

## NITRIC OXIDE와 치수

김영경 · 김성교

경북대학교 치과대학 치과보존학교실

## ABSTRACT

## NITRIC OXIDE AND DENTAL PULP

Young-Kyung Kim, Sung-Kyo Kim

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University

Nitric oxide (NO) is a small molecule (mol. wt. 30 Da) and oxidative free radical. It is uncharged and can therefore diffuse freely within and between cells across membrane. Such characteristics make it a biologically important messenger in physiologic processes such as neurotransmission and the control of vascular tone. NO is also highly toxic and is known to acts as a mediator of cytotoxicity during host defense.

NO is synthesized by nitric oxide synthase (NOS) through L-arginine/nitric oxide pathway which is a dioxygenation process. NO synthesis involves several participants, three co-substrates, five electrons, five co-factors and two prosthetic groups.

Under normal condition, low levels of NO are synthesized by type I and III NOS for a short period of time and mediates many physiologic processes. Under condition of oxidant stress, high levels of NO are synthesized by type II NOS and inhibits a variety of metabolic processes and can also cause direct damage to DNA. Such interaction result in cytostasis, energy depletion and ultimately cell death. NO has the potential to interact with a variety of intercellular targets producing diverse array of metabolic effects.

It is known that NO is involved in hemodynamic regulation, neurogenic inflammation, re-innervation, management of dentin hypersensitivity on teeth. Under basal condition of pulpal blood flow, NO provides constant vasodilator tone acting against sympathetic vasoconstriction. Substance P, a well known vasodilator, was reported to be mediated partly by NO, while calcitonin-gene related peptide has provided no evidence of its relation with NO.

This review describes the roles of NO in dental pulp in addition to the known general roles of it.

**Key words** : nitric oxide, hemodynamic regulation, constant vasodilator tone, dental pulp

## I. 서 론

치수에서 조직 손상을 야기하는 화학적 및 기계적 자극이 염증 매체물들을 분비시키고 이들이 신경의 과민반응, 혈류 증가, 그리고 혈관 미세누출 등을 초래한다. 치수 신경, 특히 C 섬유의 흥분은 substance P와 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 같은 신경 펩티드를 유리하게 하고 이들이 신경성 혈관변화와 치수의 조직압을 변화시킨다고 알려져 있는데 그 기전에 관한 연구가 활발히 진행

되어 왔다.

Nitric oxide(NO)는 아주 작은 분자량을 가지며 산화능을 가지는 유리기(free radical)이다. 따라서 그 존재 및 역할을 파악하기가 용이하지 않았으나 최근 연구 기법의 발달로 점차 그 내용이 밝혀지고 있다. NO는 신경전달이나 혈관 긴장도(vascular tone)의 조절 등 생체에서 중요한 전령(messenger) 역할을 하고, 또한 독성이 매우 크기 때문에 숙주방어기전에서 세포독성에 관여하는 매개체(mediator)로서의 역할도 하며 피부 등에서 신경성 혈관확장과 부종

형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 최근, 경조직에 둘러싸여 있는 말단기관의 하나로 신체 타 부위와 다른 특수성을 가지는 것으로 알려져 있는 치수<sup>1)</sup>에서의 역할이 연구되어 다소의 보고가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 치수 생리에 대한 이해를 증진시킬 목적으로 NO의 성질, NO의 합성 및 이의 일반적 기능에 대해 알아보고 이를 바탕으로 NO의 치수에서의 역할을 고찰하고자 하였다.

## II. NO의 성질 (Properties of NO)

NO는 분자량 30 Da의 작은 분자이다. 한 개의 질소 원자와 한 개의 산소 원자가 결합된 짝짓지 않은 전자(unpaired electron)이며 상자성체(paramagnetic)의, 산화능을 가진 유리기이다. 수용액에서, 산소의 존재 하에 NO의 반감기는 4분 정도이지만 생체에서는 이보다 불안정한 상태로 반감기가 30초 이하로 짧다. 전하를 띠지 않으므로 세포 내나 세포막을 가로질러서 세포 사이를 자유롭게 확산하여 이동할 수 있다. 이러한 성질들로 인하여 NO가 생체에서 중요한 전령으로서의 역할을 한다고 볼 수가 있다. 또한 NO는 매우 독성이 강하기 때문에 숙주방어기전동 안에 세포독성에 관여하는 매개체로서의 역할을 담당한다. NO는 이렇게 다양한 종류의 세포내 표적(intercellular target)과 반응하여 다양한 대사효과를 만들어낸다.

## III. NO의 합성 (Synthesis of NO)

NO는 L-arginine/nitric oxide pathway를 통하여 합성 효소인 NOS에 의해 합성된다<sup>2)</sup>. 이 합성과정은 L-arginine에서 중간물질인 N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine이 만들어지는 한 개의 산화과정과 최종적으로 L-citrulline과 NO가 만들어지는 또 한 개의 산화과정으로 이루어진, 엄밀히 말해서 두 개의 별도의 산화과정으로 이루어지는 dioxygenation process이다. NO에서 질소원자는 arginine의 terminal guanidino nitrogen으로부터 오고 산소원자는 molecular O<sub>2</sub>로부터 온다. 이 합성과정에는 여러 가지의 참여인자가 포함되는데, 첫째, arginine, molecular O<sub>2</sub>, NADPH인 세 개의 co-substrate, 둘째, NADPH로부터의 다섯 개의 전자, 셋째, FAD (flavin adenine dinucleotide), FMN (flavin mononucleotide), BH<sub>4</sub> (tetrahydrobiopterin)와 같은 co-factor, 넷째, haem과 calmodulin 같은 배합 군이 있다<sup>3)</sup>(Fig. 1).

### NO 합성효소 (NOS)

NOS는 두 가지 또는 세 가지의 isoform으로 분류된다.

