

Imipramine이 배뇨근 세포의 수축성에 미치는 직접작용

영남대학교 의과대학 약리학교실

허찬욱 · 이광윤 · 김원준

서 론

Imipramine은 삼환계 항우울제에 속하는 약물로서, 소아에서 흔히 관찰할 수 있는 반복적이고 부적절하며 불수의적인 소변 배설을 특징으로 하는 배뇨장애인 유뇨증의 치료제로서도 널리 사용되고 있다.^{1,2)} Imipramine의 유뇨증에 대한 치료효과의 기전에 대해서는 Winsberg 등³⁾과 Rapoport 등⁴⁾에 의해 그 항우울작용이 항유뇨작용의 합당한 기전이 될 수 있는가가 토론된 바 있는데, 이들은 imipramine의 유뇨억제 효과가 그 항우울작용에 기인한다고 보기는 어렵다고 하였다. 또한 이 약물의 수면에 미치는 영향이 치료 효과를 나타낸다는 견해도 있으나,⁵⁾ imipramine은 낮동안의 요실금(urinary incontinence)에도 효과가 있으며, 투여시 수면 시기와 야뇨 빈도와의 사이에 유의한 상관 관계가 없다는 보고도 있다.^{4,6)}

Imipramine의 방광에 대한 직접작용에 관한 연구보고를 보면, 일찌기 Axelrode 등⁷⁾과 Sulser 등⁸⁾은 imipramine이 방광근 수축작용에 대하여 억제적으로 작용하는 교감신경 말단에서 catecholamine의 재흡수를 억제함으로써 그 방광근 이완작용을 나타낸다고 하였는데, 이 설은 최근에 와서도 제창되고 있다.⁹⁾ 한편 1977년 Benson 등¹⁰⁾은 imipramine이 항무스카린성 작용에 의해 방광근을 이완시킨다

고 하였는데 이러한 imipramine의 항 무스카린성 작용 또한 그 후 여러 연구자들에 의해 재확인 되었다.¹¹⁻¹³⁾

약물의 자율신경계에 대한 작용을 관찰하기 위해서는 근절편에 대한 전기자극법, 경쟁적 길항약물의 사용법, 방사성 동위원소를 이용한 효현제와 수용체의 결합능 추적법 등이 있으나, 본연구에서는 방광근에 대한 모든 신경지배를 배제하고 방광 평활근 세포를 분리배양하여 imipramine의 단일세포에 대한 직접작용을 관찰하는 방법을 시도해 보기로 하였다.

본실험의 목적은 방광평활근 세포를 분리하되 그 생명력을 유지하고 약물에 대한 반응성을 유지한 상태에서 단시간 배양할 수 있는 방법을 확립하고, 이와 같이 분리배양된 방광 평활근 세포에 대한 imipramine의 작용이 과연 세포에 대한 직접작용으로서 항콜린성작용을 나타내는가 하는 것을 관찰하는데 있다.

재료 및 방법

개 41마리의 방광을 적출하여 0~4°C의 Krebs-Henseleit buffer 영양액 (이하 K-H 용액)내에서 점막을 제거하고 2 x 2mm 크기의 평활근 절편을 얻

었다. 이 평활근 절편들은 36°C의 0.12% collageanse 용액에 넣고 95%/5% O₂/CO₂ 혼합산소 공급하에서 17~20분 동안 배양하였다. Collagense는 Worthington Biochemical 제 Type 2를 사용하였는데, K-H 용액내에 collagenase 1.2 mg/ml를 가하고, 과도한 단백분해 특히 평활근 세포의 세포막단백의 손상을 방지하기 위하여 soybean trypsin inhibitor 0.08 mg/ml (Sigma Biochemical)를 첨가하였다. 또 용액의 적정한 삼투압을 유지하기 위하여 bovine serum albumine을 2%의 농도로 첨가하였다. 이렇게 제조한 collagenase 용액 10ml를 20ml 비이커에 담고 평활근 절편을 바닥에 고루 퍼질 정도로 넣은 후 95%/5% O₂/CO₂의 혼합산소를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였고, 36°C의 항온수조내에서 2cm/sec의 속도로 왕복 진탕하였다(Digestion 과정). 이 실험에서 사용된 K-H 용액의 조성(mM)은 NaCl 120, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.17, NaHCO₃ 23.8, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1.2, Glucose 10 이었다. Collagenase 배양이 끝난 절편들을 450 µm mesh에서 K-H 용액으로 세척한 후에 다시 K-H 용액내에서 12~15분간 진탕하였다. 이 때 산소의 공급은 collagense 배양 때와 같이 하였다(Dissociation 과정).

