기니픽 기도평활근의 전접합부 무스카린성 M2수용체에서 아세틸콜린분비에 대한 Enflurane의 영향

가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 마취과학교실

권 오 경 · 이 윤 기 · 정 지 영

= Abstract =

The Effect of Enflurane on the Tracheal Smooth Muscle Contracted with Electrical Field Stimulation in the Guinea Pig

Ou Kyoung Kwon, M.D., Yoonki Lee, M.D., and JiYoung Joong M.D.

Department of Anesthesiology, College of Medicine, Catholic University, Seoul, Korea

Background: Inhalation anesthetics have been known as bronchodilators, and there are reports that enflurane has some relaxing effects on tracheal smooth muscles. However, there are not so many reports on the ACh release in the postganglion nerve endings. We tried to evaluate the effect of enflurane on the contraction of the tracheal smooth muscle in the postganglion nerve ending in guinea pigs.

Methods: Isolated tracheal preparations of guinea pigs were used and contractions were induced by electrical field stimulation (3 Hz & 30 Hz). In the pilocarpine- enflurane group, pilocarpine (10^{-5} M) was administrated and enflurane (1 MAC and 2 MAC) was administered. In the gallamine-enflurane group, gallamine (10^{-6} M) was administrated and enflurane (1 MAC and 2 MAC) was administered. In the enflurane 1 MAC group and 2 MAC group, contractions were induced by electrical field stimulation before and after administration of enflurane. The percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) were evaluated.

Results: The potentiation of the contraction which was induced by electrical field stimulation was observed by enflurane administration and with prior administration of pilocarpine (10^{-6} M), with prior administration of gallamine (10^{-5} M). There was no potentiation of contractions, but potentiation of the contraction was observed with enflurane (2 MAC, 30 Hz).

Conclusions: Enflurane potentiates the contraction induced by electrical field stimulation in guinea pig tracheal smooth muscle. These findings seem to be related with prejunctional M₂ receptor in the postganglionic nerve endings. (Korean J Anesthesiol 2003; 44: 562~567)

Key Words: Enflurane; tracheal smooth muscle; muscarinic receptor.

논문접수일 : 2002년 9월 13일

책임저자 : 권오경, 서울시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학 부속 강남성모병원 마취과
우편번호: 137-040
Tel: 02-590-1545, Fax: 02-537-1951
E-mail: kwon208@catholic.ac.kr

서 론

대부분의 평활근은 무스카린성 수용체를 보유하고 있으며 이는 주로 근육 수축과 관련되며 세포내 칼슘이온 이동증가, 고리에이엠펜(cyclic AMP)의 감소

및 포타슘 통로의 폐쇄로 인한 베타 아드레날린성 수용체 활성 작용의 상쇄 등으로 인하여 평활근 수축에 관여하게 된다.

사람 및 기니픽 등의 기도 평활근에서 발견되는 M2 수용체는 콜린성 신경연접에 존재하는 신경절전 섬유말단의 절전 M2 수용체와 콜린성 신경근결합에 존재하는 신경절후섬유말단의 전접합부 M2 수용체가 있다고 알려져 있다.¹⁾ 이중 전접합부 M2 수용체는 아세틸콜린의 분비를 억제하는 기능을 가지고 있다고 하며 이런 기능으로 인하여 이 수용체의 길항제를 투여한 경우 기관지수축이 발생하였다고 보고되었다.^{2,3)} 또한 사람에서 전접합부 M2 수용체의 기능은 기관지 천식과 관련이 있다고 보여⁴⁾ 전접합부 M2 수용체가 기관지 평활근 수축과 관계가 있음을 보여 주고 있다.