두 가지 isoform에는 c(constitutive)NOS와 i(inducible)NOS가 있다. cNOS는 세포 내에 정상적으로 존재하며 뉴런과 내피세포에서 발견되었고, iNOS는 정상적으로 존재하지는 않고 자극이 왔을 때 유도되어 생성되며 대식세포(macrophage)에서 발견되었다.

세 가지 isoform에는 type I, II, III NOS가 있는데 type I NOS(nNOS)는 분자량 160 kDa이며 뉴런에서 처음 확인되었고 세포 내에서 cytosolic(free, soluble)한 형태로 존재하며<sup>3)</sup>, type II NOS(iNOS)는 130 kDa의 분자량을 가지며 대식세포에서 처음 확인되었고 세포 내에서 cytosolic한 형태로 존재한다. type III NOS(eNOS)는 133 kDa의 분자량에 내피세포에서 처음 확인되었고 세포막에 부착되어 있다<sup>4,5)</sup>.

이상에서 볼 때, type I, III NOS는 cNOS이며 type II NOS는 iNOS이다. 정상적 상태에서는 type I, III NOS에 의해 NO가 합성되며 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin에 의해 post-translational level에서 그 합성이 조절되고 비정상적인 상태에서는 type II NOS에 의해 NO가 합성되며 type II NOS의 유도 및 생성은 transcription level에서 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin이 아닌 endotoxin이나 IL-1, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), TNF- $\beta$  (tumor necrosis factor- $\beta$ ), lymphotoxin과 같은 cytokine에 의해 활성화된다. Type II NOS의 생성을 억제하는 물질로는 TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), NO, prostaglandin 등이 알려져 있다(Fig. 2).

NOS는 전자를 제공하는 한 개의 효소와 NO를 생성하는 다른 한 개의 효소의 결합체라고 볼 수가 있는데, 이 역할은 각각 NOS의 양쪽 영역, 즉 Cytochrome P<sub>450</sub> reductase (CPR)와 haem domain에서 이루어진다<sup>3)</sup>. CPR은 NOS와 실제적으로 동일한 배열을 가지고 있는 것으로 알려진

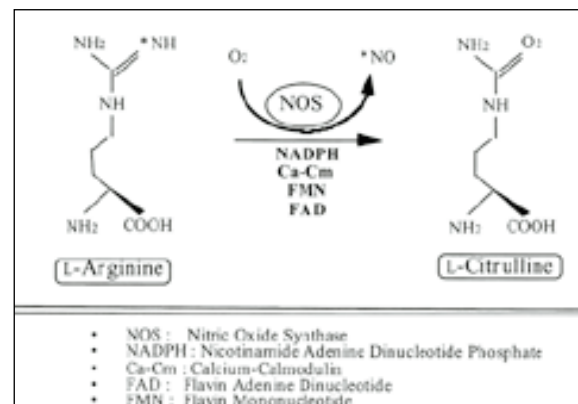
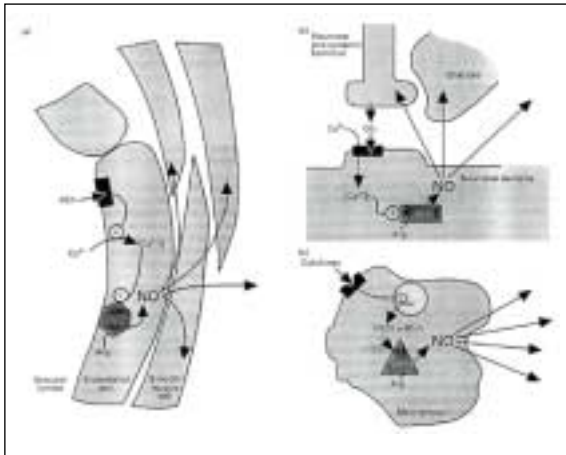
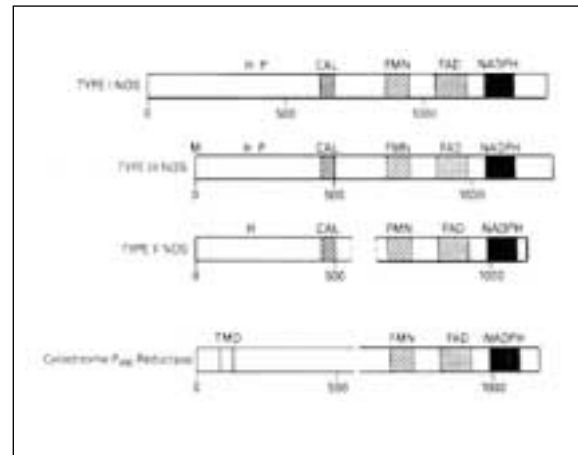


Fig. 1. Schematic representation of the biosynthesis of NO from L-Arginine by the NO synthase system.



**Fig. 2.** Synthesis of NO by three isoforms of NOS. (Adapted from Knowles and Moncada, *Biochem. J.*, 1994, 298:249-258.)



**Fig. 3.** Amino acid arrangement of type I, II, III NOS and CPR. (Adapted from Dawson and Snyder, *Journal of Neuroscience*, 1994, 14:5147-59)

효소로 그 역할은 포유동물에서 NADPH로부터 전자를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 NOS를 1st self-sufficient mammalian P<sub>450</sub> enzyme이라고도 한다.

Calmodulin은 분자량 17,000의 칼슘의존성 조절단백 (calcium-dependant regulating protein)이며 네 개의 Ca<sup>2+</sup>이 부착되는 자리가 있어서 여기에 Ca<sup>2+</sup>이 부착되면 구조적 변화를 일으켜 효소를 활성화 또는 불활성화시킨다. 세 형의 NOS에는 모두 calmodulin이 부착되는 자리가 있지만 type II NOS는 calmodulin과 매우 단단히 부착되어 있어서 Ca<sup>2+</sup>에 의해 영향을 받지 않는다<sup>6)</sup>.

