 1991*
- 32) Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U : *The nitric oxide and cGMP signal transduction system : regulation and mechanism of action. Biochim Biophys Acta 1178 : 153-175, 1993*
- 32) Mannix RJ, Moatter T, Kelley KA, Gerritsen ME : *Cellular signaling responses mediated by a novel nucleotide receptor in rabbit microvessel endothelium. Am J Physiol 265 : H675-H680, 1993*
- 34) Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC : *Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. Am J Physiol 259 : H1038-H1043, 1990*
- 35) Kasakov L, Burnstock G : *The use of the slowly degradable analog, α , β -methylene ATP, to produce desensitization of the P₂-purinoceptor : effect on non-adrenergic, non-cholinergic response of the guinea-pig urinary bladder. Eur J Pharmacol 86 : 291-294, 1983*
- 36) Dainty IA, O' Connor SE, Leff P : *Is 2-methylthio ATP an appropriate tool for the identification of P_{2Y}-purinoceptors ? Br J Pharmacol 101 : 507, 1990*