Dissociation 과정이 끝난 부유세포군은 끝이 넓은 micropipette으로 5 ml test tubes에 나누어 담고 acetylcholine을 첨가하였는데 그 최종농도는 10⁻⁶M가 되게 하였다. Acetylcholine에 의해 수축한 세포를 고정시키기 위하여 acrolein 수용액을 가하여 그 최종농도가 1%가 되도록 하였는데, 최대반응을 측정할 수 있는 적정한 시간을 알기 위하여 acetylcholine 투여 후 5, 10, 20, 30, 60 및 120초에 acrolein을 첨가하였다. 고정된 부유세포군은 micropipette을 사용하여 slide glass에 점적하고 cover glass를 덮은 후 위상차 현미경으로 그 길이를 측정하였다.

세포의 길이를 측정하기 위하여 위상차현미경에 CCTV camera (Hidachi VK-C150)를 장착하여 채취한 영상을 microscaler (FOR.A, IV-550)로 전송하였다. Microscaler에 연결된 세포를 측정하여 그

산술평균치를 그 표본의 성적으로 하였다. 이와 같이 시간에 따른 acetylcholine의 효과를 관찰하기 위하여 방광 6마리 분을 사용하였다.

약물실험을 위하여서는 부유세포군을 일정량씩 나누어 시험관에 넣고 제 1군(atropine 군)은 다시 2개 군으로 나누어 각군에 atropine을 10⁻⁷M (n=7)와 10⁻⁶M (n=7)의 농도로 첨가하여 5분간 방치한 후 acetylcholine을 첨가하였다. 제 2군(imipramine 군)은 3개 군으로 나누어 (각 군 n=7) imipramine을 각각 10⁻⁷M, 10⁻⁸M 및 10⁻⁹M의 농도로 첨가하여 5분간 방치한 후에 acetylcholine을 첨가하였다. 이 때 acetylcholine의 농도는 10⁻¹⁴M부터 10⁻⁶M까지 10배수의 농도로 첨가하였다.

본 실험에 사용한 atropine (Fluka AG)과 imipramine (Eisai, 한일약품 기증) 및 acetylcholine (Sigma)은 증류수에 용해시켜 사용하였다. 각 약물의 효과를 비교하기 위하여서는 먼저 약물을 첨가하지 않은 세포의 평균 길이를 100%로 하고 각 실험군의 성적(세포 50개의 평균치)을 이에 대한 백분율로 나타내었으며, 성적의 유의성검정은 Student's t-Test (unpaired)를 이용하였고, p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

성 적

표 1은 acetylcholine 10⁻⁶M 첨가에 의한 세포의

Table 1. Time-Response to acetylcholine of single cells isolated from canine detrusor

Time (sec)	Cell Length (µm)
Control	88.1±1.2
5	79.2±2.4*
10	82.0±2.3*
20	81.7±2.6*
30	84.7±1.8
60	84.3±2.0
120	83.2±1.6*

Values are expressed as Mean±SE of 22 controls and 6 samples (average of 50 cells from each slide preparation).

*p<0.05: significant from control.

Table 2. Effect of atropine on the acetylcholine-induced contraction of single cells isolated from canine detrusor

-Log[Ach] (M)	Contraction (% , length)		
	Control	Atropine 10 ⁻⁷ M	Atropine 10 ⁻⁶ M
14	4.7±0.4	3.1±0.7	1.3±1.4
13	9.3±0.4	6.9±1.3	2.4±1.6*
12	12.8±0.4	10.1±1.1	3.0±1.3*
11	14.6±0.7	12.4±1.0	5.0±1.3*
10	17.8±1.0	13.4±1.3*	4.5±1.2*
9	19.5±1.2	14.7±1.5*	4.9±1.0*

Ach : acetylcholine

Values are expressed as mean±SE of 7 individuals (average %-shortening of 50 cells in one slide preparation).

*p<0.05 : significantly different from control.

