

Adenosine 5'-tetrphosphate(ATPP)가 심장 활동에 미치는 영향*

연세대학교 원주의과대학 생리학교실 및 직업의학 연구소

이중우 · 박규상 · 공인덕

= Abstract =

Effects of Adenosine 5'-tetrphosphate on the Cardiac Activity*

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

*Department of Physiology and Institute of Occupational Medicine, Yonsei University,
Wonju College of Medicine, Wonju, Korea*

Background : Adenosine 5'-tetrphosphate(ATPP), an endogenous nucleotide, is stored in cells and released into the extracellular space upon stimulation. Some of the biological responses to ATPP were reported, but characteristics of its receptor were not well known. Present study was conducted to investigate the effects of ATPP on mechanical contractility, resting membrane potential and action potential of rat left atrium.

Methods : Left atrium was isolated from Sprague-Dawley rat. Mechanical contraction induced by electrical field stimulation(EFS) was recorded on polygraph using force transducer. With glass microelectrodes(10 M Ω), potential difference across the membrane was measured and recorded on an oscilloscope and a polygraph.

Results : ATPP reduced the left atrial contractility with concentration-dependent manner. ATPP also hyperpolarized the resting membrane potential and decreased the action potential duration of the left atrial cell. Nucleotides other than ATPP, such as ATP, ADP, AMP and adenosine, have the same effect as ATPP. However, there is no difference among the nucleotides. Prior treatment of DPCPX, a P₁-purinoceptor blocker, inhibited the ATPP-induced negative inotropism and changes of the membrane potential. But suramin, a nonselective P₂-purinoceptor blocker, did not alter the effects of ATPP. α , β methylene ADP and adenosine deaminase, which attenuates hydrolysis of adenine nucleotides and inactivates adenosine respectively, did not influence the effects of adenine nucleotides except for adenosine.

Conclusion : ATPP reduced the mechanical contractility, hyperpolarized the resting membrane potential and decreased duration of action potential of rat left atrium. These effects were induced by ATPP directly, not by adenosine from hydrolyzed ATPP.

KEY WORDS : Adenosine tetrphosphate(ATPP) · Rat left atrium · Purinoceptor.

*본 연구비는 '1994년도 연세대학교 학술연구비'에 의하여 이루어 졌음.

서 론

세포 외액에 존재하는 adenine compounds가 다양한 생물학적 작용을 나타낸다는 것이 처음 밝혀진 것은 1929년 Drury와 Szent-Györgyi에 의해서이다¹⁾. 그 이후로 adenine nucleotides 및 adenosine의 작용에 관해 많은 연구가 계속되어 왔으며, 이들은 세포막 투과도의 변화²⁾, 심근 및 평활근의 수축 또는 이완^{3,4)}, 혈소판 응집⁵⁾, 신경세포의 흥분성 조절^{6,7)} 및 종양 세포의 성장 억제⁸⁾ 등 다양한 반응을 나타내는 것으로 알려졌다. 이러한 반응들은 세포 외액에 존재하는 수용체를 통하여 매개될 것이라 추측하여서, 이들의 수용체를 퓨린 수용체(purinoceptor)라고 명명하였다^{9,10)}. 퓨린 수용체의 특성에 관한 연구가 지속됨에 따라 Burnstock은 이를 adenosine의 작용이 우세한 P₁ 수용체와, 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_{2U}, P_{2Z}, P_{2T} 등으로 세분하게 되었다⁹⁾.

심장에서 adenine nucleotides 및 adenosine의 효과는 주로 P₁ 수용체를 매개로 한다고 알려져 있는데, 이중 A₁ 수용체에 작용하여 심박동수 감소^{11,12)}, 심근수축력 저하^{11,13)}, 자극전도속도 저하^{14,15)}를 유발하며, A₂ 수용체를 통하여 관상동맥 이완효과¹⁶⁾를 나타낸다고 하였다. 특히 ATP와 같은 adenine nucleotides는 일반적으로 세포 외액에 존재하는 ecto-nucleotidase들에 의해 adenosine으로 분해된 다음 P₁ 수용체에 작용하여 심장 활동을 억제시킨다고 알려져 있다^{3,17)}. 하지만 adenine nucleotides가 빠른 시간 내에 adenosine으로 분해될 수 있는지에 대해서는 근거가 부족하며, 오히려 다소 회의적인 보고들도 있다^{18,19)}. 뿐만 아니라 일부에서는 ATP등이 P₂ 수용체에 작용하여 심근세포 내 Ca⁺⁺ 농도를 증가시키고^{20,21)}, 수축력을 향진시킨다는 보고도 있다^{22,23)}.

한편 ATP에 phosphate가 하나 더 붙은 adenosine tetraphosphate(ATPP)가 골격근 세포 내에 존재함이 밝혀졌으며^{24,25)}, 최근에는 본 실험실에서 토끼의 혈소판 내에 일정 양의 ATPP가 존재하고 있다가 thrombin 투여시 세포 외액으로 유리됨을 보고한 바 있다¹⁹⁾. ATPP는 ATP에 비해 nucleotidase에 의한 분해율이 낮고

(Lee 등, unpublished), 평활근 수축에서 보다 강력한 효과를 나타내었다^{26,27,28,29)}. 하지만 ATPP의 다양한 생물학적 작용 및 이들의 수용체에 관해서는 아직 구체적으로 밝혀지지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 첫째, ATPP가 흰쥐 좌심실에서의 안정막 전압, 활동 전압 및 기계적 수축에 미치는 효과를 관찰하고, 둘째, ATPP의 작용이 직접적인 것인지 혹은 adenosine으로 분해된 후 나타나는 이차적인 작용인지를 확인하며, 셋째, 퓨린 수용체 차단제 처치 후의 작용을 비교해 봄으로써 심근에 존재하는 퓨린 수용체의 특성을 일부 밝히고자 한다.