Type III NOS의 N-terminal에는 myristoylation(M) site가 있어서 효소가 세포막에 부착될 수 있도록 하므로 type I, II NOS와는 달리 cytosolic 하지 않고 세포막에 부착된 상태로 되어 있다<sup>2)</sup> (Fig. 3).

Type II NOS를 발현하는 세포로는 대식세포/단핵세포 (monocyte), Kupffer cell, 그리고 T-임파구와 같은 면역계 세포와 상피세포, 대동맥, 뇌의 내피세포, 혈관 평활근 세포, 심근세포(cardiac myocytes), 조골세포(osteoblasts), 연골세포(chondrocytes), keratinocytes, 섬유모세포(fibroblasts), 간세포(hepatocytes), pancreatic  $\beta$  cells, 성상세포(astrocytes), 그리고 신경세포(neuronal cells) 등의 비면역계 세포가 있다.

Type I, III NOS에 의해서 합성된 NO는 신경전달의 매개체, 혈관 평활근 이완 등의 생리적 기능을 담당하며, type II NOS에 의해 합성된 NO는 면역독성에 관여한다<sup>7)</sup>.

### NO 합성의 억제 (Inhibition of NO Synthesis)

NO의 합성을 억제하는 방법에는 arginine 유사물질 (analogue)의 주입, diphenyleneiodonium와 같은 NADPH 억제제, trifluoperazine, chlorpromazine, calmidazolium, W7, W13 등의 calmodulin 길항제 사용, DAHP, methotrexate, N-acetyl-5-hydroxytryptamine 등에 의한 BH<sub>4</sub> 합성의 억제, NO에 의한 feedback inhibition, carbon monoxide와 methylene blue 등 haem과 반응하는 물질의 사용 등이 있다. 앞의 세 가지 방법은 기질 (substrate) 혹은 co-factor에 직접적, 경쟁적으로 작용하여 합성을 억제하는 방법이고, BH<sub>4</sub> 합성을 억제하는 방법은 기질이나 co-factor의 공급을 억제하여 간접적으로 합성을 억제하는 방법이다.

Arginine 유사물질을 주입하는 방법은 혈류에 대한 NO의 역할을 알아보기 위한 실험에서 널리 이용되는 방법이며 arginine 유사물질에는 L-NMMA(N<sup>ω</sup>-monomethyl-L-arginine), L-ADMA(N<sup>ω</sup>-dimethyl-L-arginine), L-NAME(N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester), L-NA(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine), N<sup>ω</sup>-amino-L-arginine, NOLA, L-NIO(N<sup>ω</sup>-iminoethyl-L-ornithine), L-canavanine, D-arginine, L-glutamate 등이 있다<sup>2,8)</sup>. L-NMMA는 가장 널리 이용되는 억제제이며, L-NMMA와 L-ADMA는 자연적으로 생성된 물질이다. L-NMMA는 거의 모든 종류의 NOS에 억제 작용을 하는 비선택적 억제제인 반면, L-NNA와 L-NAME은 뇌의 NOS에, L-NIO, N<sup>ω</sup>-amino-L-arginine, L-canavanine은 다른 NOS보다는 대식세포와 호중구(neutrophil)의 NOS를 강력하게 억제하는 선택적

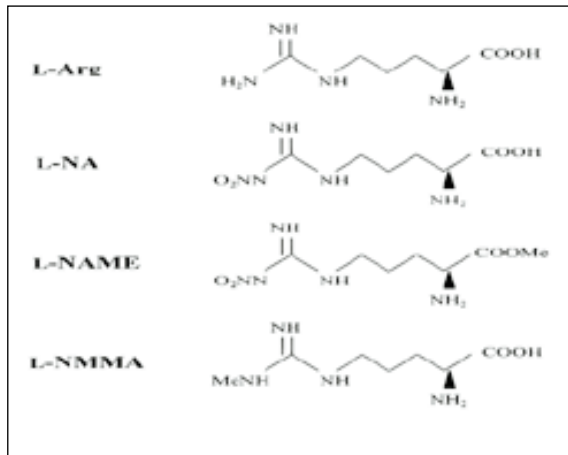


Fig. 4. Structural formula of L-arginine and analogue that inhibit NO formation.

억제제이다(Fig. 4).

#### IV. NO의 일반적 기능 (Roles of NO)

##### 생리적 과정의 매개체 (정상적인 상태)

정상적인 상태에서는  $10^{-12}$  mole (picomole) 정도의 소량의 NO가 짧은 시간 동안 분비되며, superoxide( $O_2^-$ )의 세포 내 농도는 낮다. NO는 불활성상태의 sGC(soluble guanylate cyclase)를 활성화시켜 GTP로부터 cGMP의 생성을 증가시킨다. 이 cGMP를 통하여 신경전달이나 혈관 평활근의 이완, 혈소판응집의 억제 등 여러 과정에 관여한다. 또한 NO는 산소( $O_2$ )와 반응하여 nitrite( $NO_2^-$ )를 형성하여 방출되므로 불활성화되기도 하고 단백질의 철(iron)과 반응하여 철 항상성(iron homeostasis)에 관여한다. 또는 thiol(R-SH)과 반응하여 nitrosothiol(R-S-NO)의 안정된 형태로 되어 이동(transport)되기도 하고 thiol protein을 nitrosylation시켜 축삭 종말(axon terminal)의 remodeling에 관여하기도 한다(Fig. 5).

##### 세포독성의 매개체 (oxidant stress 상태)

비정상적인 상태에서는  $10^{-9}$  mole(nanomole) 정도의 많은 양의 NO가 지속적으로 분비되며 세포 내  $O_2^-$ 의 농도도 높고 세포 내 thiol pool은 고갈된다. NO는  $O_2^-$ 와 반응하여 peroxynitrite, 이어서 hydroxy radical을 형성하는데 이는 NO 자체보다도 매우 독성이 강하다. NO는 Fe-S group이나 R-SH group과 반응하여 효소작용을 억제시킬 수 있으며 GADPH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 nitrosylation시켜 비가역적 ADP-ribosylation을 야기한다. 또한 NO는 DNA를 탈아미노화(deamination)시켜 PARS(polyADP-ribose synthetase)를 활

성화시킨다. 이러한 작용으로 NO는 세포성 색전, 에너지 고갈, 돌연변이(mutagenesis)를 일으켜 결국에는 세포의 죽음에 이르게 한다(Fig. 5).

