

# Carbachol에 의한 위장관 수축에 대한 rebamipide의 융합성 조절 효과

제현동<sup>1</sup>, 민영실<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대학교 약학대학 약학과 교수, <sup>2</sup>중원대학교 제약공학과 조교수

## The Effect of Rebamipide on the Regulation of Intestinal Contractility

Hyun Dong Je<sup>1</sup>, Young Sil Min<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Professor, Dept. of Pharmacology, College of Pharmacy, Daegu Catholic University

<sup>2</sup>Assistant Professor, Dept. of Pharmaceutical Science, Jungwon University

**요약** 이번 연구는 소화기계 출혈, 궤양 등에 대해 치료와 예방을 목적으로 사용되는 rebamipide에서 농도 의존적 장관 수축성 조절 기전에 대해 조사하고자 한다. 소화기 수축은 근육의 섬유의 조절에 의하여 일어난다. 실험용 쥐의 회장 과 결장을 적출하여 carbachol로 회장 과 결장의 근육수축을 유발하여 연구를 진행하였다. rebamipide 단독으로 장관수축을 억제하지 않고 소폭으로 carbachol 유도 수축을 높이는 것으로 관찰되었다. 소화기계 부작용을 일으키는 indomethacin 과 rebamipide를 흔히 병용하기에, 병용 효과를 관찰하였다. Indomethacin과 병용된 rebamipide는 장관 중 회장의 수축성을 증대시켰다. rebamipide는 장관중 회장에서 수축성을 증대시키고, NSAIDs에 의한 궤양에 대한 항궤양효과 외에 운동성도 일부 조절하는 것으로 생각된다.

**주제어** : 회장-결장, 소화기 수축성, rebamipide, 항궤양, 평활근

**Abstract** The aim of the study was to observe the influence and related mechanism of rebamipide on the intestinal contraction. Intestinal contraction includes the activation of thick or thin filament regulation. However, there are few reports addressing the question whether this regulation is involved in rebamipide-induced regulation. We hypothesized that rebamipide plays a role in intestinal contraction evoked by carbachol in rat intestine. Interestingly, rebamipide alone didn't inhibit and rather slightly increased the contraction in the denuded muscle. Therefore, rebamipide alone and together with indomethacin increases the ileal contraction suggesting that additional pathways might be involved in the regulation of ileal contractility. In conclusion, rebamipide has some effect on the regulation of contractility and anti-ulcer by NSAIDs

**Key Words** : Colon:ileum, Contraction, Rebamipide, Anti-ulcer, Smooth muscle

### 1. 서론

위장관 운동은 자율신경에 의해 조절되며 평상시에 규칙적이고 섬세하게 조절되고 있다. 위장관 운동의 조절에는 신경세포, 평활근, 기질세포 등의 세포들이 복잡한 상호작용을 통해 구성되며 자발적 흥분성을 유발하는 카탈간질세포와 장근신경층 등이 관여된다고 생각된

다[1].

정상적인 평활근의 수축은 세포막 존재성 수용체 조절작용에 의한 악틴과 미오신이 결합하여 연결고리를 형성하여 평활근 세포 길이가 감소되는데 주로 미오신 경사슬 인산화 정도에 의해 결정된다[2]. 미오신 경사슬 인산화에 칼슘 의존성 반응과 칼슘 감작성 반응이 있다 [3]. 궤양에 대해 흔히 사용되는 rebamipide의 경우 프

\*Corresponding Author : Young Sil Min (youngsil31@jwu.ac.kr)

Received September 6, 2020

Accepted October 20, 2020

Revised October 3, 2020

Published October 28, 2020

로스타글란딘을 유도하고 프리 래디칼을 제거하여 항궤양효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4,5]. 따라서 이번 실험의 목적은 항궤양성 rebamipide 을 사용하여 rebamipide에 의한 위장관 조절 관찰과 이에 대한 칼슘이온 탈감작에 대한 indomethacin 병용 또는 RhoA/ Rho-kinase 활성 조절의 역할을 추측하는 것이다. rebamipide 의 화학구조는 Fig. 1과 같다. 수축제에 의한 위장관 수축에 가는 미세섬유성 조절과 굵은 미세섬유성 조절이 참여하는데[6] 여러 수축제에 의한 위장관 수축에서 rebamipide에 의한 조절에 이런 경로가 관여되었다는 보고는 없었다. 따라서 우리는 투여된 rebamipide가 위장관 수축에 어떤 역할을 수행할 것으로 생각하였고 적출된 위장관이 활용되었고 수축에 의한 기계적 신호는 전기적 신호로 변환되어 컴퓨터에 저장되었다.