한편 흡입마취제의 기관지 평활근 수축에 대한 영향을 보면 enflurane의 경우 기도평활근 긴장도를 감소시키고 미주신경 자극에 의한 기도 평활근 수축을 약화시킨다고 보고되고 있으며, 전접합부 M2 수용체도 수축 억제작용에 관여하고 있다고 하였다.⁵⁾ 그러나 전접합부 M2 수용체에 대한 흡입마취제의 영향에 대한 보고는 연구가 많지 않다. 저자들은 흡입마취제의 기도평활근의 수축에 대한 작용중 전접합부 M2 수용체에 대한 enflurane의 작용을 관찰하기 위하여 기니픽에서 전기장 자극(Electrical Field Stimulation, EFS)으로 기도평활근 수축을 일으킨 후 이런 수축에 대한 흡입마취제 enflurane의 영향을 관찰하였다.

대상 및 방법

체중 350-450 g의 기니픽 20마리를 암수 구별없이 외관상 건강한 것을 사용하여 산소와 enflurane 4%를 투여하는 플라스틱 상자에 장치하여 마취한 후 기관을 100% 산소를 포말하면서 주위조직을 제거하였으며 기도상피는 그대로 보존하였다. 기관을 3-4 mm정도 윤상으로 절단하여 분절로 나누고 단단한 삼각형의 스테인레스 강선을 사용하여 평활근을 Krebs 용액 30 ml가 들어있는 조직조에 한쪽을 연결하고 다른 쪽을 수직이 되게 장력분석기(Strain Gauge Transducer, Grass FT103®, USA)에 연결하였다. 조직조는 37°C로 유지하고 95% O₂와 5% CO₂가 포말되

도록 하였다. Krebs용액의 조성은 다음과 같았다. (μM/liter : NaCl 120.7, KCl 5.9, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 15.5, NaH₂PO₄ 12, glucose 11.5). 각 표본은 1g의 휴지기 장력을 걸고 60분간 평형이 되도록 하였으며 30분 간격으로 새로운 Krebs용액으로 세척을 하였다. 실험 전에 EFS시 억제성 비아드레날린성, 비콜린성(inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic, iNANC)에 의한 이완작용을 배제하기 위하여 indomethacin 10⁻⁵ M과 propranolol 10⁻⁶ M을 투여하였다. M2 수용체에 대한 자극은 전기자극을 이용하여 시행하였으며 백금판(1.5 × 1.5 cm)을 평활근 사이 양측에 장치하고 frequency 3 Hz 및 30 Hz, voltage 70 V AC, pulse duration 0.5 ms의 전기자극을 10 초간 가하였다. 전기자극의 Hz는 M2 수용체를 자극하기 위하여 Nagtegaal 등이⁶⁾ 사용한 32 Hz를 참고하여 30 Hz를 선택하였으며 Berge 등이⁷⁾ 사용한 2-16 Hz 중에서 3 Hz를 선택하여 사용하였고 첫 번째 자극 3 Hz후에 15 분 기다려서 장력이 안정되면 다음 자극 30 Hz를 가하였다. Enflurane를 투여하는 경우 조직조에 15분간 포말 하였다. 실험군은 다음과 같이 나누었다. Pilocarpineenflurane군(n = 6) : 3 Hz 및 30 Hz의 자극 후 pilocarpine 10⁻⁶ M을 투여한 후 3 Hz 및 30 Hz의 자극을 가하여 평활근 수축을 관찰한 후 enflurane 1 MAC 및 2 MAC을 투여한 군, Gallamine-enflurane군(n = 6) : 3 Hz 및 30 Hz의 자극 후 gallamine 10⁻⁵ M을 투여한 후 3 Hz 및 30 Hz의 자극을 가하여 평활근 수축을 관찰한 후 enflurane 1 MAC 및 2 MAC을 투여한 군, enflurane 1 MAC 군

Fig. 1. The dose response curve of Ach in guinea pig tracheal smooth muscle. Values are mean $\pm$ SE, n = 6.