연구대상 및 방법

암, 수 구별 없이 200~300gm의 흰 쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였으며, 후두부를 강타하여 희생시킨 뒤, 즉시 복강을 열어 하대정맥으로 heparin(500IU/kg)을 주입하고, 잠시 후 흉곽을 열어 심장을 적출하였다. 적출한 심장은 차가운 Tyrode 용액(NaCl 140, KCl 5.4 CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.3, MgCl₂ 1.0, HEPES 5, glucose 5.5mM, pH 7.4)에 담근 뒤 tissue chamber로 옮겨 좌심방을 조심스럽게 분리하였다. 분리된 좌심방의 양쪽 끝을 가는 실로 묶은 후, Tyrode 용액이 들어 있는 organ bath에 옮겼다. Bath 내의 온도는 30℃로 유지하였으며, 100% O₂ gas로 충분히 산소를 공급하였다. 이어서 좌심방 절편의 한쪽 끝을 bath 바닥에 고정하고 다른 한쪽 끝은 force transducer(FT03C, Grass, MA, U.S.A.)에 연결하였다. 절편에 300mg의 일정한 기초 장력을 가한 다음, 등척성 조건하에서 수축력의 변화를 polygraph(7E, Grass, MA, U.S.A.)에 기록하였다. 좌심방 절편의 양쪽 옆에는 백금선을 평행하게 위치시키고, 이를 stimulator(Harvard Apparatus Ltd. MA, U.S.A.)와 연결하여 전기장 자극(1 Hz, 5ms duration, 10~20V)을 가하였다. 심근 수축효과가 일정해진 뒤 ATPP를 비롯한 adenine nucleotides 및 adenosine을 일정농도가 되게 투여하고 그 변화를 관찰, 비교하였다. 또 ecto-nucleotidase의 작용을 억제한다고 알려진 α , β methylene ADP(APCP: 30 μ M)와 adenosine을 inosine으로 분해시키는 adenosine deaminase(0.5units/ml)를 함께 투여한 뒤, adenine compounds의 작용을 비교하여, 이들의 작용이 adenosine

으로 분해된 뒤 나타나는 것인지를 확인하였다.

안정막 전압 및 활동 전압을 측정하기 위하여 좌심방의 일부를 분리하여 2ml 정도 되는 tissue bath로 옮긴 뒤, 미세 텅스텐 핀으로 조직을 고정하였다. 조직의 양쪽 옆에는 백금선을 평행하게 위치하게 한 뒤, stimulator와 연결하여 전기장 자극을 가하였다. 안정막 전압 및 활동 전압을 측정하기 위한 유리 미세전극(glass microelectrode)은 직경 1mm의 microcapillary tubing(1B100F-6, WPI Inc., CT, U.S.A.)을 vertical puller(Harvard apparatus Ltd. MA, U.S.A.)로 뽑아서 3M KCl을 채운 뒤 10MΩ 정도의 저항이 되는 것을 골라 사용하였다. 이 조직에 100% O₂로 미리 포화된 30℃의 Tyrode 용액을 3ml/min의 속도로 관류시켰으며, 한시간 이상 충분히 기다려서 평형 상태에 이르게 하였다. 조직 주위에는 원형으로 된 Ag-AgCl선을 용액에 잠기게 하여 reference electrode로 사용하였다. 해부 현미경 하에서 manipulator를 사용하여 미세전극을 조직에 접근, 세포 내로 삽입시켰다. 측정된 막 전압의 변화는 micro-electrode D.C. amplifier(P16D, Grass, MA, U.S.A.)로 10배 증폭한 후 oscilloscope(Tektronix 2230, OR, U.S.A.)와 polygraph에 기록하였다. 이때 관류용액 내에 ATPP를 비롯한 adenine nucleotides를 일정 농도가 되게 가하여 심근세포의 안정막 전압 및 활동 전압에 미치는 영향을 관찰하였다.

퓨린 수용체 차단제의 영향을 관찰하기 위해 먼저 100μM ATPP에 의한 변화를 대조군으로 하고, P₁ 수용체 차단제인 DPCPX(1μM) 및 P₂ 수용체 차단제인 suramin(100μM)을 10분간 전처리 한 후 같은 양의 ATPP를 투여하여 변화의 정도를 대조군과 비교하였다.

adenosine 5'-tetraphosphate(ATPP), adenosine 5'-triphosphate(ATP), adenosine 5'-diphosphate(ADP), adenosine 5'-monophosphate(AMP), adenosine, α, β methylene ADP(APCP) 및 adenosine deaminase는 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., Mo, U.S.A.)을 사용하였으며, suramin은 Biomol 제품(Research Biochemicals international, MA, U.S.A.)을 사용하였다. DPCPX 및 adenosine은 dimethyl sulfoxide(DMSO : Merck, Darmstadt, Germany)에, 나머지 모든 시약은 생리식염수에 녹였으며, nucleotide들은 1N NaOH로 pH가 7.0이 되게 적정한 뒤 사용하기 직전까지 영하 20℃의 냉동고에 보관하였다.

결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, nucleotides 사이의 효과 비교는 ANOVA test에 의하여, 차단제의 효과 검정은 Student의 paired t-test에 의하여 p값이 0.05이하일 때를 유의한 차이의 한계로 삼았다.

