

소(牛) 식도구 윤상근의 비아드레날린 비콜린성 이완 및 수축

강동목 · 한호재* · 양일석

서울대학교 수의과대학
전남대학교 수의과대학*
(1995년 2월 25일 접수)

Non-adrenergic non-cholinergic relaxation and contraction in circular smooth muscle of bovine reticular groove

Tong-mook Kang, Ho-jae Han*, Il-suk Yang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
College of Veterinary Medicine, Chonnam Naational University*

(Received Feb 25, 1995)

Abstract : To characterize non-adrenergic non-cholinergic(NANC) nerve mediated contractile responses in circular smooth muscle of bovine reticular groove, we investigated NANC relaxation and contraction induced by electric field stimulation to enteric nerves. In the presence of atropine(1 μ M) and guanethidine(50 μ M), electric field stimulation at frequency of 1 to 16Hz(square pulses, 0.5ms duration, 70V) evoked clear-cut relaxations through stimulations. Transient 'rebound contraction' was occurred when the stimulus was switched off. All of the responses (relaxation and rebound contraction) were dose-dependently blocked by Nw-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), an inhibitor of nitric oxide synthesis, and methylene blue, and inhibitor of soluble guanylate cyclase. Tetraethyl ammonium(TEA), a potassium channel blocker, did not block the NANC relaxations.

Key words : bovine reticular groove, nitric oxide, NANC relaxation, rebound contraction, L-NAME

서 론

소를 포함한 반추동물에서 식도구(esophageal groove)는 제2위벽에 존재하는 홈통모양의 구조물로서 어린 반추류의 경우 섭취한 액상내용물을 분문부에서 제4위로 직접 보내는 역할을 담당한다. 식도구의 형성은 이유 후 동물이 성숙함에 따라 사라지는 것으로 알려지고 있으나 심한 탈수에 빠졌을 때는 식도구의 형성이 다시 나타나

는 것으로 보아 성숙동물에서 완전히 퇴화한 기능은 아닌 듯 하다. 이러한 식도구의 형성에 관여하는 신경기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지는 않으나, 액상내용물이 구강과 인두에 있는 수용체를 자극하면 그 자극이 전후두신경을 통해 중추로 전해지고 이는 다시 식도구에 분포하는 원심 미주신경을 통해 acetylcholine을 분비하므로써 홈통구조가 형성된다는 것이 일반적으로 알려진 사실이다¹. 그러나 콜린성 신경 이외에 비아드레날린 비

콜린성(non-adrenergic non-cholinergic; NANC) 신경의 자극에 의해서도 reticular omasal orifice(ROO)의 개구가 유도되어진다는 사실³은 acetylcholine 이외에 NANC 신경 유래의 다른 신경전달물질이 식도구의 형성에 관여하고 있음을 시사하며, in vivo에서 vasoactive intestinal peptide(VIP)^{4,5} 혹은 vasopressin⁶ 등의 NANC neurotransmitter가 reticulomasal orifice의 개구 형성에 관여할 가능성이 있다는 사실도 이를 뒷받침 해준다.

최근들어 위장관을 포함한 여러 평활근 조직에서 NANC 신경의 주요 억제성 신경전달물질로서 nitric oxide(NO)가 보고되었다^{7,9}. 따라서 소의 식도구 평활근에서도 NANC 신경에 의한 수축력 조절기전에 NO가 관련되어 있을 가능성이 높다. 따라서 본 실험에서는 성숙 소의 식도구 평활근 조직에서 NANC 신경 자극에 의한 이완 및 수축과정에 NO가 관련되어 있는지에 대해 알아보는 한편 다른 NANC 신경전달물질이 관련되어 있을 가능성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 본 실험을 위해 수원 도축장에서 도축되는 약 2세 가량의 건강한 수소를 이용하였다. 도살 직후 위를 열어 내용물을 비우고 제2위벽에서 식도구를 찾아 분문부와 reticulomasal orifice 사이의 가운데 부분에서 너비 5cm 가량을 잘라 Tyrode용액에 담아 즉시 실험실로 운반하였다.