(n = 6)에서는 enflurane 1 MAC을 투여 후 3 Hz 및 30 Hz의 전기자극을 투여한 군, enflurane 2 MAC군 (n = 6)에서는 enflurane 2 MAC 투여 15 분 후에 각각 3 Hz 및 30 Hz의 자극을 가하여 평활근 수축을 관찰 한 군으로 하였다. Pilocarpine, gallamine, indomethacine, acetylcholine 및 propranolol은 Sigma Co (USA)

로부터 구입하였다. 평활근의 수축은 등척성 장력을 기록하였다. 그 값을 아세틸콜린 10^{-4} M (Fig. 1)에 의한 평활근 수축에 대한 비율(%)로 표시하여 그 값 들은 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며 군내의 비교는 paired t test, 군 간의 비교는 unpaired t-test로 검정하여 P값이 0.05 미만인 경우 의의 있는 것으로

Fig. 2. The contraction induced by electrical field stimulation were decreased with administration of pilocarpine (10^{-5} M) and there were no potentiation observed with administration of enflurane (1 MAC) Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz). *: P > 0.05 vs control (3 Hz), †: P < 0.05 vs control (30 Hz).

Fig. 4. The potentiation of percent contraction of tracheal smooth muscle contracted with electrical field stimulation were observed and also with administration of enflurane (1 MAC) Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz). *: P < 0.05 vs control (3 Hz), †: P < 0.05 vs control (30 Hz).

Fig. 3. The contraction induced by electrical field stimulation were potentiated with administration of gallamine (10^{-5} M) and there was no potentiation observed with administration of enflurane (1 MAC) Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz), *: P < 0.05 vs control.

Fig. 5. The contraction induced by electrical field stimulation were decreased with administration of pilocarpine (10^{-6} M) and there were no potentiation observed with administration of enflurane (2 MAC) Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz), *: P < 0.05 vs control, †: P < 0.05 vs control (30 Hz).

Fig. 6. The contraction induced by electrical field stimulation were potentiated with administration of gallamine (10^{-5} M) and there was no potentiation observed with administration of enflurane (2 MAC), but potentiation were observed with 3 Hz. Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz). *: $P < 0.05$ vs control, †: $P < 0.05$ vs gallamine (3 Hz).

Fig. 7. The potentiation of percent contraction of tracheal smooth muscle contracted with electrical field stimulation were observed and with administration of enflurane (2 MAC) Values are mean $\pm$ SE, n = 6: percentile contraction to the contraction induced by acetylcholine (10^{-4} M) control: electrical field stimulation (3 Hz, 30 Hz). *: $P < 0.05$ vs control, †: $P < 0.05$ vs control (30 Hz).

하였다.

결 과

Pilocarpine-enflurane군

Pilocarpine 10^{-6} M 투여 후 EFS를 가한 경우 평활근 수축이 현저히 감소되었으며($P < 0.05$) 이후

enflurane (1 MAC 및 2 MAC, 3 및 30 Hz) 투여 경우에도 더 이상의 수축 변화는 없었다(Fig 2, 3).

Gallamine-enflurane 군

Gallamine 10^{-5} M의 투여 후 EFS를 가한 경우 평활근 수축이 현저히 증가되었으며($P < 0.05$) 이후 enflurane(1 MAC 3 Hz 및 30 Hz 및 2 MAC 30 Hz) 투여 경우에 더 이상의 수축정도의 변화는 없었으나 2 MAC, 3 Hz에서는 평활근 수축이 증가되는 소견을 보였다($P < 0.05$, Fig. 4, 5).

Enflurane 1 MAC 군 및 2 MAC 군

Enflurane을 1 MAC 및 2 MAC투여한 후 EFS를 가한 경우 3 Hz 및 30 Hz에서 평활근 수축이 현저히 증가되었다($P < 0.05$, Fig. 6, 7).

