

돼지 위저부 평활근의 비아드레날린 비콜린성 신경전달물질에 관한 연구

김태완 · 나준호 · 이장현 · 양일석

서울대학교 수의과대학
(1997년 2월 4일 접수)

A study on the nonadrenergic noncholinergic neurotransmitters in porcine gastric fundus

Tae-wan Kim, Jun-ho Na, Jang-hern Lee, Il-suk Yang

Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Feb 4, 1997)

Abstract : The relaxation of gastric fundus smooth muscles is the primary physiological event which induces the receptive relaxation of monogastric animals. L-arginine/Nitric oxide(L-arg/NO) system is known to mediate the inhibitory non-adrenergic non-cholinergic(NANC) neurotransmission in various tissues including gastrointestinal smooth muscles.

The longitudinal smooth muscles of porcine gastric fundus showed fast relaxation during electrical field stimulation(EFS) and rebound contraction after EFS in NANC condition. So, the purpose of present study was elucidation of the neurotransmitters related to the NANC relaxation and explanation of the relation between NANC relaxation and L-arg/NO system.

The longitudinal smooth muscles of porcine gastric fundus were hung in the organ bath and under the presence of guanethidine($5 \times 10^{-5}M$), precontraction was induced by carbachol($1 \times 10^{-6}M$). The muscle responses to EFS and drugs were isometrically recorded. The results were summarized as follows.

1. The longitudinal muscles of porcine gastric fundus showed frequency-dependent relaxation and rebound contraction to electrical field stimulator(1ms, 8V, 1~16Hz, 20sec, EFS). These responses were blocked by tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}M$).

2. The relaxation and rebound contraction of the longitudinal muscles of porcine gastric fundus to EFS were inhibited by L-NAME($2 \times 10^{-5}M$). The inhibitory effect of L-NAME was antagonized by L-arginine($1 \times 10^{-3}M$), but not by D-arginine($1 \times 10^{-3}M$).

3. Exogenous NO($NaNO_2$, $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}M$, pH=2.0) caused concentration-dependent relaxation as EFS did.

이 논문은 1996년도 서울대학교 발전기금 포철 학술연구비에 의해 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Il-suk Yang, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

4. Methylene Blue($2 \times 10^{-5}M$), a soluble guanylate cyclase inhibitor, inhibited the relaxation and rebound contraction of the longitudinal muscles of porcine gastric fundus induced by EFS, but N-ethylmaleimide, a adenylate cyclase inhibitor, did not.

5. 8-Br-cGMP($1 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-6}M$), permeable cGMP analogue, induced dose-dependent relaxation. but 8-Br-cAMP($1 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-6}M$), permeable cAMP analogue, did not. Both did not evoked rebound contraction.

6. α -chymotrypsin did not affect the relaxation of the longitudinal muscles of porcine gastric fundus.

7. Reactive blue 2($1 \times 10^{-4}M$, 40min) significantly inhibited the rebound contraction induced by EFS and inhibited contraction caused by exogenous ATP($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}M$).

These results suggests that NANC relaxation of the longitudinal muscles of porcine gastric fundus mainly mediated by NO and the rebound contraction is related to NO and other neurotransmitters.

Key words : porcine gastric fundus smooth muscle, nonadrenergic noncholinergic neurotransmitter, nitric oxide(NO), rebound contraction.

서 론

섭식과 연하작용시 위 근위부에서는 위저부를 중심으로 한 능동적인 반사성 이완작용이 일어나 위내압이 과도하게 증가되는 것을 방지하게 된다. 이러한 현상을 "receptive relaxation"이라 부른다^{1,2}. 이러한 "receptive relaxation"에는 억제성의 비아드레날린 비콜린성(nonadrenergic noncholinergic, NANC) 신경이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 이들 신경에서 분비되어 평활근의 이완을 매개하는 억제성 신경전달물질의 정확한 정체에 대하여는 알려져 있지 않다^{2,3}. 현재까지 위저부에서 작용하는 NANC 신경전달물질의 정체를 규명하기 위한 연구는 주로 purines, VIP, NO에 초점을 맞추고 있다.

랫트⁴, 기니픽⁵ 등의 위저부에서 NANC 이완에 VIP가 관련되어 있다는 보고가 있었으나 그후 랫트와 기니픽에서 NANC 신경의 전장자극으로 유도된 이완반응이 VIP-antiserum과 trypsin 등에 의해 완전히 차단되지 않는다는 것이 밝혀져 VIP 이외의 또다른 신경전달물질이 관련되어 있을 것으로 제안되었다. 또 위장관의 여러 부위에서 ATP가 NANC 신경전달물질로 작용한다는 보고들이 있었고⁶, 랫트⁷와 기니픽⁸의 위저부를 포함한 위장관 조직에서 NANC 이완에 nitric oxide(NO)가 관련되어 있을 것으로 제안되었다. 또 최근에는 랫트의 위저부에

서 억제성 NANC 신경전달과정에 VIP와 NO가 공동으로 작용하여, VIP는 고자극빈도에서 상당기간 동안 분비되는 반면 NO는 단기간 동안의 저자극빈도의 전장자극에 의해 순간적으로 분비되어 NANC 이완을 매개하는 것으로 보고되기도 하였다⁹.

본 연구의 목적은 NANC 신경자극에 의한 돼지 위저부의 반응을 관찰하여 돼지 위저부 평활근의 이완을 매개하는 신경전달물질을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직절편의 제작 : 도살직후의 성숙한 돼지에서 점막을 제거한 후 위저부 평활근을 냉장시킨 Krebs 용액에 담아 실험실로 운반하였다. 운반 즉시 실험에 사용되지 않는 조직은 4℃ 냉장보관하면서 24시간 이내에 실험에 사용하였다. 돼지 위저부 종주근 조직을 Krebs 용액이 담긴 용기 안에서 혼합가스(95% O₂+5% CO₂)를 공급하면서 1×2×10mm 크기의 절편으로 만들어 양끝을 tissue holder에 고정하였다.

