

Substance P 에 의한 가토 회장평활근의 수축기전에 대한 연구

부산대학교 의과대학 생리학교실

조 세 현 · 정 진 섭 · 이 상 호

=Abstract=

Studies on the Mechanism of Contraction by Substance P in Rabbit Ileum

Se-Hun Jo, Jin Sup Jung and Sang Ho Lee

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University

The mechanism of the contractile response of longitudinal muscle of rabbit ileum to substance P (SP) has been investigated. The contractions in rabbit ileum under various conditions were recorded isometrically.

The following results were obtained.

1) The contractions by SP increased according to concentrations. SP-induced contraction was not sustained but faded rapidly at 10^{-7} M. The response to the cumulative addition of SP was decreased in comparison to the response to separate administration of each concentration.

2) The response to 10^{-8} M SP after 5 min application of 10^{-7} M SP was increased with increasing the time interval between the administration of 10^{-7} and 10^{-8} M SP.

3) The treatment of rabbit ileum by 10^{-7} M SP for 5 min didn't decrease the response to 10^{-6} M acetylcholine.

4) 10^{-6} M atropine had no effect of the contractile response to 10^{-7} M SP. The response to 10^{-7} M SP was normal or subnormal in the presence of 3 mM tetraethylammonium (TEA).

5) 100K solution, 10^{-4} M ouabain, and Na-free solution inhibited the response to 10^{-8} M SP and 3 mM TEA completely, and to 10^{-7} M SP incompletely. 3 mM TEA induced a considerable contraction in K-free solution, but 10^{-8} M SP didn't induce the contraction. 10^{-6} M norepinephrine decreased the contractile responses to SP and TEA.

6) The contractile response to 10^{-7} M SP was dependent on the extracellular Ca^{2+} concentrations to 1.8 mM.

7) The contractile response to 10^{-7} M SP remained 15% of the maximal response after bathing the ileum in a Ca-free solution for 2.5 min.

8) The responsiveness to SP was completely lost within 10 min of bathing in Ca-free solution, but was restored by the exposure to Ca^{2+} . The restorative effect of Ca^{2+} depended on the concentration of Ca^{2+} , and on time for which the tissue exposed to this Ca^{2+} concentration.

These results suggest that there are two mechanisms of the action by which the low concentrations of substance P causes the contraction of intestinal smooth muscle: the reduction

of K conductance and a mechanism dependent on the extracellular Ca^{2+} , and that high concentration of SP may elicit a contraction by releasing Ca^{2+} from an intracellular store, which is not as sensitive to removal of extracellular Ca^{2+} or as easily accessible to EGTA as the extracellular space of the muscle. The location of this store is not known; it may be associated with the internal side of the cell membrane.

서 론

1931년 von Euler 와 Gaddum³¹⁾이 말의 뇌조직 추출물에 장관을 수축시키는 물질이 존재한다고 하여 처음 존재가 시사된 substance P(SP)는 포유류 장관의 신경세포와 내분비세포에 존재하는 것으로 알려져 있고^{7,26,28)} 신경말단에서 유리되어 신경세포^{22,24)}와 장관 평활근^{9,16)}을 흥분시킴으로써 신경세포와 신경세포, 그리고 신경세포와 평활근사이의 교통에 관여하는 것으로 알려져 있다.

von Euler 와 Gaddum³¹⁾이 SP 가 장관의 수축을 일으키는 것을 보고한 이래 guinea pig ileum 을 이용하여 많은 연구가 이루어져 SP 에 의한 수축작용은 장관 평활근에 대한 직접 작용인 것으로 밝혀졌으나^{4,29)} SP 의 근수축에 관여하는 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.

Fujisawa 와 Ito¹⁰⁾는 SP 가 K의 conductance 를 감소시켜 막전위의 탈분극을 일으키고 자발적인 spike potential 을 증가시켜 근육의 수축을 일으킨다고 하였고, Holzer 와 Petsche¹⁷⁾는 K conductance 의 감소가 SP 에 의한 수축에 일부 관여하나 이것만으로는 SP 에 의한 수축을 전부 설명할 수 없다고 하였다. 또한 SP 에 의한 수축은 급격히 최고 수축에 도달했다가 그 수축이 서서히 감소하는 것으로 알려져 있고(desensitization)^{17,19)} 이러한 수축력의 감소는 SP 에 의한 수축시 세포내부의 Ca^{2+} 이 동원되고 이 세포내부의 Ca^{2+} 저장고의 고갈에 의해 일어난다고 주장되어 SP 에 의한 수축에 일부 세포내부의 Ca^{2+} 도 이용된다는 것이 시사되었다¹⁷⁾. 또한 Kamikawa 와 Shimo²¹⁾는 guinea pig 식도의 muscularis mucosae 에서 SP 에 의한 수축이 verapamil 에 의해 억제되지 않는다고 함으로써 막전위와 무관한 Ca^{2+} channel 을 통한 Ca^{2+} 의 유입이 수축에 관여한다고 하였다.

