

Mirtazapine Regulates Pacemaker Potentials of Interstitial Cells of Cajal in Murine Small Intestine

Byung Joo Kim*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, Korea

Received May 11, 2021 / Revised June 2, 2021 / Accepted June 18, 2021

Interstitial cells of Cajal (ICCs) are the pacemaking cells in the gastrointestinal (GI) muscles that generate the rhythmic oscillation in membrane potentials known as slow waves. In the present study, we investigated the effects of mirtazapine, a noradrenergic and serotonergic antidepressant, on pacemaking potential in cultured ICCs from the murine small intestine. The whole-cell patch-clamp configuration was used to record pacemaker potential in cultured ICCs. Mirtazapine induced pacemaker potential depolarizations in a concentration-dependent manner in the current clamp mode. Y25130 (a 5-HT₃ receptor antagonist), RS39604 (a 5-HT₄ receptor antagonist), and SB269970 (a 5-HT₇ receptor antagonist) had no effects on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations. Also, methoctramine, a muscarinic M₂ receptor antagonist, had no effect on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations, whereas 4-diphenylacetoxy-N-methyl-piperidine methiodide (4-DAMP), a muscarinic M₃ receptor antagonist, inhibited the depolarizations. When guanosine 5'-[β-thio] diphosphate (GDP-β-S; 1 mM) was in the pipette solution, mirtazapine-induced pacemaker potential depolarization was blocked. When an external Ca²⁺ free solution or thapsigargin, a Ca²⁺-ATPase inhibitor of the endoplasmic reticulum, was applied, the generation of pacemaker potentials disappeared, and under these conditions, mirtazapine induced pacemaker potential depolarizations. In addition, protein kinase C (PKC) inhibitor, calphostin C, and chelerythrine inhibited mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations. These results suggest that mirtazapine regulates pacemaker potentials through muscarinic M₃ receptor activation via a G protein-dependent and an external or internal Ca²⁺-independent PKC pathway in the ICCs. Therefore, mirtazapine can control GI motility through ICCs.

Key words : Gastrointestinal tract, interstitial cells of Cajal, mirtazapine, motility, pacemaker potentials

서론

항우울제는 종종 과민성 장 증후군과 소화불량 환자에서 사용된다. 이것은 아마도 복통을 줄이는 효과 때문이라 생각된다[1, 2, 8, 11]. 하지만 항우울제와 위장관 운동성과의 관련성에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 미르타자핀(mirtazapine)은 노르아드레날린성 및 세로토닌성 양쪽에 반응하는 기존 항우울제와는 기전이 다른 새로운 항우울제로 알려지고 있다[3, 7]. 최근 미르타자핀은 장 과민성을 억제하고 위 배출능을 증가시키는 것으로 보고 되었고, 기존 위장관 운동성 증가 치료에 반응하지 않는 심각한 위마비(gastroparesis)치료에 효과적인 것으로 보고 되었다[21]. 또한 당뇨병 위마비 및 소화불량을 가진 환자에서도 효과적으로 보고 되었지만 정확한 기전은 알려져 있지 않다[9].

위장관 운동은 음식의 소화에 중요한 역할을 한다. 위장관 운동 연구에서 중요한 발견은 카할세포(interstitial cells of Cajal; ICC)가 위장관 운동의 항도잡이(pacemaker activity) 역할을 한다는 점이다[16, 19, 22, 23]. 카할세포는 위장관 운동을 조절하는 역할을 하고 있으며, 또한 신경과 위장관 사이에서 중계역할을 하는 것으로 알려지고 있다[30]. 하지만 장 과민성 및 위마비와 같은 위장관 질환에 효과가 있다고 알려지고 있는 미르타자핀은 가장 기본적인 위장관 운동성에 대한 효능은 잘 알려져 있지 않다. 따라서, 본 실험에서는 위장관 운동 조절 기전에 관한 연구에 중요한 카할세포를 이용하여 미르타자핀의 카할세포에 대한 효과와 작용기전을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료

미르타자핀(10-200 μM) 및 이 논문에 사용된 모든 시약은 sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 사용 직전에 원하는 농도로 만든 후 세포에 투여하였다.

카할세포 배양

카할세포의 배양을 위해 주로 이용되는 마우스는 3-5일령

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8469, Fax : +82-51-510-8420

E-mail : vision@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Balb/C를 사용하고 에테르(ether)로 마취 시킨 후 개복하여 유문륜(pyloric ring)에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출하였다. 실온에서 크렙스 링거 중탄산염(Krebs-Ringer bicarbonate)용액으로 채워진 준비 용기 속에서 창자간막 가장 자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 운상근을 노출시킨 후 분리된 소장 근육조직을 교원질 분해 효소(collagenase) (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) 1.3 mg/ml, 소혈청알부민(bovine serum albumin) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 2 mg/ml, 트립신 저해제(trypsin inhibitor) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 2 mg/ml 등이 들어 있고, Ca^{2+} 이 들어 있지 않은 행크(Hank's) 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화시킨 후 진탕시켜 세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 유리 커버 글라스 위에 분주하고, 10분 후에 간상세포인자(stem cell factor) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5 ng/ml와 2% 항생/항진균제(antibiotic/antimycotic) (Gibco, Grand Island, NY, USA)가 들어 있는 smooth muscle growth medium (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) 용액을 분주한 후, 37°C(95% O_2 - 5% CO_2) 배양기에서 배양 시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 항생/항진균제(antibiotic/antimycotic)만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주고 실험은 배양 1일째 후부터 시행하였다. 모든 동물 실험 과정은 부산대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받아 실시 하였다(PNU-2019-2462) [19, 22, 23].