기록장치의 설계 : pH 7.4로 조정된 Krebs 용액이 담긴 20ml 용량의 장기수조의 중앙에 설치된 백금판 전극 사이에 tissue holder를 넣어 조직절편을 전극의 중앙에 위치시킨 후 고정하였다. 조직절편의 상단은 isometric force transducer(Narco Biosystem, F-60)에 연결하여 ph-ysiograph

(Narco Biosystem)로 평활근의 수축과 이완을 기록하였다.

조직의 안정화 및 전수축의 유도 : 위저부 중주근 절편에 1.0g의 안정화 장력을 적용시켜 매 15분마다 신선한 Krebs solution을 교환하면서 60분간 안정화시킨 후 실험하였다. 비아드레날린 비콜린성(nonadrenergic noncholinergic) 환경을 조성하기 위하여 아드레날린성 신경차단제로서 guanethidine($5 \times 10^{-6}M$)을 전처치한 후 cholinergic agonist인 carbachol($1 \times 10^{-6}M$)을 사용하여 전수축을 유도하였다. 이후 40분이상 경과하여 전수축으로 유도한 긴장성 수축이 안정화되면 실험을 수행하였다.

전장자극 및 이완의 측정 : 전수축 제거에 의해 안정된 긴장성 수축을 유도한 후 전장자극과 각 약물들에 의한 이완 및 수축반응을 등척성으로 기록하였다. 전장자극을 위해 electric stimulator(Narco, SI-10)를 이용하여 80V, 1ms, 1~16Hz)의 조건을 20초동안 전장자극(electric field stimulation, EFS)을 가하였다. 전장자극에 의해 이완 및 수축된 평활근이 자극을 가하기 전의 전수축에 의한 수축고를 회복하면 다음 전장자극을 가하였다. 또한 전장자극으로 유도된 이완반응에 대한 각 약물들의 전처치 효과를 알아보기 위하여 각 약물들을 전처치하기 전후의 전장자극에 의한 이완정도를 비교하였다.

사용약물의 조제와 보관 : 실험에 사용한 대부분의 약물은 증류수에 녹이고 tetrodotoxin은 생리식염수에 녹여

서 stock 용액($4 \times 10^{-3}M$)을 제조하여 냉동보관하면서 사용할 때마다 Krebs 용액으로 희석하여 사용하였다. ATP와 $NaNO_2$ 는 매 실험직전에 만들어 사용하였으며, 본 실험에 사용된 외원성 nitric oxide는 acidified sodium nitrite ($NaNO_2$, pH 2.0) 형태로 제조하였으며¹⁰ 용해된 $NaNO_2$ 의 농도를 외원성 NO의 농도로 표시하였다. 실험에 사용한 모든 약물의 최종농도는 장기 수조내의 농도로 표시하였으며 영양액으로 사용한 Krebs 용액의 조성은 다음과 같다(mM); NaCl 118.4, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, $CaCl_2$ 2.5, glucose 11.7.

본 실험에 사용한 약물은 다음과 같다. Guanethidine sulfate(Sigma), Carbachol(Sigma), Adenosine 5'-triphosphate(Sigma), Cibacron blue 3GA(Sigma), Tetrodotoxin(Sigma), α -chymotrypsin(Sigma), $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester(Sigma), $N\omega$ -nitro-D-arginine methyl ester(Sigma), L-arginine hydrochloride(Sigma), Sodium nitrite(Avondale Laboratories), Methylene blue(Fluka AG), N-ethylmaleimide(Sigma), 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate(Sigma), 8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate(Sigma).

결과분석 및 통계처리 : 전장자극 및 각 약물들에 의한 이완 및 수축의 정도는 전수축고에 대한 백분율(%)로 계산하여 $mean \pm s.e.m.$ 으로 나타내었으며, Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

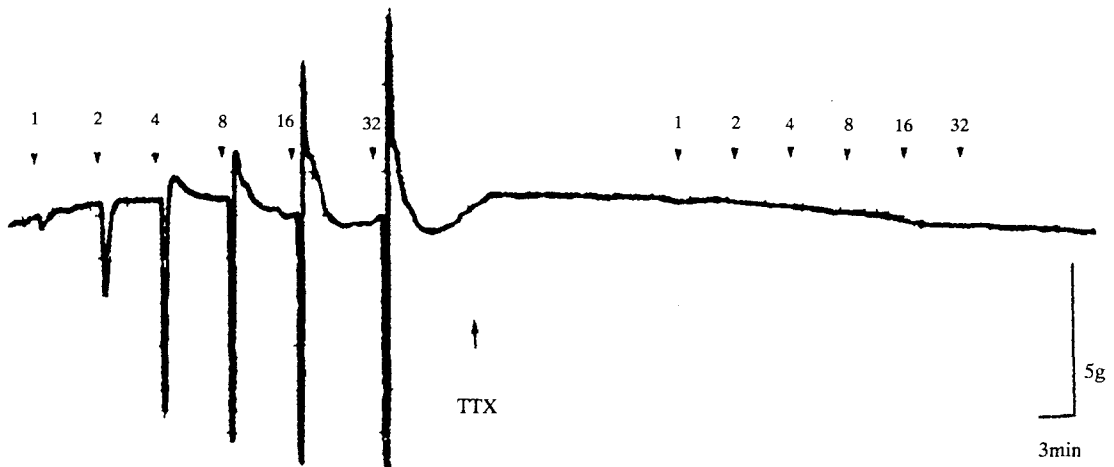


Fig 1. Original records showing frequency-dependent isometric relaxations and rebound contractions induced by electric field stimulation(EFS, 1-16Hz, 80 V, 1ms, 20sec.) in the longitudinal smooth muscle of porcine gastric fundus before and after tetrodotoxin(TTX, $1\mu M$). TTX blocked both the relaxations and the rebound contractions.

