백서 기도 평활근 장력에 미치는 Benzodiazepine의 효과

충남대학교 의과대학 마취과학교실 및 *가톨릭대학교 성가병원 마취과

김태관* · 김혜자 · 신웅섭 · 윤석화 · 박종욱*

= Abstract =

The Inhibitory Effects of Midazolam and Diazepam on Smooth Muscle Tension in Rat Trachea

Tae Kwan Kim, M.D.*, Hae Ja Kim, M.D., Yong Sup Shin, M.D.
Seok Hwa Yoon, M.D., and Jong Wook Park, M.D.*

Department of Anesthesiology, Chungnam National University College of Medicine,
Taejeon, Korea; *Department of Anesthesiology, The Catholic University of Korea,
Holy Family Hospital, Puchon, Korea

Background: It has been demonstrated that a group of minor tranquilizers, benzodiazepines, are able to relax airway smooth muscle, but the mechanism by which these agents produce muscle relaxation are not fully understood. This study was undertaken to determine the effects and mechanism of diazepam and midazolam on Ca^{2+} and K^{+} channel in isolated rat trachea muscles by measuring isometric tension.

Methods: Our experiment was performed to evaluate the effects of midazolam and diazepam by cumulative administration from 10^{-6} M to 3×10^{-5} M to tracheal smooth muscle contraction which was induced by contractile agonists such as ACh 10^{-5} M, carbachol 3×10^{-7} M, and KCl 40 mM. The effects of midazolam and diazepam were evaluated on Ca^{2+} and K^{+} channels by inhibition of contraction using a nonspecific K^{+} channel blocker such as tetraethyl ammonium (TEA) elicited by a 2 mM Ca^{2+} space addition to Ca^{2+} free on high K^{+} depolarizing rat tracheal muscle. Also, to elucidate any mechanism involved, the effects of flumazenil (a specific central antagonist of benzodiazepines), propranolol (a beta adrenergic antagonist), and atropine (a muscarinic antagonist) and tracheal epithelium removal were examined.

Results: In a concentration-dependent way, both midazolam and diazepam relaxed airway smooth muscle directly and had inhibitory effects on voltage-dependent Ca^{2+} (VDCC) and K^{+} channels.

Conclusions: These results suggest that benzodiazepines relax airway smooth muscle, not via a neural pathway or benzodiazepine receptor but through a direct action on Ca^{2+} and K^{+} channels. Benzodiazepine enhanced K^{+} conductance, leading to a decrease in VDCC opening, thus reducing Ca^{2+} through the voltage-dependent Ca^{2+} channel, in addition to inhibiting of intracellular Ca^{2+} release. (Korean J Anesthesiol 2000; 39: 381~391)

Key Words: Anesthetics, intravenous: diazepam; midazolam. Airway: trachea; smooth muscle.
Ions: Ca^{2+} channel; K^{+} channel. Pharmacology: tetraethyl ammonium.

논문접수일 : 2000년 5월 3일

책임저자 : 김혜자, 대전시 중구 대사동 640, 충남대학교 의과대학 마취과학교실, 우편번호: 301-721

Tel: 042-220-7840, Fax: 042-220-7968, E-mail: hjkim@cnuh.co.kr

서 론

Benzodiazepine계 약물은 마취 전처치, 국소 마취나 전신 마취에서 보조 마취제 또는 심혈관계가 불안정한 환자에서 마취 유도제로서 사용되며 barbiturate보다 심혈관계나 호흡기계 억제 작용이 적고, 안전역이 넓으며 특이한 금기사항이 없고 특별한 효소 유도를 하지 않고 선행성 기억상실을 나타내므로 많이 선호되고 있다.^{1,2)} 주로 임상에서 쓰이는 약제로는 midazolam, diazepam과 lorazepam이 있으며 midazolam은 수용성이며 높은 역가와 짧은 작용시간으로 마취 유도제로 사용되며 diazepam은 매우 효과적인 항경련 작용이 있어 파상풍이나 뇌성마비 환자의 근육강직이나 연축 치료에 이용된다.³⁾

Benzodiazepine의 주된 작용 기전은^{1,2)} 중추 신경계 특히 대뇌 피질에 있는 특수 수용체에 작용하여 신경전달 억제물질인 GABA (Gamma-Aminobutyric acid)의 생성을 촉진하고 GABA의 염소이온(Cl⁻)에 대한 세포막 투과를 증가시키므로 세포가 과극성화되어 정상적인 신경기능을 억제하게 됨으로써 작용을 나타내는데 benzodiazepine의 항불안, 항경련, 근육 이완 효과는 GABA 수용체에 의해 매개되는 반면, 수면효과는 전위 의존성 칼슘 이동의 변화로 매개된다고 추측된다.^{4,5)}

임상에서 흔히 사용되고 있는 benzodiazepine의 기도 평활근 장력에 미치는 효과의 기전에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 그러나, 최근 midazolam의 심근과 혈관 평활근의 작용에 대한 연구에서 benzodiazepine의 말초 결합 부위보다는 직접 세포막 부위의 Ca²⁺ 통로에 작용하여 이 통로를 통한 Ca²⁺ 이온의 이동을 억제함으로써 심근 수축력 감소와⁶⁾ 혈관 확장 작용을^{7,8)} 유발하여 마취 유도시 또는 마취유지 동안에 일시적으로 저혈압을 나타낼 수 있다는 보고가 제시되었다.

또한 midazolam은 기도 평활근에서도 muscarine 수용체의 촉진제, serotonin, histamine 등의 기도 수축제나 고농도의 K⁺으로 탈분극되어 수축된 기도 평활근을 직접 이완시킨다고 알려져 있다.^{9,10)} 이러한 이완 작용은 benzodiazepine의 말초 수용체나 GABA 수용체에 작용하기보다는 cholinesterase의 활성을 촉진하거나⁹⁾ 또는 기도 평활근에 직접 작용하여 이완시킨 것으로 이는 심근이나 혈관 평활근에서와 같이

Ca²⁺ 통로를 통한 Ca²⁺ 이온의 이동과 관련이 있다는 연구가 있다.^{10,11)} 그러나, 이에 대한 세포내 기전은 충분히 밝혀지지 않았다.

