

## 토끼 위체에서 비-아드레날린 비-콜린성 이완반응의 하행성 감소

홍은주 · 최지은 · 박미선\* · 김명우 · 최수경 · 홍승철<sup>†</sup>

부산대학교 약학대학, \*부산 식품의약품청

(Received March 20, 1997)

### Downward Decrease of Non-adrenergic Non-cholinergic Relaxation in the Rabbit Gastric Body

Eun Ju Hong, Ji Eun Choi, Mi Sun Park\*, Myung Woo Kim,  
Su Kyung Choi and Sung Cheul Hong<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea  
\*Pusan Food and Drug Administration, Pusan, 608-080, Korea

**Abstract**—Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) innervation on the circular muscle of the rabbit gastric body was investigated by observing the magnitude of relaxations induced by the electrical field stimulation (EFS). Strips were cut from the greater curvature of the gastric body and stimulated with 5s trains of 0.5 ms pulses at 1~20 Hz, 40 V. The EFS induced transient frequency-dependent contractions, followed by a slowly recovering relaxation especially at higher frequencies of the EFS. In the presence of atropine and guanethidine, the contractions were virtually abolished, while the frequency-dependent relaxations by the EFS remained unaffected. The magnitude of relaxations progressively decreased as the location of the strips gets closer to the bottom of the gastric body. The relaxations were abolished by tetrodotoxin, indicating that their origin is the NANC nerve stimulation. N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA, 10~100 μM), the inhibitor of nitric oxide (NO)-synthase, caused a concentration-dependent inhibition of the NANC relaxations. The inhibitory effects of L-NNA were not affected by the location of the strips and were reversed by L-arginine, the precursor of NO-biosynthesis. Hemoglobin (20~60 μM), a NO scavenger, inhibited the NANC relaxations in a concentration-dependent manner. This inhibition was more prominent in the NANC relaxations observed in the lower portion of the gastric body and the relaxations induced by lower frequencies of the EFS. Methylene blue (10~100 μM), an inhibitor of cytosolic guanylate cyclase, markedly inhibited the NANC relaxations, almost abolishing the response at a higher dose (100 μM). These results suggest that NANC innervation of the rabbit gastric body progressively decrease as the location of the strips gets closer to the bottom of the gastric body, and that the NANC relaxation is primarily mediated by NO-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP).

**Keywords** □ Rabbit gastric body. Electrical field stimulation. Inhibitory NANC innervation. NO-cyclic GMP pathway

위는 주로 음식물의 저장기능 (reservoir function)을 하는 근위부와 수축운동 (phasic contractility)을 하여 음식물을 분쇄하고 위를 비우는 원위부로 되어 있으며, 근위부는 위저와 위체 상부로 되어 있고 원위부는

위체 하부와 유문부로 되어 있다.<sup>1)</sup>

위를 지배하고 있는 원심성인 미주신경 절전섬유는 위벽에 있는 장근신경총 (myenteric plexus)에서 수축성인 콜린 효능 신경과 억제성인 비-아드레날린 비-콜린성 (non-adrenergic non-cholinergic, NANC) 신경으로 된 두개의 절후신경섬유와 접합하고 있다.<sup>2)</sup> NANC 신경은 음식물을 먹을 때 미주신경을 거치는 반

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-510-2805 (팩스) 051-513-6754

사적인 수용성 이완반응 (receptive relaxation)을 매개하는 점에서 위의 조절기능에 중요한 역할을 하리라고 추측되고 있다.<sup>3)</sup>

위를 지배하고 있는 NANC 신경의 전달물질은 NO 생합성 저해제 ( $N^G$ -monomethyl-L-arginine : L-N-MMA,  $N^G$ -nitro-L-arginine : L-NNA 및  $N^G$ -nitro-L-arginine methylester : L-NAME 등)에 의하여 흰쥐<sup>4,5)</sup>, 기니픽<sup>6, 8)</sup> 및 토끼<sup>9, 11)</sup> 위의 NANC 이완반응이 억제되었으며, 흰쥐 위의 NANC 신경을 자극하였을 때 NO와 성질이 비슷한 불안정한 혈관이완인자가 유리되었고<sup>4)</sup>, 면역화학적 연구에서 NO-synthase가 흰쥐 위체<sup>12)</sup>와 기니픽 위체<sup>7)</sup>의 장근신경총에서 발견된 것으로 보아 NO가 신경전달역할을 하리라고 추정하였다.<sup>4,7, 8, 11, 13)</sup> 또한 세포막에서 NO와 결합하여 NO를 불활성화시키는 hemoglobin<sup>14)</sup>이 토끼와 기니픽 위의 NANC 이완반응을 억제하였으며<sup>4, 8, 11)</sup>, cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue<sup>14)</sup>가 NANC 이완반응을 억제<sup>13, 15, 17)</sup>한 것으로 보아 위의 NANC 이완반응은 주로 NO-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) 경로에 의하여 매개되리라고 추정하였다.<sup>17)</sup>