길이의 변화를 나타낸 표이다. Acetylcholine을 첨가하지 않은 군의 길이가 88.1±1.2 mm인데 비해서 acetylcholine 첨가 5초후의 길이는 79.2±2.4mm으로서 대조군에 비해 유의하게 (p<0.05) 감소되었다. 이후 10초 후에는 82.0±2.3mm (p<0.05), 20초 후에는 81.7±2.6m (p<0.05), 30초 후에는 84.7mm (ns), 60초 후에는 84.3±2.0mm (ns)이었고, 120초 후에는 83.2±1.6mm (p<0,05)으로 증가하였으나 대체로 대조군에 비해서는 유의한 감소 상태를 유지하였다. 이 성적은 그림 2에 도시하였다.

표2는 acetylcholine 유발 수축에 대한 atropine의 길항작용을 관찰한 결과를 나타낸 것이다. Acetylcholine은 10⁻¹⁴M 부터 10⁻⁹M까지 농도의존적 수축반응을 유발하였는데, 10⁻¹⁴M에서는 4.7±0.4%의 수축을 보였고 점차로 증가하여 10⁻¹⁰M에서는 17.8±1.0%, 10⁻⁹M에서는 19.5±1.2%의 수축을 보였다. Atropine 10⁻⁷M를 전처치한 군에서는 acetylcholine 10⁻¹⁴M에서 부터 3.1±0.7%의 수축을 보여 대조군에 비해 수축성이 저하되는 경향을 보였으며, 10⁻¹⁰M에서는 13.4±1.3%로서 대조군에 비하여 (p<0.05) 낮았고, 10⁻⁹M에서도 14.7±1.5%로서 대조군에 비해 유의한 (p<0.05)감소를 보였다.

Atropine 10⁻⁹M를 전처치한 군에서는 acetylcholine 10⁻¹³M에서 부터 2.4±1.6%로서 대조군의 9.3±0.4%에 비해 유의한 억제 효과가 관찰되었으며, 10⁻¹¹M 이상에서는 수축율이 5% 미만에 머물러 대조군에 비해 유의한 (p<0.05) 억제를 보였다. 이 성적을 도시

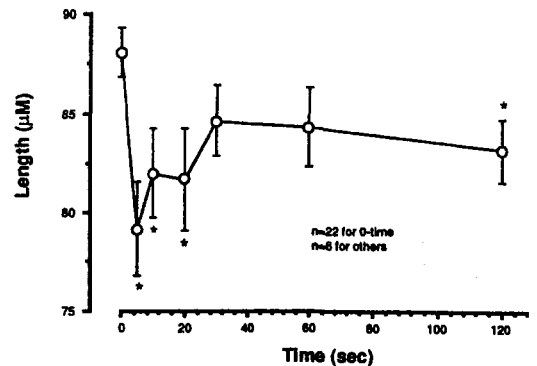


Fig. 2. Time-response to acetylcholine of single cells isolated from canine detrusor. Values are expressed as Mean±SE of 22 individuals. Values are expressed as Mean±SE of 22 individuals and 6 samples (average of 50 cells for each individual) *p<0.05 : Significantly different from control.

하면 그림3과 같다.

표 3은 imipramine을 전처치한 군에서 imipramine의 acetylcholine 유발 수축 억제작용을 관찰한 성적을 나타낸 것이다. Imipramine은 10⁹M의 저농도에서도 acetylcholine의 모든 농도에 의한

수축작용을 유의하게 (p<0.05) 억제하였으며, 10⁸M전처치시에는 acetylcholine에 의한 최대수축을 6.0±0.5%, 10⁷M 존재하에서는 최대수축을 5.0±1.3% 까지 유의하게 (p<0.05)억제하였다.

이상의 성적은 그림 4에 도시하였다.

Table 3. Effect of imipramine on the acetylcholine-induced contraction of single cells isolated from canine detrusor

-Log[Ach] (M)	Contraction (% length)			
	Control	IMP 10 ⁹ M	IMP 10 ⁸ M	IMP 10 ⁷ M
14	4.7±0.4	2.9±0.4*	2.0±0.3*	2.3±0.8*
13	9.3±0.4	4.9±0.4*	3.0±0.6*	3.7±0.9*
12	12.8±0.4	6.7±0.7*	4.2±0.5*	4.2±1.0*
11	14.6±0.7	8.3±0.7*	5.0±0.5*	4.7±1.2*
10	17.8±1.0	9.4±0.8*	5.6±0.4*	4.6±1.4*
9	19.5±1.2	10.5±0.9*	6.0±0.5*	5.0±1.3*

Ach : acetylcholine, IMP : imipramine

Values are expressed as mean ±SE of 7 individuals (average %-shortening of 50 cells in one slide preparation).