##### 중추신경계 (central nervous system)

중추신경계에서 NO는 다양한 기능을 담당하고 있다. 뇌에서는 세가지 형(Type)의 NOS가 발견되는데 type I(nNOS)은 뉴런에서, type II(iNOS)는 신경교세포(glial cell)에서, type III(eNOS)는 내피세포와 뉴런에서 발견된다. 대부분이 nNOS에 관해서 알려져 있으며 신경교세포의 NOS에 관해서는 많은 연구가 이루어지지 않았고 중추신경계의 eNOS는 말초 신경계의 eNOS와 거의 유사한 기능을 하고 있다. 중추신경계에서 nNOS의 주된 작용은 4가지로 요약되는데 신경독성(neurotoxicity), 신경의 보호(neuro-protection), 시냅스 가소성(synaptic plasticity), 그리고 조절 작용(modulatory activity) 등이다.

신경독성은, 저산소증(hypoxia)과 같은 비정상적인 병적 상태에서 glutamate가 과량 분비되고 이것이 NMDA수용체에 결합되면 neuron내로  $Ca^{2+}$ 이 유입되고 이로 인해 NOS가 활성화되어 NO가 합성된다. NO는  $O_2^-$ 와 반응하여 peroxynitrite를 형성하고 이것이 세포독성을 일으킨다. NO는 PKC(phosphokinase C), GADPH와 같은 여러 효소를 nitrosylation시켜 당 분해(glycolysis)를 억제하고, DNA의 변성과 strand의 파절을 야기하여 PARS를 활성화시켜 대량의 에너지 고갈과 세포사에 이르게 한다. 그리고 haem이나 non-haem (Fe-S) complex의 철과 반응하여 당 분해 억제와 같은 유해효과를 나타낸다. Nitrosylation과 DNA손상기전에 대해서는 NO는 유리기와는 다른 산화환원 형(redox form)으로, 간접적으로 영향을 미친다.

신경의 보호는 NO가 NMDA수용체에 작용해서 glutamate의 결합과  $Ca^{2+}$ 의 세포 내 유입을 억제하므로써 이루어진다.

시냅스 가소성에는 long-term potentiation(LTP)과 long-term depression(LTD)이 있다. LTP은 시냅스 전도(synaptic transmission)의 효과를 증폭, 시냅스 강도(synaptic strength)의 증가를 야기하는 데 이런 효과가 나타나는 주된 곳은 presynaptic nerve, postsynaptic receptor, postsynaptic dendritic spine 등이다. LTD효과를 나타내는 가능한 예로는 소뇌의 learning motor movement이다. 그 기전은 Purkinje cell의 climbing fiber에 의해 지속적으로 흥분이 야기되면 parallel fiber와 Purkinje cell사이의 시냅스 강도가 감소하고 이로 인해 glutamate에 대한 postsynaptic AMPA수용체의 민감성(sensitivity)이 감소한다. Parallel fiber에 의한 탈분극(depolarization)으로 glutamate수용체를 통한  $Ca^{2+}$ 통로(channel)의 활성화와  $Ca^{2+}$ 의 세포 내 유입이 이루어지고 이

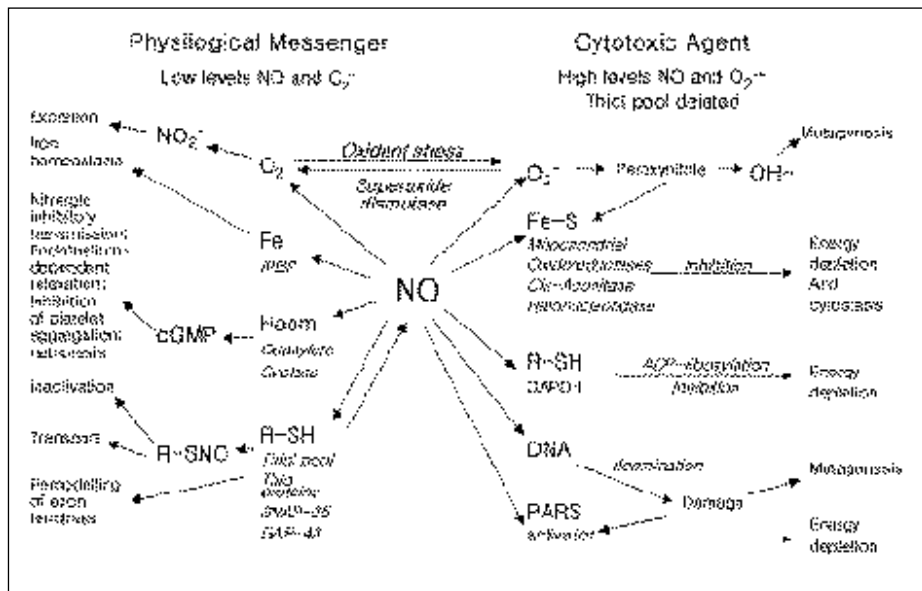


Fig. 5. Roles of NO: physiological messengers and cytotoxic agent.

로 인해 voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  통로의 활성화와 phospholipase C의 활성화가 야기된다. 증가된  $\text{Ca}^{2+}$  농도로 인해 protein kinase C가 활성화되고 활성화된 PKC가 AMPA 수용체를 phosphorylation시켜 민감성을 감소시킨다.  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가는 또한 NOS를 자극해서 cGMP 생성이 증가되고 이로 인해 protein kinase G가 활성화되어 수용체의 탈감작(desensitization)을 야기한다.