따라서 저자들은 백서 기도 평활근에서 서로 다른 작용기전으로 기도 평활근을 수축시킨 후, benzodiazepine계 약물인 midazolam과 diazepam을 누적 투여하여 기도 평활근에 대한 작용에 대해 알아보고, 기도상피 제거와 β -adrenergic 길항제인 propranolol, benzodiazepine의 중추 길항제인 flumazenil 및 muscarine 수용체의 길항제인 atropine을 투여하여 기도 평활근 이완에 대한 효과와 세포막의 Ca²⁺과 K⁺ 이온 통로를 통한 이완 기전에 대하여 알아보려고 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

실험 동물은 한국화학연구소에서 4주령 되는 수컷의 백서를 분양 받아 본 실험실 동물사육실에서 4-5주간 사육하여 체중이 200-250 gm으로 자란 백서 60마리를 실험대상으로 하였다. 백서를 ether가 들어 있는 통속에 넣어 기절시킨 뒤 즉시 흉곽을 절개하여 기도를 적출하였다. 적출한 기도는 즉시 100% 산소를 통기시키는 실온의 tris 완충 Tyrode 용액이 들어 있는 실험접시 내에서 기도 주위의 결체조직을 제거하여 폭이 2 mm인 두 개의 환상절편을 적출하였다.

한편, 기도 평활근의 상피 세포 제거를 위하여서는 stainless wire를 이용하여 기도 절편조직을 3-4 회 정도 부드럽게 문질렀다. 그리고, 이 각각의 절편을 37°C에서 100% 산소로 평형을 이룬 용액 Tris 완충 Tyrode 용액이 들어있는 50 ml 두 개의 실험 용기에 각각 옮겨 절편의 한쪽 끝은 근육 고정기에 연결하고 다른 쪽 끝은 근수축 변환기(Force Transducer, Hugo Sachs, Electron, Co., Germany)에 연결하여 생리 기록기(Polygraph)를 통하여 등축성 수축을 기록할 수 있도록 하였다. 휴지기 장력을 2.0 gm으로 하여 120분간 평형시기를 유지하였으며 이 시기에 20 분 간격으로 Tris 완충 Tyrode 용액을 교환하였다.

실험용액은 Tris 완충 용액을 이용하였으며, 이의 조성은 1 liter당 NaCl 158 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucose 6 mM, Tris 6 mM로 이루어졌으며 37°C에서 100% 산소가 지속적으로 용액에 주입되도록 하였다. 이 용액에 prostaglandin 생합

성 저해작용을 나타내는 indomethacine 10^{-5} M과 교감신경 차단제인 guanethidine 10^{-6} M을 첨가하여 자발적인 장력의 발생과 장력 저해의 요인을 피하도록 하였다. 실험에서 사용된 midazolam과 diazepam 및 flumazenil은 한국로슈의 제품을 사용하였다. Acetylcholine (ACh), KCl, carbachol (CCh), Ethylene Glycol-bis β -Aminoethyl (Ether)-N,N,N',N'-Tetracetic Acid (EGTA), TEA (Tetraethyl-ammonium) 등의 약제들은 Sigma Chemical Co. (St. Louise, USA)의 제품이었으며, propranolol과 atropine은 Zeneca의 제품을 사용하였다.

실험 방법으로 기도 평활근 수축제에 대한 midazolam과 diazepam이 기도 평활근에 미치는 효과를 보기 위하여 먼저 ACh 10^{-5} M을 투여한 기도절편을 최대 수축시켜 평형을 유지시킨 다음 midazolam과 diazepam을 각각 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M (10^{-6} M - 3×10^{-5} M)을 점차 누적적으로 투여하여 용량반응 곡선(cumulative dose-response curve)을 구하였다.

수축의 발생 정도는 ACh 10^{-5} M에 의한 수축을 100%로 간주하여 상대적인 수축의 변화로 나타내었다. 그 다음 CCh 3×10^{-7} M으로 기도절편을 최대 수축시켜 평형을 유지시킨 후에 midazolam과 diazepam을 각각 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M (10^{-6} M - 3×10^{-5} M)을 점차 누적적으로 투여하여 용량 반응곡선(cumulative dose-response curve)을 구하였다. 수축의 발생 정도는 CCh 3×10^{-7} M에 의한 수축을 100%로 간주하여 상대적인 수축의 변화로 나타내었으며 다음은 KCl 40 mM로 기도 평활근 절편을 최대 수축시킨 후 midazolam과 diazepam을 각각 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M (10^{-6} M - 3×10^{-5} M)을 점차 누적적으로 투여하여 용량 반응곡선(cumulative dose-response curve)을 구하였다. 수축의 발생 정도는 K⁺ 40 mM에 의한 수축을 100%로 간주하여 상대적인 수축의 변화로 나타내었다.

기도 평활근에 영향을 미치는 여러 인자들에 대해 midazolam과 diazepam이 미치는 영향을 보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 기도내피 인자와의 관련성을 알아보기 위해 기도내피가 제거되지 않은 기도 군과 제거된 기도 군으로 각각 나누어 ACh 10^{-5} M을 투여하여 기도를 수축시킨 후 midazolam

과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 장력에 대한 효과를 관찰, 비교하였다. 이때 절편의 기도내피의 존재유무를 확인하기 위하여 수축제로 최대 수축시킨 후 기도절편에 ACh 10^{-6} M을 투여하여 최대 수축력의 80% 이상 유지하는 것을 내피가 제거된 기도절편으로 간주하였다.