결 과

ATPP가 분리된 좌심방의 수축력에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 1Hz의 빈도로 자극하면서 약물을 가하였다. 1~300μM의 ATPP를 각각 bath내에 투여하였는데, 가한 ATPP의 농도에 비례하여 심근 수축력이 억제되었다. 100μM의 ATPP를 투여하였을 때 수축력이 50% 이상 감소하였으며, 수축력 감소효과의 EC₅₀은 30.9μM이었다(Fig. 1).

안정막 전압 및 활동 전압 측정을 위하여 유리 미세전

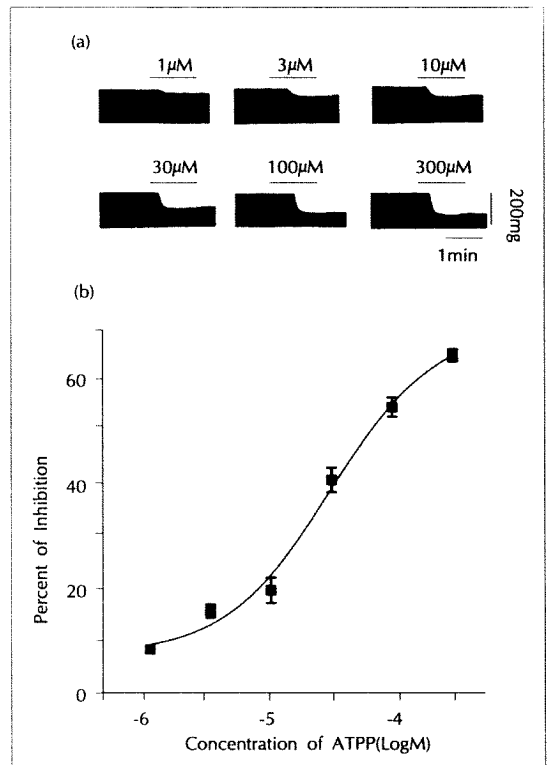


Fig. 1. ATPP에 의한 좌심방 수축력의 변화.

(a) 분리된 좌심방에 1Hz의 빈도로 전기장 자극을 가하여 이에 의한 수축력이 일정해 진 뒤, 여러 농도의 ATPP를 투여 하여 나타난 수축력의 변화이다. (b) ATPP에 의해 수축력이 감소된 정도를 투여전 수축력의 크기에 대한 백분율로 나타내었다. 수축력의 감소효과는 투여한 ATPP 농도에 의존적이었으며, EC₅₀은 30.9μM이었다.

극을 세포 내로 삽입하여 막 전압의 변화를 기록하였다. 활동 전압의 duration은 amplitude의 90%까지 재분극되는데 걸리는 시간(APD_{90})을 기준으로 비교하였다. ATPP는 안정막 전압을 과분극(hyperpolarization) 시키면서 활동 전압의 duration을 현저하게 감소시켰다 (Fig. 2). 안정막 전압의 과분극 효과와 활동 전압의

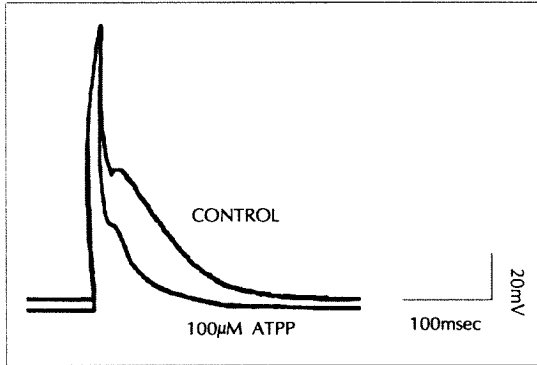


Fig. 2. ATPP에 의한 전형적인 심근세포의 막 전압 변화. 일정빈도(1Hz)로 자극을 가하여 평형 상태에 이른 좌심방 절편에 100 μ M의 ATPP를 투여한 뒤, 이에 의한 심근세포의 막 전압 변화를 기록하였다. ATPP의 투여로 인해 안정막 전압은 과분극되었으며, 활동 전압의 duration은 현저히 감소되었다.

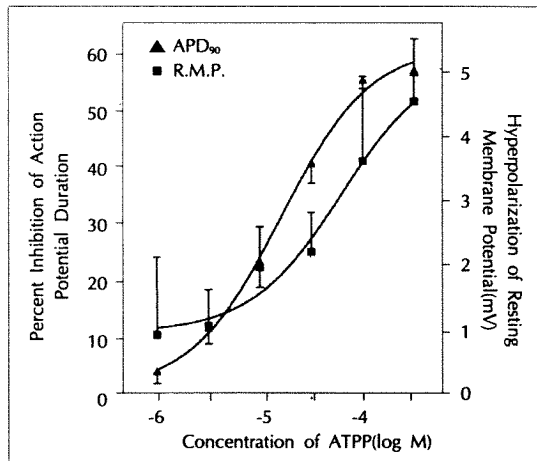


Fig. 3. ATPP가 심근세포에 안정막 전압 및 활동 전압에 미치는 영향.