따라서 저자는 SP 에 대해 민감한 장기로 알려진 토끼의 회장을 이용하여 SP 에 의한 수축에 관여하는 Ca의 동원 기전을 밝히고 SP 수축의 desensitization 에 Ca^{2+} 이 어떤 영향을 미치는지를 보고자 본 실험을 시행하였다.

실 험 방 법

1) 실험재료

체중 2.0~2.5 kg 되는 성숙한 가토를 자웅 구별없이 사용하였다. 가토의 두부를 타격하여 희생시킨 후 회장말단부를 절제한 후 Tyrode 용액에 담그고 너비 2 mm, 길이 1 cm 의 중주근 절편을 만들어 사용하였다.

2) 수축력 측정

Tyrode 용액의 조성은 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, 5.5 mM glucose, 24 mM Tris 이었고, 37°C 에서 pH 7.4 로 맞추었다. Ca^{2+} 없는 용액은 Ca^{2+} 을 빼고 1 mM EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid)를 첨가하여 만들었다.

중주근 절편을 실험용기(20 ml)에 옮겨 한 끝은 실험용기내의 저부에 고정시키고 다른 끝은 근육수축 변환기(Narco, F-60)에 연결하여 기록기(Narco, MK-IV)로 등장성수축(isometric contraction)을 기록할 수 있도록 한 다음, 37°C 에서 100% O_2 를 공급하면서 1 시간 평형시킨 후 초기장력을 0.2 g 부하시켜 1시간 평형시킨 후 실험을 행하였다.

SP 는 변성을 막기 위하여 0.01 N HCl 에 녹여 사용하였고 수축의 크기는 10^{-6} M acetylcholine(Ach)에 의한 수축에 대한 %로 나타내었다.

실 험 성 적

1) 고양이 회장 평활근의 수축력에 미치는 Substance P 의 효과

Fig. 1 A 는 SP 농도변동에 따른 회장 평활근의 수축양상을 나타낸 것이다. 10^{-9} M 의 SP 에서는 긴장성 수축없이 위상성수축만 증가하였고 긴장성수축은 5×10^{-8} M 부터 농도에 따라 증가하였으며 10^{-7} M 에서 최대수축에 도달하였고 더 이상 증가하지 않았다. 그리고 위상성수축의 빈도는 어느 농도에서도 증가되지 않았고 SP 농도가 증가함에 따라 위상성수축의 크기는