Propranolol과의 관계를 보기 위하여 ACh 10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 수축을 발생시킨 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 이완을 관찰한 후 (대조군) Tris 완충 용액으로 세척한 다음에 ACh 10^{-5} M을 투여하여 수축을 유발한 후 약 20분 뒤에 propranolol 10^{-6} M을 전 처치 투여한 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M 각각 투여하여 기도 평활근 장력에 미치는 영향을 관찰하였다. 다음은 ACh 10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 수축을 발생시킨 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 이완을 관찰한 후 (대조군) Tris 완충 용액으로 세척한 다음 ACh 10^{-5} M을 투여하여 수축을 유발시킨 뒤 약 20분 후에 flumazenil 10^{-6} M을 전 처치 투여한 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 장력에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 다음 KCl 40 mM을 투여하여 기도 평활근 수축을 발생시킨 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 이완을 관찰한 후 (대조군) Tris 완충 용액으로 세척한 후에 KCl 40 mM을 투여하여 수축을 유발시킨 뒤 약 20분 후에 atropine 10^{-6} M을 전처치로 투여하고 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 장력에 미치는 영향을 관찰하였다.

다음으로 midazolam과 diazepam이 기도 평활근 이완작용에 미치는 작용과 Ca²⁺ 및 K⁺ 통로와의 관계를 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. Midazolam과 diazepam의 세포내로의 Ca²⁺ 이동에 미치는 영향을 관찰하고자 먼저 정상 Tyrode 용액에서 KCl 40 mM로 최대 수축을 관찰한 후 기도 절편을 세척하고, Ca²⁺ 제거 완충 Tyrode 용액에서 잔류한 Ca²⁺를 제거하기 위하여 0.2 mM의 EGTA를 투여한 다음 KCl 40 mM을 투여하여 평활근 수축이 발생하지 않음을 확인한 후, Ca²⁺ 2 mM을 투여하고 수축 절편을 관찰하여 세포내 Ca²⁺ 변화의 대조군으로 하였다. 그 후 마찬가지로 Ca²⁺ 제거 완충 Tyrode 용액에

서 잔류한 Ca^{2+} 를 제거하기 위하여 0.2 mM EGTA를 투여하고 midazolam과 diazepam을 각각 3×10^{-5} M로 전처치한 다음 KCl 40 mM을 투여하고 절편의 수축이 없음을 확인한 후 Ca^{2+} 2 mM을 투여하고 절편 수축을 관찰 비교하여 실험군으로 하였다. 수축의 발생 정도는 KCl 40 mM에 의한 수축을 100%로 간주하여 상대적인 수축 변화로 나타내었다. K^{+} 통로를 보기 위하여 ACh 10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 수축을 유발한 후 midazolam과 diazepam 10^{-6} M - 3×10^{-5} M을 투여하여 기도 평활근 이완을 관찰한 후 (대조군), Tris 완충 용액으로 세척한 다음에 약 20분 후에 ACh 10^{-5} M을 투여하여 수축을 유발시키고 비특이성 K^{+} 통로 차단제인 2 mM TEA를 투여한 다음 midazolam과 diazepam을 10^{-6} M - 3×10^{-5} M 투여하여 기도 평활근 장력에 미치는 영향을 관찰하였다. 수축의 발생 정도는 ACh 10^{-5} M에 의한 수축을 100%로 간주하여 상대적인 수축의 변화로 나타내었다.

자료 분석 및 통계처리로써 기도 평활근 수축 정도의 실험 결과는 처음 ACh 10^{-5} M과 KCl 40 mM에 의한 최대 수축 높이를 100%로 하여 대조군과 실험군 각각의 수축 정도를 백분율로 나타냈다. Midazolam과 diazepam에 의한 누적적 반응 곡선은 Sigma Plot Window Version 4.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 얻었으며 측정된 모든 값은 평균 $\pm$ 표준오차로서 나타내었다. Midazolam과 diazepam의 농도

증가에 따른 이완 정도의 비교 변화는 one-way ANOVA로, 같은 군내에서 각 구간간의 비교는 Bonferroni t-test를 이용하여 비교하였고, 같은 농도에서의 각 구간 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

ACh 10^{-5} M, CCh 3×10^{-6} M 및 KCl 40 mM의 기도 평활근 수축제에 의해 유발된 수축에 대해 mi-

Fig. 2. Relaxation response (%) of midazolam and diazepam in rat tracheal smooth muscle after pretreated contraction with CCh 3×10^{-7} M. Values are mean $\pm$ SE. *P < 0.01, †P < 0.001 vs with 10^{-6} M.

Fig. 1. Relaxation response (%) of midazolam and diazepam in rat tracheal smooth muscle after pretreated contraction with ACh 10^{-5} M. Values are mean $\pm$ SE. *P < 0.01, †P < 0.001 vs with 10^{-6} M.

Fig. 3. Relaxation response (%) of midazolam and diazepam in rat tracheal smooth muscle after pretreated contraction with KCl 40 mM. Values are mean $\pm$ SE. *P < 0.01, †P < 0.001 vs with 10^{-6} M.

Fig. 4. Relaxation response (%) of midazolam in rat tracheal smooth muscle on pretreated contraction with ACh 10^{-5} M and CCh 3×10^{-7} M. Values are mean $\pm$ SE. $^{\dagger}P < 0.001$ vs with ACh 10^{-5} M.

Fig. 6. Relaxation response (%) of midazolam in rat tracheal smooth muscle after pretreatment of propranolol 10^{-6} M, flumazenil 10^{-6} M, and rubbed epithelium on pretreated contraction with ACh 10^{-5} M. Values are mean $\pm$ SE.