조절 작용에는 동통의 인식과 기억의 형성, 학습 과정 등이 포함되며 실험적으로 NOS를 억제하였을 때 항 침해 효과(antinociceptive effect)가 나타난다.

#### 말초신경계 (peripheral nervous system)

말초신경계에서 NO는 신경전달물질의 범주를 완전히 충족시키지는 못하지만 일반적으로 신경전달물질로서의 역할을 하며 주로 억제성 신경근 신경전달물질(inhibitory neuromuscular neurotransmitter)로서 작용한다. 단독으로 작용하기보다는 주로 VIP(vasoactive intestinal polypeptide)와 함께, 혹은 ATP와 상호작용(co-transmission)하여 근육을 이완시킨다. 위의 reflex receptive relaxation, 장의 descending inhibition 그리고 장의 tonic inhibition을 일으키며 방광 경부(bladder neck)와 요도(urethra)와 같은 하부 요로(lower urinary tract)의 이완, 음경 해면조직(penile cavernosal tissue)과 retractor penis muscle과 같은 남성 생식기(male reproductive tract)의 이완, 그리고 여성 생식기(female reproductive tract)에서는 자궁(uterine)을 이완시킨다. 심혈관계에서는 신경성 혈관확장(neurogenic vasodilation)을 일으켜 교감

신경 지배(sympathetic transmission)에 의한 혈관수축효과를 조절하며, 호흡기계통에서도 근육이완효과를 나타낸다. 신경절전 뉴런(preganglionic neuron)과 자율신경절(autonomic ganglia)에서도 NO의 분비가 증명되었으나 그 역할에 관한 확실한 증거는 아직 없으며 일차 감각 뉴런(primary sensory neuron)에서는 신경성 혈관확장과 동통의 인식에 관여하는 것으로 알려져 있고 운동 뉴런(motor neuron)에서도 미미한 역할이 있을 것으로 생각되지만 정확히 알려진 바는 없다.

#### 면역계 (immune system)

면역계에서 NO는 독성 매개체로서 숙주방어기전에 관여하지만 숙주 자체에도 독성을 나타낸다. 이렇게 면역독성(immunocytotoxicity)에 관여하는 반면 Th1-type의 면역반응을 억제하는 면역조절자(immunoregulator)로서의 역할도 하는데 이러한 역할은 되먹임억제기전(feedback control mechanism)으로 작용하여 NO에 의해 야기되는 과잉의 염증반응을 억제한다. 그러나 만성감염이나 암의 경우, NO에 의한 면역억제 효과는 감염에 대한 저항성을 떨어뜨릴 수도 있다.

#### V. 치수에서의 역할

치아에 있어서 NO는 혈관 긴장도의 조절, 신경성 염증반응, 신경의 재지배, 과민성 상아질의 완화 등에 관여한다고 알려져 있다.



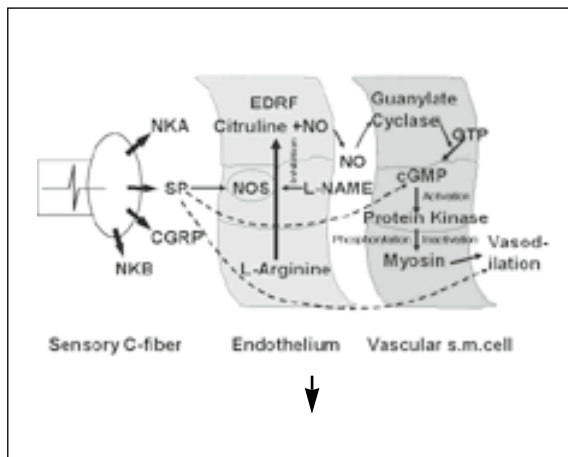


Fig. 6. Diagram illustrating proposed intracellular mechanism for SP in the vascular relaxation.

### 혈관 긴장도의 조절

교감신경에 의한 치수혈류의 억제에는 neuropeptide Y (NPY) 및 norepinephrine (NE) 등에 의해 매개되며 이는 NPY 길항제인 PP56 및 알파 아드레날린 수용기 차단제인 phentolamine에 의해 효과적으로 차단되어 교감신경의 작용은 NPY 및 NE를 통해 이루어짐을 알 수 있는데<sup>9-11)</sup>, 자극이 가해지지 않은 안정된 상태(resting condition)에서 NO에 의한 혈관 평활근의 이완과 그에 따른 혈관확장으로 교감신경 지배에 의한 혈관수축을 조절하여 혈관의 긴장도를 일정하게 유지하게 하는 데 관여하는 것으로 보인다.

### 신경성 염증반응

이 상태에서는 치아에 유해자극이 가해지면 구심성 신경 말단(afferent nerve terminal)에서 SP와 CGRP 등의 신경펩티드가 분비되고 실험적으로 SP의 주입은 치수혈류를 유의하게 증가시켰고 수종의 SP 길항제의 주입은 이를 효과적으로 차단하였다<sup>12)</sup>. 이들이 직접적 또는 NO를 통하여 간접적으로 혈관확장을 일으켜 염증을 일으킨다. NO는 불활성상태의 sGC를 활성화시켜 GTP로부터 cGMP의 합성을 증가시키고, 이 cGMP는 protein kinase를 활성화시키며, sarcoplasmic reticulum을 phosphorylation시키고, myosin light chain을 dephosphorylation 시키며,  $Ca^{2+}$ 의 세포 내 유입을 자극하여 혈관 평활근의 이완과 혈관확장을 일으켜 염증을 야기하는 것으로 본다(Fig. 6).

Kerezoudis 등<sup>13)</sup>에 의하면 치수 내에서 NO가 존재할 수 있는 곳(source)은 혈관의 내피세포, 조상아세포, 신경조직, 백혈구, 혈관의 평활근 등이며 NO가 합성되는 과정인 L-arginine/nitric oxide pathway가 존재한다는 것도

cGMP의 존재나 NADPH-d activity positive cell(조상아세포, 조상아세포층하 세포, 치수혈관의 내피세포)의 존재로서 확인되었다.