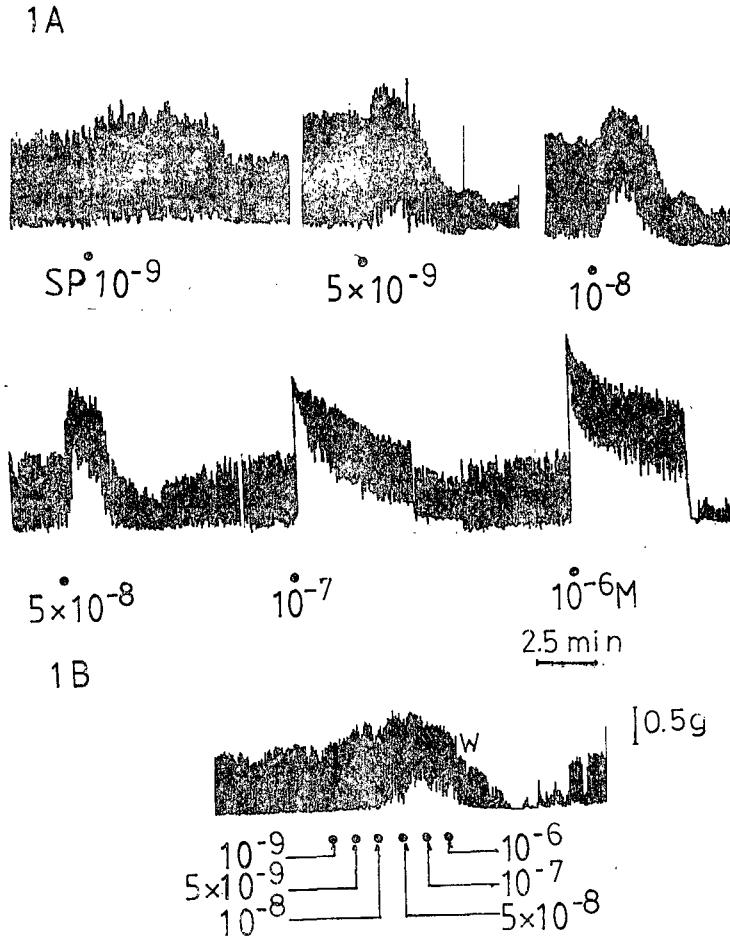


Fig. 1 A. The tracings of the response of longitudinal smooth muscle of rabbit ileum to increasing doses of substance P (SP).

1 B. The contractile response of rabbit ileum to cumulative addition of substance P.

오히려 감소하는 현상을 나타내었다. 낮은 농도의 SP에 의한 수축은 유지되었으나 $10^{-7}M$ SP에 의한 수축은 5초 이내에 급격히 최고에 달한 후 빠른 속도로 감소하였다. SP를 농도별로 1분 간격으로 부가적으로 가할 때 회장 평활근의 SP에 의한 수축은 Fig. 1 A에서 관찰된 것보다 크게 감소하였다(Fig. 1 B). 이와 같은 결과는 SP가 자신의 수축을 감소시키는 효과가 있음을 시사한다.

Fig. 2는 SP에 의한 긴장성수축의 크기를 acetylcholine $10^{-6}M$ 에 의한 수축의 %로 나타낸 것이다. $10^{-7}M$ 의 SP는 $10^{-6}M$ acetylcholine 수축의 거의 90%에 달하는 수축을 유발하였다.

2) SP의 autodesensitization의 회복시간

Fig. 3은 이러한 SP에 의한 수축력의 자가억제작용

에서 회복되는 시간을 알기 위하여 $10^{-7}M$ SP에 5분간 노출시키고 세척후 2, 5, 10, 15 및 20분 후 다시 $10^{-8}M$ SP를 주어 대조군과 수축의 크기를 비교한 것이다.

$10^{-7}M$ SP에 노출시킨 조직은 상당기간동안 SP에 대한 반응이 감소하였고 SP를 투여하는 시간 간격이 길수록 회복의 정도는 증가하여 20분후 완전히 정상으로 회복되었다. 따라서 이후 실험에서 SP는 적어도 25분 이상의 간격으로 투여하였다.

3) Substance P와 Acetylcholine의 상호작용

Fig. 4는 SP에 의한 수축력 억제효과가 SP에 대해서만 특이적으로 작용하는지를 알기 위해 SP와 Ach에 의한 수축의 상호작용을 본 것이다. $10^{-6}M$ Ach 투여후 5분뒤 SP를 주면 그 수축이 상당히 감소하였고

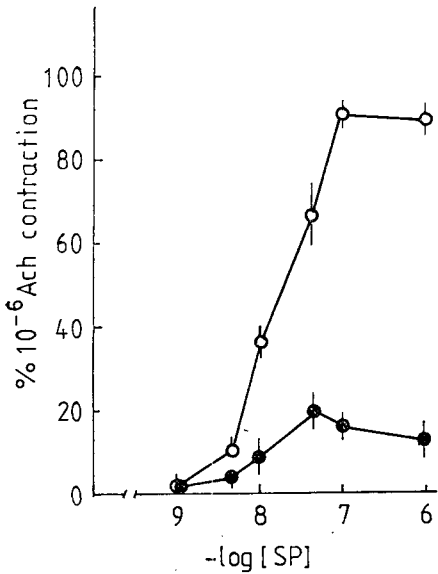


Fig. 2. Concentration-response curves for the contractile effect of substance P on the longitudinal muscle of rabbit ileum.
 ○. Contractile responses to separate administrations of each concentration of SP at 25 min interval.
 ●. Contractile responses to cumulative addition of SP at 1 min interval.
 Contractions are expressed as a percentage of the response to 10⁻⁶M acetylcholine. (Mean ± S.E.M, n=5).