결 과

전장자극에 의한 비아드레날린 비콜린성 신경자극 효과 : 안정된 전수축이 유도된 후 전장자극(electrical stimulation, EFS, 1-16Hz)으로 평활근 조직내에 존재하는 내재성 신경만을 자극하였을 경우 이상성(biphasic)의 반응을 보였다. 즉, 평활근 조직은 전장자극 기간중에는 빠른 이완반응을 보였으나 자극이 끝나는 동시에 반사성의 수축반응(rebound contraction)을 나타내었다(Fig 1). 이러한 이완 및 반사성의 수축반응은 전장자극의 자극빈도에 비례하여 모두 증가하였으며, 반사성 수축반응은 주로 4Hz 이상에서 잘 나타났다. 신경차단제로 알려진 tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}M$)은 전장자극에 의한 이완반응과 자극 후의 반사성의 수축반응을 모두 차단하였다(Fig 1).

NANC 이완반응에 대한 NO/cGMP경로 확인 : 전장자극에 의한 돼지 위저부 중주근의 이완반응은 Nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, $2 \times 10^{-5}M$)에 의해 유의성 있게 억제되었다(Fig 2). L-NAME에 의해 억제된 이완반응은 NOS의 기질인 L-arginine($1 \times 10^{-3}M$)에 의해 유의성 있게 회복되었다(Fig 2). 외원성 NO는 pH 2.0으로 조정된 acidified sodium nitrite($NaNO_2$, 10-100 μM) 형태로 투여하였다. 외원성 NO는 농도 의존적으로 이완을 유발시켰으며, 그 정

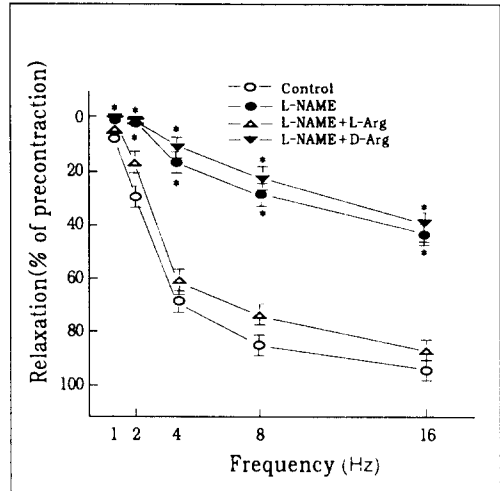


Fig 2. Effects of N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, 20 μM), L-arginine(1mM) and D-arginine(1mM) on relaxation of the gastric smooth muscle induced by EFS. L-NAME significantly inhibited the relaxation and the inhibitory effect of L-NAME was recovered by L-arginine(n=8) but not by D-arginine(n=9). Value are mean \pm s.e.m(*:p<0.05).

도는 2, 4, 16Hz의 전장자극에 의한 이완반응과 유사하였다(Fig 3). 이러한 외원성 NO에 의한 반응은 전장자극에 의한 반응에 비해 작용개시(onset)가 약간 늦고 보다 지속적인 반응을 나타내었다.

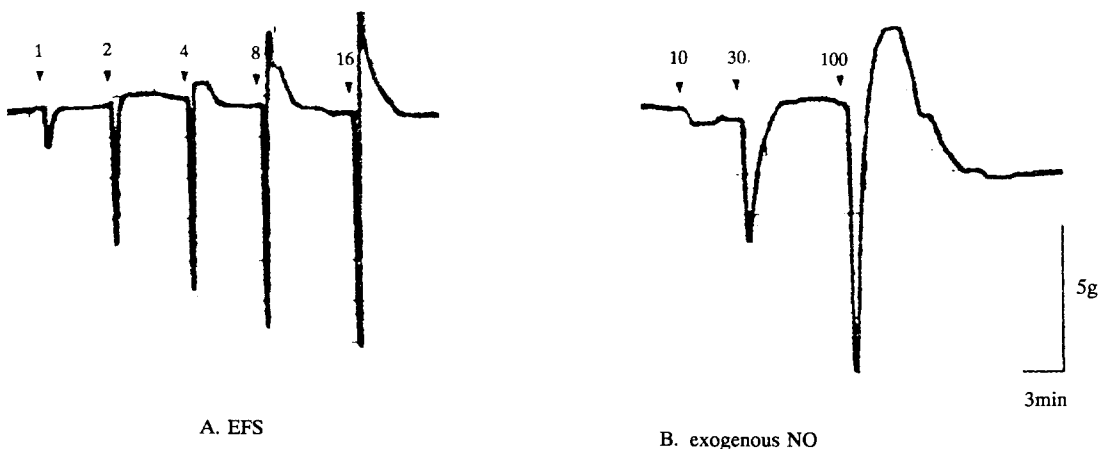


Fig 3. Original records showing the effects of exogenous nitric oxide(acidified sodium nitrite, 10-100 μM). Exogenous NO caused dose-dependent relaxations in the longitudinal smooth muscle of porcine gastric fundus and also induced rebound contraction at high concentration(100 μM).