한편 수축제 carbachol에 의한 수축에 RhoA/ Rho-kinase 경로 활성화가 포함되며 일부 가는 미세섬유성 조절을 경유해 작동하는 것으로 보고되었다.[6] 그러나 현재까지 rebamipide 투여에 의한 장관 평활근 수축성 조절에서 이러한 경로가 조절되는지에 대한 문헌상 보고는 없었다. Rebamipide는 최근에 소개된 항궤양성 약물이지만 위장관 운동성 조절 기전에 대해 알려진 바가 적다.

그리고 효능약이나 증가된 위장관내압에 대한 위장관 평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린 경우 미오신 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 전통적인 평활근의 생화학적 경로에 주로 의존한다.[7,8] 이들 경로의 존재는 분리된 위장관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 측정으로 직접적으로 관찰되었다. 위장관 평활근 수축의 시작이 미오신의 20 kDa 라이트체인 인산화의 칼슘의존성 증가에 의해 주로 조절된다고 추정되었지만[9] 기타 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 관계 없이 미오신의 20 kDa 라이트체인 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 추측된다.[10-12] 미오신 라이트체인 인산화는 약틴과 미오신의 상호작용과 평활근 수축을 증가시킨다. 그런데 미오신 경사슬 인산화와 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 항상 일치하지는 않다. 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화와 수축력의 정도는 보통 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 높는데 이 현상을 소위 칼슘이온 감작이라고 설명한다.[9] 따라서 미오신 라이트체인 인산화수준과 수

축정도를 조절하는 추가기전이 제시되었다. 즉 guanine nucleotide-exchange factors (Rho GEFs), Rho A, Rho-kinase에 의한 미오신 인산가수분해효소의 역제가 칼슘이온 감작에서 주요한 경로라는 것이 다음 연구들에서 밝혀졌다.[13-16]

노인이나 소화불량이나 변비 등 소화기계 질병을 지닌 환자에서 위장관의 수축 기능이 손상되어 수축이 억제된다. 따라서 프로스타글란딘 유도나 프리래디칼 제거에 작용한다는 기존 연구에 의하면[4,5] rebamipide는 노인이나 소화불량 환자에서 효과가 없을 것이다. 그런데 노인이나 소화기계 질병 환자에서 저농도의 rebamipide가 효과가 있다면 항궤양 외에 저농도의 rebamipide가 장관평활근에 직접 작용할 수 있을 것이다. 따라서 저농도의 rebamipide 사용이 장관 수축성 조절에 중요한 역할을 수행하며 기존의 NSAIDs와의 병용투여 시 여러 상호작용이 나타날 수 있다. 농도와 관련하여 저농도 및 고농도의 rebamipide의 단독 및 병용 효과를 관찰한다.

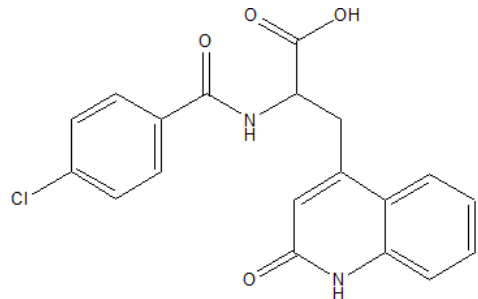


Fig. 1 Chemical structure of rebamipide (2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2-(1H)-quinolinon-4-yl] propionic acid).