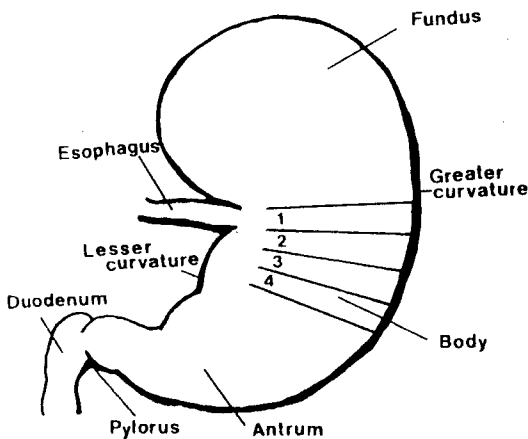
위의 수용성 이완반응은 위체에서 더 현저하게 일어나므로 지금까지 위의 NANC 이완반응의 기전에 대한 연구는 주로 위체에서 많이 연구되었으므로<sup>4-6, 8-11, 17-18)</sup> 본 연구에서는 토끼 위체의 윤상근을 상부에서 하부로 순차

적으로 절단하여 만든 신경근 표본들에 대한 NANC 이완반응의 크기를 비교하여 위체의 NANC 신경지배를 검토하고, 위체의 NANC 이완반응도 위의 NANC 이완반응처럼 주로 NO-cyclic GMP 경로에 의하여 매개되는지를 연구하고자 하였다.

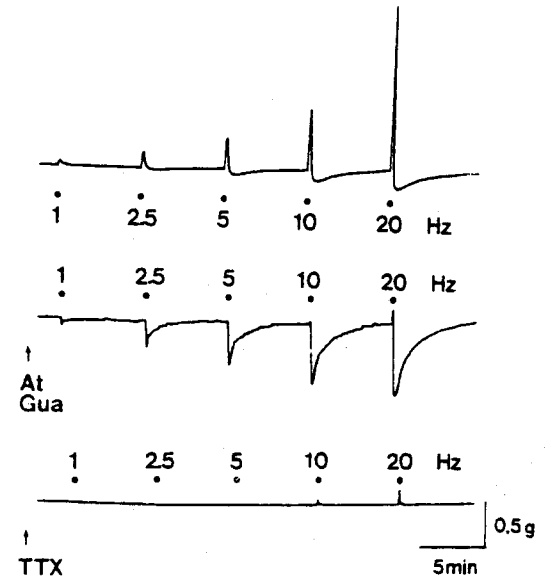
**실험방법**

**표본의 제작 및 실험방법**

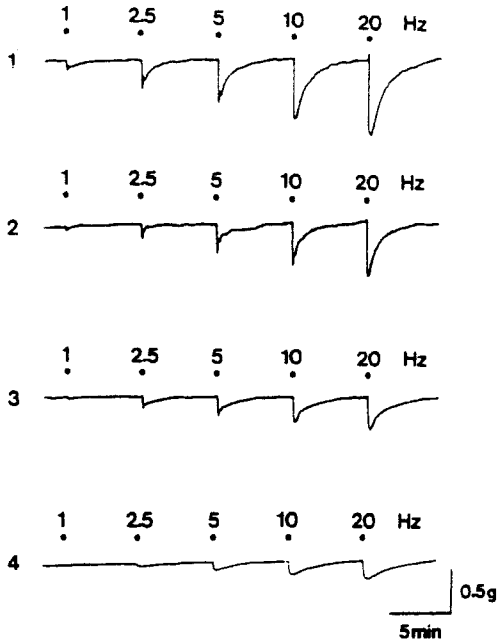
토끼 (체중 2~3 kg)를 ether로 마취시킨 후 경동맥을 절단하여 출혈사시키고 위를 분리하여 위점막을 조심스럽게 제거한 다음, 위체 (gastric body)의 신경근 표본은 Fig. 1의 1, 2, 3 및 4와 같이 위체의 윤상근을 대만 (greater curvature)으로부터 상부에서 하부로 순차적으로 절단하여 길이 약 15~20 mm, 폭 2~3 mm의 표본으로 만들었다. 이들 표본을 Krebs's 용액이 담긴 5 ml의 반응조에 설치한 백금전극 사이에 장치하고, 37°C에서 약 0.7 g의 안정장력 (resting tension)을 부하한 후, 실험 개시전에 90분 간 방치하여 평형을



**Fig. 1** -- Diagram of circular muscle strips of the rabbit gastric body. The rabbit gastric body was successively cut from upper strip to lower one of the circular muscle in ventral part of the isolated rabbit gastric body.

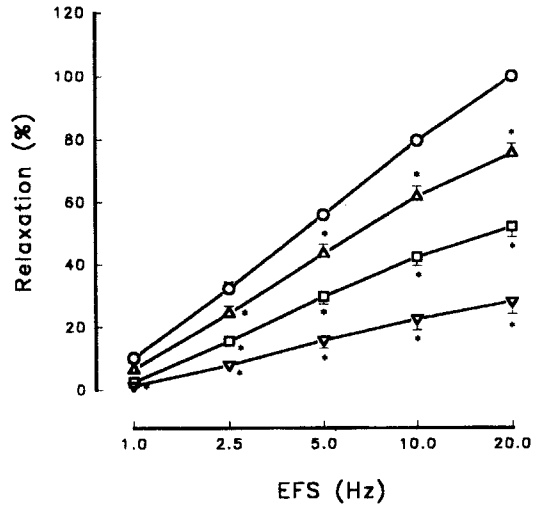


**Fig. 2** -- Typical tracing of non-adrenergic non-cholinergic relaxation of a circular muscle strip in the isolated rabbit gastric body. Atropine (At, 1  $\mu$ M) and guanethidine (Gua, 3  $\mu$ M) or tetrodotoxin (TTX, 0.3  $\mu$ M) were added at arrow. Electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms for 5 secs) was added at dot. Tracing-breaks represent periods of tissue equilibration. Similar results were obtained in other experiments (n=7).