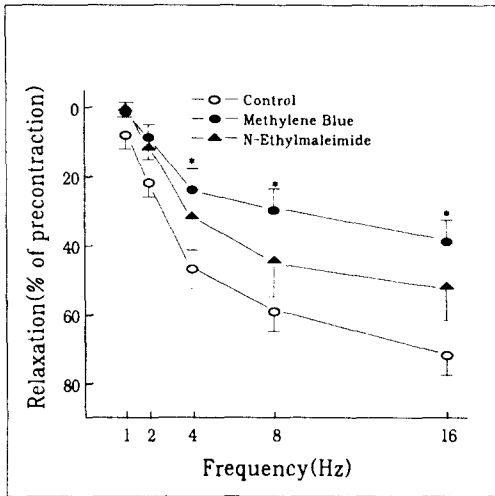


Fig 4. Effects of methylene blue and N-ethylmaleimide on relaxation induced by EFS. Relaxations were significantly inhibited by methylene blue(n=8) but not by N-ethylmaleimide (n=7). Value are mean \pm s.e.m(* : $p < 0.05$).

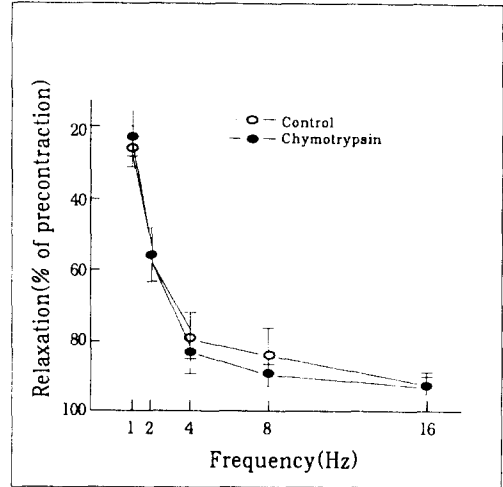


Fig 6. Effects of α -chymotrypsin(2U/ml) on the relaxations induced by EFS in the longitudinal smooth muscle of porcine gastric fundus. α -chymotrypsin did not affect the relaxations. Value are mean \pm s.e.m(n=6).

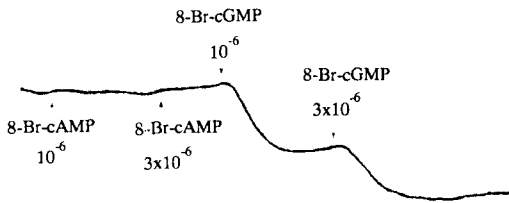


Fig 5. Original records showing the effects of 8-Br-cAMP(1×10^{-6} - 3×10^{-6} M) and 8-Br-cGMP(1×10^{-6} - 3×10^{-6} M). 8-Br-cGMP caused dose-dependent relaxation in the longitudinal smooth muscle of porcine gastric fundus, but 8-Br-cAMP did not. Both did not evoked rebound contraction.

한편 soluble guanylate cyclase 억제제로 알려진 methylene blue(2×10^{-5} M, 30분 배양)는 전장자극에 의한 이완 반응을 유의성 있게 억제하였다. 그러나 adenylate cyclase 억제제인 N-ethylmaleimide(1×10^{-4} M, 30분 배양)는 전장자극에 의한 이완반응에 영향을 주지 못했다(Fig 4). 또한 cGMP의 유도체인 8-Br-cGMP(1×10^{-6} - 3×10^{-6} M)는 농도 의존적으로 이완반응을 유발하였으나 cAMP의 유도체인 8-Br-cAMP(1×10^{-6} M)는 이완반응을 유발하지 않았다(Fig 5).

VIP가 전장자극에 의한 이완반응에 관여하는지를 알

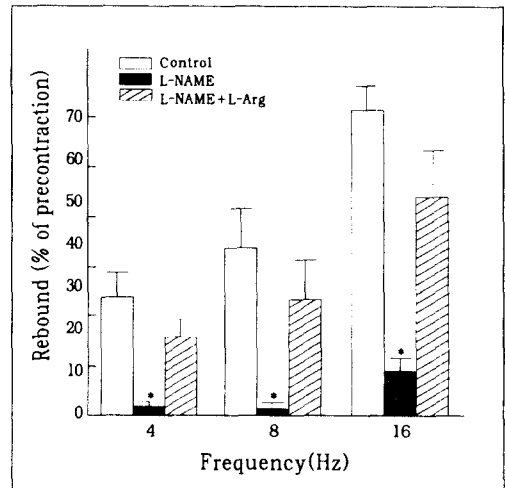


Fig 7. Effects of N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, 20 μ M) and L-arginine(1mM) on the rebound contractions after EFS. L-NAME significantly inhibited the rebound contractions, which was antagonized by L-arginine. Value are mean \pm s.e.m(n=8, * : $p < 0.05$).

아보기 위하여 peptide 분해효소인 α -chymotrypsin(2U/ml, 15분 배양)의 효과를 관찰하였다. α -chymotrypsin은 전장 자극에 의한 이완반응에 유의성 있는 영향을 주지 못하

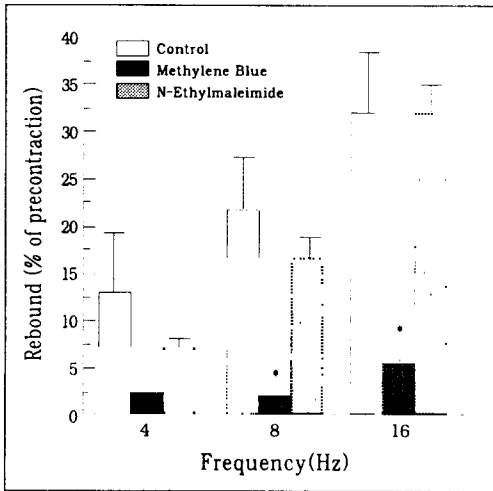


Fig 8. Effects of methylene blue(20 μ M) and N-ethylmaleimide (100 μ M) on the rebound contractions after EFS. The rebound contractions were significantly inhibited by methylene blue(n=7) but not by N-ethylmaleimide(n=5). Value are mean \pm s.e.m (* : p<0.05).