## 2. 실험 방법

### 2.1 재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Rebamipide (Donga-Otsuka, Korea), potassium chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA), carbachol (Sigma), indomethacin (Sigma), sodium bicarbonate (Sigma), pentobarbital sodium (Dongwon, Korea), porbol 12,13-dibutyrate (Sigma), acetylcholine (Sigma), D-(+)-glucose (Sigma), SD (Sprague-Dawley) 쥐 (Hyochang Science, Korea). 그 외 다른 시약은 특급

또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요 시 생리식염수나 Krebs 용액에 첨가되었다.

## 2.2 실험과정

본 실험은 US National Institute of Health (NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 체중 200-250g의 수컷 Sprague-Dawley 쥐가 실험에 사용되었다. 수컷 쥐는 분리된 케이지에 개별적으로 수용되었고 1주일 동안 사료와 물이 충분히 제공되었다. 그 다음 무작위로 대조군, 저농도 rebamipide군 및 고농도 rebamipide군으로 분류되고 집진적인 적응기를 거쳐 실험에 사용되었다. 실험 당일에 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강 투여하여 마취시키고 고정시켰다.

## 2.3 위장관 적출

복부 절개로 복강이 열렸고 수술도구로 장관과 주변 부위를 노출시켰다. 위와 직장은 분리되지 않았고 장관 적출을 위한 충분한 공간을 확보하고자 좌측으로 이동시켜 생리식염수로 적셔진 거즈로 덮었다. 장관은 직장 근처에서 위 부근까지 적출되었고 즉각 차가운 Krebs 용액에 넣어졌다. 장관내 변과 각종 결체조직은 제거되었다. 장관은 6 mm 길이의 고리로 잘려졌고 점막은 물리적으로 제거되었다.

## 2.4 기계적 활성 측정

장관의 평활근 조각은 2개의 금속 고리로 수조안에 현수되었다. 아래쪽 고리는 수조바닥에 고정되었고 위쪽 고리는 등장력 변환기에 연결되었다. 변환기의 신호는 physiograph에 기록되었다. 수조의 용적은 10 ml이고 수조안의 용액은 37°C에서 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 포화되었다. Krebs 용액의 조성은 아래와 같다. KCl, 4.8; NaCl, 118.0; NaHCO<sub>3</sub>, 24.0; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; glucose, 11.0. 용액의 산도 pH는 7.4로 유지되었다. 1시간의 평형기간동안 휴지기 장력은 1.0g으로 조절되었다. 평형기간 후 장관 고리는 72 mM KCl로 수축되었고 근육이 충분히 수축될 경우 실험이 진행되었다. 용량-반응 곡선을 얻기 위해 장관수축 제들이 수조내로 투여되었다. 결과는 72 mM KCl에 의한 대조수축의 %로 기록되었다.

## 2.6 통계분석

모든 실험결과들이 mean  $\pm$  s.e. (평균  $\pm$  표준오차)로 표시되었고 통계 처리는 Student's t-test 를 수행하여 Fig. 2-5에서와 같이  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 결정하였다.

## 3. 실험결과

### 3.1 쥐 회장에서 carbachol에 의한 수축에 대한 고농도 rebamipide의 효과

분리된 쥐 회장의 휴지기 장력은 공기가 통과한 Krebs 용액 관류 60분 후 항정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 1.0 g으로 조절하였다. 조직 배양 중인 쥐 회장에서 rebamipide 투여 시 기저 수축에 대한 효과가 없었고 (data not shown) carbachol (10  $\mu$ M)에 의한 수축에 대해 고농도의 rebamipide는 억제 효과가 없었고 오히려 수축성을 Fig. 2에서와 같이 약간 증대시켰다.

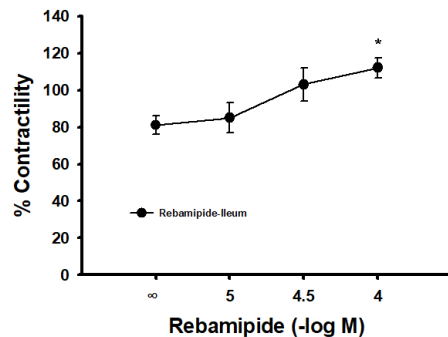


Fig. 2. The effect of rebamipide on 10  $\mu$ M carbachol-induced contraction in the ileal muscle. The tension was expressed as a percentage of the maximum contraction to 72 mM KCl. Data were expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. \* $P < 0.05$ , presence versus absence of rebamipide.