식도구 평활근 제작 : 식도구 조직을 95% O₂, 5% CO₂의 혼합가스가 계속 공급되는 Tyrode 용액이 담긴 넓은 초자용기에서 지방조직과 결합조직들을 제거한 다음 식도구를 펼쳐 고정하였다. 펼쳐진 식도구의 바닥 부위에서 윤상근만을 분리한 후 폭 3mm, 길이 10mm의 크기의 평활근 조직 절편을 제작하여 실험에 사용하였다.

평활근의 수축력 측정 : 37℃로 일정하게 온도를 맞추면서 95% O₂, 5% CO₂의 혼합가스로 평형을 이룬 Tyrode 용액이 담긴 25ml용 organ bath에 윤상근 절편을 옮긴 후 한쪽 끝은 고정하고 다른쪽 끝은 상하, 좌우, 전후로 움직일 수 있는 manipulator에 달려 있는 근수축변환기(Narco, F-60)에 연결하여 Physiograph(Narco, MK-IV)로 등척성 수축을 기록하였다. 매 표본마다 1.0g의 장력을 걸어준 후 45분-1시간 동안 안정을 시켜 baseline tension이 일정하게 유지되었을 때 실험을 수행하였으며 각 실험 사이에는 정상용액으로

3회 이상 세척한 후 실험을 계속 하였다. NANC 환경을 조성하기 위하여 atropine(1μM)과 guanethidine(50μM)을 전처치 한 후 2.5-5.0μM의 norepinephrine으로 전수축을 유도한 상태에서 조직에 전장자극을 가해 이 때 유발되는 이완을 측정하였다. 전장자극(electric field stimulation; EFS)을 위해서 평활근 조직의 양측에 백금판(0.5cm×2.5cm)을 설치하고 전기자극기(Narco SI-10)를 연결하여 square pulse로서 자극기간 0.5ms, 1-16Hz, 70V의 자극강도로 평활근 조직내에 존재하는 내재성신경만을 자극하였다.

Tyrode 용액의 조성 및 사용약물 : 사용한 Tyrode 용액의 조성(mM/L)은 다음과 같다. NaCl 118, KCl 5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24, CaCl₂ 1.8, glucose 10, pH 7.4. 실험에 사용된 모든 약물은 Sigma로부터 구입하였다.

결과분석 및 통계처리 : 전장자극에 의한 이완 및 수축정도는 각 실험에서 주어진 최대 전장 자극 강도에 의해 유발된 반응에 대한 상대적 크기(%)로 표시하였으며 mean±SEM로 나타내었고 Student's paired "t" test와 ANOVA test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

NANC 환경하에서 norepinephrine으로 전수축시킨 후 전장자극으로 평활근 조직내에 존재하는 내재성 신경만을 자극하였을 경우 식도구 평활근 조직은 이상성(biphasic) 수축반응을 보였다. 즉, 평활근 조직은 전장 자극 기간중에는 빠른 이완을 보였으나 자극이 끝나는 동시에 일시적인 큰 수축현상(rebound contraction)을 나타내었다(Fig 1). 이러한 이상성 이완 및 수축반응은 전장자극의 크기(1-16Hz)에 비례하여 모두 증가하였으며(Fig 1, 2) 신경차단제인 tetrodotoxin(1μM)에 의해 차단되어(Fig 1B) 이러한 이상성 수축반응 모두 내재성 신경에 의해 매개되어짐을 알 수 있었다. 전장자극 기간중에 나타나는 이완반응의 크기는 약 8Hz 이상에서 최대치를 보여 norepinephrine으로 전수축을 유도하기 이전의 기초장력 수준으로 이완하였다(Fig 1C).

이러한 NANC 이완반응이 nitric oxide(NO)에 의해 매개 되어지는지를 알아보기 위하여 NO synthase 억제제인 Nw-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)을 전처치 하였던 바 이완반응은 농도의존적으로 감소하였으나(Fig 2) 고농도의 L-NAME(100μM) 존재하에서도 이러한 이완반응이 완전히 차단되어지는 아니하였다.

L-NAME은 이완반응 뿐만 아니라 rebound contraction까지도 농도의존적으로 억제하였으나(Fig 2B, C) 이완반응에 대한 억제효과가 더 컸다. 즉 L-NAME 100 μ M은 전자극범위(1-16Hz)에서 유의성 있는 이완 억제를 유도했으나 rebound contraction에 대해서는 8Hz 이상의 자극에 대해서만 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다.