전기생리학적 실험

배양한 카할세포에서 막전압을 기록하기 위해 패치클램프(patch clamp) 실험기법 중 전 세포(whole cell patch)방법을 이용하였다. 전압은 패치클램프 앰프(standard patch clamp amplifiers) (Axon Instruments, Foster, CA, USA)를 통해 증폭시키며, 나오는 신호는 컴퓨터 모니터 및 생리적 기록기(Gould 2200, Gould, Valley View, OH, USA)를 통해서 관찰하였다. 막전압을 기록하는 동안 세포의 관류용액의 조성은 다음과 같다(각 수치는 mM 단위임): KCl 5, NaCl 135, $CaCl_2$ 1.2, glucose 10, HEPES 10이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 하고, 전극내 용액의 조성은 다음과 같이 하였다(각 수치는 mM 단위임): KCl 140, $MgCl_2$ 5, K_2ATP 2.7, Na_2GTP 0.1, creatinine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 하였다. 배양된 카할세포에서 세포막 전류 고정법(Current clamp)을 시행하여 자발적으로 발생하는 내향성 향도잡이 전압을 기록한 후 미르타자핀의 효능을 알아 보았다[19, 22, 23].

통계 분석

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test를 사용하였으며 유의수준 $p < 0.05$ 를 사용하였다. 실험결과치는 mean \pm SD로 기재하였다.

결 과

미르타자핀의 카할세포 효과

소장 카할세포에서 발생하는 pacemaker potential에서 미르타자핀에 의한 조절 가능성을 알아 보았다. 미르타자핀은 농도 의존적으로 pacemaker potential의 탈분극(depolarization)을 증가시킬 수 있었다(Fig. 1A - Fig. 1D). 미르타자핀 10 μ M에서는 1.7 ± 0.4 mV ($n=6$), 50 μ M에서는 5.5 ± 0.5 mV ($n=6$; $p < 0.01$), 100 μ M에서는 22.0 ± 0.7 mV ($n=6$; $p < 0.01$), 200 μ M에서는 24.8 ± 1.0 mV ($n=6$; $p < 0.01$) 정도로 탈분극 정도가 증가되었다(Fig. 1E).

미르타자핀의 카할세포 효과에 세로토닌 수용체(serotonin receptor)의 관련성

세로토닌 수용체는 위장관에서 위장관 운동성 조절에 관여하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 미르타자핀과 세로토닌 수용체와의 관련성에 대해서 알아보았다. 세로토닌 수용체는 7개가 존재하는 것으로 알려져 있으나 배양한 카할세포에는 3번, 4번, 7번 세로토닌 수용체만 존재하는 것으로 알려져 있다[27, 32]. 미르타자핀에 의한 카할세포 반응에 어떤 세로토닌 수용체가 관여하는지를 알아보기 위해서 3번 세로토닌 수용체 억제제인 Y25130, 4번 세로토닌 수용체 억제제인 RS39604, 그리고 7번 세로토닌 수용체 억제제인 SB269970을 각각 5분 동안 전처치한 후 미르타자핀의 효능을 알아 보았다. Y25130, RS39604, SB269970을 각각 전처치한 후 미르타자핀의 효능을 보면 미르타자핀에 의한 탈분극 반응은 억제 되지 않았다(Fig. 2A - Fig. 2C). Y25130을 전처치한 경우는 미르타자핀에 의해서 23.0 ± 1.1 mV ($n=5$), RS39604를 전처치한 경우는 22.0 ± 1.1 mV ($n=7$), 그리고 SB269970을 전처치한 경우는 24.5 ± 1.5 mV ($n=6$) 정도로 탈분극이 증가되었다(Fig. 2D). 따라서, 미르타자핀에 의한 탈분극 반응은 세로토닌 수용체와는 관련 없음을 알 수 있다.

미르타자핀의 카할세포 효과에 무스카린성 수용체(muscarinic receptor)의 관련성

무스카린성 수용체는 위장관 평활근 세포의 탈분극을 일으키는 것으로 알려지고 있다[14, 17]. 위장관 카할세포에서는 M2와 M3 무스카린성 수용체가 존재한다[6]. 따라서, 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극 반응에 무스카린성 수용체의 관련성을 알아보기 위해서 M₂ 수용체 억제제인 methoctramine과 M₃ 수용체 억제제인 4-DAMP를 사용하였다. 일단 카할세포 탈분극 반응에 methoctramine과 4-DAMP 자체는 아무런 영향을 미치지 않았고, Methoctramine을 전처치한 경우는 미르타자핀에 의한 탈분극이 나타났지만(Fig. 3A), 4-DAMP를 전처치한 경우는 미르타자핀에 탈분극이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 3B). Methoctramine를 전처치한 경우는 미

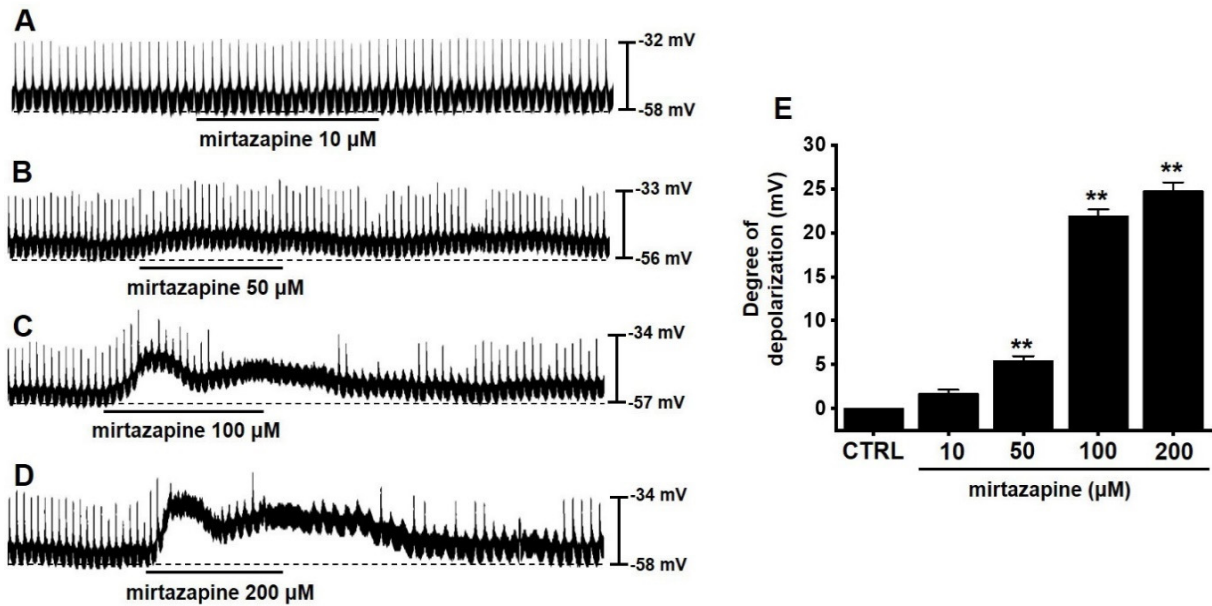


Fig. 1. Effects of mirtazapine on pacemaker potentials in cultured ICCs from the murine small intestine. (A-D) mirtazapine-induced pacemaker potential depolarization of ICCs (10-200 μM). (E) Summary of depolarization responses by mirtazapine. The values were expressed as the mean ± S.D. ***p*<0.01. CTRL, control.