**Fig. 3**—Typical tracing of the frequency-dependent relaxations that progressively decreased as the location of the strips gets closer to the bottom of the gastric body. The experiments were performed in the presence of atropine (1  $\mu$ M) and guanethidine (3  $\mu$ M). Electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms for 5 secs) was added at dot. Tracing-breaks represent periods of tissue equilibration. Similar results were obtained in other experiments (n=18~26)

유지시켰다. 이 방치기간 동안에 15분마다 새로운 영양액으로 교환하여 주었다. 등장성 장력 (isometric tension)의 변화는 Narco physiograph (MK IV)에 연결된 isometric force transducer (Narco F60)를 사용하여 기록했다. Krebs 용액의 조성 (mM)은 NaCl, 118.3; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; Ca-EDTA, 0.026 및 glucose, 11.1 (pH 7.4)이고, 이 영양액을 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합 가스로 포화시켰다. 토끼 위체 표본은 자동적으로 장력 (tone)이 상승되므로 이완반응을 보기위하여 장력을 상승시킬 필요가 없었다. 전기자극 (electrical field stimulation)은 Fujiwara<sup>19)</sup>의 방법에 따라 한 쌍의 평행한 백금선 전극을 통하여 자극했다. 비-아드레날린 비-콜린성 이완반응을 일으키기 위하여 운상근 표본을 muscarine 수용체 차단제인 atropine (1  $\mu$ M) 과 아드레날린 효능 신경 차단제인 guanethidine (3  $\mu$ M) 존재하에서 낮은 자극 빈도 (1~20 Hz, 40 V)에



**Fig. 4**—The frequency-dependent relaxation that progressively decreased as the location of the strips gets closer to the bottom of the gastric body.  $\circ$ : first strip (n=26),  $\triangle$ : second strip (n=18),  $\square$ : third strip (n=22),  $\nabla$ : fourth strip (n=18). Results were shown as mean  $\pm$  S.E. from 18 to 26 experiments and expressed as percentage of relaxation induced by 20 Hz in the first strip. \*P<0.05, significantly different from values of the first strip. Student's *t* test for unpaired observation. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 3.

서 0.5 ms 구경파로써 5초 간 자극하였다. Tetrodotoxin, L-NNA, L-arginine, hemoglobin은 전기 자극 15분 전에 각각 반응조에 투여하였으며, methylene blue는 전기자극 30분 전에 반응조에 투여하였다.

### 사용한 약물 및 용액

실험에 사용한 시약인 atropine sulfate는 Wako 사 (Japan), guanethidine sulfate는 Tokyo-Kasei 사 (Japan), tetrodotoxin, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine, L-arginine hydrochloride는 Sigma Chemical 사 (U.S. A.), methylene blue는 Fluka 사 (Switzerland) 및 sodium nitrite는 Yakuri Pure Chemicals 사 (Japan)의 것을 각각 사용하였다. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine은 0.065 M HCl에 녹여 사용하였다. 그의 약물은 증류수에 녹여 사용하였다. 본 실험에 사용한 hemoglobin은 다음과 같이 만들어 사용하였다. 즉 토끼의 경동맥에서 채취한 혈액 10~15 ml를 4°C에서 20분 간 1200 g 에서 원심분리하여 혈청과 백혈구층을 제거한 후 남아있는 적혈구를 등장인산완충생리식염액 (iso-

tonic phosphate-buffered saline : pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 세척한 적혈구 2 ml를 저장인산완충액 (hypotonic phosphate buffer) 8 ml에 넣어 용혈시킨 후, 4°C에서 40분 간 20,000 g 에서 원심분리하여 상등액인 용혈액 (hemolysate)을 얻었다. 이 방법은 Bowman 및 Gillespie에 의한 방법<sup>20)</sup>에 기초를 둔 것이다. 용혈액의 hemoglobin 농도는 cyanmethemoglobin법<sup>21)</sup>에 의하여 측정하였다. 인산완충액은 Dodge등의 방법<sup>22)</sup>에 따라 다음과 같이 만들어 사용하였다. 저장액은 sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 0.155 M과 sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.103 M이며, 등장인산완충액은 위 두 용액을 적당히 섞어서 pH 7.4에 맞춘것이다. 저장인산완충액 (20 mOsm, pH 7.4)은 등장인산완충액을 1 : 15.5로 희석하여 만들었으며, 등장인산완충생리식염액은 식염수 (0.9% NaCl) 4 용적과 등장인산완충액 1 용적을 혼합하여 만들었다 (pH 7.4).

### 통계분석

위체 표본의 이완작용은 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응의 경우 약물을 투여하기 전 20 Hz의 전기자극으로 일으킨 이완반응의 백분율 (%)로써 각각 표시하였다. 실험결과는 실험회수에 대한 평균치  $\pm$  S. E.로써 나타내었다. 실험결과의 통계처리는 ANOVA 방법으로 한 다음, Student's *t* test에 의해 분석하였으며, P치가 0.05이하일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

### 실험성적

#### 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응

토끼 위체의 윤상근 표본을 전기자극 (1~20 Hz, 0.5 ms, 5s) 하였을 때 자극빈도에 의존하는 수축반응을 일으켰으며 고빈도 (5~20 Hz)에서는 자극빈도에 의존하는 수축반응과 서서히 회복되는 이완반응을 일으켰으나, muscarine 수용체 차단제인 atropine (1  $\mu\text{M}$ )과 아드레날린 효능 신경 차단제인 guanethidine (3  $\mu\text{M}$ ) 존재하에서는 전기자극 후 급격하게 이완된 다음 처음에는 빠르게 다음에는 서서히 회복되는 자극빈도 의존성 이완반응으로 바뀌었다. 이들 이완반응은 신경전도 차단제인 tetrodotoxin (0.3  $\mu\text{M}$ )을 전처리하였을 때 소실되었으므로 비-아드레날린 비-콜린성 (NANC) 이완반응이라 사료된다 (Fig. 2). 위체의 윤상근을 상부에