Fig. 5. Relaxation response (%) of diazepam in rat tracheal smooth muscle on pretreated contraction with ACh 10^{-5} M and CCh 3×10^{-7} M. Values are mean $\pm$ SE. $^*P < 0.01$, $^{\dagger}P < 0.001$ vs with ACh 10^{-5} M.

Fig. 7. Relaxation response (%) of diazepam in rat tracheal smooth muscle after pretreatment with propranolol 10^{-6} M, flumazenil 10^{-6} M, and rubbed epithelium on pretreated contraction with ACh 10^{-5} M. Values are mean $\pm$ SE.

dazolam과 diazepam의 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 3×10^{-5} M 및 3×10^{-5} M을 누적적으로 투여하였을 때 용량 의존적으로 유의하게 기도 평활근 이완작용을 보였으며($p < 0.05$)(Fig. 1-3), 특히 CCh에 의한 기도 평활근 수축에서 midazolam과 diazepam의 누적적 투여에 의한 이완효과는 ACh 및 KCl에 의한 수축보다 같은 농도에 의한 효과보다 더 유의있게 기도 평활근 이완작용을 보였다($P < 0.01$)(Fig. 4, 5).

기관 상피가 기도 평활근에 미치는 영향을 보기 위해 ACh 10^{-5} M의 투여에 의하여 유도된 기도 평활근 수축에 대하여 midazolam과 diazepam의 10^{-6}

M - 3×10^{-5} M의 농도에 따른 기도 평활근 이완효과는 기도상피 보존군과 제거군 모두에서 이완되는소견을 보였으며 두 군간에 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 6, 7).

10^{-5} M의 ACh에 의해 유도된 기도 수축에서 propranolol 10^{-6} M을 투여한 후 midazolam과 diazepam의 누적적 투여에 의한 기도 평활근 이완 작용은 propranolol 10^{-6} M의 전처치 투여에 의하여 억제되지 않았으며(Fig. 6, 7) 10^{-5} M ACh에 의하여 유도된 수축에 대하여 midazolam과 diazepam의 투여에

Fig. 8. Relaxation response (%) of midazolam in rat tracheal smooth muscle after pretreatment with atropine 10^{-6} M on pretreated contraction with KCl 40 mM. Values are mean $\pm$ SE.

Fig. 10. Effect of TEA 2 mM on relaxation response (%) for midazolam in rat tracheal smooth muscle with pretreated contraction with ACh 10^{-5} M. Values are mean $\pm$ SE. * $P < 0.01$ vs with 3×10^{-5} M, † $P < 0.001$ vs with 10^{-5} M and 3×10^{-5} M.

Fig. 9. Relaxation response (%) of diazepam in rat tracheal smooth muscle after pretreatment with atropine 10^{-6} M on pretreated contraction with KCl 40 mM. Values are mean $\pm$ SE.

Fig. 11. Effect of TEA 2 mM on relaxation response for diazepam in rat tracheal smooth muscle with pretreated contraction with ACh 10^{-5} M. Values are mean $\pm$ SE. * $P < 0.01$ vs with 3×10^{-6} M, † $P < 0.001$ vs with 10^{-5} M, 3×10^{-5} M.

의한 기도 평활근 이완작용은 flumazenil 10^{-6} M의 전처치 투여에 의해 억제되지 않았다(Fig. 6, 7).

또한 KCl 40 mM에 의하여 유도된 기도 평활근 수축에서 atropine 10^{-6} M을 전처치 후 midazolam과 diazepam의 투여에 의한 기도 평활근 이완작용은 atropine 10^{-6} M의 전처치 투여에 의하여 억제되지 않았다(Fig. 8, 9).

Midazolam과 diazepam의 Ca^{2+} 과 K^{+} 통로에 미치는 영향은 Ca^{2+} 제거 완충용액에 Ca^{2+} 2 mM 첨가 시 기도 평활근의 장력변화는 KCl 40 mM로 수축된 기도에 비하여 midazolam군에서는 $89.32 \pm 5.38\%$,

diazepam군에서는 $89.72 \pm 3.17\%$ 의 수축력을 보였으나 midazolam과 diazepam을 각각 3×10^{-6} M로 전처치를 실시한 후 Ca^{2+} 제거완충 용액에 Ca^{2+} 2 mM 첨가 시 midazolam군에서는 $59.59 \pm 2.64\%$, 그리고 diazepam군에서는 $69.24 \pm 2.86\%$ 로 각 군에서 기도 평활근 수축이 통계학적으로 유의하게 억제됨을 보였다($P < 0.01$)(Table 1).

그리고, KCl 40 mM로 기도 평활근을 전수축시킨 후 2 mM의 TEA를 투여한 후 midazolam과 diaze-

Table 1. Effects of Extracellular Ca^{2+} Inducing Contractile Response after Midazolam and Diazepam 3×10^{-5} M Pretreatment on Contracted Tracheal Smooth Muscle Strips

Group	% contraction	
	Before	After
Midazolam	89.32 $\pm$ 5.83	59.68 $\pm$ 2.64*
Diazepam	89.72 $\pm$ 3.17	69.24 $\pm$ 2.86*

Values are mean $\pm$ SE.

Before: 0.2 mM EGTA + KCl + 2 mM Ca^{2+}

After: 0.2 mM EGTA + Benzodiazepine + KCl + 2 mM Ca^{2+}

*P < 0.001 vs before

pam을 10^{-6} M부터 3×10^{-5} M까지 누적 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 midazolam과 diazepam의 기도 평활근 이완작용이 더 억제되어 지속적인 수축을 보였다(P < 0.01)(Fig. 10, 11).