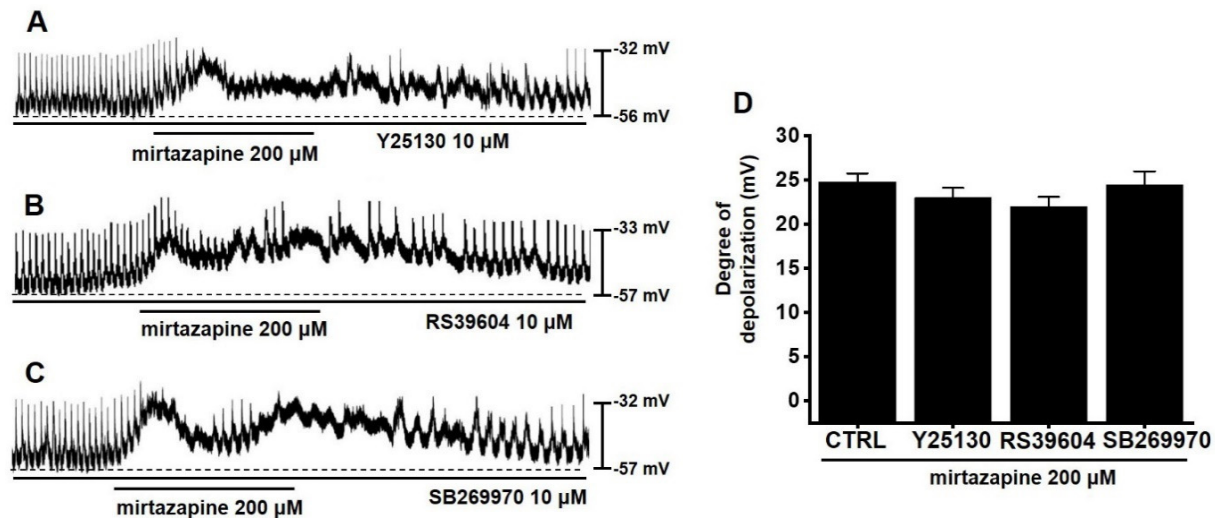


Fig. 2. Effects of 5-HT receptor subtype antagonists on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations in cultured ICCs. (A) Pacemaker potential depolarization of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of Y25130 5-HT₃ receptor antagonist (10 μM). (B) Pacemaker potential depolarization of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of RS39604 5-HT₄ receptor antagonist (10 μM). (C) Pacemaker potential depolarization of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of SB269970 5-HT₇ receptor antagonist (10 μM). (D) Summary of depolarization responses by mirtazapine in the presence of different 5-HT receptor antagonists. The values were expressed as the mean ± S.D. CTRL, control.

르타자핀에 의해서 25.2±0.7 mV (n=5), 4-DAMP를 전처치한 경우는 1.3±0.4 mV (n=5; *p*<0.01) 정도로 탈분극이 증가되었다 (Fig. 3C). 따라서, 미르타자핀은 무스카린성 3번 수용체(M₃ muscarinic receptor)를 통해서 탈분극 반응이 나타남을 알 수 있었다.

미르타자핀의 카탈세포 효과에 G protein의 관련성

미르타자핀에 의한 카탈세포 탈분극 반응에 G protein의 관련성을 알아보기 위해서 세포내 G protein의 기능을 억제시키는 GDPβS를 사용하였다[28]. 미르타자핀에 의한 카탈세포 탈분극에서 GDPβS (1 mM)의 세포내 투여시 탈분극 반응이 억제되었다(Fig. 4A). 세포내로 GDPβS (1 mM)를 투여한

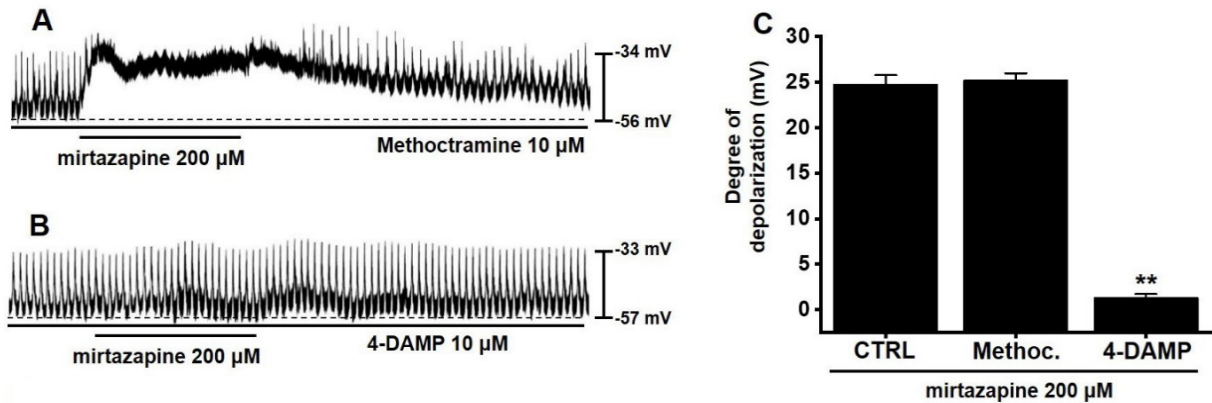


Fig. 3. Effects of muscarinic receptor subtype antagonists on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations in cultured ICCs. (A) Pacemaker potential depolarizations of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of methoctramine muscarinic M₂ receptor antagonist (10 μM). (B) Pacemaker potentials of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of 4-DAMP muscarinic M₃ receptor antagonist (10 μM). Pacemaker potential depolarizations were inhibited. (C) Summary of depolarization responses by mirtazapine in the presence of different muscarinic receptor antagonists. The values were expressed as the mean ± S.D. ***p*<0.01. CTRL, control. Methoct, methoctramine. 4-DAMP, 4-diphenylacetoxy-N-methyl-piperidine methiodide.