*p<0.05 : significantly different from control.

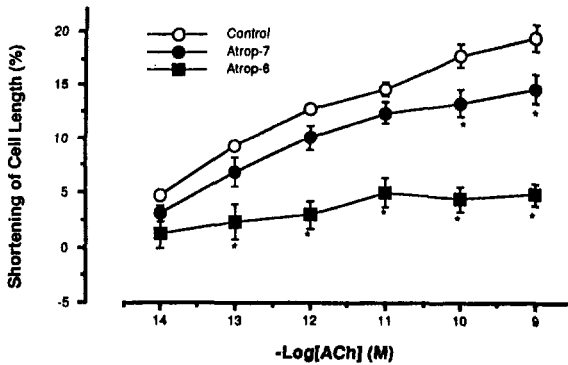


Fig. 3. Effect of atropine on the acetylcholine-induced shortening of the length of cells isolated from canine detrusor. Atrop-7 and Atrop-6 mean the concentrations of atropine 10⁻⁷ M and atropine 10⁻⁷ M, respectively.

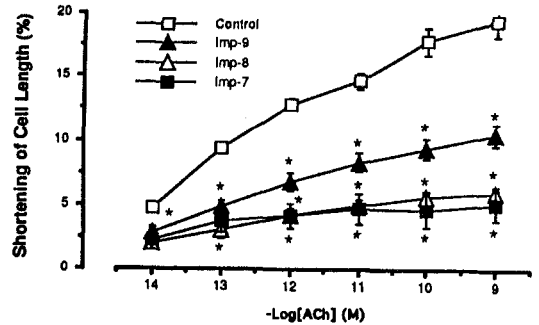
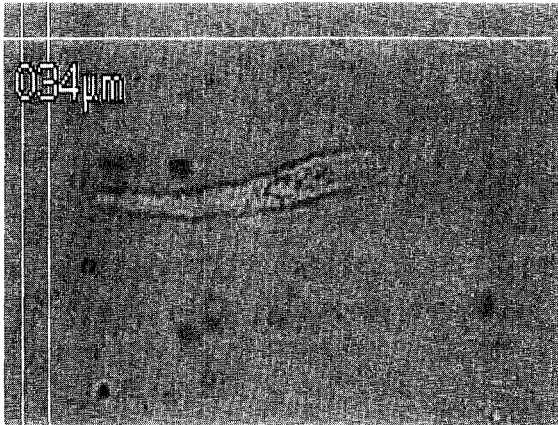
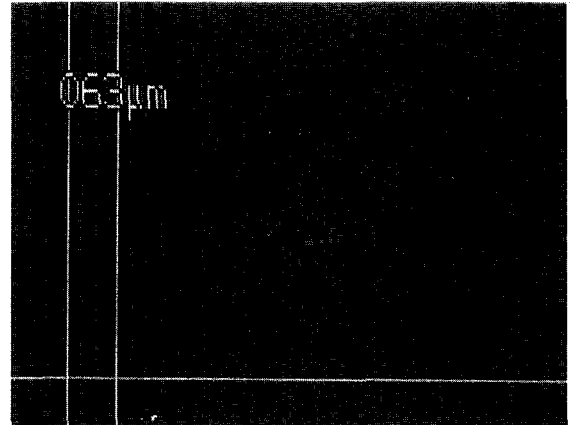


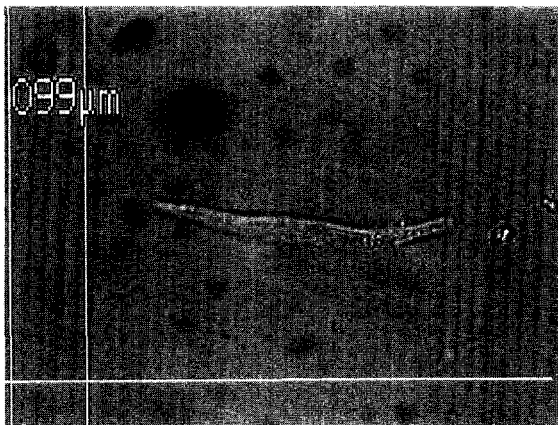
Fig. 4. Effect of imipramine on the acetylcholine-induced shortening of the length of cells isolated from canine detrusor. Imp-9, Imp-8 and Imp-7 mean the concentrations of atropine 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M and 10⁻⁷ M, respectively.