고 찰

임상에서 전신마취시 사용되는 enflurane은 일반적으로 기도평활근 수축을 억제하는 것으로 알려져 있으며 enflurane의 histamine에 의한 기관수축 약화,⁸⁾ halothane, 및 isoflurane의 항체에 의한 기관수축의 약화 등이 보고되고 있어⁹⁾ 흡입마취제들이 기도 평활근 수축을 약화 시키는 것을 보여주고 있다. 또한 이들 흡입마취제의 작용 부위는 벽내부교감신경성의 신경절의 연접부후부 니코틴작용의 콜린수용체(intramural parasympathetic ganglia, postsynaptic nicotinic cholinergic receptors), 신경절후의 섬유(postganglionic fibers)의 전접합부수용체(prejunctional 수체), 및 평활근에 있는 아세틸 콜린 수용체 등이라고 보고 되고 있으며¹⁰⁾ 이중에서 벽내 부교감신경의 신경절(intramural parasympathetic ganglia)의 연접부후부 니코틴작용의 콜린성 수용체 자극에 의한 수축에 대한 흡입마취제의효과가 가장 강력하며, 다음으로 신경절후 섬유의 전 접합부의 억제효과 및 평활근의 아세틸콜린수용체에 대한 직접 작용 순서라고 보고 되었다.¹⁰⁾ 그러나 Watson 등은¹¹⁾ 후접합부 무스카린성 M2 수용체의 기능은 아직 확실치 않다고 보고 하고 있다.

EFS으로 평활근내의 내인성 신경이 자극되어 연접부후부 콜린성 신경에서 아세틸콜린이 분비되어 기도평활근 수축하며, 기니픽에서 M2 수용체 작용제

인 *Pilocarpine*을 투여한 경우 EFS에 의한 기도 평활근 수축이 억제 되고, M_2 수용체의 길항제인 *gallamine*을 투여한 경우 이런 기도평활근 수축이 강화되었다고 보고 되었다.¹²⁾ 본 실험에서도 *enflurane*의 기도 평활근 수축에 대한 작용 중 신경절후 섬유 전접합부의 M_2 수용체에 대한 작용을 관찰 하였으며 EFS를 사용하여 3 Hz, 30 Hz의 전기자극을 가하였다. 본 실험에서 M_2 수용체 작용제인 *Pilocarpine*을 투여하여 M_2 수용체를 활성화시킨 후 EFS를 가한 경우 이세틸콜린의 분비가 감소되어 수축이 현저히 감소되는 소견을 보였으며 M_2 수용체의 길항제인 *gallamine*을 투여한 경우 EFS에 의한 평활근수축이 현저히 증가하였다. 이런 EFS자극들에 의하여 아세틸콜린이 분비되는 것이 전접합부 M_2 수용체의 억제작용에 의하여 아세틸콜린의 분비가 감소 되었으며 M_2 수용체가 억제되는 경우 아세틸콜린의 분비가 증가되는 것을 보여주고 있으며 또한 EFS가 평활근에 직접 작용하여 수축에 관여하지 않는 것을 보여 주고 있다.

한편 흡입마취제 *enflurane* 1 MAC을 투여한 후 EFS를 가한 경우 3 Hz나 30 Hz의 자극에서 *enflurane* 투여 하지 않은 경우에 비하여 모두 기도 평활근 수축이 강화되는 소견을 보였다. 또한 M_2 수용체 작용제 *Pilocarpine* 10^{-6} M을 전투여 한 후 EFS를 가한 경우 기도 평활근 수축반응이 현저히 약화되는 소견을 보였으며 *enflurane*을 투여 하여도 수축반응 약화되는 상태가 지속되는 소견을 보였으며, *gallamine* 10^{-5} M을 투여 한 후 EFS를 가한 경우 3 Hz 및 30 Hz 모두에서 평활근수축이 증가되었으며 *enflurane* 1 MAC을 투여 한 경우 *gallamine*투여 경우보다 평활근 수축이 증가하는 소견은 보이지 않았으며, *enflurane* 2 MAC을 투여한 경우에 3 Hz의 자극에서 평활근 수축이 증가되는 소견을 보였으나 30 Hz에서는 증가되는 소견은 없어서 Hz를 증가하여도 더 이상의 효과는 없는 것이 관찰 되었다. 이런 소견을 볼 때 흡입마취제 *enflurane*은 EFS의 경우 신경절 후 섬유의 전 접합부에서 아세틸 콜린의 분비를 증가시키고 이런 현상에 M_2 수용체가 관련 되어 있는 것으로 사료된다.