일반적으로 NO의 평활근에 대한 이완효과는 세포내 soluble guanylate cyclase를 활성화하여 cGMP 생성을 증가함으로써 나타나는 것으로 알려져 있다. Guanylate cyclase 억제제인 methylene blue(2.5mM)를 처치한 후 시간 경과에 따른 이완 및 rebound contraction의 억제를 관찰하였다. Methylene blue 처치 후 시간 경과에 따라

억제효과가 나타나 20분에 전장자극(2, 4Hz)에 의한 이완 및 rebound contraction이 모두 유의성 있게 감소하였다(Fig 3).

NANC 신경에 의한 이완과정이 칼슘통로의 활성화에 의해 나타나는지를 알아보기 위하여 비특이적 칼슘통로 억제제인 tetrathyl ammonium chloride(TEA-Cl)를 처치하여 보았다. 고농도의 TEA(10-20mM) 처치 후 수축력이 크게 증가하면서 phasic contraction이 나타났으며 이 경우에도 NANC 신경에 의한 이완반응 및 rebound contraction은 차단되지 않았다(Fig 4). 이는 NANC 이완 및 rebound contraction이 칼슘통로의 활성화와는 무관한 다른 기전을 통해 유도되어짐을 시사한다.

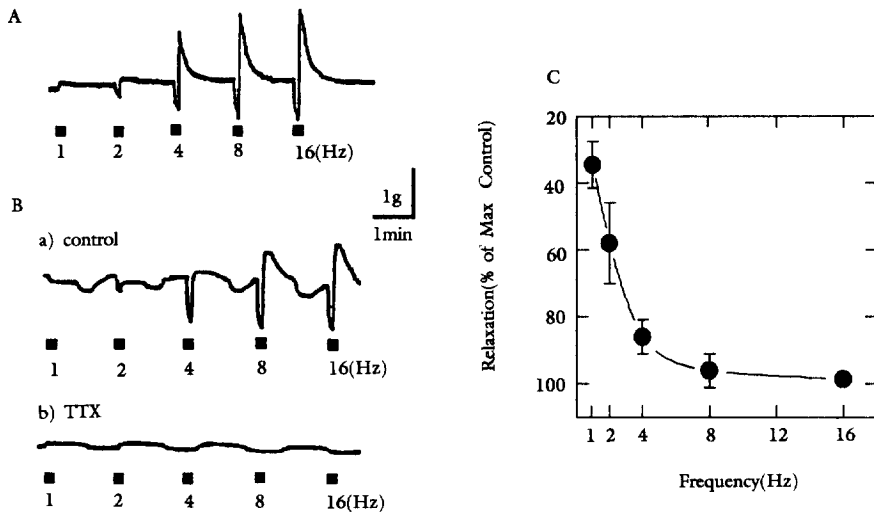


Fig 1. NANC relaxations and rebound contractions. A,C. EFS(1-16Hz) induced frequency-dependent NANC relaxations. The 'rebound contraction' was occurred when the stimulus was switched off. B. Both responses were completely blocked by tetrodotoxin(1 μ M) indicating that responses were NANC-neurogenic. EFS with 10s trains(1-16Hz) at about 2 min intervals in the presence of atropine(1 μ M) and guanethidine(50 μ M). n=4; mean \pm SEM