### 3.2 쥐 결장에서 carbachol에 의한 수축에 대한 고농도 rebamipide의 효과

분리된 쥐 결장의 휴지기 장력은 공기가 통과한 Krebs 용액 관류 60분 후 항정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 1.0 g으로 조절하였다. 조직 배양 중인 쥐 결

장에서 rebamipide 투여 시 기저 수축에 대한 효과가 없었고 (data not shown) carbachol (10  $\mu$ M)에 의한 수축에 대해 고농도 rebamipide는 억제 또는 증강 효과가 Fig. 3에서와 같이 변화 없었다.

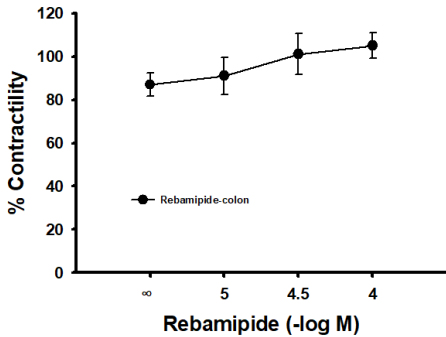


Fig. 3. The effect of rebamipide on 10  $\mu$ M carbachol-induced contraction in the colonic muscle. The tension was expressed as a percentage of the maximum contraction to 72 mM KCl. Data were expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM.

### 3.3 쥐 회장에서 carbachol과 indometahcin에 의한 수축에 대한 고농도 rebamipide의 효과

분리된 쥐 회장의 휴지기 장력은 공기가 통과한 Krebs 용액 관류 60분 후 항정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 1.0 g으로 조절하였다. NSAIDs에 의한 소화기계 부작용에 대해 흔히 병용되는 rebamipide의 효과를 관찰하였다. 쥐 회장에서 rebamipide 투여 시 기저 장력에 대한 효과가 없었고 (data not shown) carbachol (10  $\mu$ M)에 의한 수축에 대해 고농도의 rebamipide는 NSAIDs와 병용 사용시 수축성 증대 효과가 Fig. 4에서와 같이 나타내었다. 따라서 NSAIDs와 병용된 rebamipide는 항궤양 효과 외에 추가적으로 회장 운동성에 대한 효과도 있었다.

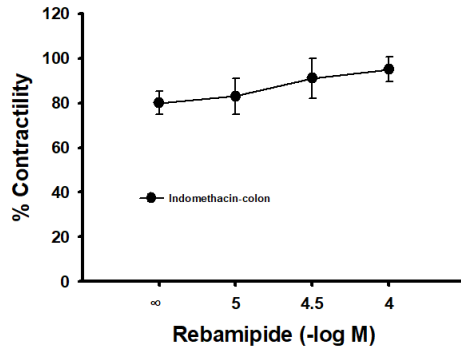


Fig. 4. The effect of rebamipide on 10  $\mu$ M carbachol and indomethacin-induced contraction in the ileal muscle. The tension was expressed as a percentage of the maximum contraction to 72 mM KCl. Data were expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. \*P<0.05, presence versus absence of rebamipide or indomethacin.

### 3.4 쥐 결장에서 carbachol과 indometahcin에 의한 수축에 대한 고농도 rebamipide의 효과

분리된 쥐 결장의 휴지기 장력은 공기가 통과한 Krebs 용액 관류 60분 후 항정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 1.0 g으로 조절하였다. NSAIDs에 의한 소화기계 부작용에 대해 흔히 병용되는 rebamipide의 효과를 관찰하였다. 쥐 결장에서 rebamipide 투여의 기저 장력에 대한 효과가 없었고 (data not shown) carbachol (10  $\mu$ M)에 의한 수축에 대해 고농도의 rebamipide는 NSAIDs와 병용 사용시 수축성 증대 효과가 Fig. 5에서와 같이 보였다. 따라서 NSAIDs와 병용된 rebamipide는 항궤양 효과 외에 추가적으로 결장 운동성에 대한 효과가 없었다.