1-300 μ M의 ATPP 투여로 인해 안정막 전압의 과분극 및 활동 전압 duration의 감소가 나타났으며, 이러한 효과들은 모두 가한 ATPP의 농도에 의존적이었다. 안정막 전압의 변화는 투여 전에 비하여 과분극된 전압의 크기(mV)를 나타내었으며, 활동 전압의 duration은 amplitude의 90%까지 재분극되는데 걸리는 시간(APD_{90})을 기준으로 하여 ATPP에 의해 감소된 정도를 투여 전에 대한 백분율로 나타내었다.

duration 감소 작용은 모두 투여한 ATPP의 농도에 비례하였으며, 각각의 EC_{50} 은 61.0 μ M과 16.1 μ M이었다 (Fig. 3). 그러나 활동 전압의 amplitude는 ATPP에 의하여 크게 변화되지 않았다.

여러 adenine nucleotides 및 adenosine의 수축력 및 막 전압에 미치는 효과를 비교하였다. ATPP, ATP, ADP, AMP 및 adenosine은 농도에 비례하여 심방근 수축을 억제하였으며, 이러한 효과들의 EC_{50} 은 각각 30.9, 23.2, 18.7, 28.9 μ M이었다(Fig. 4). 그러나 이들 약물간의 수축력 감소효과는 차이는 없었다($p > 0.05$). ATPP 이외의 다른 nucleotides도 안정막 전압을 과분극 시켰는데, 100 μ M의 농도에서 ATPP, ATP, ADP, AMP 및 adenosine은 각각 3.7 ± 1.3 , 3.9 ± 0.7 , 3.0 ± 0.8 , 3.7 ± 0.7 , 5.8 ± 0.6 mV 과분극 시켰다. 그러나 약물간의 유의있는 차이는 없었다($p > 0.05$). 이들 약물들은 활동 전압의 duration 역시 유의있게 감소시켰는데, 같은 농도(100 μ M)에서 비교해 볼 때 감소 정도가 각각 55.9 ± 1.5 , 53.1 ± 1.6 , 50.7 ± 1.1 , 50.1 ± 2.0 및 $55.4 \pm 1.3\%$ 이었으나 각 약물간의 차이는 없었다($p > 0.05$). 한편 ATPP에서와 마찬가지로 이들 nucleotides 나 adenosine은 활동 전압의 amplitude에는 영향을

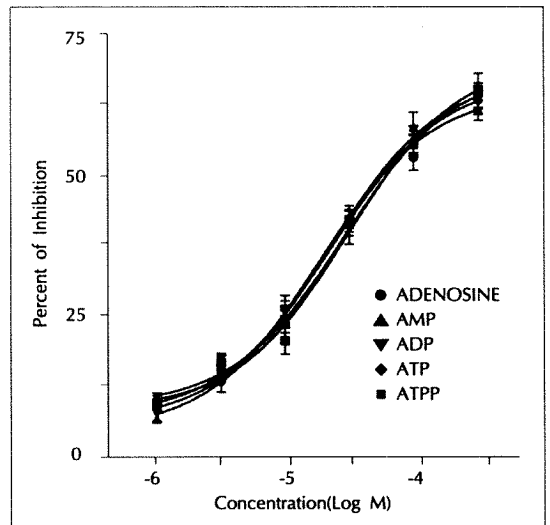


Fig. 4. Adenine nucleotides adenosine의 수축력 억제효과 비교.

1-300 μ M의 ATPP, ATP, ADP, AMP 및 adenosine에 의한 좌심방 수축력 억제 효과를 비교하였다. 수축력이 감소된 정도는 투여전 수축력 크기에 대한 백분율로 나타내었다. 이들은 모두 농도에 비례하여 수축력을 억제하였으나, 약물간의 감소효과는 차이가 없었다($p > 0.05$).

주지 않았다.

ATPP가 작용하는 수용체를 확인하기 위하여 퓨린 수용체 차단제를 전처치 한 후, 이에 의한 영향을 관찰하였다. P_1 퓨린 수용체 중 A_1 수용체 차단제인 DPCPX ($1\mu M$)를 전처치 한 경우, ATPP에 의한 안정막 전압 과분극 및 활동 전압 duration 감소현상이 거의 차단되었다. ATPP에 의한 수축력 억제효과도 DPCPX에 의하여 완전히 차단되었으며, 이때는 오히려 수축력 증가현상이 나타나기도 하였다(Fig. 5). 반면 비선택적 P_2 퓨린 수용체 차단제인 suramin($100\mu M$)은 ATPP의 작용, 즉 수축력 억제, 활동 전압 duration 감소 그리고 과분극 작용, 어느 것에도 영향을 주지 않았다.

위에서 나타난 ATPP의 효과가 직접적인 것인지 혹은 adenosine으로 분해된 후 나타나는 이차적인 작용인지를 확인하기 위하여 adenosine으로 분해시키는 5'-nucleotidase의 억제제인 APCP($30\mu M$), 그리고 일부 분해되어 생성된 adenosine을 생리적 효과가 없는 inosine으로 변환시키는 adenosine deaminase(0.5 units/ml)를 미리 전처치 한 후 adenine nucleotides 및 an-

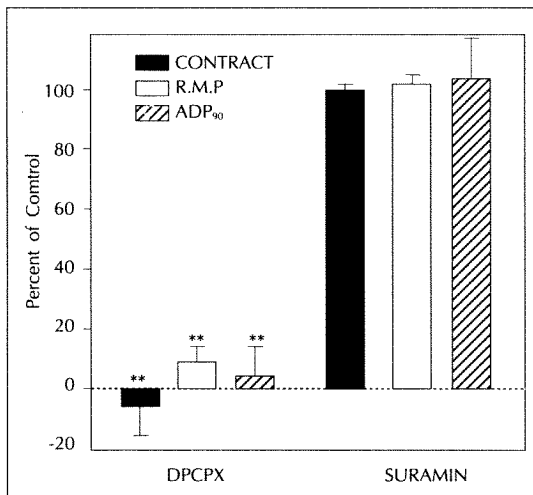


Fig. 5. 퓨린 수용체 차단제가 ATPP에 의한 심근 수축력 및 막 전압 변화에 미치는 영향.