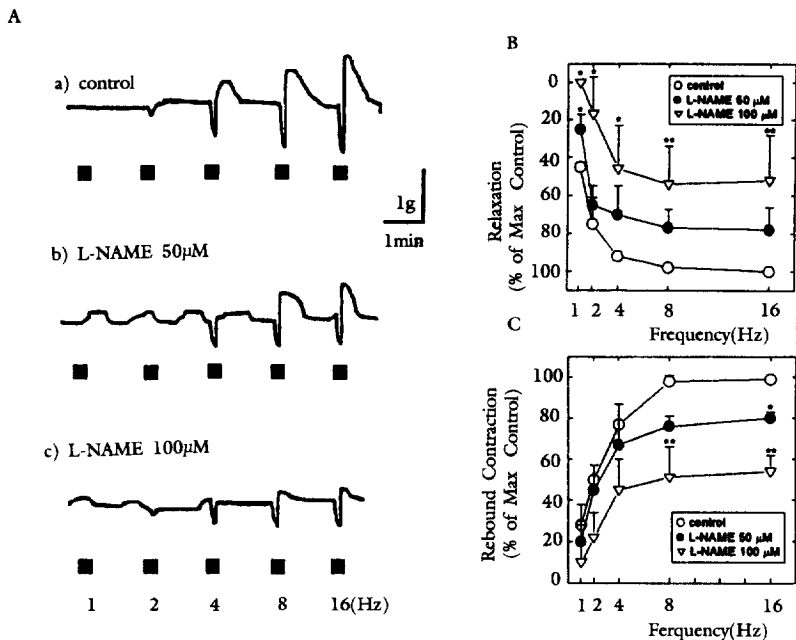


Fig 2. Effects of Nw-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) on the NANC contractile responses. L-NAME dose-dependently inhibited both relaxation and rebound contraction. Inhibitory effect of L-NAME on the relaxation was significant compare to that for rebound contraction. A. original traces, B. effect on the NANC relaxation, C. effect on the rebound contraction. EFS with 10s trains(1-16Hz) at about 2min intervals in the presence of atropine(1μM) and guanethidine(50μM). n=4; mean±SEM *: p<0.05, **: p<0.01

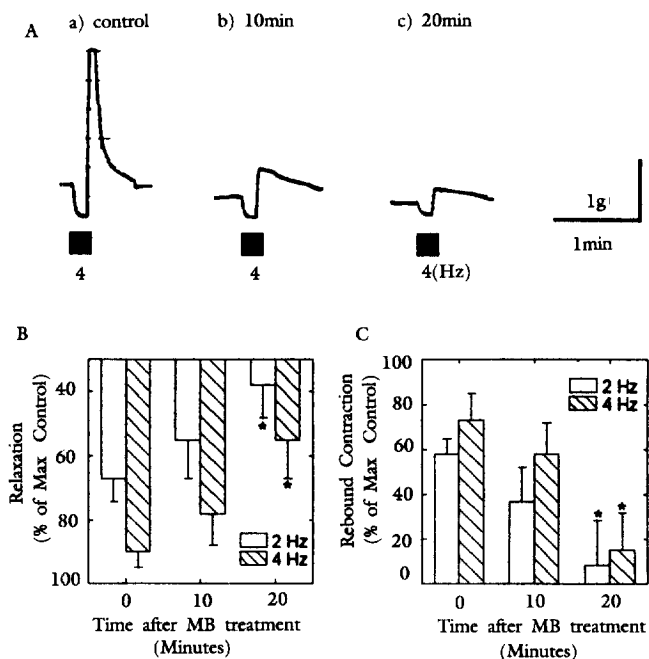


Fig 3. Effects of methylene blue on the NANC contractile responses. Methylene blue(2.5mM) was pre-treated and contractile responses were measured at time of 10 and 20min after the administration. At 20min after both relaxation and rebound contraction were significantly inhibited by methylene blue. A. original traces, B. effect on the NANC relaxation, C. effect on the rebound contraction. EFS with 10s trains(2, 4Hz) in the presence of atropine(1μM) and guanethidine(50μM). n=4; mean±SEM. *: p<0.05

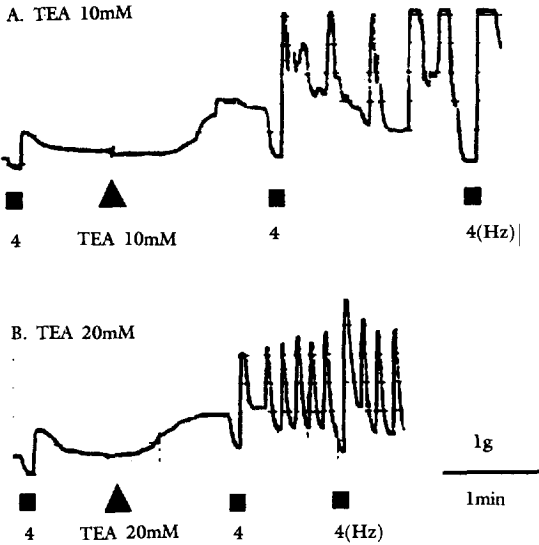


Fig 4. Effect of tetraethyl ammonium chloride(TEA-Cl) on the NANC relaxation. High concentration(10-20mM) of TEA did not block the NANC relaxation. EFS with 10s trains(4Hz) in the presence of atropine(1 μ M) and guanethidine(50 μ M).