서 하부로 순차적으로 절단하여 만든 표본 (Fig. 1의 1, 2, 3 및 4)의 NANC 이완반응을 비교한 결과, 위체의 제일 상부에서 얻은 표본 (Fig. 3의 1)의 NANC 이완반응이 가장 크고 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되는 현상을 나타내었다 (위체 상부의 제 1 표본을 20 Hz의 자극빈도로 전기자극하였을 때의 이완반응을 100%로 하였을 때 20 Hz로 일으킨 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 이완반응은 각각  $75.56 \pm 3.05\%$ ,  $52.08 \pm 3.39\%$  및  $28.13 \pm 4.07\%$ 로 점차적으로 감소되었다) (Fig. 3의 1, 2, 3, 4 및 Fig. 4).

#### NANC 이완반응에 대한 $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA) 및 L-arginine의 영향

위체의 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되는 NANC 이완반응 (제 1 표본을 20 Hz의 자극빈도로 전기자극하여 일으킨 이완반응을 100%로 하였을 때 20 Hz로 일으킨 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 이완반응은 각각  $77.98 \pm 3.95\%$ ,  $57.25 \pm 5.89\%$  및  $42.65 \pm 5.06\%$ 로 감소되었다)은 NO synthase 차단제인 L-NNA (10~100  $\mu\text{M}$ )에 의하여 농도의존적으로 유의성

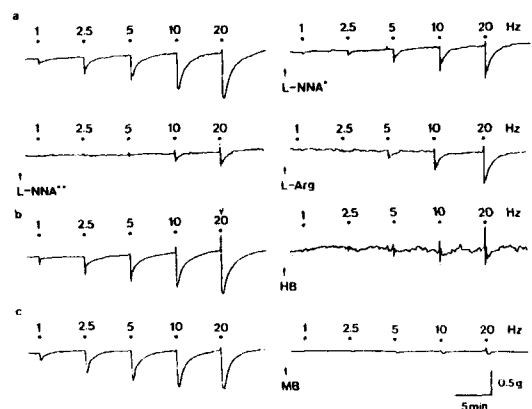
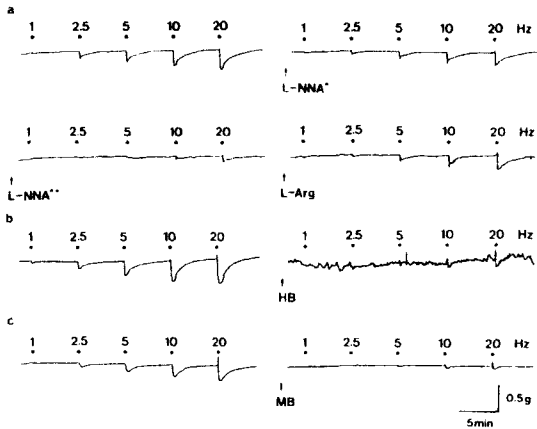
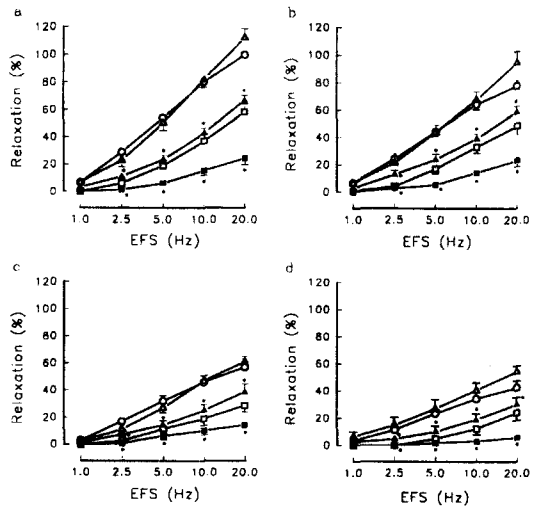


Fig. 5 — Typical tracing showing effects of  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine, L-arginine, hemoglobin and methylene blue on the relaxation to electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms) in the first strip of the circular muscle of the isolated rabbit gastric body.  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA★, 10  $\mu\text{M}$ ; L-NNA★★, 100  $\mu\text{M}$ ), L-arginine (L-Arg, 5 mM), hemoglobin (HB, 60  $\mu\text{M}$ ) and methylene blue (MB, 100  $\mu\text{M}$ ) were added at arrow. a, b and c were different preparations. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 3. Similar results were obtained in other experiments (n=5~15).



**Fig. 6**—Typical tracing showing effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine, L-arginine, hemoglobin and methylene blue on the relaxation to electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms) in the third strip of the circular muscle of the isolated rabbit gastric body. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 5. Similar results were obtained in other experiments (n=4~11).