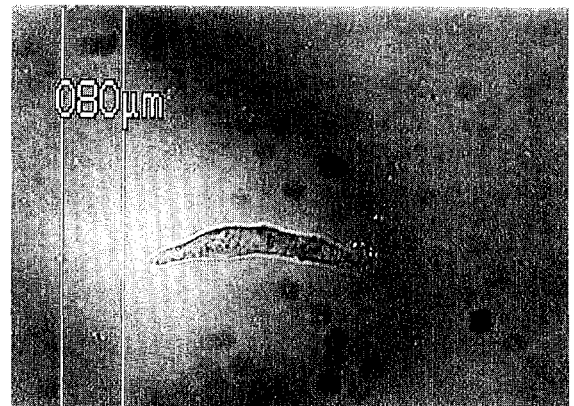
Picture A. A damaged relaxed cell, X400. The scale should be neglected. Cell has lost a part of its body.



Picture B. A damaged contracted cell at X400. The scale should be neglected. Hazy and granular appearance of cytoplasm suggest that the cell has a severe membrane damage and subsequent deterioration of cellular contents.



Picture C. A healthy relaxed cell at X400. The scale should be neglected. There is a halo around the cell, and the clear nucleus is visible.



Picture D. A healthy relaxed cell at X400. The scale should be neglected. There is a halo around the cell, and the clear nucleus is visible.

Fig.1 Captured images of isolated cells of rat detrusor.

고 찰

평활근 수축성에 작용하는 약물의 작용기전을 밝히기 위한 연구는 여러가지 접근방식이 있는데 생체에 약물을 투여하여 혈압이나 팔약근내압등을 측정하는 방법, 적출 평활근 절편을 이용하여 그 수축력을 측정하는 방법 (myography)등이 있으며, 이들 각 방법마다 자율신경 및 그 수용체와의 상호작용을 관찰하는 방법들이 있다.

방광평활근은 기본적으로 부교감신경과 교감신경의 지배를 받으며,¹⁰⁾ 이들 양자의 균형과 조화로 그 생리적 역할인 뇨의 저장과 배설기능을 수행하고 있다. 방광기능의 부조화로 인한 질병중에서 유뇨증은 소아에서 흔히 관찰할 수 있는데, 이는 반복적이고 부적절하며 불수의적인 소변 배설을 특징으로 하는 배뇨 장애로서, 가족내 문제 뿐 아니라 환자의 사회적 적응에 있어서도 정신적 고통을 야기한다. 이 장애에 대한 치료 방법으로서는 행동 치료, 정신치료, 배뇨훈련, 수면방해요법, 최면요법 등이 있으나 최근에는 약물치료의 중요성이 강조되고 있다.¹²⁾ 치료약물로서는 삼환계 항우울제에 속하는 imipramine이 널리 사용되고 있으며, 비교적 안전하고 효과적인 약물로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 그러나 부작용으로서 소변저류, 입마름, 위장 장애를 포함한 항콜린성 작용외에도 졸음, 신경 과민, 성격 변화등이 나타나며, 특히 급성중독시의 심근 기능 장애는 아주 위험하다.

Imipramine이 유뇨증 치료제로서 명백한 임상효과를 나타내는데도 불구하고 그 작용기전에 대해서는 아직 논란이 많다. 즉 imipramine의 항우울 작용으로는 보는 견해가 있었으나 다른 작용기전을 가진 항우울제는 치료 효과가 없으며, 또 항우울 효과는 투여 2주후에 나타나는데 비해 항유뇨 효과는 즉시 나타난다는 점등으로 미루어 볼 때, 항우울작용을 항유뇨효과의 합당한 기전으로 받아들이기는 어렵다고 한다.^{3,4)}

서론에서 언급한 바와 같이 imipramine의 항유뇨작용이 방광근에 대한 작용이며, 자율신경지배

와 연관되어 있다면 이에 대한 연구로서는 방광근 절편에 대한 전기장 자극과 myography를 병용한 연구 방법이 사용가능하며 또 많이 시행되고 있다. 그러나 그러한 간접적인 방법으로는 실험성적의 평가에 어려운 점이 많다. 따라서 본 연구자는 방광평활근으로 부터 단일세포를 분리 배양하여 자율신경의 영향을 배제한 상태에서 imipramine의 직접작용을 관찰해 보기로 하였다.