경우 미르타자핀에 의해서 1.7±0.6 mV (n=7; *p*<0.01) 정도로 탈분극이 억제되었다(Fig. 4B). 따라서 G protein이 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극 반응에 관여함을 알 수 있다.

미르타자핀의 카할세포 효과에 세포 밖과 안 Ca²⁺ 관련성
세포 밖과 안 Ca²⁺은 위장관 평활근 수축과 카할세포의

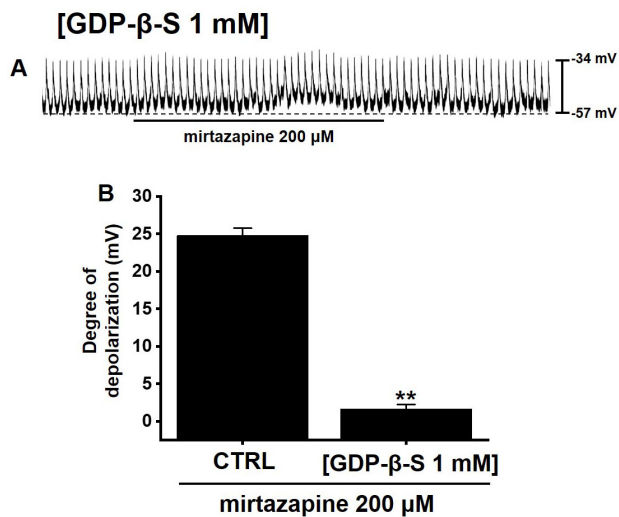


Fig. 4. Effects of GDPβS on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations in cultured ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs exposed to mirtazapine in the presence of GDPβS (1 mM) in the pipette. Under these conditions, mirtazapine-induced pacemaker potential depolarization was blocked. (B) Summary of depolarization responses by mirtazapine in the presence of GDP-β-S in the pipette. The values were expressed as the mean ± S.D. ***p*<0.01. CTRL, control. GDP-β-S, guanosine 5'-[β-thio] diphosphate.

pacemaker potential 조절에 관여한다[25]. 미르타자핀에 카할세포 조절에 세포 밖과 안 Ca²⁺의 관련성을 알아보기 위해서 세포 밖 Ca²⁺을 free (0 mM)로 바꾸었고, 소포체 Ca²⁺-ATPase 억제제인 thapsigargin를 사용하였다. 세포 밖 Ca²⁺ 0 mM인 경우 카할세포에 의한 pacemaker potential은 억제되고, 이때 미르타자핀 투여시 카할세포 탈분극은 발생되었다(Fig. 5A). Thapsigargin에서도 카할세포에 의한 pacemaker potential은 억제되고, 이때 미르타자핀 투여시 탈분극 역시 발생되었다(Fig. 5B). 세포 밖 Ca²⁺ 0 mM인 경우 미르타자핀에 의한 탈분극 정도는 25.4±1.0 mV (n=6), thapsigargin인 경우 미르타자핀에 의한 탈분극 정도는 12.3±0.9 mV (n=5; *p*<0.01)이다(Fig. 5C). 따라서, 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극 반응은 세포 밖과 안 Ca²⁺이 관여하지 않음을 알 수 있다.

미르타자핀의 카할세포 효과에 protein kinase C (PKC) 관련성

PKC 기전의 관련성을 알아보기 위해서 PKC 억제제인 calphostin과 chelerythrine을 이용하였다. Calphostin과 chelerythrine 각각 존재할때, 카할세포의 pacemaker potential기능은 변화 없고, 이때 미르타자핀에 의한 탈분극 반응은 억제되었다(Fig. 6A, Fig. 6B). Calphostin을 투여한 경우 미르타자핀에 의한 탈분극 정도는 1.5±0.4 mV (n=6; *p*<0.01), chelerythrine을 투여한 경우 미르타자핀에 의한 탈분극 정도는 1.4±0.5 mV (n=6; *p*<0.01)이다(Fig. 6C). 따라서, 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극 반응은 PKC 기전이 관여함을 알 수 있다.

고 찰

본 연구에서 미르타자핀은 위장관 소장 카할세포 pace-

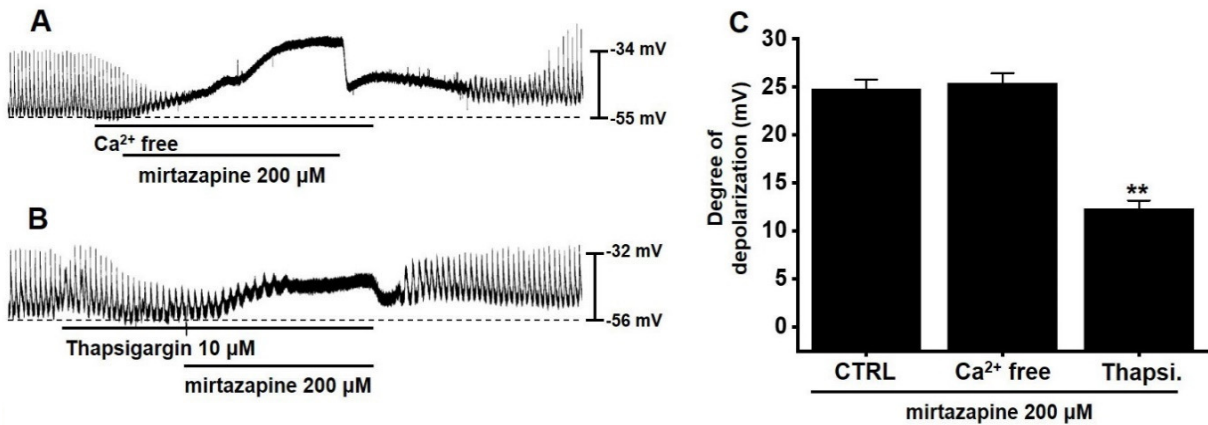


Fig. 5. Effects of external Ca²⁺ free solution or thapsigargin, a Ca²⁺-ATPase inhibitor of endoplasmic reticulum, on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations in cultured ICCs. (A) External Ca²⁺ free solution eliminated the generation of pacemaker potentials. Under these conditions, mirtazapine depolarized pacemaker potentials. (B) Thapsigargin eliminated the generation of pacemaker potentials. In these conditions, mirtazapine depolarized pacemaker potentials. (C) Summary of depolarization responses by mirtazapine in the presence of external Ca²⁺ free solution or thapsigargin. The values were expressed as the mean ± S.D. ***p*<0.01. CTRL, control. Thapsi., Thapsigargin.