한편 *enflurane*에 의한 신경절후 섬유의 전 접합부의 M_2 수용체 및 흡입마취제의 기도평활근 수축에 대한 영향을 보면 다음과 같이 설명될 수 있다. M_2

수용체를 활성화하면 포타슘 통로를 억제한다고 보고되고 있으며¹³⁾ 또한 Patel 등은¹⁴⁾ 포타슘 통로는 기도의 부교감성 신경절의 연접후부 신경말단에서 이세틸콜린 분비에 관여한다고 보고 하였으며, Tagaya 등은¹⁵⁾ 미주신경 말단에서 칼슘이온활성 매개성 포타슘 통로(Ca^{2+} -activated potassium channel)는 아세틸콜린의 세포외유출성 분비를 억제 한다고 하였다. 즉 M_2 수용체의 활성화는 포타슘 통로를 억제하며 이로 인하여 세포외유출성 아세틸콜린 분비억제작용 상실로 아세틸콜린의 분비가 증가되는 것을 알 수 있다. Fukushima 등은¹⁶⁾ *halothane*의 기관지 평활근 이완작용에 대한 작용 중 포타슘통로에 대한 작용은 관여하지 않았다고 보고하고 있으나 Namba 등은¹⁷⁾ 흡입마취제가 칼슘이온활성 매개성 포타슘 통로(Ca^{2+} -activated potassium channel)를 억제한다고 보고 하였으며, Antkowiak와 Kirschfeld도¹⁸⁾ *enflurane*이 거대 전도성 칼슘이온활성 매개성 포타슘 통로(large conductance Ca^{2+} -activated potassium channel)를 억제한다고 보고하여 *enflurane*이 포타슘통로를 억제하는 작용이 있는 것을 보고하고 있으며 본 실험에서도 EFS에 의한 기도평활근 수축은 *enflurane*을 투여하는 경우 평활근 수축이 더욱 강화되었던 것은 흡입마취제에 의한 포타슘 통로의 억제와 이로 인한 아세틸콜린 분비증가로 수축이 강화되었던 것으로 사료 된다. 이는 흡입마취제의 기도 평활근의 작용 부위중 신경절후 섬유의 전 접합부의 억제가 발생하였다는 Brichant 등의⁸⁾ 보고와 다소 상이한 결과를 보이고 있으며 이는 방법상의 차이라고 생각 될 수 있다. 이는 임상에서 투여하는 흡입마취제의 작용에 의한 기관지 평활근 이완작용과는 달리 실험실 상황에서 전기자극을 주어 M_2 수용체를 자극하는 경우, 본 실험에서와 같이 *enflurane*의 경우 Ach의 분비를 증가시킨다고 사료될 수 있으며 또한 다른 점은 Matera 등은¹⁹⁾ 기니픽 기도의 EFS으로 자극시 i-NANC의 활성화로 이완효과가 발생 할 수 있으며 이를 방지 하기 위하여 prostanoid 합성 억제제와 베타 차단제의 선행 투여가 필요하다고 하였다. 본 실험에서도 이런 i-NANC에 의한 이완 효과를 차단하기 위하여 *indomethacin*과 *propranolol*을 투여하였으며 이런 실험 방법상의 차이로 서로 다른 결과가 나타났다고 사료된다.