있게 억제되었으나 (Fig. 5a, 6a 및 7a-d), 각 표본에 대한 억제효과에는 유의한 영향이 없었다 (위체의 각 표본에서 20 Hz의 전기자극으로 일으킨 이완반응을 각각 100%로 하였을 경우 L-NNA 10 μM을 전처리하였을 때 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 표본에서의 이완반응은 각각 66.99±3.68%, 75.92±3.53%, 65.40±5.41% 및 67.80±6.50%로 비슷하게 감소되었고, L-NNA 100 μM을 전처리하였을 때는 각각 24.57±4.81%, 31.12 ±4.99%, 29.76±2.86% 및 16.31±6.50%로 감소되었다. 단 L-NNA 100 μM에서 제 4 표본만이 다른 표본에 비하여 더 현저하게 억제되었다) (Fig. 7a-d). L-NNA의 억제작용은 NO 생합성 전구물질인 L-arginine (L-Arg, 5 mM)을 전처리하였을 때 L-NNA 10 μM의 억제작용은 완전히 제거되었으며, L-NNA 100 μM의 억제작용도 부분적으로 비슷하게 제거되었다 (위체의 각 표본에서 20 μHz의 전기자극으로 일으킨 이완반응을 각각 100%로 하였을 경우, L-NNA 10 μM의 억제작용은 L-Arg 5 mM을 전처리하였을 때 완전히 제거되어 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 이완반응이 각각 112.30±6.46%, 121.40±10.43%, 106.90 ±6.41% 및 128.00±10.12%로 회복되었고, L-NNA 100 μM의 억제작용도 L-Arg 5 mM을 전처리하였을 때 부분적으로 제거되어 각각 58.54±5.91%, 64.94± 6.49%, 60.00±5.56% 및 67.

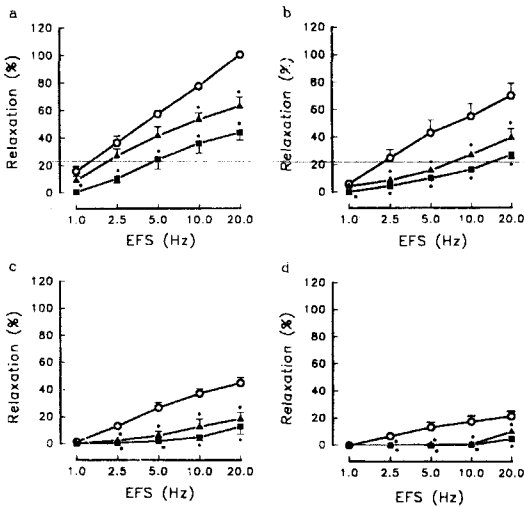


**Fig. 7**—Effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine, L-arginine on the relaxation to electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms) in a circular muscle strip of the isolated rabbit gastric body. a: first strip, b: second strip, c: third strip, d: fourth strip. ○: control (EFS), ▲: L-NNA 10 μM+EFS, ■: L-NNA 100 μM+EFS, □: L-NNA 100 μM plus L-arginine 5 mM+EFS. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 3. Results were shown as mean±S.E. from 5 to 15 experiments and expressed as percentage of relaxation induced by 20 Hz of the first strip in the absence of L-NNA and L-arginine. \*P<0.05, significantly different from control values, Student's *t* test for unpaired observation.

53±9.93%로 비슷하게 회복되었다) (Fig. 7a-d).

**NANC 이완반응에 대한 hemoglobin의 영향**

위체의 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소된 NANC 이완반응 (제 1 표본을 20 Hz의 자극빈도로 전기자극하여 일으킨 이완반응을 100%로 하였을 때 20 Hz로 일으킨 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 이완반응은 각각 69.77±8.66%, 45.19±3.82% 및 22.00±3.51%로 감소되었다)은 세포밖에서 NO와 결합하여 불활성화하는 hemoglobin (HB, 20~60 μM)을 전처리하였을 때 농도의존적으로 억제되었으며 (Fig. 8a-d), 이 억제작용은 위체 상부에서 하부로 내려갈수록 증가되는 경향을 나타내었고, 특히 저빈도의 전기자극에 의한 이완반응이 더 현저하게 억제되었다 (위체의 각 표본에서 20 Hz의 전기자극으로 일으킨 이완반응을 각각 100%

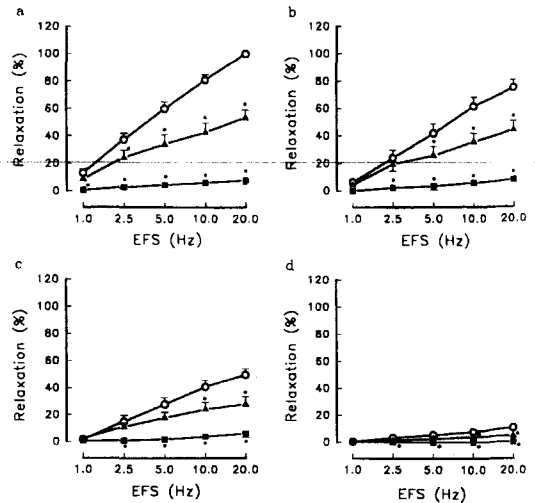


**Fig. 8**—Effects of hemoglobin on the relaxation to electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms) in a circular muscle strip of the isolated rabbit gastric body. a: first strip, b: second strip, c: third strip, d: fourth strip. ○: control (EFS), ▲: hemoglobin 20  $\mu$ M, ■: hemoglobin 60  $\mu$ M. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 3. Results were shown as mean $\pm$ S.E. from 4 to 7 experiments and expressed as percentage of relaxation induced by 20 Hz of the first strip in the absence of hemoglobin. \*P<0.05, significantly different from control values, Student's *t* test for paired observation.