그림 1은 본 실험에서 볼 수 있는 평활근세포의 영상을 부류별로 나열한 것이다. 사진 A는 손상을 입었으나 이완되어 있는 세포이다. 이는 세포의 일부가 탈락되었으나 나머지 부분의 세포질은 대개 정상세포와 유사한 상태를 유지하고 있는 것으로서 아마도 acrolein 고정 직전 또는 직후에 손상을 입은 것으로 생각된다. 사진 B는 손상되고 수축된 세포로서 손상된 세포막을 통하여 세포외액의 칼슘이 대량 유입하여 세포를 수축시키고 원형질 전반에 걸쳐 세포의 형태적 및 기능적 특성을 상실한 것으로 보이는 바, 이러한 유형의 세포는 측정에서 제외되었다. 사진 C와 D는 세포의 외형이 잘 보존되어 있으며 건강한 핵이 밝은 빛을 내고 있고 세포 주위에 밝은 후광 (halo)이 형성되어 있다. 이런 세포만이 측정의 대상이 되었다.

단일세포의 acetylcholine에 대한 반응성은 매우 신속하여 acetylcholine 첨가 후 5초 이내에 수축을 완료하였다. 이는 근절편의 수축력 측정 실험에서도 볼 수 있는 현상으로서 초기의 phasic contraction에 해당한다고 볼 수 있다. 10초 이후 120초까지 5초 대의 수축보다는 약하지만 지속적으로 유의한 수축상태를 유지하는 것은 근절편의 수축력 측정 실험에서도 볼 수 있는 tonic contraction에 해당하는 것으로 볼 수 있다. 그러나 단일세포에서의 phasic contraction이 신속히 발생하고 지속 시간이 짧은 경향을 보이는 것은 약물이 개개의 세포에 직접 접촉하기 때문인 것으로, 근절편에서 처럼 조직사이로 침투해 들어가는 시간이 소요되지 않으며, 또 같은 이유에서 수축을 유발하는 약물의 용량도 적게 소요된다. 그러므로 이하의

실험에서는 최대의 수축을 관찰하기 위하여 acetylcholine첨가 5초후에 acrolein을 투입하여 세포를 고정시켰다.

Acetylcholine 유발 수축에 대한 atropine의 억제 작용은 atropine의 항무스카린성 작용인데, 그림 3에서 보는 바와 같이 atropine은 acetylcholine 유발 수축을 농도 의존적으로 억제하였다. Atropine 10⁻⁷M에 의한 억제는 크게 뚜렷하지 않아서 acetylcholine의 고농도 첨가시에만 유의한 차이가 관찰되었으나, atropine 10⁻⁶M 첨가로 인한 억제는 매우 강력하여 용량 반응곡선 전체가 유의하게 억압되는 양상을 보였다.

약리학적으로 경쟁적 길항관계에 있는 수용체 봉쇄제는 효현제의 용량-반응곡선을 우측으로 평행이동시킨다.¹⁶⁾ 그러나 본 실험에서 acetylcholine의 농도-반응곡선은 atropine 첨가시에 평행이동 대신 수직방향으로 억압되는 양상을 보였다. 그것은 살아있는 개체나 적출장기에 측정되는 생리적 data의 근간은 각장기를 이루고 있는 세포의 변화이다. 즉 평활근절편의 수축력이 gram 단위로 측정되었다면 이는 그 조직을 이루고 있는 세포들의 수축이 하나의 중력의 단위로 측정된 것이다. 그러나 본 실험에서의 성적은 독립적으로 존재하는 세포 하나 하나의 수축상을 그 길이의 변화로 나타낸 것이며, 이러한 차원에서의 성적은 고전적인 약리학적 길항관계에 적용되지 않을 수도 있을 것으로 본다. 향후 이와 같은 성적의 상호관계를 규정하고 또 판별할 수 있는 방법이 연구되어야 할 것이다.