고 찰

본 실험의 결과를 요약하면 1) 소 식도구 윤상근에는 이완 및 수축을 유도하는 NANC 신경이 존재하며 2) NANC 신경자극에 의해서 이완 및 rebound contraction의 이상성 수축이 유도되었으며 3) 이러한 이상성 이완 및 수축 모두 L-NAME 및 methylene blue에 의해 부분적으로 억제되었고 4) 이완반응은 칼륨통로의 활성화와는 무관하였다.

일반적인 NO의 평활근 이완과정을 살펴보면 다음과 같다. NO 분비 세포내에 존재하는 constitute type의 NO synthase(NOS)가 L-arginine을 substrate로 하여 L-citrulline으로 전환하는 과정에서 자유라디칼인 NO를 생성한다. 생성된 NO는 세포막을 자유롭게 통과하여 평활근 세포내에서 존재하는 soluble guanylate cyclase를 활성화하여 cGMP 생성을 증가시켜 최종적으로 이완반응을 나타낸다¹⁰. 따라서 이러한 L-arginine/NO 계에 의한 pathway는 enzyme의 substrate인 L-arginine을 NOS가 이용할 수 없는 arginine analogues(L-NAME)로 치환하였을 경우나, guanylate cyclase 억제물질(methylene blue)을 처리하였을 경우 차단된다⁹. 따라

서 본 실험에서 NANC 신경 자극에 의한 이완 및 c-bound contraction이 L-NAME 및 methylene blue 모두에 의해 비슷한 양상으로 차단된다는 사실은 이들 두 반응 모두에 NO가 관련되어 있을 가능성을 말하며, 같은 농도의 L-NAME에 의해 rebound contraction 보다는 이완이 더 잘 차단된다는 사실은 NO가 NANC 이완과정에 주로 관여한다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 다른 여러 평활근 조직에서의 결과와 일치하는 것이다^{8,9,11}.

NANC 신경자극에 의해 유도된 rebound contraction에 NO 이외에 어떠한 종류의 신경전달물질이 관여되어져 있는지 본 실험만으로는 정확히 알 수 없었지만 NANC 이완반응 및 rebound contraction이 고농도의 L-NAME에 의해서도 완전히 차단되지 못한 사실은 NO 이외에 다른 이완성 및 수축성 NANC 신경전달물질이 동시에 분비될 가능성을 시사한다. 일반적으로 NO는 모든 평활근조직에서 이완반응을 유도¹⁰하므로 본 실험에서의 NANC 이완현상은 전술한 L-arginine/NO계에 의한 이완현상으로 쉽게 이해되어 질 수 있으나 rebound contraction은 본 실험의 결과만으로는 명확한 기전을 알 수 없었다. Rebound contraction이 일어날 수 있는 가능한 경우에는 NANC 신경말단으로 부터 분비된 NO가 다른 내재성 interneuron을 자극하여 어떤 종류의 흥분성 신경전달물질을 분비하여 평활근세포에 작용하지만 NO가 작용하는 기간동안에는 이완반응이 우세하여 이완효과만이 보이다가 전장자극이 끝나면 비로소 수축반응이 나타날 경우 가능하다. 이러한 NO와 다른 종류의 신경전달물질간의 직렬적 연결구조가 위장관조직에서 보고 되었다¹². 실제로 NO의 작용시간은 매우 짧고 NO 자체의 반감기도 매우 짧으므로¹⁰ 이러한 가능성은 매우 높다고 할 수 있다. 몇몇 위장관 조직에서 퓨린성 신경전달물질인 ATP가 이완 및 수축의 이상성 반응을 유도한다는 보고가 있다¹³. 또한 양(sheep)의 방광 경부 평활근에서 본 실험에서와 유사한 NANC 신경자극에 의한 이상성 수축반응(이완 및 rebound contraction)이 보고¹⁴되었는데 이들 결과를 보면 이완 및 rebound contraction 모두 NO 억제제에 의해 가역적으로 억제되었으며 ATP receptor 차단제에 의해서 rebound contraction은 차단되지 못하였다. 따라서 소의 식도구 윤상근에서 유발된 rebound contraction에 ATP가 관여되어져 있는지는 앞으로 더 규명해야 할 사항으로 생각되며, 이완과정에 있어서 NO 이외에 다른 NANC 신경전달물질이 직렬 혹은 병렬적으로 연계되어져 있는지도 상세히 규명되어야 할 것으로 사료된다.