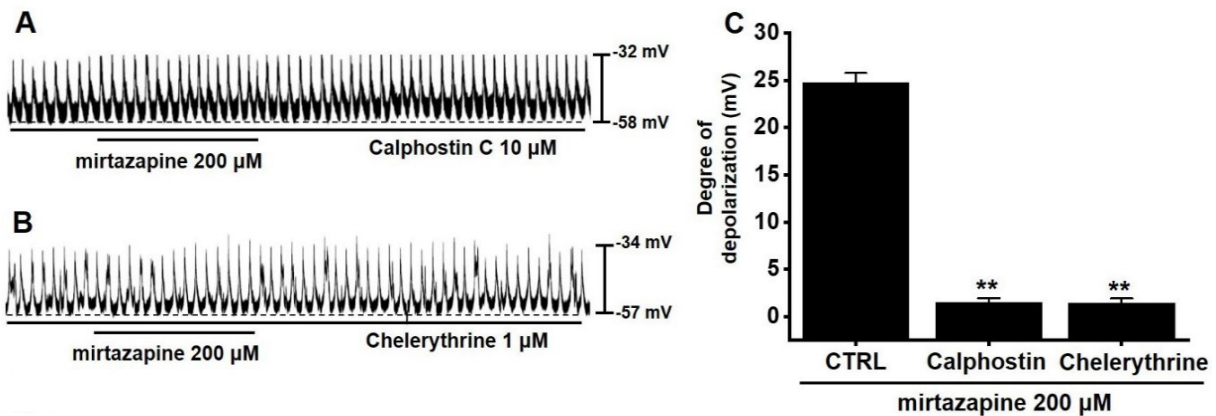


Fig. 6. Effects of PKC inhibitors on mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations in cultured ICCs. (A) Calphostin C, a PKC inhibitor, blocked the mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations. (B) Chelerythrine, a PKC inhibitor, blocked the mirtazapine-induced pacemaker potential depolarizations. (C) Summary of depolarization responses by mirtazapine in the presence of PKC inhibitors. The values were expressed as the mean ± S.D. ***p*<0.01. CTRL, control.

maker potential을 무스카린성 3번 수용체를 통해서 G protein-PKC에 의존적으로, 세포 밖과 안 Ca²⁺은 비의존적으로 탈분극 기능을 조절하고 있다.

카할세포는 위장관 전체에 존재하는 항도잡이 역할을 하는 세포로 위장관 운동성 조절을 담당하고 있다[16, 19, 22, 23]. 최근에는 카할세포가 심장근육, 요관갈때기이음부(ureteropelvic junction), 요도와 같은 조직에서도 발견되고 있다[15, 24]. 카할세포는 c-kit라는 tyrosine kinase 단백질 수용체를 통해서 확인할 수 있으며[16], 최근에는 anoctamin 1 (ANO1)이 위장관에서 카할세포를 확인할 수 있는 새로운 바이오마커로 발견되었다[41]. 카할세포는 위장관의 특정 층에 네트워크를 형성하면서 분포하며 위장관의 부위에 따라 그 분포의 차이가 있으며 그 분포도의 차이에 따라 다양한 카할세포의 기능이

존재한다[12, 13]. 소장에는 카할세포-IM (intramuscular ICC), 카할세포-MY (myenteric plexus ICC), 그리고 deep muscularis plexus region안에 위치하는 카할세포-DMP가 있다[12, 13]. 사람 및 기타 실험동물을 통한 연구에서 소장의 카할세포-MY가 항도잡이 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다[12, 13]. 또한 임상적으로 중요한 점은 카할세포 손상시 위마비, 만성 구토 및 오심, 기능성 소화불량등을 일으키는 것으로 알려지고 있는 점이다[10, 29].

일반적으로 기능성 위장관 운동 장애에 대한 효과적인 치료법은 잘 알려져 있지 않기 때문에 삼환계 항우울제나 세로토닌 재흡수 억제제 같은 항우울제가 임상에서 많이 처방되고 있다[36]. 항우울제가 기능성 위장관 운동 질환 임상에서 많이 사용되는 이유는 이 약들은 우울증을 치료하고 만성적인 고통