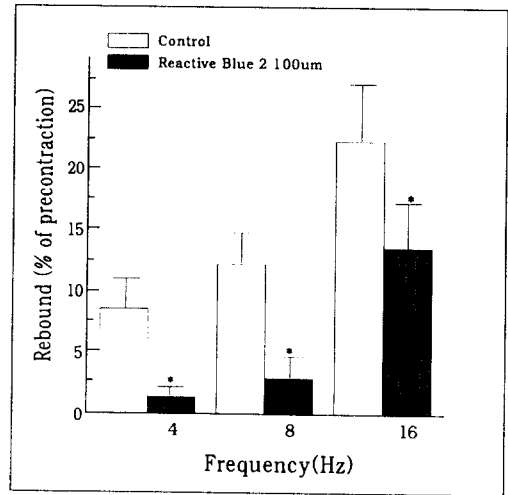


Fig 9. Effects of reactive blue 2(100 μ M) on the rebound contractions after EFS in the longitudinal smooth muscle of porcine gastric fundus. Reactive blue 2 inhibited the rebound contractions significantly. value are mean \pm s.e.m(n=8, * : p<0.05).

였다(Fig 6).

반사성 수축반응(rebound contraction)에 대한 약물효과 : 돼지 위저부 종주근은 전장자극에 의해 이완반응에 이어서 반사성의 수축반응을 일으켰다. 이러한 반사성의 수축반응은 tetrodotoxin(1×10^{-6} M)에 의해 차단되는 것으로 보아 이완반응과 마찬가지로 신경매개성임을 알 수 있었다(Fig 1). 또한 반사성의 수축반응은 L-NAME (2×10^{-5} M)에 의해 억제되고, L-arginine(1×10^{-3} M)에 의해 회복되었다(Fig 7). Soluble guanylate cyclase inhibitor인 methylene blue(2×10^{-5} M)는 반사성의 수축반응을 유의성 있게 억제하였으나 adenylyate cyclase inhibitor인 N-ethylmaleimide(1×10^{-4} M)는 유의성 있는 변화를 일으키지 않았다(Fig 8).

cGMP의 유도체인 8-Br-cGMP(1×10^{-6} - 3×10^{-6} M), cAMP의 유도체인 8-Br-cAMP(1×10^{-6} - 3×10^{-6} M) 둘 다 수축반응을 유발하지 않았다(Fig 5).

돼지 위저부 종주근에서 전장자극에 의한 반사성의 수축반응에 NO 이외에 다른 신경전달물질이 관련되어 있는지 알아보고자 P_{2y} -purinergic receptor antagonist인 reactive blue 2의 전장자극에 대한 효과를 알아보았다.

reactive blue 2(1×10^{-4} M, 40분)는 전장자극에 의한 반사성의 수축반응을 유의성 있게 억제하였다(Fig 9).

전수축을 유도한 상태에서 외원성 ATP(10^{-4} - 10^{-3} M)를 투여하면 수축반응이 일어난 후 이어서 완만한 이완반

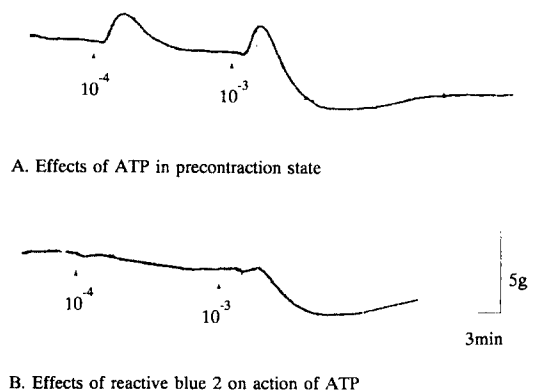


Fig 10. Original records showing the effects of exogenous ATP (10^{-4} - 10^{-3} M) and reactive blue 2. A. ATP caused contraction and ensuing slow relaxation after precontraction with carbachol(1×10^{-6} M). B. Reactive blue 2 selectively inhibited the contraction induced by ATP.

용이 일어났다. 그러나 reactive blue 2($1 \times 10^{-4} M$, 40분)를 전처치한 후 같은 용량의 ATP를 투여하면 수축반응은 억제되고 완만한 이완반응만 나타났다(Fig 10).

고 찰

NANC 환경하에서 돼지 위저부 중주근은 전장자극(electrical field stimulation)에 의해 자극빈도 의존적으로 이완 및 반사성의 수축반응을 나타내었다. 이때 반사성의 수축은 4Hz 이상의 자극에서 잘 나타났다. 이러한 이완 및 반사성의 수축반응은 신경차단제인 tetrodotoxin에 의해 차단되었고, cytosolic guanylate cyclase 억제제와 NOS 억제제에 의해서 억제되었으며, NOS에 대한 억제 효과는 L-arginine에 의해서 회복되었다.

여기서 이완부분과 반사성의 수축부분을 나누어서 살펴보고자 한다. 먼저 이완부분을 살펴볼 것이다.

랫트와 마우스의 항미근 등 NO가 억제성 신경전달물질로 작용하는 여러 조직에서 L-arginine analogue는 NO에 대해 길항적으로 작용하며, L-arginine analogue 의해 억제된 NO의 평활근 이완효과는 NOS 기질인 L-arginine 과량투여에 의해 회복되었다고 보고되었다¹¹. 본 실험에서도 L-arginine analogue로서 nitric oxide synthase (NOS) 억제제로 알려진 N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)는 전장자극에 의한 이완반응을 유의성 있게 억제하였다. 그리고 NOS의 기질은 L-arginine의 투여에 의해 완전히 회복되는 양상을 보였다. 또한 acidified sodium nitrite 형태로 투여된 외원성 NO¹⁰는 돼지 위저부 중주근을 농도 의존적으로 이완시켰으며, 그 모양은 전장자극에 의한 이완반응과 유사하였다. 이러한 것들은 전장자극에 의한 돼지 위저부 중주근의 이완에 nitric oxide가 관여하고 있다는 것을 의미한다.