먼저 $100\mu M$ 의 ATPP 및 adenosine에 의한 수축력 및 막 전압 변화를 관찰하여 이를 대조군으로 하였으며, P_1 수용체 차단제인 DPCPX($1\mu M$) 또는 P_2 수용체 차단제인 suramin($100\mu M$)을 10분간 전처치 한 후 같은 양의 ATPP를 투여하여 이에 의해 변화된 정도를 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. DPCPX는 수축력(CONTRACT), 안정막 전압(RMP) 및 활동 전압 duration(APD_{90})의 변화를 현저히 차단하였으나, suramin은 어느 것에도 영향을 미치지 않았다. **는 $p < 0.01$ 임.

adenosine의 효과를 관찰하였다. ATPP, ATP, ADP 및 AMP의 효과는 위의 전처치 후에도 각각 대조군의 95.4, 98.7, 90.2, 94.6%로 큰 차이가 없으나, adenosine의 효과만이 대조군에 비해 20.4%로 크게 감소하였다 ($p < 0.01$). Fig. 6에서와 같이 APCP 및 adenosine deaminase의 전처치가 ATPP의 효과에 크게 영향을 주지 못한 점으로 볼 때, ATPP의 작용은 adenosine으로 분해되어서가 아니라 퓨린 수용체에 직접 작용하여 나타난 결과라 생각된다.

고 안

세포 외액의 adenine nucleotides가 증가하는 요인으로는 크게 세포의 용해로 인한 유리, 세포막의 투과도 증가 그리고 과립의 형태로 방출(exocytosis)을 들 수 있다¹⁰⁾. 이 중 가장 잘 알려진 것은 혈소판에 저장되어 있던 고농도의 nucleotides가 과립 형태로 방출된 것으로, 이들이 세포 외액으로 유리됨으로 인해 ADP나 ATP의 혈장 농도가 $20\mu M$ 까지 증가한다고 하였다^{30,31)}. 그 외에도 다양한 경로를 통해 세포 외액으로 유리된

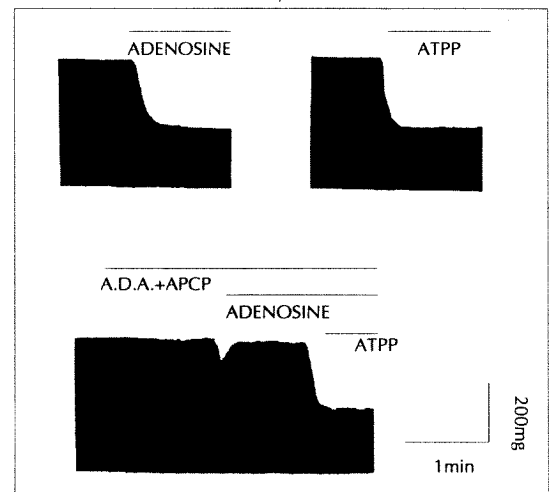


Fig. 6. APCP와 adenosine deaminase가 ATPP 및 adenosine에 의한 심근 수축력 변화에 미치는 영향.

먼저 $100\mu M$ 의 ATPP 및 adenosine에 의한 수축력의 변화를 관찰하여 이를 대조군으로 하였으며, nucleotidase의 억제제인 APCP($30\mu M$)와 adenosine을 inosine으로 전환시키는 adenosine deaminase(0.5 units/ml)를 미리 전처치 한 후에 다시 ATPP 및 adenosine을 투여하여 변화의 정도를 대조군과 비교하였다. Adenosine의 효과는 위의 전처치로 거의 억제된 반면, ATPP의 효과는 크게 영향을 받지 않는다.

adenine compounds는 혈소판 응집작용, 혈관 평활근 이완, 심박동수 및 수축력 변화 등 심혈관계에 많은 영향을 미친다⁴¹. 뿐만 아니라 adenosine이나 ATP는 상심실성 부정맥(supraventricular arrhythmia)의 치료에 사용되기도 하고^{32,33}, 심근 허혈시 손상을 줄이고, 회복에 도움을 주는 등 다양한 효과를 나타낸다고 알려져 있다^{34,35}. ATP 역시 토끼의 혈소판 등에 존재하는 내인성 nucleotides로서(Lee 등, 1995a) 자극에 의해 방출된 뒤 다양한 생리작용을 나타낼 것으로 생각된다^{27,28}.²⁹, 공 등(1991)에 의하면 흥미롭게도 ATP는 혈압에 이원적으로 영향을 미치는데, 정상혈압군에서는 동맥압을 감소시켰으나, 출혈로 인한 저혈압 군에서는 오히려 동맥압을 증가시켰다³⁶. 그러나 아직 자세한 ATP의 효과 및 역할은 알려지지 않고 있다.