Imipramine은 atropine보다 더욱 강력한 억제작용을 보여 imipramine 10⁻⁶M의 첨가만으로도 acetylcholine의 농도-반응 곡선을 유의하게 억압하였다. Imipramine의 농도가 10⁻⁷M일 때는 10⁻⁶M일 때와 농도-반응 곡선이 일치되며 이는 atropine 10⁻⁶M 존재하에서의 성적과 그 양상이 매우 흡사하였다.

위의 결과를 종합하면 본 실험에 사용된 조건하에서의 collagenase를 이용한 세포 분리법은 단일 세포를 대상으로 하는 실험을 위하여 가용한 방법이며, imipramine은 개의 방광평활근 단일세포에서

atropine보다 더 강력한 콜린성 수용체 봉쇄작용을 나타낸다고 생각되었다.

요 약

유뇨증의 치료제로서 널리 사용되고 있는 imipramine의 작용기전에 관한 학설이 여러가지가 있으나 그 중 콜린성수용체 봉쇄작용을 관찰하기 위한 방법으로 평활근 세포를 분리배양하여 단일 세포에 대한 acetylcholine의 수축작용과 이에 대한 imipramine의 길항작용을 atropine의 그것과 비교해 보기로 하였다.

개의 방광을 적출하여 0~4℃의 K-H 용액내에서 2 x 2mm크기의 평활근 절편을 얻어 36℃의 collagenase 용액에 넣고 95%/5% O₂/CO₂ 혼합산소 공급하에서 17~20분동안 배양하여 분리된 부유세포군을 5 ml test tubes에 나누어 담고 acetylcholine을 10⁻¹⁴M~10⁻⁶M의 농도로 첨가하였다. Acrolein 1%를 가하여 수축한 세포를 고정시킨 후, 위상차 현미경에 장착한 CCTV camera로 채취한 영상을 microscaler로 전송하고 monitor상에서 세포의 길이를 측정하였다.

분리된 세포들은 acetylcholine에 의해 5초 이내에 최대 수축을 보였으며 이후 120초까지 수축상태를 지속하였다.

Atropine은 acetylcholine 유발 수축을 atropine 10⁻⁷M에서부터 농도의존적으로 억제하였으며, imipramine도 acetylcholine 유발수축을 atropine과 같은 경향으로 농도의존적으로 억제하였는데, imipramine 10⁻⁶M의 저농도에서도 유의한 억제제를 보였다.

이상의 결과를 종합하면 본 실험에 사용된 조건하에서의 collagenase를 이용한 세포 분리법은 단일 세포를 대상으로 하는 실험을 위하여 가용한 방법이며, imipramine은 개의 방광평활근 단일세포에서 atropine보다 더 강력한 콜린성 수용체 봉쇄작용을 나타낸다고 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Wall, LL : The management of detrusor instability. *Clin Obstet Gynecol* 33(2):327-77, 1990
2. Kumazawa Ichikawa MR, Franco Tostado B, Ruvalcaba Aceves R: Management of primary nocturnal enuresis in school children with slow learning ability : usefulness of imipramine. *Bol Med Hosp Infant Mex* 47(6):390-394, 1990
3. Winsberg B, Bailer J, Kupietz S: Effect of imipramine and dextroamphetamine on behavior of neuropsychiatrically impaired children. *Am J Psychiatry* 128(11):1425-1431, 1972.
4. Rapoport JL, Mikkelsen EJ, Zavadil A, Lee L, Gruenau C, Mendelson W, Gillin JC: Childhood enuresis II : Psychopathology, tricyclic antidepressants concentration in plasma and antienuretic effect. *Arch Gen Psychiatry* 37(10):114-115, 1980.
5. Martin GI : Imipramine pamoate in the treatment of childhood enuresis. *AM J Dis Child* 122(1): 42-47, 1971.
6. Kales A, Kales JD, Jacobson A, Humphrey FJ, Soldatos CR: Effect of imipramine on the enuretic frequency and sleep stage. *Pediatrics* 60(4):431-436, 1977.
7. Axelrod J, Whitby LG, Hertting G : The effect of psychotropic drugs on the uptake of 3H-norepinephrine by tissues. *Science* 133:383-384, 1961.
8. Sulser F, Vetulani J, Mobley PL : Mode of action of antidepressant drugs. *Biochem Pharmacol* 27(3):257-261, 1978
9. Foreman MM, McNulty AM : Alterations in K (+)-evoked release of 3H-norepinephrine and contractile responses in urethral and bladder tissues induced by norepinephrine reuptake inhibition. *Life Sci* 53(3):193-200, 1993.
10. Benson GS, Sarshik SA, Raeze DM, Wein AJ : Bladder muscle contractility : Comparative effects and mechanisms of action and atropine, propanthelin, flavoxate, and imipramine. *Urology* 9(1):31-35, 1977.
11. Levin RM, Wein AJ : Direct measurement of the anticholinergic activity of a series of pharmacological compounds on the canine and rabbit urinary bladder. *J Urol* 128(2):396-398, 1982.
12. Nilvebrant L, Andersson KE, Mattiasson A : Characterization of the muscarinic cholinceptors in the human detrusor. *J Urol* 134(2):418-423, 1985.
13. Noronha-Blob L, Lowe VC, Peterson JS, Hanson RC : The anticholinergic activity of agents indicated for urinary incontinence is an important property for effective control of bladder dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 251(2):586-593, 1989.
14. Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P : Neurohormonal transmission : the autonomic and somatic motor nervous system. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P : *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. Pergamon Press, New York, 1991, pp 84-121.
15. Esperanca M, Gerrard JW : Nocturnal enuresis : Comparison of the effect of imipramine and dietary restriction on bladder capacity. *Can Med Assoc J* 101(12):65-68, 1969.
16. Elmer M, Alm P, Kullendorff CM : Innervation of the child urinary bladder. *Sacnd J Urol Nephrol* 20(4):267-273, 1986.
17. Kullendorff CM, Elmer M, Alm P : Urinary bladder innervation in children. *J Pediatr Surg* 22(3):240-242, 1987.
18. Ross EM : *Pharmacodynamics : Mechanisms of*