을 줄이기 때문이다[36]. 하지만 기전 관련 기초 연구가 많이 부족한 현실이다. 미르타자핀은 주요 우울장애에 널리 사용되고 있는 대표적인 항우울제로써 서론에서 언급된 것처럼 노르아드레날린성 및 세로토닌성 양쪽에 반응하는 기존 항우울제와는 기전이 다른 새로운 항우울제로 알려지고 있다[3, 7, 18, 38]. 졸림, 식욕증가, 체중증가, 어지러움 등의 부작용이 나타날 수 있지만 대부분은 투여초기에 발생하고 3-4일 내에 호전을 보인다[33]. 특히 불안, 불면 등의 증상에 매우 효과적이다. 위장관 운동성과 관련된 대부분의 기전은 일반적으로 세로토닌성 수용체나 무스카린성 수용체에 의해서 반응이 나타나는 것으로 알려지고 있어 본 연구에서는 가장 가능성이 높은 세로토닌성 및 무스카린성 관련성을 연구하였고 그 결과 미르타자핀의 탈분극 반응은 세로토닌성 수용체는 관여하지 않고 무스카린성 3번 수용체가 관여함을 알 수 있다(Fig. 2, Fig. 3). 또한 미르타자핀에 의한 다양한 효능이 알려지고 있는데 위장관 관련 기능으로는 과민성 장 증후군 억제 기능[37]과 대장 이상에 의한 복통에서 통증을 억제시키는 기능이 보고되고 있다[39]. 미르타자핀은 건강한 개(dogs)에서 위 배출능을 증가시키고 정상적인 대장 운동성을 유지하는데 도움을 주는 것으로 보고 되고 따라서 임상적으로 기능성 위장관 질환을 가지고 있는 환자의 위장관 운동성 및 통증을 조절하는 효능이 있다[40]. 미르타자핀의 다른 효능으로는 효소적 및 비효소적 산화제 생성을 억제하고 항산화 방어 메커니즘을 증가시켜 직접적인 항산화 특성을 갖는 특성도 있으며 이러한 항산화 능력은 좋은 세포 보호 한다[4, 31]. 또한 미르타자핀은 세로토닌성 수용체를 통해서 TGF- β 1/Smad3 및 ERK1/2 신호 전달 경로와 간 섬유화의 진행에 기여하는 산화 스트레스를 억제하기도 한다[5]. 본 연구에서는 미르타자핀은 카탈세포의 탈분극을 일으키고 이러한 탈분극 반응에는 배양한 카탈세포에 존재하는 3번, 4번, 7번 세로토닌 수용체는 관여하지 않고 3번 무스카린성 수용체만이 관여함을 알 수 있다(Fig. 2, Fig. 3). 또, G 단백질이 관여하고 PKC 기전이 관여함을 알 수 있다(Fig. 4, Fig. 6). 하지만 일반적으로 카탈세포의 반응성에 관여한다고 알려지고 있는 세포 밖과 안 Ca^{2+} 은 미르타자핀의 반응에 관여하지 않았다(Fig. 5).

위장관 운동 조절 관련 세포로는 평활근, 신경세포, 기질세포, 카탈세포 및 최근에 발견된 섬유아세포-유사 세포(fibroblast-like cells) 등 많은 세포들이 매우 복잡한 상호작용을 통해 이루어지며, 현재까지도 모든 기전이 명확히 알려져 있지는 않다[30]. 미르타자핀은 위장관 운동 조절 관련 세포 중 카탈세포에 직접적으로 작용해 위장관 운동성을 조절하는 것으로 생각된다. 카탈세포가 탈분극을 일으킨다는 것은 흥분 자극을 평활근이나 신경세포에 전달한다는 의미이고 이것들의 작용에 의해서 수축이 나타나게 된다고 생각된다. 또한 지금까지 일반적으로 위장관 수축은 평활근의 무스카린성 수용체 활성화와 관계되고 이때 일과성 수용체 전압(Transient receptor

potential; TRP) classical 4 또는 5 번 이온통로가 관여한다고 잘 알려져 왔다[20, 26, 35]. 본 연구의 미르타자핀도 평활근처럼 카탈세포에 있는 TRP classic 4 또는 5 번 이온통로가 관여할 것으로 추측된다. 그외에 미르타자핀이 다양한 이온통로에는 어떤 효과를 보이는지를 확인하고 실제로 미르타자핀이 카탈세포의 기능조절에 관여하는 다른 TRP 이온통로 및 염소 이온통로를 조절하고 있는지를 연구할 예정이다. 미르타자핀에 의한 *in vivo* 실험으로 장 이동능과 위 배출능 등을 측정하여 실제로 마우스에서 위장관 운동성 효능은 어떤지 확인할 예정이다. 또한 항우울제로의 기능에 과민성 장 증후군을 가진 환자에서 장 운동성에 효과를 가지고 있다는 보고가 있는 것처럼 일반적으로 과민성 장 증후군 환자에 항우울제를 많이 사용한다[37]. 이유는 많은 과민성 장 증후군 환자가 우울증이나 불안으로 고통 받기 때문이며, 항우울제는 장 운동성과 내장 과민성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 밝혀졌기 때문이다[37]. 과민성 장 증후군 증상에 대한 항우울제의 유익한 효과는 뇌와 장에서 발견되는 신경 전달 물질에 대한 이러한 약물의 작용으로 생각할 수 있지만 본 연구의 결과를 보면 미르타자핀은 카탈세포에 직접 작용하여 위장관 운동성을 조절해서 복부 불편감을 해소 하는걸 알 수가 있다. 또 미르타자핀에 의한 카탈세포 조절 기전은 G 단백질에 의해서 영향을 받지만, 세포 안밖의 Ca^{2+} 에 의해서 영향을 받지 않았다는 점이 상당히 특이한 반응이라고 생각되고 앞으로 세포안밖 Ca^{2+} 농도 측정 방법을 사용해서 좀더 깊이 있는 연구를 진행할 예정이다. 또한 세포막의 다양한 이온통로가 관여할 것으로 생각되는데 이러한 미르타자핀에 의한 카탈세포 반응에 관여하는 이온통로와 PKC가 연결되어 있을 것으로 생각되고, 또한 다른 이온통로에 의해서 Na^{+} 또는 K^{+} 등이 관여하고 있을 것으로 생각된다. 앞으로 Na^{+} 또는 K^{+} 의 관련성에 대한 심도있는 연구를 진행할 예정이다.

소화기 질환 중 위장관 운동 질환은 가장 빈번하게 발생하는데, 원인이 불확실한 기능성 위장관 질환 환자는 위장관 운동 질환 환자에서 차지하는 비율이 우리나라 포함해 전 세계적으로 40% 이상을 차지하고, 이중 변비가 12.5%로 가장 높게 나타났고 기능성 설사(5.8%)와 기능성 소화불량증(4.9%), 과민성 장증후군(4.7%), 기능성 가스팽창(2.1%) 순으로 나타났다[34]. 기능성 소화관 질환은 병태생리학적 기전이 명확히 밝혀지지 않았기 때문에 원칙적인 치료방법이 확립되지 못하여 대부분 증상에 따른 대증치료에 머물고 있어 삶의 질(Quality of Life) 저하에도 영향을 주는 것으로 나타나고 있으며 수명이 연장되고, 생활 스트레스의 상승, 성인병의 빈도가 증가하면서 여러 가지 약제를 동반 사용하는 경우가 많아, 성인병 자체, 스트레스 또는 약제 부작용으로 인한 소화관 기능성 질환의 발생이 급격히 상승하고 있는 실정이다. 이와 같이 소화기 질환으로 인해 발생하는 의료비용을 고려할 때 소화기 질환의 예방과 진단, 치료에 대한 중요성은 지속적으로 증대된다고