Shuttleworth *et al*¹²은 NO의 평활근에 대한 작용을 크게 두 가지 기전에 의해 즉, 세포내 Ca²⁺ 농도를 감소시키거나 또는 Ca²⁺에 대한 수축기구의 감수성을 감소시켜 평활근의 이완 또는 수축억제반응을 일으키는 것으로 제안하였다. NO가 세포내 Ca²⁺ 농도를 감소시키는 기전은 다음 세 가지가 제기되고 있다. 첫째는 근형질세망(SR)안으로의 Ca²⁺ uptake를 증가시키는 것이다. 이 가설에서 NO는 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cGMP 농도를 증가시키고, 증가된 cGMP는 protein kinase G(PKG)를 활성화시킨다. PKG는 조절단백질 또는

Ca²⁺-ATPase를 인산화시켜 SR안으로의 Ca²⁺ 이동을 촉진시키는 것으로 생각되어진다. 두번째 가설은 NO가 L-type Ca²⁺ 통로를 통한 Ca²⁺의 세포내 유입을 감소시키는 것이다. 이 가설에서 NO는 직접적으로 또는 간접적으로 cGMP 경로를 통해 K⁺ 통로를 활성화시켜 세포막을 과분극시키거나 흥분성을 억제하는 것으로 생각되어진다. 이러한 변화는 세포막에 있는 Ca²⁺ 통로를 억제하여 세포외액에 있는 Ca²⁺이 세포안으로 들어오는 것을 감소시킨다. 세번째 가설은 NO가 cGMP경로를 경유하여 L-type Ca²⁺ 통로에 직접 작용함으로써 Ca²⁺의 세포내 유입을 감소시키는 것이다. 한편 NO가 수축성 단백질의 Ca²⁺에 대한 감수성을 감소시킴으로써 이완반응을 유발한다는 가능성도 제기되고 있다¹³. 이 가설에서 PKG는 myosin light chain kinase와 같은 수축기구를 이루는 요소를 인산화시키는 것으로 생각되고 있다.

본 실험에서 전장자극에 의한 돼지 위저부 중주근의 이완반응이 soluble guanylate cyclase 억제제로 알려진 methylene blue에 의해 억제되었다. 또한 cGMP 유도체인 8-Br-cGMP를 투여하였을 때 농도 의존적으로 이완이 일어났다. 이상의 결과로 볼 때 돼지 위저부 중주근의 이완은 주로 cGMP의 매개에 의해 일어난다고 볼 수 있다. 그러나 이 실험만으로는 돼지 위저부 중주근의 이완반응에서 cGMP 이후의 구체적인 반응경로라든가 또는 cGMP 비의존적인 반응도 관여하는지에 대해서는 알 수 없다. Raymond와 Wendt¹⁴는 랫트 항미근에서 SNP에 의한 이완반응에 세포내 Ca²⁺을 낮추는 기전과 세포내 Ca²⁺ 농도에 비의존적인 기전이 모두 관여한다고 보고하였다. 따라서 2차 전달물질의 구체적인 경로를 규명하기 위해서는 좀 더 실험을 진행해야 한다고 생각한다.

돼지 위저부 중주근의 전장자극에 의한 이완반응에서 VIP inactivating peptidase로 알려진 α -chymotrypsin은 유의성 있는 영향을 미치지 못했다. 한편 VIP는 세포내 cAMP의 농도를 증가시켜¹⁵ 생리적 반응을 나타내는 것으로 알려져 있는데 adenylate cyclase inhibitor인 N-ethylmaleimide 역시 전장자극에 의한 이완반응을 억제하지 못하였다. 또한 cAMP 유도체인 8-Br-cAMP도 돼지 위저부 중주근의 장력에 아무런 영향을 주지 못하였다. 이것으로 보아 VIP는 전장자극에 의한 이완 및 반사성의 수축에는 관여하지 않는 것으로 보인다. 이러한 사실은 Lefebvre *et al*¹⁶의 보고와 상충된다. 한편 Smits와 Lefebvre¹⁷는 랫트에서 어릴 때는 NO와 VIP가 함께 작용하나 나

이가 들면서 VIP에 대해서는 둔감해지고 NO에 대해서는 민감해진다고 보고하였다. 돼지에서 *aging factor*에 의해 VIP에 대한 반응이 나타나지 않을 가능성이 있으며 이 부분은 좀 더 실험을 할 필요가 있다고 생각한다.

ATP는 혈관과 장관평활근을 이완시키는 것으로 알려져 있다¹⁸. 그러나 본 실험에서 돼지 위저부 평활근은 ATP에 대하여 수축을 일으킨 후 완만한 이완을 일으켰으나 그 이완정도는 전수축에 의한 수축고에 비해 현저하지 않았으며 또한 전장자극에 의한 이완반응과는 양상이 아주 달랐다. 따라서 ATP는 전장자극에 의한 돼지 위저부 중주근의 이완반응에 관여하지 않을 것으로 생각된다.

한편 위장관 평활근에서 일반적으로 이완반응을 매개하는 것으로 생각되었던 NO가 NANC 환경에서 수축반응을 매개한다는 보고들이 나오고 있다. 이러한 경우 보통 이완반응과 함께 나타나며, 조직에 따라 나타나는 양상이 달라 수축반응이 일어난 후 이완반응이 일어나는 primary contraction, 반대로 이완반응이 일어난 후 수축반응이 일어나는 aftercontraction으로 구분한다¹⁹. 한편 NANC 신경에 전장자극을 가하는 동안에는 이완반응이 일어나다가 자극을 중단하였을 때 수축반응이 나타나는 것을 반사성 수축(rebound contraction) 또는 "off"-contraction이라고 한다²⁰.