결론적으로 흡입마취제 *enflurane*의 경우 신경절후

섬유의 전 접합부의 억제에는 발생하지 않고 오히려 아세틸콜린의 분비를 증가시키는 경향을 보였으나 이는 흡입마취제의 기도평활근이완작용과는 서로 반대되는 소견을 보이고 있다. 이는 임상에서 이런 enflurane의 사용시 기도 평활근의 수축작용보다 흡입마취제 의한 미주신경반사의 억제 작용에 의한 수축억제 작용이 더욱 현저하여 실제 임상에서는 관찰되지 않을 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Goyal RK: Muscarinic receptors subtypes. Physiology and clinical implications. *New Engl J Med* 1989; 321: 1022-9.
- Fryer AD, MacLagan J: Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1984; 83: 973-8.
- Blaber LC, Fryer AD, MacLagan J: Neuronal muscarinic receptors attenuate vagally-induced contraction of feline bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1985; 84: 723-8.
- Mintte PA, Lammer JW, dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ: A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1989; 67: 2461-5.
- Nagtegaal JE, Siero HLM, Dirksen RLammers, et al. Pancuronium Masks the prejunctional autoreceptor in guinea pig tracheal smooth muscle. *Life Science* 1995; 2325-33.
- Berge RE, Krikke M, Teisman AC, Roffel AF: Zaagsma J *Eur J Pharmacol* 1996; 131-9.
- Kochi T, Hagiya M, Mizuguchi T: Effects of enflurane on contractile response of canine trachealis muscle. *Anesth Analg* 1989; 69: 60-8.
- 심재용, 권오경: 가토에서 enflurane 및 halothane투여가 histamine에 의한 기관지 평활근수축에 미치는 영향. *대한 마취과학회지* 2000; 39: 849-53.
- Hirshman CA, Edelstein G, Peetz S, Wayne R, Downes H: Mechanism of action of inhalational anesthesia on airways. *Anesthesiology* 1982; 56: 107-11.
- Brichant JF, Gunst SJ, Waner DO, Rehder K: Halothane, enflurane and isoflurane depress the peripheral vagal motor pathway in isolated canine tracheal smooth muscle. *Anesthesiology* 1991; 74: 325-32.
- Watson N, Reddy H, Eglen RM: Role of muscarinic M₂ and M₃ receptors in guinea-pig trachea: effects of receptor alkylation. *Eur J Pharmacology* 1995; 195-201.
- Minette PA, Barnes PJ: Prejunctional inhibitory muscarinic receptors on cholinergic nerves in human and guinea-pig airways. *J Appl Physiol* 1988; 64: 2532-7.
- Kotlikoff, MI, Dhulipala P, Wang YX: M₂ signaling in smooth muscle cells. *Life Sci* 1999; 64: 437-42.
- Patel HJ, Gienbycz MA, Keeling JE, Barnes PJ, Belvisi MG: Inhibition of cholinergic neurotransmission in guinea pig trachea by NS1619, a putative of large-conductance, calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286(2): 952-8.
- Tagaya E, Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, Chiyotani A, Konno K: Modulation of cholinergic neurotransmission by Ca(2+)-activated K channel and Na(+)-K(+)-ATPase in canine airway smooth muscle. *Anesthesiology* 1994; 43: 62-7.
- Fukushima T, Hirasaki A, Jones KA, Waner DO: Halothane and potassium channels in airway smooth muscle. *Br J Anaesth* 1966; 76: 847-53.
- Namba T, Ishii TM, Ikeda M, Hisano T, Itoh T, Hirota K, et al: Inhibition of the human intermediate conductance Ca(2+)-activated K(+) channel, hIK1, by volatile anesthetics. *Eur J Pharmacol* 2000; 395: 95-101.
- Antkowiak B, Kirschfeld K: Enflurane is a potent inhibitor of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels of *Chara australis*. *FEBS Lett* 1992; 313: 281-4.
- Matera MG, D'Agostino B, Costantino M, Amorena M, Lucarelli: Possible functional modulation by acetylcholine of nitric oxide on guinea pig isolated trachea. *Life Sci* 1988; 62: 553-9.