### 신경의 재지배

이에 관한 실험에서는 편측 하치조 신경의 절단 후 절단된 쪽과 절단되지 않은 쪽의 labeled neuron의 비를 측정하였을 때 절단 며칠 후 그 값이 저하되며 NO의 길항제 주입 시 그 값이 현저히 감소하고 L-arginine(NO합성의 기질) 주입 시 그 값이 서서히 증가하고, 절단된 쪽의 NADPH-d diaphorase positive neuron이 현저하게 증가하는 것으로 보아 NO가 신경 절단후 신경의 재생에 관여한다고 추측된다<sup>14)</sup>.

### 상아질 지각과민증

이 증상의 완화에서는 그 기전이 명확히 밝혀진 것은 아니지만 칼륨이온( $K^+$ )이 직접적으로 신경전달에 관여하거나, 혹은 간접적으로 이차 전령(second messenger)인 NO를 통하여 nociceptive input의 조절과 감작된 침해수용체(sensitized nociceptor)의 억제(down-regulation)를 통하여 동통을 감소시킨다고 보고 있다<sup>15)</sup>.

### Endothelium-derived relaxing factor (EDRF, EDNO)

혈관의 내피세포에서 생성되어 혈관의 평활근을 이완시키는 역할을 하는 인자(EDRF)가 있으며 이것이 NO(EDNO)와 동일한 것임이 증명되었다<sup>16)</sup>. EDNO는 내피에서 합성되어 확산에 의해 혈액으로 가서 헤모글로빈에 의해 불활성화되거나, 혈관의 평활근으로 가서 근육을 이완시켜 혈관확장을 일으킨다. 그리고 thiol과 결합하여 nitrosothiol의 안정된 형태로 되어 이동하는데 혈액 순환 중 내피로 역 이동(back transport)되거나 평활근으로 가서 근육을 이완시켜 혈관확장을 일으키거나 또는 내피에 저장되어 있다가 자극이 오면 방출(exocytosis)되어 평활근으로 가서 혈관확장을 일으킨다<sup>17)</sup>. EDRF의 분비를 일으키는 물질로는 acetylcholine, nor-adrenaline, ATP, ADP, histamine, bradykinine, leukotrien, PG, 5-HT, angiotensin II, thrombin, CGRP, SP, NKA, calcium ionophore A23187 등의 vasoactive agent와 혈관의 전단 응력(shear stress)의 증가, 저산소증, 전기적 자극 등이 있다. EDNO의 역할은 앞에서 언급한 것과 같이 기초상태에서 혈관의 긴장도를 조절하고 혈소판의 응집과 혈관 벽 부착을 억제하여 혈액의 유동성을 조절하고 혈전(thrombus)형성을 억제한다<sup>18,19)</sup>. 그리고 내피세포의 투과성을 조절하고 혈관 평활근의 유사분열(mitogenesis)과 증식(proliferation)을 억제한다.

### NADPH-dependant (NADPH-d) diaphorase

NADPH-d는 분자량 150 kDa의 산화능을 가진 효소이다. 이 효소는 뇌와 여러 말초조직에 존재하며 흥분성 아미노산(excitatory amino acid), 저산소증의 독성효과에 대해 저항하며 Huntington's chorea와 Alzheimer disease와 같은 뇌의 퇴행성 질환을 저지하는 것으로 알려져 있다. 면역염색, 번역반응성, nitro blue tetrazolium inhibition, 조직화학적 검사, 효소 검사, 효소 정제 등의 방법에 의하여 NOS와 동일한 효소임이 증명되었다<sup>20-23)</sup>.

### 혈류에 대한 NO의 역할

감각신경에 자극을 가했을 때 혈관확장의 효과에 관한 연구는 많았지만 자극이 가해지지 않은 안정된 상태 동안에 감각신경섬유의 말단으로부터 신경펩티드가 분비되는지에 관해서는 잘 알려지지 않았는데 1977년 Jacobsen 등에 의해서 처음으로 감각신경 origin의 basal, resting vasodilator tone이 보고되었다. Eklund 등<sup>24)</sup>은 L-NMMA를 동맥내 주입하여 고양이의 골격근의 동맥(large-bore arterial resistance vessel), 세동맥, 정맥에서의 혈관의 저항성을 측정 한 결과, 동맥에서 길항제의 주입 용량에 따라 저항이 증가함을 보여 NO가 혈관저항(긴장도)의 조절에 중요한 역할을 하며 그 주된 부위는 동맥이며 이러한 이유는 NO 합성 능력을 가진 내피의 분화(differentiation)가 이러한 혈관에 한정된 것으로 추측하였고, Kerezoudis 등<sup>13)</sup>은 쥐에서 NO 합성 억제제 투여시 안정된 상태에서 치수 혈류량이 감소하므로 NO가 생리적인 혈관 확장 상태(physiologic vasodilator tone)를 유지하는 역할을 할 것으로 보았다. Glick 등<sup>25)</sup>은 실험동물에게 L-NMMA를 정맥내 주입하여 MCFP(mean circulatory filling pressure)에 대한 효과를 측정 한 결과, 주입 용량에 따라 평균 동맥압(mean arterial blood pressure)은 증가하고 심박동 수는 감소함을 보이며 MCFP는 증가함을 보여 NO가 baseline venous tone을 감소시킨다고 보고하였으며, Lohinai 등<sup>26)</sup>은 치수 혈류에 대한 NO의 효과를 알아보기 위한 목적으로 NO 공여제(donor)인 3-morpholinonitrosodimethylamine과 길항제인 L-NA를 정맥내 주입하여 방사선동위원소로 표식한 미세구(microsphere) 방법을 사용하여 주입 전, 후의 평균 동맥압, 심박동수, 혈액가스, 수소이온농도, 심 박출량, 조직 혈류량을 측정 한 결과 공여제 주입 시 혈관 저항이 감소하였으며 길항제 주입 시 치수 혈류량은 감소하고 혈관 저항은 증가하는 결과를 얻어 NO가 치수 혈류의 조절에 중요한 역할을 하며 치수 내에 NO-dependent basal vasodilator tone이 존재한다고 보고하였다. 한편 Hsu 등의 연구<sup>27,28)</sup>에서는 고양이에서 전신적인 영향을 미치지 않으면서 치수에만 영향을 미치는 량의 약물을 치수근접 동맥에 주입한 바, NO 합성억제제인 L-