돼지 위저부 중주근에서도 전장자극이 끝난 후에 반사성의 수축반응이 나타났으며, 이는 NOS 억제제인 L-NAME에 의해 억제되었고 L-arginine에 의해 회복되었다. 그리고 고농도의 외원성 NO에 의해 반사성의 수축반응이 재현되었으며, soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의해 억제되었다. 전장자극에 의한 돼지 위저부 중주근의 반사성 수축반응이 NOS에 의해 생성된 NO의 활성화에 의존적이라는 이상의 결과는 고양이²⁰, 양(sheep)의 방광 경부 평활근²¹, 소 식도구 윗상근²² 등에서의 보고와 일치한다.

NANC rebound contraction 또는 rebound excitation을 일으키는 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이러한 반응이 일어날 수 있는 가능한 경우로는 NANC 신경말단으로부터 분비된 NO가 다른 내재성 interneuron을 자극하여 어떤 종류의 흥분성 신경전달물질을 분비할 경우 가능하다²⁰. 이 경우에 있어서 NO(또는 다른 억제성 신경전달물질)가 작용하는 기간 동안에는 이완반응이 우세하여 이완효과만 보이다가 전장자극이 끝나면 비로소 수축반응이 나타나는 것으로 생각할 수

있다²².

NANC 신경자극에 의해 유도된 rebound contraction에 NO 이외에 어떠한 종류의 신경전달물질이 관련되어 있는지 본 실험만으로는 정확히 알 수 없었지만 외원성 ATP에 의해 농도의존적인 수축반응이 일어나는 것과 P_{2y}-purinoceptor antagonist로 알려진²³ reactive blue 2가 전장자극에 의한 반사성의 수축반응과 외원성 ATP에 의한 수축반응을 억제하였으므로 ATP가 반사성의 수축반응을 매개하는 신경전달물질로 작용할 가능성이 있다고 생각된다.

한편 NO와 같은 NANC 억제성 신경전달물질이 신경원성이 아닌 다른 흥분성 물질을 분비시켜 반사성의 수축을 유발시킬 수 있다는 가능성이 제기되고 있다. 즉, cyclooxygenase 억제제인 indomethacin은 고양이²⁰와 개²⁴의 결장에서 반사성의 수축반응을 억제시켰으며 따라서 prostaglandin 또는 다른 eicosanoids가 NANC 자극 후의 수축반응에 관여할 것으로 제기되었다. Thornbury *et al*²⁵은 양의 방광경부 평활근에서 NO에 의한 rebound contraction이 ryanodine에 의해 차단되는 것을 관찰하고, NO는 세포내 Ca²⁺ 저장소로부터 Ca²⁺을 유리시킴으로써 rebound contraction을 일으킨다고 보고하였다. 또한 cGMP 경로에 의해 생성되는 세포내 cADP-ribose는 새로 확립된 2차 전달물질로서 ryanodine-sensitive Ca²⁺ 통로를 개방하여 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시킨다고 알려졌다²⁶. 이러한 사실은 cADP-ribose가 NO에 의한 수축에 관여할 가능성을 시사한다.

본 실험에서 methylene blue에 의해 rebound contraction이 억제되었으나 cGMP의 유도체인 8-Br-cGMP는 이완반응만 일으키고 수축반응은 일으키지 못하였다. 이러한 사실은 rebound contraction이 cGMP에 의존적이나 cGMP가 분해되지 않으면 발생되지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 cGMP의 분해산물이 NO에 의한 rebound contraction에 관여할 가능성이 있다고 생각된다.

이상의 관찰내용으로 돼지 위저부 중주근의 전장자극에 의한 이완반응은 주로 NO/cGMP 경로에 의해 매개되며 VIP와 ATP는 작용을 하지 않거나 아니면 미미한 수준의 적용을 할 것으로 사료된다. 그리고 돼지 위저부 중주근의 반사성 수축반응이 nitroergic nerve의 활성화에 의존적으로 나타났으나 평활근에서 이완반응을 매개하는 NO가 어떤 경로를 통하여 수축반응과 연계되는지 즉, 다른 흥분성 신경을 자극하는 것인지 아니면 다른 기전

으로 작용하는지 아직 불명확하며 앞으로 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

결 론

단위동물의 receptive relaxation을 유도하는 일차적인 생리현상이라고 추정되는 위저부 평활근의 이완에는 비아드레날린 비콜린성 신경이 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험은 돼지 위저부 평활근의 이완 반응이 비아드레날린 비콜린성 신경매개에 의한 것인지를 알아보고 이에 관여하는 신경전달물질을 밝히고자 실시되었으며, 돼지 위저부 종주근 절편을 이용하여 등척성 이완을 기록하였다. 실험결과는 다음과 같다.

1. 돼지 위저부 종주근은 비아드레날린 비콜린성 환경 하에서 전장자극에 대하여 전장자극기간 중에는 신속한 이완반응이 일어나고 자극이 끝난 후에는 반사성의 수축반응이 일어났다. 이러한 이완 및 반사성의 수축반응은 자극빈도 의존적으로 일어났다.

2. 돼지 위저부 종주근의 전장자극에 의한 이완 및 반사성의 수축은 두 반응 모두 tetrodotoxin($1 \times 10^{-6}M$)에 의해 차단되었다.

3. 전장자극에 의한 돼지 위저부 종주근의 이완 및 수축 반응은 NO synthase 억제제인 N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, $2 \times 10^{-5}M$)에 의해 억제되었으며, L-NAME에 의한 억제효과는 L-arginine($1 \times 10^{-3}M$)에 의해 회복되었으나 D-arginine($1 \times 10^{-3}M$)에 의해서는 회복되지 않았다.