durg action and the relationship between drug concentration and effect. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P: The Pharmacological

Basis of Therapeutics, 8th ed. Pergamon press, New york, 1991, pp 33-48.

-Abstract-

Effect of Imipramine on the Contractility of Single Cells Isolated from Canine Detrusor

Chan Wook Huh, Kwang Youn Lee, Won Joon Kim

*Department of Pharmacology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

The objective of this study was to establish a good methodology to isolate single smooth muscle cells that are alive and respond properly to pharmacological agents. Canine urinary bladders were employed as the source of single cells, and acetylcholine, atropine and imipramine were used as indicators of pharmacological responsiveness.

Imipramine, an antidepressant drug exhibited the anticholinergic and calcium antagonizing properties on rat detrusor muscle. To establish a control value for a further experiment to elucidate the mechanism of action of imipramine on detrusor muscle, we measured the concentration-response of single cells to acetylcholine in the presence of imipramine by length of the cells and compared the result with the response in the presence of atropine.

Tiny chops of smooth muscle taken from anesthetized canine urinary bladder were incubated in collagenase solution at 36°C for 17-20 minutes. The collagenase solution included collagenase 1.2 mg/ml, soybean trypsin inhibitor 0.08 mg/ml, bovine serum albumin 2% in 10 ml Krebs-Henseleit buffer solution aerated with a consistent breeze of 95/5% O₂/CO₂ to maintain the pH at 7.4. After washing with plain K-H solution on 450 mesh, cells were dissociated from the digested tissue for 12-15 minutes. Cell suspension was transferred in 5 ml test tubes and acetylcholine was added for the final concentration to be 10⁻¹⁴~10⁻⁹M. To find the optimal time to fix the cells to determine the contractile responses, 1% acrolein was added 5, 10, 20, 30, 60 and 120 seconds after the administration of ACh.

The length of cells fixed by acrolein were measured by microscaler via CCTV camera on phase-contrast microscope. The average length of 50 cells from a slide glass was taken as the value of a sample at the very concentration point.

Single cells were isolated from canine detrusor. The length of untreated cells varied from 82 μm to 94 μm. The maximal response to acetylcholine 10⁻⁹M was accomplished within 5 seconds of exposure, and the shortening was 19±3%.

Atropine reduced the contraction of the cells concentration-dependently. Imipramine which exerts a cholinergic blocking action on some smooth muscles also reduced the contraction concentration-dependently and by a similar pattern as atropine.

These findings document that imipramine may exerts a cholinergic blocking activity in the single smooth muscle cells isolated from canine urinary bladder.

Key Words : Detrusor, Imipramine, Single cell