NAME가 휴식기의 혈관 긴장도에 변화를 초래하지는 않았으나 SP-유도성 혈관확장은 강화시키는 것으로 나타나 L-NAME이 guanylate cyclase의 활성기전을 통해 SP로 유도되는 혈관확장을 강화할 것으로 추론하였다. Olgart 등<sup>29)</sup>은 acetylcholine에 의해 야기된 혈관확장은 부분적으로 NO의 합성에 의존하며, 이로 인해 치수혈관의 교감신경 지배에 의한 혈관수축이 조절된다고 보고하였다. Berggreen 등<sup>30)</sup>은 안정된 상태에서와 치아에 전기적 자극을 가했을 때, 치수 혈류량과 간질액압(interstitial fluid pressure)에 대한 CGRP와 SP 등의 감각신경펩티드와 NO의 역할을 연구하기 위해 ferret에 전신에 영향을 미치지 않는 량의 CGRP와 SP의 길항제, 그리고 NO의 길항제인 L-NAME를 동맥내 주입하여 micropuncture technique으로 조직압을, laser-Doppler flowmetry로 치수 혈류량을 측정한 결과, 안정된 상태에서는 CGRP 및 SP의 길항제에 의해서는 치수 혈류량과 조직압은 현저히 감소하였고 L-NAME에 의해서는 조직압은 다소 증가하였지만 치수 혈류량은 다소 감소함을 발견하였다. 그러나 약물 주입후 치아에 가해진 자극에는 CGRP 길항제의 경우 별 변화가 없었으나 SP 길항제의 경우에는 혈관확장 효과가 부분적으로 감소하였고 L-NAME의 경우에는 별 변화가 없었다고 보고하였다. 이로써 안정된 상태에서는 CGRP, SP, NO에 의해서 혈관확장이 야기되나, 치아에 자극을 가해졌을 때에는 CGRP에 의해 주로 혈류량과 조직압이 조절되며 NO에 의해서는 별 다른 효과가 없다고 하였다.

감각신경펩티드의 NO 매개에 관해 SP는 Kim 등의 연구<sup>31,32)</sup>에서 NO를 통한 cGMP 생성 및 NO를 통하지 않는 cGMP 생성의 두 경로가 모두 관여하는 것으로 나타났으나, CGRP는 Walsch<sup>33)</sup>의 연구에서 cGMP 생성과 연관이 적은 것으로 나타났다. 따라서 CGRP의 작용은 SP와 달리 NO에 의해 현저하게 매개되는 것은 것으로 보인다. 그리고 SP는 cAMP 생성에 별반 관여하지 않는 것으로 나타난 반면 CGRP는 cAMP의 생성에 현저하게 관여하는 것으로 나타나 CGRP는 치수혈관의 평활근 세포에 더 직접적으로 작용하는 것으로 보인다. 그리고 SP의 cGMP의 생성은 치수의 변연부보다는 중앙부에서 더 활발한 반면 SP의 NO 생성은 치수의 중앙부보다는 변연부에서 더 활발한 것으로 나타나 CGRP의 cAMP 생성은 치수의 중앙부에서 더 활발한 것으로 나타나 치수의 부위에 따른 endothelial cell 분포의 차이와 연관이 있는 것으로 보인다. 그리고 NO와의 연관성이 나타나지 않은 CGRP는 자체적으로는 치수혈류에 미치는 영향은 미약하나 교감신경에 의해 유도되는 치수혈관의 수축은 현저히 억제하는 것으로 보인다<sup>34)</sup>. 이상의 보고들을 보면 NO가 전체적인 혈류조절에 관계하는 것으로 보이지는 않으나 신경펩티드에 따라 국소적, 또는 선택적으로 치수혈류 조절에 관여함을 알 수 있다.

## Ⅶ. 결 론

NO는 여러 가지의 특징적 성질로 인하여 세포 내나 세포 사이를 자유로이 이동할 수 있으므로 신체 전반에 걸쳐 생리적으로는 여러 대사 과정의 매개체로서, 병리적으로는 독성 물질로서 중요한 역할을 담당한다. 각 세포나 조직에서의 NO의 합성이나 역할, 그리고 그 기전에 관해서는 지금까지 꾸준한 연구가 이루어지고 있으며 불확실한 존재였던 EDRF, NADPH-d diaphorase에 관해서도 NO와 동일함이 여러 실험을 통해 증명되었다.