로 하였을 경우 HB 60  $\mu$ M을 전처리하였을 때 1, 2.5, 5, 10 및 20 Hz의 자극빈도에서 제 1 표본의 이완반응은 각각  $0.48\pm 0.48\%$ ,  $10.14\pm 3.12\%$ ,  $24.10\pm 7.16\%$ ,  $35.54\pm 6.99\%$  및  $43.36\pm 5.73\%$ 로 감소되었고, 제 2 표본은 0%,  $7.27\pm 2.89\%$ ,  $16.21\pm 5.34\%$ ,  $23.86\pm 2.64\%$  및  $39.43\pm 5.79\%$ 로 감소되었으며, 제 3 표본은 0%,  $1.56\pm 1.04\%$ ,  $4.22\pm 2.95\%$ ,  $11.51\pm 6.38\%$  및  $30.60\pm 13.69\%$ 로 감소되었고, 제 4 표본은 0%, 0%,  $3.33\pm 3.33\%$  및  $20.04\pm 7.72\%$ 로 더욱 감소되었다 (Fig. 5b, 6b 및 8a-d)

#### NANC 이완반응에 대한 methylene blue의 영향

위체의 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소된 NANC 이완반응 (제 1 표본을 20 Hz의 자극빈도로 전기자극하여 일으킨 이완반응을 100%로 하였을 경우 20 Hz로 일으킨 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 이완반응은 각각  $75.28\pm 5.36\%$ ,  $49.90\pm 4.38\%$  및  $11.03\pm 1.51\%$



**Fig. 9**—Effects of methylene blue on the relaxation to electrical stimulation (1~20 Hz, 0.5 ms) in a circular muscle strip of the isolated rabbit gastric body. a: first strip, b: second strip, c: third strip, d: fourth strip. ○: control (EFS), ▲: methylene blue 10  $\mu$ M, ■: methylene blue 100  $\mu$ M. Other experimental conditions were the same as those described in Fig. 3. Results were shown as mean $\pm$ S.E. from 4 to 6 experiments and expressed as percentage of relaxation induced by 20 Hz of the first strip in the absence of methylene blue. \*P<0.05, significantly different from control values, Student's *t* test for paired observation.

로 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되었다)은 cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue (MB, 10~100  $\mu$ M)를 전처리하였을 때 농도 의존적으로 현저하게 억제되었으며 (Fig. 9a-d), 동일 농도의 MB에서는 비슷하게 억제되었다 (위체의 각 표본에서 20 Hz의 전기자극으로 일으킨 이완반응을 각각 100%로 하였을 경우 MB 10  $\mu$ M을 전처리하였을 때 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 표본의 20 Hz의 자극빈도로 일으킨 이완반응은 각각  $53.34\pm 5.51\%$ ,  $58.72\pm 6.39\%$ ,  $56.57\pm 11.28\%$  및  $46.96\pm 4.98\%$ 로 비슷하게 감소되었으며, MB 100 M을 전처리하였을 때는 각각  $7.96\pm 3.09\%$ ,  $11.55\pm 3.95\%$ ,  $13.06\pm 5.83\%$  및  $4.17\pm 4.17\%$ 로 현저하게 감소되었다) (Fig. 5c, 6c 및 9a-d).

#### 고 찰

비-아드레날린 비-콜린성 (NANC) 신경은 음식물을

먹을 때 위의 수용성 이완반응을 매개하는 점에서 위의 조절기능에 중요한 역할을 하고 있으나<sup>3)</sup>, 위의 수용성 이완반응이 위체에서 더 현저하게 일어나므로 위의 NANC 이완반응의 기전의 연구는 주로 위체에서 많이 연구되었다 (서문 참조). Sakai 등<sup>23)</sup>은 개의 위체 소만 (lesser curvature)에서 분리한 윤상근 표본을 전기자극하여 일으킨 반응을 연구하여 개의 위체 윤상근은 흥분성인 콜린 효능 신경과 흥분성 및 억제성인 비-아드레날린 비-콜린성 신경에 의하여 지배되고 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 토끼의 위체 대만 (greater curvature)으로부터 상부에서 하부로 순차적으로 절단하여 만든 신경근 표본을 콜린 효능 수용체와 아드레날린 효능 신경차단하에서 일으킨 NANC 이완반응의 크기를 비교하여 위체의 NANC 신경지배 정도를 추정하였으며, 위체의 NANC 이완반응도 위체의 NANC 이완반응처럼 주로 NO-cyclic GMP 경로에 의하여 매개되는지를 연구하였다.

토끼 위체의 윤상근 표본을 전기자극하였을 때 자극빈도에 의존하는 수축반응을 일으켰으며 고빈도 (5~20 Hz)에서는 자극빈도에 의존하는 수축반응과 서서히 회복되는 이완반응을 일으켰으나, muscarine 수용체 차단제인 atropine과 아드레날린 효능 신경차단제인 guanethidine 존재하에서 수축반응은 소실되었고 신경전도 차단제인 tetrodotoxin에 의하여 차단되는 자극빈도 의존성 이완반응을 일으켰다 (Fig. 2). 이 결과로써 위체 윤상근을 지배하고 있는 신경은 흥분성인 콜린 효능 신경과 억제성인 NANC 신경이 포함되고 있음을 시사하고 있다. 대만에서 위체의 상부에서 하부로 순차적으로 절단하여 만든 윤상근 표본을 전기자극하여 일으킨 NANC 이완반응의 크기는 위체의 제일 상부에서 얻은 표본이 제일 크고 하부로 내려갈수록 점점 감소되는 결과 (Fig. 3 및 4)를 얻었다. 이와같이 위체 윤상근의 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응이 하부로 내려갈수록 감소되는 것은 NANC 신경의 지배정도가 적어지기 때문이라 추정되어진다. 또한 토끼 위체 윤상근의 NANC 이완반응도 위체에서처럼<sup>17)</sup> NO-cyclic GMP 경로에 의하여 매개되는 지를 연구하기 위하여 NO synthase 억제제인 L-NNA<sup>24-26)</sup>, 세포밖에서 NO와 결합하여 불활성화시키는 hemoglobin 및 cytosolic guanylate cyclase 저해제인 methylene blue의 영향을 검토하였다.