몇몇 위장관 평활근조직에서 NO는 세포내 칼슘에 의해 활성화되는 large conductance Ca-activated K-channel을 활성화 하므로서 이완효과를 발휘하는 것으로 보고되었다¹⁵. 소 식도구 평활근 운상근에서도 NO에 의한 이완과정에 이러한 기전이 관련되어져 있는지를 알아보기 위해 칼슘통로 차단제인 TEA를 고농도로 처치하여 NANC 이완을 차단하지는 못하였다. 이러한 결과는 낮은 농도의 TEA에 의해서도 Ca-activated K-channel이 잘 차단된다는 보고¹⁶에 비추어 볼 때 이 채널의 활성화에 의해 식도구 운상근의 NANC 이완이 유도되어지는 것은 아니라는 것을 시사한다.

결 론

소 식도구(esophageal groove) 운상근의 수축조절에 있어서 NANC 신경의 역할 및 이를 담당하는 신경전달물질의 본체를 규명하고자 전장자극을 이용 내재성 신경만을 자극하면서 등척성 수축력을 측정하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소 식도구 운상근에서 NANC 신경자극에 의해서 이완 및 rebound contraction의 이상성 수축이 유도되었으며, 이완 및 수축의 크기는 자극의 크기에 의존적으로 증가하였고 신경차단제인 TTX에 의해 모두 차단되었다.

2. 이러한 이상성 이완 및 수축 모두 NO 차단제인 L-NAME 및 methylene blue에 의해 부분적으로 억제되었다.

3. 이완반응은 칼슘통로의 활성화와는 무관하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 소 식도구 운상근에서 NANC 신경자극에 의한 이완 및 수축과정에 NO가 관여하며, NO 이외에 다른 NANC 신경전달물질이 동시에 분비될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Wester J. The rumination reflex in the ox. *The Vet J* 1930; 36: 401-410.
2. Dziuk HE. *Digestion in the ruminant stomach*. In: Swenson MJ ed. *Duke's physiology of domestic animals*, 10th ed. Ithaca: Cornell Univ Press 1984; 320-339.
3. Newhook JC, Tichen DA. Effect of vagotomy, a-

- tropine, hexamethonium and adrenline on the destination in the stomach of liquids sucked by milk-fed lambs and calves. *J Physiol* 1974; 237: 415-430.
4. Reid AM, Shulkes A, Titchen DA. Effects of the vagus nerves on gastric motility and release of vasoactive intestinal polypeptide in the anaesthetized lamb. *J Physiol* 1988; 396: 11-24.
5. Reid AM, Shulkes A, Titchen DA. The effects of vasoactive intestinal polypeptide on gastric motility in the lamb. *J Physiol* 1988; 396: 41-54.
6. Mikhail M, Barugere H, Bars HL, et al. Stimulated esophageal groove closure in adult goats. *Am J Vet Res* 1988; 49(10): 1713-1715.
7. Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-347.
8. Desai KM, Sesa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991; 351: 477-479.
9. Ward SM, Dalziel HH, Bradley ME, et al. Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 1075-1082.
10. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
11. Lefebvre RA, hasrat J, Gobert A. Influence of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on vagally induced gastric relaxation in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 315-320.
12. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 303-309.
13. Maguire MH, Satchell DG. Purinergic receptors in visceral smooth muscle. In: Burnstock G, ed. *Purinergic receptors*. London: Chapman Hall, 1981; 49-91.
14. Thornbury KD, Hollywood MA, McHale NG. Mediation by nitric oxide of neurogenic re-

laxation of the urinary bladder neck muscle in sheep. *J Physiol* 1992; 451: 133-144.

15. Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, et al. Nitric oxide and nitrocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in

canine proximal colon. *Am J Physiol* 1991; 261: G553-G557.

16. Carl A, Sanders KM. Ca^{2+} -activated K channels of canine colonic myocytes. *Am J Physiol* 1989; 257: C470-C480.