전기장 자극을 통해 일정 빈도(1 Hz)로 수축을 유도한 흰쥐의 좌심방에 ATP를 가하였을 때, 투여한 ATP의 농도에 의존적으로 수축력이 억제되었다(Fig. 1). 이러한 효과의 기전을 보다 이해하기 위하여 심근세포의 안정막 전압 및 활동 전압에 미치는 영향을 관찰하였다. ATP는 역시 농도에 비례하여 안정막 전압을 과분극(hyperpolarization) 시켰으며, 활동 전압의 duration을 두드러지게 감소시켰다(Fig. 2). 심근 활동 전압의 duration은 주로 Ca^{++} 유입에 의해 나타나는 plateau phase의 duration에 의해 결정되므로, 이는 세포 내로의 Ca^{++} 유입 정도를 직접적으로 반영한다³⁷. 심근세포에서 세포 내로의 Ca^{++} 유입 통로는 주로 막 전압 의존성 통로로서, 이 통로의 활성화는 크게 두 가지 요소에 의해 영향을 받게 된다. 그 중 하나는 안정막 전압의 탈분극이나 과분극현상이며, 다른 하나는 이온통로를 이루고 있는 단백질이 인산화된 정도에 따른 변화이다³⁸. 본 실험에서와 같이 안정막 전압이 과분극되면 통로를 통한 Ca^{++} 유입이 감소하게 되며, 따라서 이는 활동 전압의 duration 감소 및 수축력 억제에 있어서 중요한 기전으로 작용할 수 있다³⁹. 이미 adenosine은 심방 세포에서 K^+ 통로($I_{KAch, Ado}$)를 활성화시킨다고 알려져 있으므로⁴⁰, 다른 adenine nucleotides 역시 이와 같이 K^+ 이온의 세포 밖 유출에 의하여 안정막 전압의 과분극 현상이 나타날 것으로 생각된다. 한편 이온통로의 일부가 인산화 되게 되면 통로의 활성화로 인해 Ca^{++} 유입이 증가하게 되는데, 이러한 인산화의 정도는 cyclic adenosine 5'-monophosphate(cAMP)와 같은

세포내 이차전달물질에 의해 많은 영향을 받는다³⁸. 예를 들어 교감신경계 β -효현제를 투여하여 심근 세포내 cAMP 생성을 증가시키면, 이에 의해 활성화되는 cAMP-dependent protein kinase(protein kinase-A)에 의해 Ca^{++} 통로의 일부가 인산화 되게 되고, 이로 인해 Ca^{++} 의 유입이 증가하게 된다⁴¹. 반면 adenosine은 이와 반대로 cAMP생성을 억제하게 되며, 이로 인해 Ca^{++} 유입이 감소하게 된다고 보고 된 바 있다⁴². 본 실험 결과에서 나타난 adenine nucleotides 및 adenosine에 의한 수축력 감소 효과들도 위의 두 가지 기전들과 관련되어 나타난 변화로 생각되어 진다. 흥미로운 점은 adenine compounds 투여시 대부분 안정막 전압의 과분극 현상이 먼저 관찰되었으며, 활동 전압의 duration은 수분에 걸쳐 천천히 감소한다는 점이다. 이는 활동 전압의 duration 감소 기전의 일부가 이차전달물질의 변화로 인해 나타나는 효과이므로 다소 시간이 걸리기 때문이라 생각되어 진다.

퓨린 수용체 차단제를 투여한 결과, ATP의 효과는 P_1 수용체 차단제에 의해 매우 효과적으로 차단되었으며(Fig. 5), 이러한 결과는 ATP의 효과 역시 동일하였다(결과에 나타내지 않았음). 일반적으로 P_1 수용체에 대한 효현제들의 효능은 adenosine이 가장 강력하고 ATP는 직접적으로 거의 효과가 없다고 알려져 있으며⁹, 일부 ATP는 먼저 adenosine으로 분해된 뒤에야 작용을 나타낼 것이라 하였다⁴³. 하지만 본 실험 결과에 따르면 두 가지 점으로 볼 때 ATP나 ATP에 의한 효과가 adenosine으로 분해되어서 나타났다고는 보기 어렵다. 첫번째로는 수축력과 막 전압 변화 모두에서 ATP 및 ATP의 효과가 adenosine에 비해 큰 차이가 없다는 점인데(Fig. 4), 이러한 현상은 adenosine으로 분해되는 속도가 아주 빠르지 않는 이상 나타나기 어렵다. 두번째로는 adenosine으로의 분해를 차단하는 APCP와 생성된 adenosine을 inosine으로 변화시키는 adenosine deaminase의 투여에도 불구하고 ATP 등의 효과에는 변화 없이 adenosine의 효과만 차단된 점이다(Fig. 6). 이러한 결과들은 ATP나 ATP가 분해되지 않고 직접 수용체에 작용하여 효과를 나타낸다는 증거가 될 수 있으며, 따라서 이들이 작용하는 수용체는 P_1 수용체와 차이가 있을 뿐 아니라 기존의 P_1 과 P_2 수용체 분류로는 쉽게 설명되지 않는다.

일부 문헌에서 본 실험 결과와 유사하게 adenine

nucleotides간의 효능이 거의 같고⁴³⁾, adenosine deaminase에 의해 adenosine의 효과만이 차단되거나^{18,44)}, adenosine uptake blocker에 의해 adenosine의 작용만이 강화되는 등⁴⁵⁾ 이들이 adenosine으로 분해되어 나타나는 효과가 아님에도 불구하고, P₁ 수용체 차단제에 의해 선택적으로 차단되는 현상을 각각 다른 조직들에서 보고한 바 있다. Matsuoka 등(1995)은 ATP의 분해 정도를 HPLC를 이용하여 직접 측정한 결과, 배양 45분까지 생성된 adenosine이 투여한 ATP의 5%이하로 나타났다¹⁸⁾. 따라서 조직간의 차이를 감안하더라도 ATP가 수분 내로 분해될 수 있다고는 생각하기 어렵다. Shinozuka 등은 이러한 결과를 바탕으로 P₃ 수용체(혹은 A₃ 수용체)라고 분류하기도 하였으나⁴⁵⁾, 아직 이에 대한 근거 및 이해가 부족한 상태이다.