고 찰

기도 직경의 크기는 기도 본연의 내적 기관지 장력(intrinsic airway tone)과 기도 벽의 부종 유무, 기도내 분비물 등에 의해 영향을 많이 받는다. 내적 기관지 장력은 여러 가지 인자들 중 반사회로(reflex arcs)의 연속인 신경과 호르몬의 복합적인 조절을 받으며, 특히 부교감 신경계를 통한 자극은 기도 평활근 장력 조절과 분비에 중요한 역할을 한다. 신경 전달 물질, catecholamine, 호르몬 및 염증에 의한 조직 부종, 화학적 매개체, 장벽(barrier) 기능과 수축 이완에 관계된 물질을 분비하는 상피세포의 손상 등에 의해 변화할 수 있다.¹²⁾

Thiopental, ketamine, propofol 등의 정맥 마취제는 흡입 마취제만큼 강하지는 않지만 기도를 지배하는 신경회로를 차단하거나, 화학적 매개체의 분비를 억제하거나 또는 기도 평활근에 직접 작용하여 기도 반응성을 감소시켜 기도 평활근 이완을 일으킨다고 한다.^{10,13,14)} 그 중 midazolam은 고농도 K^{+} 탈분극 또는 ACh이나 carbachol, serotonin 또는 histamine 등의 기도 수축 촉진제 등으로 인한 기도 평활근 수축을 직접 이완시키며 이는 Ca^{2+} 의 이동과 관련이 있다

고 보고하였다.^{9,11)}

기도 평활근의 장력은 세포막 전위차에 의해 조절되기 때문에 세포막간의 이온 통로의 변화는 직접적인 기도 평활근 이완 작용의 설명을 가능하게 한다. 평활근의 세포막 전위는 특수 통로를 통한 주로 Ca^{2+} 과 K^{+} 의 유입과 유출에 의해 좌우되며, 이 중 주로 전압 의존성 Ca^{2+} 통로(VDCC)를 통한 Ca^{2+} 유입에 의해 기도 평활근 장력이 조절된다.^{15,16)} 이 전압 의존성 Ca^{2+} 통로는 세포막의 탈분극에 의해 막전위 증가시에 열리게 되어 이를 통해 Ca^{2+} 이 유입되고 세포내 Ca^{2+} 의 증가가 있게 된다. 이렇게 증가된 세포내 Ca^{2+} 의 농도는 평활근 장력 조절에서 중요한 역할을 한다.¹⁵⁻¹⁸⁾

세포내 Ca^{2+} 이 증가되면 Ca^{2+} 이 조절 수축성 단백질인 calmodulin과 결합하여 actinomyosin adenosine triphosphatase를 활성화시킴으로 교차연결(cross bridge)이 일어나게 되어 평활근이 수축하게 된다. 평활근 수축에 필요한 Ca^{2+} 의 주된 원천은 세포외액이며^{16,17)} 평활근 수축력도 주로 세포외액의 Ca^{2+} 농도에 의존적이다.¹⁶⁾

세포질내 Ca^{2+} 이 증가되는 기전으로는¹⁵⁻¹⁷⁾ 전압 의존성 Ca^{2+} 통로, 전압 비의존성(즉, receptor operated Ca^{2+} channel), $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 의 역교환 등을 통한 Ca^{2+} 유입과 세포내 Ca^{2+} 저장에서의 Ca^{2+} 분비에 의해 농도가 증가된다. 본 연구에서 midazolam과 diazepam은 서로 다른 기전으로 작용하는 ACh, carbachol과 같은 muscarine 수용체의 촉진제와 KCl 40 mM에 의해 유도된 기도 평활근 수축에서 midazolam과 diazepam을 10^{-6} M에서 3×10^{-5} M로 누적적 투여시 농도 의존적으로 유의있게 기도 평활근 이완을시켰으며(P < 0.01)(Fig. 1-3), Ca^{2+} 제거 완충 Tyrode 용액에 0.2 mM EGTA로 Ca^{2+} 제거 후 Ca^{2+} 2 mM 첨가시 고농도 K^{+} 으로 탈분극된, 즉 KCl 40 mM로 유도된 기도 평활근 수축에서 midazolam과 diazepam 3×10^{-5} M의 전처리 투여는 기도 평활근 수축을 유의 있게 감소시켰다. 이는 midazolam, diazepam이 Ca^{2+} 대사를 억제했음을 의미하는 것으로 KCl은 세포막을 탈분극시켜 VDCC를 열어 세포내 Ca^{2+} 유입을 초래하여 평활근 수축이 일어나게 하는 것으로, 이때 Ca^{2+} 이 외부로부터 VDCC를 통해 기도 평활근 세포내로 Ca^{2+} 이 유입되어 기관지 수축이 일어난다. 본 실험 결과를 보아 3×10^{-5} M mid-

azolam과 diazepam의 전투여는 세포막 탈분극시 VDCC을 통한 세포내 Ca^{2+} 유입이 일어나는 과정을 차단함으로써 평활근 이완작용을 나타낸 것으로 생각된다. Midazolam과 diazepam의 이런 작용은 nifedipine이나 verapamil 등과 같은 Ca^{2+} 통로 차단제와 유사한 작용이다.¹⁴⁾ 그러나, 고전적인 Ca^{2+} 통로 차단제는 기도 평활근의 자발적 기저 기도장력은 억제시키지 않고 대신 K^+ 에 의해 탈분극으로 유발된 수축만을 선택적으로 이완시킴으로서 benzodiazepine계 약물의 작용과 다르다고 한다.^{14,19)}

Yoshimura 등은¹¹⁾ Ca^{2+} 지시약(indicator)인 fura-2를 사용하여 수축된 돼지의 기도 평활근에서 임상 농도에 해당하는 농도의 midazolam이 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소와 장력의 감소를 나타내었으며 이는 세포소기관내 저장 Ca^{2+} 유리와는 관계가 없다고 하였다. Chang 등도⁷⁾ 토끼의 대동맥에서 midazolam의 혈관내피 비의존성 혈관확장(endothelium-independent vasodilation)은 저친화력(low-affinity) 결합부위와 관련 있는 전압 의존성 Ca^{2+} 통로 억제에 의한 평활근 이완으로 나타내었으며, midazolam 등과 같은 정맥 마취제에 의한 심근 수축력 감소는 세포막을 통한 Ca^{2+} 전류의 감소에 더 연관이 있다는 보고가 있다.⁶⁾ Holck와 Osterrieder도²⁰⁾ benzodiazepine 이 말초 결합부위에 작용하기보다는 직접 Ca^{2+} 통로내 단백질에 작용하여 Ca^{2+} 유입을 감소 또는 억제시킨다고 보고하였다.