위체의 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되는 NANC 이완반응은 L-NNA에 의하여 농도의존적으로 현저하게 억제되었으며, 각 표본에 대한 억제효과에는 유의한 영향이 없었다. 이 L-NNA의 억제작용은 NO 생합성 전구물질인 L-arginine<sup>27, 28)</sup>에 의하여 제거되었으므로 위체의 NANC 이완반응은 주로 NO에 의하여 매개되리라 사료된다 (Fig. 7a-d). 여기에서 L-NNA에 의하여 제거되지 않고 남은 NANC 이완반응은 NO 이외의 다른 신경전달물질이 관여하리라 추정된다. Li 및 Rand<sup>5)</sup>에 의하면 흰쥐의 위체에서 NO는 주로 저빈도의 짧은 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응과 높은 자극빈도에서 지속적인 전기자극으로 일으킨 지속적인 NANC 이완반응의 초기 (initial part)에 관여하며, 지속적인 NANC 이완반응의 후기 (distal part)에는 VIP가 관여하리라 주장하였다. 이와같이 위체의 NANC 이완반응에는 NO이외에 VIP가 함께 신경전달물질로서 관여하리라는 보고들이 있다.<sup>9, 29-31)</sup> 여기에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다. 한편 위체의 NANC 이완반응은 세포밖에서 NO와 결합하여 불활성화시키는 hemoglobin에 의하여 농도 의존적으로 억제되었다. 이때 hemoglobin의 억제작용이 위체 상부의 큰 NANC 이완반응에 비하여 하부의 작은 NANC 이완반응과 저빈도의 전기자극으로 일으킨 작은 NANC 이완반응에 대하여 더 현저한 것은 hemoglobin의 분자가 커서 전기자극시 신경근접합부의 NO가 유리된 부위나 생성된 부위에 접근하기 어렵기 때문에 작용부위에 도달한 hemoglobin이 소량의 NO에 의하여 매개되는 작은 NANC 이완반응을 더 현저하게 억제하리라 추정된다 (Fig. 8a-d). 또한 위체의 NANC 이완반응은 cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의해서도 더욱 현저하게 억제되므로 (Fig. 9a-d) 토끼 위체 윤상근의 NANC 이완반응은 주로 NO-cyclic GMP 경로에 의하여 매개되리라 사료된다.

## 결 론

토끼 위체 윤상근의 비-아드레날린 비-콜린성 (NANC) 신경지배를 전기자극으로 일으킨 반응의 크기에 의하여 연구하였다.

1. 토끼 위체 윤상근을 상부에서 하부로 순차적으로 절단하여 만든 표본에 전기자극 (1~20 Hz)을 하였을

때 자극빈도에 의존하는 일과성인 수축반응과 높은 자극빈도에서는 수축 후 서서히 회복되는 이완반응을 일으켰다.

2. Atropine과 guanethidine 존재하에서는 수축반응은 소실되고 자극빈도 의존성 이완반응으로 바뀌었다.

3. 이들 자극빈도 의존성 이완반응은 위체의 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되었으며, 신경전도차단제인 tetrodotoxin (0.3  $\mu\text{M}$ )에 의하여 소실되었다.

4. NO synthase 억제제인  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine (L-NNA, 10~100  $\mu\text{M}$ )은 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응을 농도의존적으로 억제하였으며, 각 표본에 대한 억제효과에는 유의한 영향이 없었다. L-NNA의 억제작용은 NO 생합성 전구물질인 L-arginine에 의하여 역전되었다.

5. 세포박에서 NO를 포획하여 불활성화시키는 hemoglobin (20~60  $\mu\text{M}$ )은 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응을 농도의존적으로 억제하였으며, 이 억제작용은 위체의 하부로 내려갈수록 증가되는 경향을 나타내었고 특히 저빈도의 전기자극으로 일으킨 이완반응이 더 현저하게 억제되었다.

6. Cytosolic guanylate cyclase 억제제인 methylene blue (10~100  $\mu\text{M}$ )는 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응을 농도의존적으로 현저하게 억제하였으며, 고농도 (100  $\mu\text{M}$ )에서는 거의 제거하였다.

이상의 결과로써 토끼 위체 윤상근의 전기자극으로 일으킨 NANC 이완반응이 위체 상부에서 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되었으며 위체 윤상근의 NANC 신경의 지배는 하부로 내려갈수록 점차적으로 감소되리라 사료된다. 또한 위체 윤상근의 NANC 이완반응도 위저의 NANC 이완반응처럼 주로 NO-cyclic GMP 경로에 의하여 매개되리라 사료된다.

### 감사의 말씀

본 논문은 1995년 부산대학교 발전기금 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으므로 감사드립니다.