SP 10⁻⁷M 을 투여한 후 5분뒤 Ach 10⁻⁶M 을 주면 거의 영향을 받지 않았다.

이는 SP 에 의한 회장평활근의 수축력 감소가 SP 에 대해 비교적 특이적으로 작용함을 시사한다.

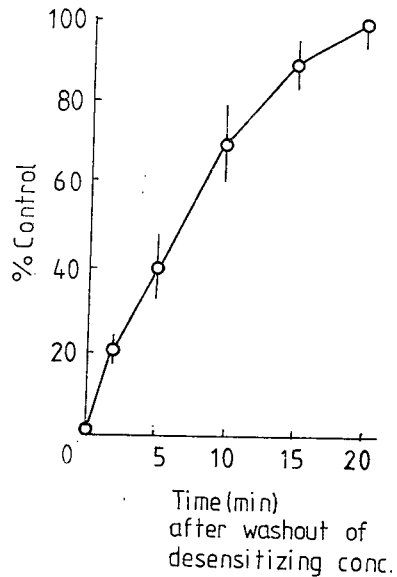


Fig. 3. Recovery time from desensitization. Tissues were exposed to the 10⁻⁷M SP for 5 min and tested for sensitivity to 10⁻⁸M SP at the times indicated. Contractions are expressed as a percentage of the initial response to 10⁻⁸M SP (Mean ± S.E.M, n=4).

4) Atropine 과 tetraethylammonium(TEA)의 효과

Fig. 5는 10⁻⁷M SP 의 수축에 대한 atropine 및 TEA 의 효과를 본 것이다. 10⁻⁶M atropine 전처치에 의해 10⁻⁷M SP 에 의한 수축은 영향을 받지 않았다. K conductance 를 감소시키는 것으로 알려진^{1,20)} 3 mM TEA 는 10⁻⁶M SP 와 유사한 정도의 수축을 일

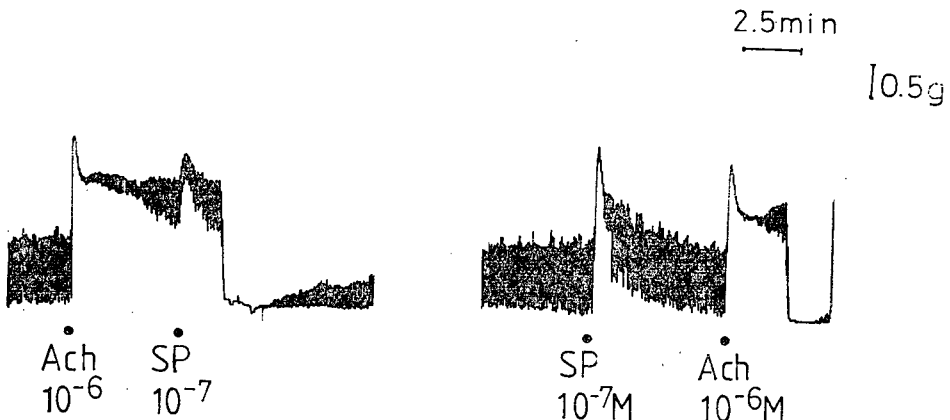


Fig. 4. Interrelationship between 10⁻⁷M SP and 10⁻⁶M Acetylcholine.