한편, 최근 기도 평활근에서 K^+ 통로의 안정막 전압을 조절하는데 관여한다는 여러 가지 증거들이 있고^{21,22)} halothane, isoflurane을 포함한 흡입 마취제와²³⁾ 정맥 마취약제가⁶⁾ K^+ 통로의 여러 아형에 영향을 주어 평활근 이완을 나타낸다는 보고들이 있다. Benzodiazepine의 평활근 이완에 대한 다른 가능성으로 benzodiazepine이 기도 평활근에서 K^+ 유출(efflux)을 증가시킴으로서 VDCC 개방의 가능성을 감소시키게 되어 평활근 이완이 생긴다는 연구가 있다.^{15,24,25)} 세포막에서 Ca^{2+} 유입에 관제하는 VDCC 개방의 가능성은 K^+ 선택적 통로에 의해 조절되는 세포 형질막 전위에 영향을 받는다.^{15,24-26)} 기도 평활근의 K^+ 의 세포 내외로의 이동에 관여하는 K^+ 통로로는 전압의존성 K^+ 통로, Ca^{2+} -activated K^+ 통로, receptor-operated K^+ 통로, ATP-controlled K^+ 통로 등이 있다. 그 중 기도에는 두 종류의 K^+ 통로

가 있는데,^{27,28)} 이는 Ca^{2+} -activated K^+ 통로, 전압의존성 K^+ 통로(delayed rectifier K^+ channel)로서 Ca^{2+} -activated K^+ 통로는²⁷⁾ 세포막에 가장 많은 통로로서 휴식기에는 개방되어 있지 않다가 세포막의 탈분극에 의해, 전압의존성, receptor-operated channel을 통해, 또는 세포내 저장 상태에서 Ca^{2+} 분비 등에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되면서 열리게 되어 K^+ 유출을 촉진하게 되고 그 결과 막의 재분극과 과분극이 오게 되며 한편으로는 전압의존성 Ca^{2+} 통로의 개방시키는 효과를 감소시키게 되어 기도 평활근의 이완이 발생하게 된다. 반면 전압의존성 K^+ 통로는 세포내 Ca^{2+} 농도에 민감하지 않으며, TEA에도 차단되지 않으며 안정 전위막 유지에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 benzodiazepine의 평활근 이완이 Ca^{2+} 유입이 차단되어 이완이 일어나는 것을 관찰하였는데, 세포막에서 Ca^{2+} 유입을 억제하는 기전이 K^+ 통로와 관계가 있는가를 알아보려고 불특정 K^+ 통로 차단제인 TEA를 사용하여 관찰하였다. ACh 10^{-5} M에 의해 평활근 수축이 유도된 기도 평활근에 불특정 K^+ 통로 차단제인 TEA 2 mM을 전처리 후, midazolam과 diazepam 10^{-6} M에서 3×10^{-5} M 농적 투여한 군에서 midazolam과 diazepam의 기도 평활근 이완 작용이 통계적으로 유의하게 억제됨을 보았다($P < 0.01$). 이는 midazolam과 diazepam이 K^+ 통로를 열어 세포내 K^+ 유출을 유도하여 더욱 세포내 전압을 음전위로 만들기 때문에, 즉 세포를 과분극 시킴으로서 외부에서 Ca^{2+} 유입이 차단되므로 기도 평활근 이완이 오는 것으로 추측할 수 있다. 그러나 Yamatage 등은²⁴⁾ 고양이의 기도 평활근에서 고농도의 midazolam과 diazepam에서 K^+ 통로 활성화를 감소시켰으며, 이는 VDCC를 억제하여 Ca^{2+} 유입을 억제시키는 농도보다 K^+ 통로를 억제하는데 고농도가 필요한 것으로 보아 midazolam과 diazepam에 의한 유입이 기관 평활근 작용은 직접적인 K^+ 통로 개방보다는 VDCC 통로를 억제시킴으로서 Ca^{2+} 유입이 억제되어 나타나는 것 같다고 하였다.

한편, benzodiazepine은 중추 신경계의 특수한 수용체 부위와 결합하여 작용을 나타내는데 이 수용체는 GABA 수용체와 분리되어 있지만 매우 가깝게 연결되어 있다. 그래서 GABA 복합 수용체의 일부인 benzodiazepine 수용체에 결합하여 positive modulatory

subunit로서 작용하게 되고 신경 전달 억제 물질인 GABA의 Cl^- 전도에 대한 효과를 증진시켜²⁹⁾ GABAergic synapse 억제작용을 하여 신경 전달을 억제하고 반응기관(effector organ)의 반응을 방해한다. 그러므로 midazolam이 benzodiazepine 수용체에 작용하거나 GABA 수용체를 활성화시켜 기도 장력에 영향을 줄 수 있다.³⁰⁾

Haxhiu 등은³¹⁾ midazolam을 중추로 투여하였을 때 수질의 복측 근처에 있는 부교감 신경을 억제시켰고 동시에 GABA 수용체를 활성화시켜 기관 평활근 이완이 발생함을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 benzodiazepine의 중추 길항제인 flumazenil을 10^{-6} M 즉, 혈장 농도인 0.04 mg/kg에서 이용하였을 때^{9,32)} 기도 평활근 수축제에 의해 유도된 기도 평활근 수축에서 midazolam과 diazepam에 의한 기관지 이완에 영향을 나타내지 못한 것을 보여주는 것으로 다른 연구와 일치한다.^{9,10,11,24)}