4. 외원성 nitric oxide($NaNO_2$, 1×10^{-5} - $1 \times 10^{-4}M$, pH=2.0)는 전장자극과 유사한 양상의 이완반응을 일으켰다.

5. Soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue ($2 \times 10^{-5}M$)에 의해 전장자극에 의한 돼지 위저부 종주근의 이완 및 수축현상이 유의성 있게 억제되었으나 adenylylate cyclase 억제제인 N-ethylmaleimide($1 \times 10^{-4}M$)는 유의한 영향을 미치지 못했다.

6. cGMP의 유도체인 8-Br-cGMP(1×10^{-6} - $3 \times 10^{-6}M$)는 농도 의존적으로 이완반응을 유발하였으나 cAMP의 유도체인 8-Br-cAMP(1×10^{-6} - $3 \times 10^{-6}M$)는 아무런 영향을 주지 못했다.

7. a-chymotrypsin은 전장자극에 의한 이완반응에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다.

8. Reactive blue 2($1 \times 10^{-4}M$, 40분)는 전장자극에 의한 반사성의 수축반응을 유의성 있게 억제하였으며, 외원

성 ATP(10^{-4} - $10^{-3}M$)에 의한 수축반응을 억제하였다.

이상의 실험결과로 돼지 위저부 종주근의 전장자극에 의한 비아드레날린 비콜린성 이완반응은 주로 NO에 의해 매개되는 것으로 생각된다. 한편 반사성의 수축반응 역시 NO에 의존적이며 그 이외에 다른 신경전달물질이 관련되어 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Stadass JD. Intragastric pressure/volume relationship before and after proximal gastric vagotomy. *Scand J Gastroent*, 10:129-134, 1975.
2. Abrahamsson H. Non-adrenergic noncholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacol Ther*, 280(suppl): 50, 1986.
3. Lefebvre RA. Non-adrenergic noncholinergic neurotransmission in the proximal stomach. *Gen Pharmacol*, 24:257, 1993.
4. De Beurme FA, Lefebvre RA. Vasoactive intestinal peptide as possible mediator of relaxation in the rat gastric fundus. *J Pharm Pharmacol*, 40:711-715, 1988.
5. Grider JR, Cable MB, Said SI, et al. Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *Am J Physiol*, 248:G73-G78, 1985.
6. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24: 509-581, 1972.
7. Boeckxstaens GE, Pelckmand PA, Bogerd JT, et al. Evidence for differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal peptide by non-adrenergic non-cholinergic nerves in rat gastric fundus. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 318:107-115, 1992.
8. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of N G -nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 106:173-179, 1992.
9. D'Amato M, Curro D, Montuchi P, et al. Release of vasoactive intestinal peptide from rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 105:P691-695, 1992.
10. Martin W, Smith JA, Henderson AH. Evidence that inhibitory factor extracted from bovine retractor penis is nitrite, whose acid activated derivative is stabilized ni-

- tric oxide. *Br J Pharmacol*, 93:597-586, 1988.
11. Gillespid JS, Xiaorong L, Martin W. The effects of L-arginine and N^G-monomethyl-L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol*, 98:1080-1082, 1989.
 12. Shuttleworth CWR, Sanders KM. Involvement of nitric oxide in neuromuscular transmission in canine proximal colon. *Proc Soc Exp Biol Med*, 211:16-23, 1996.
 13. Nishimura J, Van breemen C. direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun*, 163:929-935, 1989.
 14. Raymond GI, Wendt IR. Force and intracellular Ca²⁺ during cyclic nucleotide-mediated relaxation of rat anococcygeus muscle and the effects of cyclopiazoic acid. *Br J Pharmacol*, 119:1029-1037, 1996.
 15. Torphy TJ, Fine CF, Burman M, *et al.* Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increased cyclic nucleotide content. *Am J Physiol*, 251:G786-G793, 1986.
 16. Lefebvre RA, Smits GJM, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 116:2017-2026, 1995.
 17. Smits GJM, Lefebvre RA. Influence of age on the signal transduction pathway of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 114:640-647, 1995.
 18. Burnstock G, Warland JJI. P₂-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery : reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P_{2y}-but not the P_{2x}-purinoceptor. *Br J Pharmacol*, 90:383-391, 1987.
 19. Bartho L, Lefebvre RA. Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch int Pharmacodyn*, 329:53-66, 1995.
 20. Venkova K, Krier J. A nitric oxide and prostaglandin-dependent component of NANC off-contractions in cat colon. *Am J Physiol*, 266:G40-G47, 1994.
 21. Thornbury KD, Hollywood MA, McHale NG. Mediation by nitric oxide of neurogenic relaxation of the urinary bladder neck muscle in sheep. *J Physiol*, 451:133-144, 1992.
 22. 강동목, 한호재, 양일석. 소 식도구 윤상근의 비아드레날린 비콜린성 이완 및 수축. *대한수의학회지*, 35:279-285, 1995.
 23. Burnstock G, Warland JJI. P₂-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery : reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P_{2y}- but not the P_{2x}-purinoceptor. *Br J Pharmacol*, 90:383-391, 1987.
 24. Matharu S, Hollingsworth. Purinoceptors mediating relaxation and spasm in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol*, 106:395-403, 1992.
 25. Thornbury KD, Donaghy KM, Peake J. Characteristics of the NANC post-stimulus('rebound') contraction of the urinary bladder neck muscle in sheep. *Br J Pharmacol*, 116:2451-2456, 1995.
 26. Lee HC. A signaling pathway involving cyclic ADP-ribose, cGMP, nitric oxide. *NIPS*, 9:134-138, 1994.