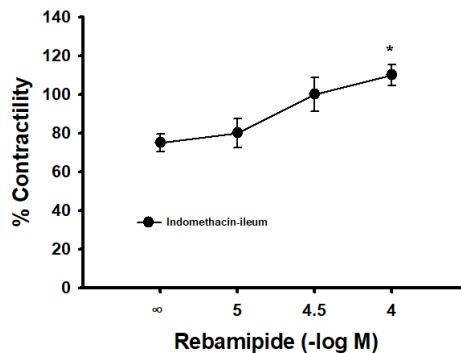


Fig. 5. The effect of rebamipide on 10  $\mu$ M carbachol

and indomethacin-induced contraction in the colonic muscle. The tension was expressed as a percentage of the maximum contraction to 72 mM KCl. Data were expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM.

#### 4. 고찰

궤양에 대해 흔히 사용되는 rebamipide의 경우 프로스타글란딘을 유도하고 프리 래디칼을 제거하여 항궤양효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나 추가적으로 운동성 조절을 의심하게 되었다. 따라서 이번 실험에서 점막을 제거한 장관을 이용하여 rebamipide의 추가 기전을 조사하게 되었다. 한편 장관 수축 기전에 효능약 자극에 의한 미오신 라이트체인 인산화 또는 수축력의 정도는 보통 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 높으며 이 현상을 소위 칼슘이온 감작이라고 설명한다.[9] 따라서 미오신 라이트체인 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가기전이 제시되었다. 즉 MEK, PKC에 의한 가는 미세섬유성 조절이나 guanine nucleotide-exchange factors (Rho GEFs), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 인산가수분해효소의 억제 가 칼슘이온 감작에서 중요한 경로라는 것이 다음 연구들에서 밝혀졌다.[10-12]

이전까지는 rebamipide가 프로스타글란딘을 유도하고 프리 래디칼을 제거하여 항궤양효과를 나타내는 것으로 보고되었고[4,5] 따라서 장관 중 회장에서 수축성이 증가되고 결장에서 수축성이 유지되는 것에 일부 장관 평활근 자체에 대한 활성이 관련되지 않을 수 있고 이는 간접적으로 저농도 rebamipide에 악틴-미오신 상호작용을 조절하는 추가적인 효과가 없다는 것을 의미한다. 따라서 노화 또는 소화불량, 변비, 설사 등 소화기계 질병에서 위장관의 수축 기능이 손상되어 수축이 억제되기 쉬운데 이 경우에는 적절한 항궤양제도 결장에서 장관압 조절 효과가 없는 것으로 생각된다.

또한 관절염, 염증, 근육통 및 심혈관계 질환 등에 흔히 사용되는 NSAIDs에 의한 소화기계 부작용에 대해 흔히 병용되는 rebamipide의 병용 효과를 관찰하였다. Fig. 4에서와 같이 Indomethacin과 병용된 rebamipide는 장관 중 회장의 수축성을 증대시켰다. 따라서 적어도 회장에서 rebamipide는 NSAIDs에 의한 궤양에 대한 항궤양효과 외에 운동성도 일부 조절하는 것으로 생각된다.

#### 5. 결론

본 실험에서는 소화기계 출혈, 궤양 등에 대해 치료와 예방을 목적으로 사용되는 저농도의 rebamipide에서의 장관 수축성 조절 기전에 대해 조사하여 농도별 rebamipide의 사용에서의 부작용과 새로운 가능성을 확인하고자 하였다. 저농도의 rebamipide는 프로스타글란딘 유도나 프리래디칼 제거 작용 외에 평활근에 대한 직접 작용이 없는 것으로 추측되며 고농도의 rebamipide는 오히려 프로스타글란딘을 억제하거나  $Ca^{2+}$  유입이나 Rho-kinase에 관여하는 것으로 추정된다. 따라서 과도한 rebamipide는 설사 등 소화기계 질환을 악화시킬 수 있으며 그 기전은 프로스타글란딘 유도나 프리래디칼 제거와 관계없이 추가적인 기전으로 평활근 자체의 악틴-미오신 상호작용을 증가시켜 작용하는 것으로 추정된다. 향후 rebamipide의 농도와 관련하여 rebamipide의 RhoA/Rho-kinase 활성 조절효과, myosin phosphatase 활성조절 효과, ERK, MEK 의존성 가는 미세섬유성 조절 경로 등에 대해 분자약리학적 방법으로 관찰하고자 한다.