Benzodiazepine 수용체는^{8,33,34)} 불안 제거와 진정, 최면 및 항경련 작용을 나타내는데 관계하며, 친화력이 높은 결합부위가 중추 부위에서 발견되고, 중추 이외의 비신경계 조직인 세포막과 심근과 혈관 평활근에서는 말초형(peripheral type) 결합 부위가 알려져 있다. Mestre 등은³⁵⁾ midazolam에 의한 혈관 확장 연구에서 Ca^{2+} 통로와 관련된 말초 결합 부위에 의해 나타난다고 하였다. 그러나, 이는 benzodiazepine 수용체를 통하기보다는 직접적으로 근육 세포막의 Ca^{2+} 통로에 작용해서 이완효과를 나타낸다고 하였다.^{7,8,21)}

혈관 장력 조절에 대한 혈관 내피세포의 작용처럼 기관지 상피가 기관 평활근 수축에 영향을 미칠 수 있다. 기도상피는³⁶⁾ 대사적으로 활발한 조직으로 prostaglandin 또는 non-prostanoid 이완 또는 수축인자를 생산하거나 파괴시킴으로서 또는 항원이나 자극제, 기도 수축제 확산에 대해 물리적 장벽(physical barrier)을 제공하거나 기도에서 substance P 등과 같은 신경 펩타이드의 분해를 조절함으로써 기도 직경 변화에 관여한다. 그러므로 기도상피가 제거된 경우,³⁷⁾ 기도 평활근 장력과 반응성이 증가 원인이 되며 비교적 경한 천식환자의 기도 생검에서도 광범위한 섬모상피의 파괴가 있고 급성 기도 감염시 상피의 탈락을 보이며, 기도 상피가 제거된 경우 ACh와 serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 같은 기관 수축제

에 대한 반응이 더욱 강화되는 반면 기관 확장제에 대한 효과는 감소한다고³⁸⁾ 한다. Parainfluenza virus에 감염된 동물 모델에서도 기도 수축을 일으키고³⁹⁾ 혈관 투과성을 증가시키며, 비만세포에서 histamine을 분비하는 tachykinin을 분해하는 neural endopeptidase의 농도가 감소되어 있고 수축 물질인 substance P에 대한 반응성이 증가되어 있음이 보고되었다. 그러나, 본 실험의 기도 상피에 대한 효과를 알아보기 위한 실험에서 기도 상피의 제거 후에는 midazolam과 diazepam의 투여는 기도 평활근의 이완 작용에 영향을 나타내지 못하였다.

한편, midazolam과 diazepam이 기도 평활근에서 이완효과를 나타낼 수 있는 가능한 기전을 규명하기 위하여 muscarine 수용체 길항제인 atropine 10^{-6} M의 전투여와 아드레날린 수용체에서 catecholamine의 효과를 길항시켜 기관지 수축을 촉진시키는 propranolol을 전처치하여 투여하였을 때 KCl과 ACh로 유발된 수축에 대해 midazolam과 diazepam의 이완 효과는 유의있는 변화를 나타내지 않았다. 이는 다른 연구와^{9,10)} 일치하는 것으로 midazolam과 diazepam의 기도 평활근 이완은 muscarine 수용체나 아드레날린성 수용체를 통해서 일어나는 것이 아니라고 추측할 수 있다.

본 실험에서는 ACh와 CCh로 기도 평활근 수축을 유도하였을 때, midazolam과 diazepam의 기도 평활근 이완 효과는 CCh로 유도한 기도 평활근 수축에서 통계학적으로 유의있게 이완되었다($P < 0.01$). Carbachol은 muscarine 수용체 촉진제로서 G-protein을 통해 phospholipase C를 활성화시켜 세포내 2차 전달자인 diacylglycerol을 증가시켜 근 소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킴으로서 Ca^{2+} 에 의존적인 평활근 수축을 시킨다고 한다.^{14,18,21)} 그리고 Koga 등에⁹⁾ 의하면 diazepam은 cholinesterase를 활성화시켜 기도 평활근을 이완시킬 수 있다고 하였는데 본 실험 결과에서는 CCh에 의해 유도된 기도에서 이완이 더 많이 되는 것으로 미루어 보아, benzodiazepine계 약물인 midazolam과 diazepam은 아마도 CCh로 유도되는 Ca^{2+} 유리도 차단시켜 기도 평활근 이완 작용에 영향을 미치는 것으로 추측되어지나, 이에 대하여는 추가적인 연구가 필요하다고 할 것이다.