치아에 있어서 NO는 혈관 긴장도의 조절, 신경성 염증반응, 신경의 재지배, 과민성 상아질의 완화 등에 관여하며 NO는 치아에 유해 자극이 가해졌을 때 신경 말단에서 분비되는 신경펩타이드 등에 대해 부분적으로 매개하여 혈관확장에 의한 염증반응에 관여하는 것으로 보인다. 그러나 신경성 염증에 관여하는 신경펩타이드의 종류 및 각 펩타이드에 대한 NO의 매개에 관해서 아직 밝혀지지 않은 부분들이 남아 있어 이러한 부분에 관해서 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Kim, S., Dörscher-Kim, J. and Kim, S. K.: Contribution of the low compliance environment to the pathophysiology of the pulp, Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 95 and the International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex, Quintessence Publishing Co., Ltd., pp.154-157, 1996.
- Knowles, R. G., Moncada, S.: Nitric oxide synthase in mammals, *Biochem. J.*, 298:249-258, 1994.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., and Snyder, S. H.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide, *Nature*, 347:768-770, 1990.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., and Bloch, K. D.: Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase, *J. Bio. Chem.*, 267:14519-14522, 1992.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., and Michel, T.: Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, 89:6348-6352, 1992.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H.: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, 87:682-685, 1990.
- Nathan, C., Xie, Q.: Regulation of biosynthesis of nitric oxide, *J. Biol. Chem.*, 269:13725-13728, 1994.
- Sessa, W. C., Hecker, M., Mitchell, J. A., and Vane, J. R.: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. USA*, 87:8607-8611, 1990.
- Kim, S. K.: Role of sympathetic nerve on the control of microcirculation in the feline dental pulp, *The Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*, 21(1): 375-384, 1996.
- Kim, S. K., Ang, L., Hsu, Y. Y., Dörscher-Kim, J. and Kim, S.: Antagonistic effect of D-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate (PP56) on neuropeptide-Y induced vasoconstriction in the feline dental pulp, *Archives of Oral Biology*, 41(8-9): 791-798, 1996.
- Kim, S. K., Ang, L., Hsu Y. Y., and Kim, S.: Effects of sympathetic nerve stimulation, norepinephrine and neuropeptide Y on vasomotor control in the feline dental pulp, *Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 95 and the International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex*, Quintessence Publishing Co., Ltd., pp.232-233, 1996.
- Kim, S. K., Ang, L., Hsu, Y. Y., Dörscher-Kim, J., Kim, S.: Characterization of NK1 receptor antagonists in the feline dental pulp, *Proceeding of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001* 64.
- Kerezoudis, N.P., Olgart, L., Edwall, L.: Differential effects of nitric oxide synthesis inhibition on basal blood flow and antidromic vasodilation in rat oral tissues, *Eur. J. Pharmacol.* 14:209-19, 1993.
- Yonehara, N., Takamura, M., Shigenara, Y.: Involvement of nitric oxide in re-innervation of rat molar tooth pulp following transection of the inferior alveolar nerve, *Brain Res.*, 757:31-36, 1997.
- McCormack, K., Davies, R.: The enigma of potassium ion in the management of dentin hypersensitivity: is nitric oxide the evulsive second messenger?, *Pain*, 68:5-11, 1996.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A.: Nitric oxide: physiology, pathology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharm. Rev.*, 43(2):109-142, 1992.
- Stamler, J. S.: Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide, *Cell*, 78:931-936, 1994.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., and Moncada, S.: Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelet, *Br. J. Pharmacol.*, 101:325-328, 1990.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., and Moncada, S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:5193-5197, 1990.
- Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., and Vincent, S. R.: Neuronal NADPH diaphorase is nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, 88:2811-2814, 1991.
- Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M., and Snyder, S. H.: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, 88:7797-7801, 1991.
- Gabbott, P. L. A., Bacon, S. J.: Histochemical localization of NADPH-dependant diaphorase(nitric oxide synthase) activity in vascular endothelial cells in the rat brain, *Neuroscience*, 57(1):79-95, 1993.
- Law, A. S., Baumgardner, K. R., Meller, S. T., and Gebhart, G. F.: Localization and change in NADPH-diaphorase reactivity and nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pulp following tooth preparation, *J. Dent. Res.*, 78(10):1585-1595, 1999.
- Ekelund, U., Mellander, S.: Role of endothelium-



- derived nitric oxide in the regulation of tones in large-bore arterial resistance vessels, arterioles and veins in cat skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, 140:301-309, 1990.
25. Glick, M. R., Gehman, J. D., and Gascho, J. A. : Endothelium-derived nitric oxide reduces baseline venous tone in awake instrumented rats, *the Am. Physiol. Soc.*, H47-H50, 1993.
  26. Lohinai, Z., Balla, I., Marczis, J., Vass, Z., and Kovach, A. G. B. : Evidence for the role of nitric oxide in the circulation of the dental pulp, *J. Dent. Res.*, 74(8):1501-1506, 1995
  27. Hsu, Y. Y. : The effect of nitric oxide synthase inhibitor: L-NAME on substance P-induced vasodilation in the feline dental pulp. Thesis, Master Sci. in Oral Biol., University of Pennsylvania (1996)
  28. Hsu, Y. Y., Kim, S. K., Karabucak, B., Wong, R., Dörscher-Kim, J. and Kim, S. : The effect of nitric oxide inhibitor (L-NAME) on substance P induced vasodilation in the feline dental pulp, *Journal of Dental Research*, 75(Spec.Iss.): 357, 1996.
  29. Olgart, L., Kostouros, G.D., Edwall, L. : Local actions of acetylcholine on vasomotor regulation in rat incisor pulp, *Acta. Physiol. Scand.*, 158:311-6, 1996.
  30. Berggreen, E., Heyeraas, K. J. : The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret., *J. Dent. Res.*, 78(9):1535-1543, 1999.
  31. Kim, S. K., Karabucak, B., Welsch, H., Simchon, S., Kim, S. : Intracellular mechanism of substance P-induced vasodilation in bovine dental pulp, *J. Endodontics* 27: 231, 2001.
  32. Kim, S. K., Karabucak, B., Welsch, H., Simchon, S., Kim, S. : Vasodilatory function of substance P and L-arginine/nitric oxide pathway, *Journal of Dental Research* 80: 552, 2001.
  33. Walsch, H. : Neuropeptide-induced vasodilation in bovine dental pulp: the role of calcitonine-gene related peptide in cGMP and cAMP production, Thesis, Master Sci. in Oral Biol., University of Pennsylvania (2001)
  34. Kim, S. K. : Regulatory mechanism of calcitonin-gene related peptide on pulpal blood flow, Project report, Medical Research Institute, Kyungpook National University Hospital, 2001.