### 문헌

1) Meyer, J. H. : Motility of the stomach and gastroduodenal junction. In *Physiology of the Gas-*

*trointestinal Tract* 2nd edn. (edited by Johnson L. R.) Raven Press, New York, p. 613 (1987).

2) Lefebvre, R. A. : Non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the proximal stomach. *Gen. Pharmac.* **24**, 257 (1993).

3) Abrahamsson, H. : Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **280** (Suppl.), 50 (1986).

4) Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Bogers, J. J., Bult, H., De Man, J. G., Oosterbosch, L., Herman, A. G. and Van Maercke, Y.M. : Release of nitric oxide upon stimulation of non-adrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 441 (1991).

5) Li, C. G. and Rand, M. J. : Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur. J. Pharmacol.* **191**, 303 (1990).

6) Lefebvre, R. A., Baert, E. and Barbier, A. J. : Influence of  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 173 (1992).

7) Desai, K. M., Warner, T. D., Bishop, A. E., Polak, J. M. and Vane, J. R. : Nitric oxide, and not vasoactive intestinal peptide, as the main neurotransmitter of vagally induced relaxation of the guinea pig stomach. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 1197 (1994).

8) Kim, M. W., Hong, S. C., Park, M. S., Hong, E. J. and Choi, J. E. : The role of nitric oxide in non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 121 (1995).

9) Jin, J. G. and Grider, J. R. : Stoichiometry of VIP release and NO production during electrical field stimulation (EFS) of gastric smooth muscle. *Gastroenterology* **104**, 4, A529 (1993).

10) Zimmerman, T., Martin, J. S., Parkman, H. P. and Ryan, J. P. : Lack of evidence for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) involvement in relaxation of rabbit gastric fundus. *Gas-*



- troenterology* **104**, 4, A1069 (1993).
- 11) Hong, S. C., Choi, J. E., Han, S. K., Kim, Y. M., Kim, N. D., Park, M. S., Hong, E. J. and Kim, J. B. : Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the rabbit gastric fundus. *Yakhak Hoeji* **38**, 149 (1994).
  - 12) Forster, E. R. and Southam, E. : Location of nitric oxide synthase in rat gastric corpus. *Reg. Pept.* **40**, 146 (1992).
  - 13) Meulemans, A. L., Helsen, L. F. and Schuurkes, J. A. : Role of NO in vagally-mediated relaxations of guinea-pig stomach. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **347**, 225 (1993).
  - 14) Martin, W., Villani, G. M., Jothianandan, D. and Furchgott, R. F. : Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 708 (1985).
  - 15) Desai, K. M., Sessa, W. C. and Vane, J. R. : Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**, 477 (1991).
  - 16) Yano, S., Kiyota, Y., Yamamoto, M. and Watanabe, K. : Pharmacological features of non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation induced by electrical vagal stimulation in isolated mouse stomach. *Jpn. J. Pharmacol.* **69**, 9 (1995).
  - 17) Kim, J. B., Park, M. S., Hong, E. J., Choi, S. K. and Hong, S. C. : The role of nitric oxide on non-adrenergic non-cholinergic relaxation induced by prolonged electrical stimulation in the rabbit gastric fundus. *Pusan Bulletin of Pharmaceutical Sciences* **30**, 27 (1996).
  - 18) Curró, D., Volpe, A. R. and Preziosi, P. : Nitric oxide synthase activity and non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 717 (1996).
  - 19) Fujiwara, M., Hong, S. C. and Muramatsu, I. : Effects of goniopora toxin on non-adrenergic non-cholinergic response and purine nucleotide release in guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* **326**, 515 (1982).
  - 20) Bowman, A. and Gillespie, J. S. : Block of some non-adrenergic inhibitory responses of smooth muscle by a substance from hemolysed erythrocytes. *J. Physiol.* **328**, 11 (1982).
  - 21) Simmons, A. : *Technical hematology*, 2nd ed. (J. B. Lippincott company, Philadelphia and Toronto) p. 7 (1976).
  - 22) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J. : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* **100**, 119 (1963).
  - 23) Sakai, Y. and Daniel, E. E. : Multiple responses to electrical field stimulation in circular muscle of canine gastric corpus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62**, 912 (1983).
  - 24) Ishii, K. B., Chang, B., Kerwin, J. F. Jr., Huang, Z. J. and Murad, F. : N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* **176**, 219 (1990).
  - 25) Moore, P. K., Al-Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R. A. and Gibson, A. : L-N<sup>G</sup>-nitroarginine (L-NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 408 (1990).
  - 26) Mülsch, A. and Busse, R. : N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (N<sup>G</sup>-[imino-(nitroamino) methyl]-l-ornithine) impairs endothelium-dependent dilatation by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **341**, 143 (1990).
  - 27) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S. : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (1988).
  - 28) Schmidt, H. H. H. W., Nan, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F. and Bohme, E. : Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **154**, 213 (1988).
  - 29) Ito, S., Kurokawa, A., Ohga, A., Ohta, T. and Sawabe, K. : Mechanical, electrical and cyclic nucleotide responses to peptide VIP and inhibitory nerve stimulation in rat stomach. *J. Physiol.* **430**, 337 (1990).
  - 30) D'Amato, M., Curró, D. and Montuschi, P. :

- Evidence for dual components in the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus : role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *J. Aut. Nerv. Syst.* **37**, 175 (1992).
- 31) Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., De Man, J. G., Bult, H., Herman, A. G. and Van Maercke, Y. M. : Evidence for a differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide by nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **318**, 107 (1992).