본 연구의 결과, benzodiazepine계 약물인 midazolam과 diazepam은 acetylcholine carbachol 및 고농도

K⁺ 등의 서로 다른 기전으로 수축이 유도된 기도 평활근을 비특정적이고 농도 의존적으로 이완시켰다. 그리고, 이 이완효과는 muscarine 수용체, 아드레날린성 수용체 또는 기도 상피 및 GABA 수용체를 통하여 발생하지는 않으며 midazolam과 diazepam의 직접적인 작용에 의하여 기도 평활근에서 K⁺ 이온 통로가 열려 K⁺ 유출이 촉진되고 그 결과로서 전위 의존성 Ca²⁺ 통로를 통한 Ca²⁺의 유입이 억제되어 발생된다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Longnecker DE, Murphy FL: Introduction to anesthesia. 9th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1997, pp 95-8.
- 길호영, 김대우, 김영재, 김해규, 백승완, 양홍석 등: 정맥마취. 1판. 서울. 군자출판사. 1998, pp81-95.
- Young RR, Delwaide PJ: Spasticity (second of two parts). *N Engl J Med* 1981; 304: 96-9.
- Correa-Sales C, Nacif-Coelho C, Reid K, Maze M: Inhibition of adenylate cyclase in the locus coeruleus mediates the hypnotic response to an alpha-2 agonist in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 1029-46.
- Mendelson WB: Neuropharmacology of sleep induction by benzodiazepines. *Neurobiology* 1992; 16: 221.
- Buljubasic N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ: Differential effects of etomidate, propofol, and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. *Anesthesiology* 1996; 85: 1092-9.
- Chang KSK, Feng MG, Davis RF: Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and independent mechanism. *Anesth Analg* 1995; 78: 710-7.
- French JF, Rapoport RM, Matib MA: Possible mechanism of benzodiazepine-induced relaxation of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14: 405-11.
- Koga Y, Sato S, Sodeyama N, Takahashi M, Kato M, Iwatsuki N: Comparison of the relaxant effects of diazepam, flunitrazepam and midazolam on airway smooth muscle. *Br J Anaesth* 1992; 69: 65-9.
- Cheng EY, Mazzeo AJ, Bosnjak ZJ, Coon RL, Kampine JP: Direct relaxant effects of intravenous anesthetics on airway smooth muscle. *Anesth Analg* 1996; 83: 162-8.
- Yoshimura H, Kai T, Nishimura J, Kobayashi S, Takashi S, Kanaide H: Effects of midazolam on intracellular Ca⁺⁺ and tension in airway smooth muscles. *Anesthesiology* 1995; 83: 1009-29.
- Hirshman CA, Bergman NA: Factors influencing intrapulmonary airway caliber during anaesthesia. *Br J Anaesth* 1990; 65: 30-42.
- Yamakage M, Hirshman CA, Thomas, Croxton TL: Inhibitory effects of thiopental, ketamine, and propofol on voltage-dependent Ca⁺⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Anesthesiology* 1995; 83: 1274-82.
- Pedersen CM, Thirstrup S, Nielsen-Kudsk JE: Smooth muscle relaxant effects of propofol and ketamine in isolated guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1993; 238: 75-80.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB: Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990; 259: C3-18.
- Guyton AC, Hall JE: Textbook of medical physiology. 9th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1996; pp95-103.
- Somlyo AP, Himpens B: Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 1989; 3: 2266-76.
- Coburn RF, Baron CB: Coupling mechanism in airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: L119-33.
- Advenier CA, Cerrina J, Duroux P, Floch A, Renier A: Effects of five different organic calcium antagonists of guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 1984; 82: 727.
- Holck M, Osterrieder W: The peripheral high affinity benzodiazepine binding site is not coupled to the cardiac Ca⁺⁺ channel. *Eur J Pharmacol* 1985; 118: 293-301.
- Branes PJ: Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev* 1992; 72: 699-729.
- Wilde DW, Lee KS: Outward potassium currents in freshly isolated smooth muscle cell of dog coronary arteries. *Circ Res* 1989; 65: 1718-34.
- Marijic J, Buljubasic N: K⁺ channel blockade with tetraethylammonium on anesthetic induced relaxation in canine cerebral and coronary arteries. *Anesthesiology* 1992; 77: 948-55.
- Yamatage M, Matsuzaki T, Tsujiguchi N, Honma Y, Namiki A: Inhibitory effects of diazepam and midazolam on Ca⁺⁺ and K⁺ channels in canine tracheal smooth muscle cells. *Anesthesiology* 1999; 90: 197-207.
- Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL: Sodium

- nitroprusside stimulates Ca^{++} activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996; 270: L338-45.
 26. Allen SL, Boyle JP, Cortijo J, Foster RW, Morgan GP, Small RC: Electrical and mechanical effects of BRL34915 in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 395-405.
 27. Kotlikoff MI: Potassium channels in airway smooth muscle: A tale of two channels. *Pharmacol Ther* 1993; 58: 1-12.
 28. McCann JD, Welsh MJ: Calcium activated potassium channels in canine airway smooth muscle. *J Physiol (Lond)* 1986; 372: 113-27.
 29. DeLorey TM, Kissin I, Brown P, Brown GB: Barbiturate-benzodiazepine interaction at the γ -aminobutyric acid receptor in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. *Anesth Analg* 1993; 77: 598-605.
 30. Tamaoki J, Graf PD, Nadel JA: Effects of γ -aminobutyric acid on neurally mediated contraction of guinea-pig trachealis smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 86-90.
 31. Haxhiu MA, Van Lunteren E, Cherniack NS, Deal EC: Benzodiazepines acting on ventral surface of medulla cause airway dilation. *Am J Physiol* 1989; 257: R810-5.
 32. Amrein R, Hetzel W: Pharmacology of Dormicum (midazolam) and Anexate (flumazenil). *Acta Anaesthesiol Scand* 1990; 34 (Suppl): 6-15.
 33. Raeburn D, Miller LG, Summer WR: Peripheral type benzodiazepine receptor and airway smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 557-62.
 34. Davis LP, Huston V: Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. *Eur J Pharmacol* 1981; 73: 209-11.
 35. Mestre M, Belin C, Uzan A: Modulation of voltage-operated, but not receptor-operated calcium channels in rabbit aorta by PK 11195, an antagonist of the peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8: 729-34.
 36. Munakata M, Huang I, Mitzer W, Menkes H: Protective role of epithelium in the guinea-pig airway. *J Appl Physiol* 1989; 39: 1547-52.
 37. Laitinen LA, Heino M, Kava T, Haahtela T: Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 599-606.
 38. Hay DW, Farmer SG, Raeburn D, Robinson VA, Fleming WW, Fedan JS: Airway epithelium modulate the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1986; 129: 11-8.
 39. McDonald DM: Respiratory tract infections increase susceptibility to neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am Rev Resp Dis* 1988; 137: 1432-40.
-