볼 수 있다. 따라서 위장관 운동 관련 치료제의 개발과 연관하여 다양한 물질들에 대한 연구 및 치료 가능성 탐색은 중요한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 성과는 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2017R1A2B 2003764).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Camilleri, M. and Chang, L. 2008. Challenges to the therapeutic pipeline for irritable bowel syndrome: end points and regulatory hurdles. *Gastroenterology* **135**, 1877-1891.
- Choung, R. S., Cremonini, F., Thapa, P., Zinsmeister, A. R. and Talley, N. J. 2008. The effect of short-term, low-dose tricyclic and tetracyclic antidepressant treatment on satiation, postnutrient load gastrointestinal symptoms and gastric emptying: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Neurogastroenterol. Motil.* **20**, 220-227.
- de Boer, T. H., Nefkens, F., Van Helvoirt, A. and Van Delft, A. M. 1996. Differences in modulation of noradrenergic and serotonergic transmission by the alpha-2 adrenoceptor antagonists, mirtazapine, mianserin and idazoxan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 852-860.
- Demiryilmaz, I., Uzkeser, H., Cetin, N., Hacimuftuoglu, A., Bakan, E. and Altuner, D. 2013. Effect of mirtazapine on gastric oxidative stress and DNA injury created with methotrexate in rats. *Asian J. Chem.* **25**, 2047.
- El-Tanbouly, D. M., Wadie, W. and Sayed, R. H. 2017. Modulation of TGF- β /Smad and ERK signaling pathways mediates the anti-fibrotic effect of mirtazapine in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **329**, 224-230.
- Epperson, A., Hatton, W. J., Callaghan, B., Doherty, P., Walker, R. L., Sanders, K. M., Ward, S. M. and Horowitz, B. 2000. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C529-C539.
- Fawcett, J. and Barkin, R. L. 1998. Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. *J. Affect. Disord.* **51**, 267-285.
- Ford, A. C., Talley, N. J., Schoenfeld, P. S., Quigley, E. M. and Moayyedi, P. 2009. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* **58**, 367-378.
- Gooden, J. Y. and Takahashi, P. Y. 2013. Mirtazapine treatment of diabetic gastroparesis as a novel method to reduce tube-feed residual: a case report. *J. Med. Case Rep.* **7**, 38.
- Grover, M., Farrugia, G., Lurken, M. S., Bernard, C. E., Faussone-Pellegrini, M. S., Smyrk, T. C. and NIDDK Gastro-paresis Clinical Research Consortium. 2011. Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis. *Gastroenterology* **140**, 1575-1585.
- Halpert, A., Dalton, C. B., Diamant, N. E., Toner, B. B., Hu, Y., Morris, C. B., Bangdiwala, S. I., Whitehead, W. E. and Drossman, D. A. 2005. Clinical response to tricyclic antidepressants in functional bowel disorders is not related to dosage. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 664-671.
- Hanani, M., Farrugia, G. and Komuro, T. 2005. Intercellular coupling of interstitial cells of Cajal in the digestive tract. *Int. Rev. Cytol.* **242**, 249-282.
- Hirst, G. D. S., Garcia-Londoño, A. P. and Edwards, F. R. 2006. Propagation of slow waves in the Guinea-pig gastric antrum. *J. Physiol.* **571**, 165-177.
- Huizinga, J. D., Chang, G., Diamant, N. E. and El-Sharkawy, T. Y. 1984. Electrophysiological basis of excitation of canine colonic circular muscle by cholinergic agents and substance P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**, 692-699.
- Huizinga, J. D. and Faussone-Pellegrini, M. S. 2005. About the presence of interstitial cells of Cajal outside the musculature of the gastrointestinal tract. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 468-473.
- Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M. and Malysz, H. B. 1995. The W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* **373**, 347-349.
- Inoue, R. and Chen, S. 1993. Physiology of muscarinic receptor-operated nonselective cation channels in guinea-pig ileal smooth muscle. *EXS.* **66**, 261-268.
- Jung, H. Y., Lee, S. I., Kim, D. H. and Choi, E. J. 2004. A case of restless leg syndrome induced by mirtazapine in a patient with major depressive disorder. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **15**, 488-491.
- Kim, B. J., Lim, H. H., Yang, D. K., Jun, J. Y., Chang, I. Y., Park, C. S., So, I., Stanfield, P. R. and Kim, K. W. 2005. Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaker activity. *Gastroenterology* **129**, 1504-1517.
- Kim, B. J., So, I. and Kim, K. W. 2006. The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J. Smooth Muscle Res.* **42**, 1-7.
- Kim, S. W., Shin, I. S., Kim, J. M., Kang, H. C., Mun, J. U., Yang, S. J. and Yoon, J. S. 2006. Mirtazapine for severe gastroparesis unresponsive to conventional prokinetic treatment. *Psychosomatics* **47**, 440-442.
- Koh, S. D., Sanders, K. M. and Ward, S. M. 1998. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J. Physiol.* **513**, 203-213.
- Koh, S. D., Ward, S. M., Ordög, T., Sanders, K. M. and Horowitz, B. 2003. Conductances responsible for slow wave generation and propagation in interstitial cells of Cajal. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 579-582.