#### REFERENCES

- [1] K. M. Sanders, S. J. Hwang & S. M. Ward. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J. Physiol*, 588(Pt23), 4621-4639.  
DOI: 10.1113/jphysiol.2010.196030
- [2] M. Kurahashi et al. (2011). A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J. Physiol*, 589(Pt3), 697-710.  
DOI : 10.1113/jphysiol.2010.201129
- [3] R. C. Webb. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ*, 27(1-4), 201-206.  
DOI : 10.1152/advan.00025.2003
- [4] T. Yoshikawa et al. (1993). Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance. *Arzneimittelforschung*, 43(3), 363-366.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8387788/>
- [5] Y. Naito et al. (1995). Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study. *Free. Radic. Biol. Med*, 18(1), 117-123.  
DOI : 10.1016/0891-5849(94)00110-6

- [6] H. D. Je, J. M. Lee & H. O. La. (2010). The Inhibitory Effect of Eupatilin on the Intestinal Contraction Induced by Carbachol. *Biomol. & Thera*, 18(4), 442-447.  
DOI : 10.4062/biomolther.2010.18.4.442
- [7] Y. J. Xiong et al. (2013). The characteristics of genistin-induced inhibitory effects on intestinal motility. *Arch. Pharm. Res*, 36(3), 345-352.  
DOI : 10.1007/s12272-013-0053-2
- [8] W. Q. He et al. (2013). Altered Contractile Phenotypes of Intestinal Smooth Muscle in Mice Deficient in Myosin Phosphatase Target Subunit 1. *Gastroenterology*, 144(7), 1456-1465.  
DOI : 10.1053/j.gastro.2013.02.045
- [9] A. P. Somlyo & A. V. Somlyo. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372(6503), 231-236.  
DOI : 10.1038/372231a0
- [10] A. P. Somlyo & A. V. Somlyo. (1998). From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand*, 164(4), 437-448.  
DOI : 10.1046/j.1365-201X.1998.00454.x
- [11] M. Uehata et al. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6654), 990-994.  
DOI : 10.1038/40187
- [12] S. Sakurada et al. (2003).  $Ca^{2+}$ -dependent activation of Rho and Rho-kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res*, 93(6), 548-556.  
DOI : 10.1161/01.RES.0000090998.08629.60
- [13] T. Kitazawa, M. Masuo & A. P. Somlyo. (1991). G Protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(20), 9307-9310.  
DOI : 10.1073/pnas.88.20.9307
- [14] A. Gohla, G. Schultz & S. Offermanns. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res*, 87(3), 221-227.  
DOI : 10.1161/01.res.87.3.221
- [15] T. Leung et al. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem*, 270(49), 29051-29054.  
DOI: 10.1074/jbc.270.49.29051
- [16] T. Matsui et al. (1996). Rho-associated kinase, a

novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO. J*, 15(9), 2208-2216.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00574.x>

### 제 현 동(Hyun Dong Je)

[정회원]



- 1994년 2월 : 중앙대학교 약학과(약학사)
- 1996년 8월: 중앙대학교 약학과 (약학석사)
- 1999년 2월: 중앙대학교 약학과 (약학박사)
- 1999년 3월 : 미국생물의학연구소 연구원
- 2005년 9월 ~ 현재 : 대구가톨릭대학교 약학과 교수
- 관심분야 : 약물학, 소화기약리, 생약추출물, 정신건강
- E-Mail : hyundong@cu.ac.kr

### 민 영 실(Young Sil Min)

[정회원]



- 1992년 2월 : 중앙대학교 (약학사)
- 2001년 2월: 중앙대학교 (약학석사)
- 2004년 2월: 중앙대학교 (약학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 중원대학교 제약공학과 조교수
- 관심분야 : 건강, 생리활성물질, 식생활
- E-Mail : youngsil31@jwu.ac.kr