본 실험을 통하여 ATPP는 흰쥐의 좌심방에서 다른 adenine nucleotides 및 adenosine과 함께 심근 수축력의 저하, 안정막 전압의 과분극 현상 및 활동 전압의 duration을 감소시키는 등 여러 생리적 작용을 나타내었으며, 이러한 효과는 adenosine으로 분해되어서 나타나는 것이 아니라 직접 수용체에 작용하여 나타남을 알 수 있다. ATPP를 비롯한 adenine nucleotides 및 adenosine이 작용하는 수용체는 기존의 P₁/P₂ 수용체 분류에는 잘 부합되지 않는 면이 있으며, 따라서 이러한 수용체의 특성에 관한 보다 명확한 규명이 앞으로 해야 할 과제라 생각된다. 그리고 내인성 nucleotides인 ATPP의 생리적 작용을 다양히 밝히는 일 역시 ATPP의 생리적 역할 및 치료에의 응용에 도움을 줄 수 있으리라 기대된다.

요 약

연구배경 :

Adenosine 5'-tetraphosphate(ATPP)는 생체내 존재하는 내인성 nucleotide로서, 세포내에 저장되어 있다가 자극시 세포 외액으로 방출되어 여러 생물학적 작용을 나타낸다. 하지만 이들의 다양한 작용들은 아직 거의 알려지지 못하였으며, 이들이 작용하는 수용체 역시 명확히 규명되지 못한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 ATPP가 흰쥐 좌심방의 기계적 수축과 안정막 전압 및 활동 전압에 미치는 효과를 관찰하고, 이들이 작용하는 수용체의 특성을 규명하고자 하였다.

방 법 :

흰쥐의 좌심방을 적출한 뒤 좌심방 절편을 force transducer에 연결하여, 전기적 자극을 가하면서 이에 의한 기계적 수축력의 변화를 polygraph에 기록하였다. 막 전압 측정을 위하여 10MΩ 정도의 저항을 가진 유리 미세전극을 세포 내로 삽입한 뒤, 전기적 자극에 따라 나타나는 막 전압의 변화를 DC amplifier로 증폭하여 oscilloscope 및 polygraph에 기록하였다.

결 과 :

1Hz의 빈도로 일정하게 수축하는 좌심방에서 ATPP는 투여한 농도에 비례하여 수축력을 억제하였다. 또한 ATPP는 안정막 전압을 과분극 시켰으며, 활동 전압의 duration을 크게 감소시켰다. 그러나 nucleotide 간의 차이는 없었다. ATPP가 작용하는 수용체를 확인하기 위하여 수용체 차단제를 투여한 결과, DPCPX(P₁ 퓨린 수용체 차단제)를 전처리 하였을 경우는 ATPP의 작용이 모두 차단된 반면, suramin(P₂ 퓨린 수용체 차단제)은 크게 영향을 미치지 못하였다. α, β methylene ADP와 adenosine deaminase를 미리 전처리하여 adenosine으로의 분해 및 생성된 adenosine을 불활성화 시킨 경우에도 ATPP를 비롯한 다른 adenine nucleotides의 효과에는 거의 영향 없이 adenosine의 효과만이 억제되었다.

결 론 :

ATPP는 좌심방의 수축력을 저하시키고, 안정막 전압의 과분극 및 활동 전압의 duration을 감소시킨다. 이러한 효과는 ATPP가 adenosine으로 분해되어서가 아니라 퓨린 수용체에 직접 작용하여 나타난 결과라 생각된다.

References

- 1) Drury AN, Szent-Györgyi A : *The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart.* J Physiol 68 : 213-237, 1929
- 2) 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
- 3) Burnstock G, Meghji P : *The effect of adenylyl compounds on the rat heart.* Br J Pharmacol 79 : 211-218,