24. Lang, R. J., Tonta, M. A., Zoltkowski, B. Z., Meeker, W. F., Wendt, I. and Parkinson, H. C. 2006. Pyeloureteric peristalsis: Role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers. *J. Physiol.* **576**, 695-705.
25. Lee, H. T., Hennig, G. W., Park, K. J., Bayguinov, P. O., Ward, S. M., Sanders, K. M. and Smith, T. K. 2009. Heterogeneities in ICC Ca²⁺ activity within canine large intestine. *Gastroenterology* **136**, 2226-2236.
26. Lee, K. P., Jun, J. Y., Chang, I. Y., Suh, S. H., So, I. and Kim, K. W. 2005. TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Mol. Cells* **20**, 435-441.
27. Liu, H. N., Ohya, S., Nishizawa, Y., Sawamura, K., Iino, S., Syed, M. M., Goto, K., Imaizumi, Y. and Nakayama, S. 2011. Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT₃ receptors. *PLoS One* **6**, e24928.
28. Ogata, R., Inoue, Y., Nakano, H., Ito, Y. and Kitamura, K. 1996. Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 351-359.
29. O'Grady, G., Wang, T. H. H., Du, P., Angeli, T., Lammers, W. J. and Cheng, L. K. 2014. Recent progress in gastric arrhythmia: Pathophysiology, clinical significance and future horizons. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 854-862.
30. Sanders, K. M., Koh, S. D., Ro, S. and Ward, S. M. 2012. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 633-645.
31. Sener, M. T., Sener, E., Tok, A., Polat, B., Cinar, I., Polat, H., Akcay, F. and Suleyman, H. 2012. Biochemical and histologic study of lethal cisplatin nephrotoxicity prevention by mirtazapine. *Pharmacol. Rep.* **64**, 594-602.
32. Shahi, P. K., Choi, S., Zuo, D. C., Yeum, C. H., Yoon, P. J., Lee, J., Kim, Y. D., Park, C. G., Kim, M. Y., Shin, H. R., Oh, H. J. and Jun, J. Y. 2011. 5-hydroxytryptamine generates tonic inward currents on pacemaker activity of interstitial cells of cajal from mouse small intestine. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.* **15**, 129-135.
33. Shuman, M., Chukwu, A., Veldhuizen, N. V. and Miller, S. A. 2019. Relationship between mirtazapine dose and incidence of adrenergic side effects: An exploratory analysis. *Ment. Health Clin.* **9**, 41-47.
34. Sperber, A. D., Bangdiwala, S. I., Drossman, D. A., Ghoshal, U. C., Simren, M., Tack, J., Whitehead, W. E., Dumitrascu, D. L., Fang, X., Fukudo, S., Kellow, J., Okeke, E., Quigley, E. M. M., Schmulson, M., Whorwell, P., Archampong, T., Adibi, P., Andresen, V., Benninga, M. A., Bonaz, B., Bor, S., Fernandez, L. B., Choi, S. C., Corazzari, E. S., Francisconi, C., Hani, A., Lazebnik, L., Lee, Y. Y., Mulak, A., Rahman, M. M., Santos, J., Setshedi, M., Syam, A. F., Vanner, S., Wong, R. K., Lopez-Colombo, A., Costa, V., Dickman, R., Kanazawa, M., Keshтели, A. H., Khatun, R., Maleki, I., Poitras, P., Pratap, N., Stefanyuk, O., Thomson, S., Zeevenhooven, J. and Palsson, O. S. 2021. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of Rome foundation global study. *Gastroenterology* **160**, 99-114.
35. Sung, T. S., Jeon, J. P., Kim, B. J., Hong, C., Kim, S. Y., Kim, J., Jeon, J. H., Kim, H. J., Suh, C. K., Kim, S. J. and So, I. 2011. Molecular determinants of PKA-dependent inhibition of TRPC5 channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C823-C832.
36. Tan, E., Smith, C. H. and Goldman, R. D. 2013. Antidepressants for functional gastrointestinal disorders in children. *Can. Fam. Physician.* **59**, 263-264.
37. Thomas, S. G. 2000. Irritable bowel syndrome and mirtazapine. *Am. J. Psychiatry* **157**, 1341-1342.
38. Timmer, C. J., Sitsen, J. M. and Delbressine, L. P. 2000. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.* **38**, 461-474.
39. Yin, J., Wang, W., Winston, J. H., Zhang, R. and Chen, J. D. 2010. Ameliorating effects of mirtazapine on visceral hypersensitivity in rats with neonatal colon sensitivity. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**, 1022-1028.
40. Yin, J., Song, J., Lei, Y., Xu, X. and Chen, J. D. Z. 2014. Prokinetic effects of mirtazapine on gastrointestinal transit. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G796-G801.
41. Zhu, M. H., Kim, T. W., Ro, S., Yan, W., Ward, S. M., Koh, S. D. and Sanders, K. M. 2009. A Ca²⁺-activated Cl-conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J. Physiol.* **587**, 4905-4918.

초록 : 생쥐 소장 카할세포의 pacemaker potential에서 미르타자핀 효능에 관한 연구

김병주*

(부산대학교 한의학전문대학원)

카할세포는 위장관 근육의 pacemaker 세포이다. 이번 연구는 생쥐 소장에서 얻은 카할세포를 배양하여 노르아드레날린성 및 세로토닌성 항우울제인 미르타자핀의 효과를 조사했다. 전기생리학적인 방법을 이용하여 카할세포의 pacemaker potential의 변화를 측정하였다. 미르타자핀은 농도 의존적 방식으로 카할세포 탈분극을 일으켰다. Y25130 (5-HT₃ 수용체 길항제), RS39604 (5-HT₄ 수용체 길항제) 또는 SB269970 (5-HT₇ 수용체 길항제)은 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극에 영향을 미치지 않았다. 또한, 무스카린성 M₂ 수용체 길항제인 메톡 트라민은 미르타자핀에 의한 카할세포의 탈분극에 영향을 미치지 않은 반면, 무스카린성 M₃ 수용체 길항제인 4-DAMP는 카할세포의 탈분극을 억제하였다. GDP-β-S를 피펫을 통해 카할세포내로 넣었을 때, 미르타자핀에 카할세포 탈분극이 억제되었다. 외부에 칼슘이 없는 용액 또는 소포체의 Ca²⁺-ATPase 억제제인 thapsigargin이 있는 경우 미르타자핀에 의한 카할세포 탈분극이 나타났다. 또한, protein kinase C (PKC) 억제제인 칼포스틴 C 또는 chelerythrine은 미르타자핀에 의한 탈분극을 억제했습니다. 이러한 결과는 미르타자핀이 카할세포에서 G 단백질 및 PKC 경로에 의한 무스카린성 M₃ 수용체 활성화를 통해 탈분극을 조절 함을 알 수 있다. 따라서 미르타자핀이 카할세포를 통해 위장관 운동성을 조절할 수 있음을 시사한다.