1983

- 4) Olsson RA, Pearson JD : *Cardiovascular purinoceptors. Physiol Rev* 70 : 761-845, 1990
- 5) 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
- 6) Krishtal OA, Marchenko SM, Obukhov AG : *Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons. Neuroscience* 27 : 995-1000, 1988
- 7) Illes P, Norenberg W : *Neuronal ATP receptors and their mechanism of action. Trends Pharmacol Sci* 14 : 50-54, 1993
- 8) 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
- 9) Burnstock C : *Purinergic mechanisms. Ann New York Acad Sci* 603 : 1-17, 1990
- 10) Boeynaems JM, Pearson JD : *P₂-purinoceptors on vascular endothelial cells : physiological significance and transduction mechanisms. Trends Pharmacol Sci* 11 : 34-37, 1990
- 11) Collis MG : *Evidence for A₁-adenosine receptors in the guinea pig atrium. Br J Pharmacol* 78 : 207-212, 1983
- 12) Evans DB, Schenden JA, Bristol JA : *Adenosine receptors mediating cardiac depression. Life Sci* 31 : 2425-2432, 1982
- 13) Hughes PR, Stone TW : *Inhibition by purines of the inotropic action of isoprenaline in rat atria. Br J Pharmacol* 80 : 149-153, 1983
- 14) Belardinelli L, Fenton RA, West A, Linden J, Althaus JS, Berne RM : *Extracellular action of adenosine and the antagonism by aminophylline on the atrioventricular conduction of isolated perfused guinea pig and rat heart. Circ Res* 51 : 569-579, 1982
- 15) Berne RM, Di Marco JP, Belardinelli L : *Dromotropic effects of adenosine and adenosine antagonists in the treatment of cardiac arrhythmias involving the atrioventricular node. Circulation* 69 : 1195-1197, 1984
- 16) Ramagopal MV, Chitwood RW, Mustafa SJ : *Evidence for an A₂ adenosine receptor in human coronary arteries. Eur J Pharmacol* 151 : 483-486, 1988
- 17) Ragazzi E, Wu SN, Shryock J, Belardinelli L : *Electrophysiological and receptor binding studies to assess activation of the cardiac adenosine receptor by adenine nucleotides. Circ Res* 68 : 1035-1044, 1991
- 18) Matsuoka I, Zhou Q, Ishimoto H, Nakanishi H : *Extracellular ATP stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C through distinct purinocpetors in NG108-15 cells. Mol Pharmacol* 47 : 855-862, 1995
- 19) Lee JW, Chun SJ, Kong ID, Jeong SW : *Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. Kor J Physiol* 29(2) : 217-223, 1995
- 20) Danziger RS, Raffaelli S, Moreno-Sanchez R, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford RG, Lakatta EG : *Extracellular ATP has a potent effect to enhance cytosolic calcium and contractility in single ventricular myocytes. Cell Calcium* 9 : 193-199, 1988
- 21) De Young MB, Scarpa A : *ATP receptor-induced Ca⁺⁺ transients in cardiac myocytes : sources of mobilized Ca⁺⁺. Am J Physiol* 257 : C750-C783, 1989
- 22) Legssyer A, Poggioli J, Renard D, Vassort G : *ATP and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol triphosphate production in rat heart. J Physiol* 401 : 185-199, 1988
- 23) Frolidi G, Pandolfo L, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, Fassina G : *Dual effect of ATP and UTP on rat atria : which types of receptors are involved? Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349 : 381-386, 1994
- 24) Marrian DH : *A new nucleotide. Biochim Biophys Acta* 13 : 278-281, 1954
- 25) Small GD, Cooper C : *Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. Biochemistry* 5 : 26-33, 1966
- 26) Taylor DA, Wiese S, Faison EP, Yarbrough GG : *Pharmacological characterization of purinergic receptors in the rat vas deferens. J Pharmacol Exp Ther* 224 : 40-45, 1983
- 27) Lee JW, Jeong SW, Kong ID : *Effects of various nucleotides on the contraction of rat tracheal smooth muscle. New Med J* 34(8) : 31-36, 1991
- 28) Lee JW, Kong ID, Chun SJ, Park KS, Lee JM : *Studies on the characteristics of the purinoceptors in the uterine smooth muscle. New Med J* 37(3) : 37-43, 1994
- 29) Lee JW, Kong ID, Park KS, Jeong SW : *Effects of adenosine tetraphosphate(ATPP) on vascular tone in*

- the isolated rat aorta. *Yonsei Med J* 36(6) : 487-496, 1995
- 30) Born GVR, Dratzer MAA : Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during hemostasis in rats, rabbits and man. *J Physiol Lond* 354 : 419-429, 1984
 - 31) Gordon JL : Extracellular ATP : Effects, sources and fate. *biochem J* 233(2) : 309-319, 1986
 - 32) DiMarco JP, Sellers TD, Berne RM, West GA, Belardinelli L : Adenosine : Electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* 68 : 1254-1263, 1983
 - 33) Belhassen B, Glick A, Laniado S : Comparative clinical and electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and verapamil on paroxysmal reciprocating junctional tachycardia. *Circulation* 77 : 795-805, 1988
 - 34) Wainwright CL, Parrat JR : An antiarrhythmic effect of adenosine during myocardial ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 145 : 183-194, 1988
 - 35) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM : Intravenous pretreatment with A₁-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 85 : 659-665, 1992
 - 36) Kong ID, Jeong SW, Lee JW : Effects of adenosine tetraphosphate on the rat cardiovascular system. *New Medical J* 34 : 53-61, 1991
 - 37) Katz AM : Cardiac action potential, In *Physiology of the heart*, 2nd Ed. p438-472, New-York, New-York, Raven Press Ltd, 1992
 - 38) Hille B : Modulation, slow synaptic action and second messengers, In *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd Ed. p170-201, Sunderland, Mass, Sinauer Assoc Inc, 1992
 - 39) Visentin S, Wu SN, Belardinelli L : Adenosine-induced changes in atrial action potential : Contribution of Ca⁺⁺ and K⁺ current. *Am J Physiol* 258 : H1070-1078, 1990
 - 40) Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T : On the mechanisms of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells : Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 407 : 264-274, 1986
 - 41) Hartzell HC, Fischmeister R : Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca⁺⁺ current in single heart cells. *Nature* 323 : 273-275, 1986
 - 42) Kato M, Yamaguchi H, Ochi R : Mechanism of adenosine-induced inhibition of calcium current in guinea pig ventricular cells. *Circ Res* 67 : 1134-1141, 1990
 - 43) Griesse M, Gobran LI, Rooney SA : A₂ and P₂ purine receptor interactions and surfactant secretion in primary cultures of type II cells. *Am J Physiol* 261 : L140-L147, 1991
 - 44) Tada S, Okajima F, Mitsui Y, Kondo Y, Ui M : P₂ purinoceptor-mediated cyclic AMP accumulation in bovine vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 227 : 25-31, 1992
 - 45) Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP : Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 338 : 221-227, 1988