—조세현 외 2인 : Substance P에 의한 가토 회장평활근의 수축기전에 대한 연구—

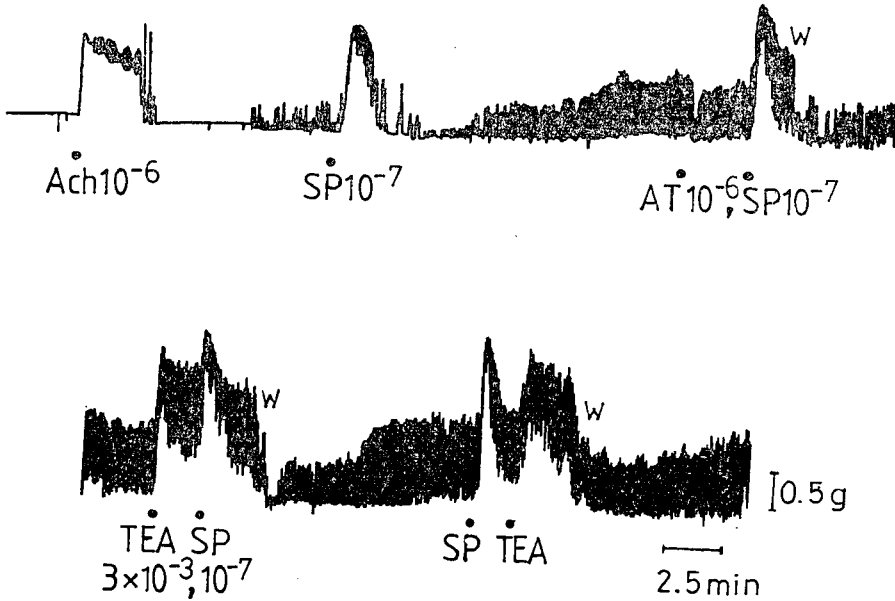


Fig. 5. Effects of 10^{-6} M atropine and 3 mM TEA on the contractile response to 10^{-7} M SP.

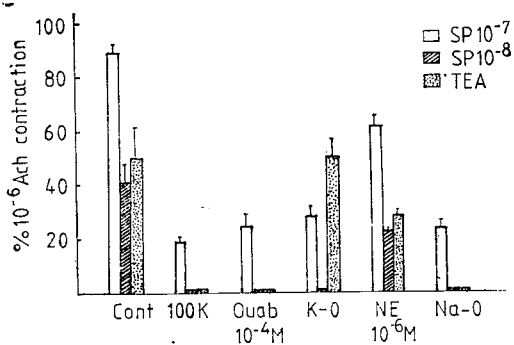


Fig. 6. Graph showing the contractile response to 10^{-8} and 10^{-7} M SP and 3 mM TEA under various conditions. The results are expressed as a percentage of the response to 10^{-6} M acetylcholine (Mean \pm S.E.M., n=4).

으였고 TEA 전처치에 의해서는 10^{-7} M SP 수축은 영향을 받지 않거나 오히려 감소하였다. 또한 SP 전처치 시 TEA의 수축은 약간 감소하였다.

5) Substance P와 TEA 수축에 미치는 여러가지 약물 및 용액조성의 변화의 효과

Fig. 6 및 7은 10^{-8} M과 10^{-7} M SP 및 3 mM TEA에 의한 수축에 대한 여러가지 약물 및 용액조성의 변화 효과를 본 것이다.

10^{-8} M SP에 의한 수축은 Na^+ 없는 용액, 10^{-4} M ouabain, K^+ 없는 용액 및 100K 용액에서 완전히 억제

되었고 10^{-7} M SP는 각 조건에서 현저한 수축을 유발하였다. K의 conductance를 감소시키는 것으로 알려진 TEA에 의한 수축은 다른 조건하에서는 10^{-8} M SP와 거의 유사한 양상을 나타내었으나 K없는 용액에서는 10^{-8} M SP와 달리 억제되지 않았고 장관평활근에서 K conductance를 증가시켜 과분극을 일으키는 것으로 알려진^{5,27)} 10^{-6} M norepinephrine에 의해 SP와 TEA에 의한 수축은 40%정도 억제되었다.

6) 외부 Ca²⁺의 영향

Fig. 8 및 9는 SP의 수축에 미치는 외부 Ca²⁺의 효과를 본 것이다. Ca²⁺없는 용액에서의 수축은 Ca²⁺없는 용액에서의 처리 시간에 따라 현저히 감소하므로 이 그림에는 나타내지 않았다. 0.1 mM의 Ca²⁺ 존재하에서는 SP에 의한 수축은 상당히 감소하였고 0.5 mM의 Ca²⁺에서는 초기수축은 급격히 증가하여 최대수축의 80%에 도달했으나 이후 수축의 감소 속도는 1.8 mM의 Ca²⁺에서 보다 더 빨랐다. 1.8 mM의 Ca²⁺에서 최대수축을 나타냈고 5.4 mM의 Ca²⁺에서는 그 수축의 크기가 오히려 감소하였다. SP에 의해 최대수축에 도달한 후 수축력이 다시 감소되는 속도는 Ca²⁺농도를 1.8 mM 이상으로 증가시켜도 영향을 받지 않았다.

Fig. 10은 Ca²⁺없는 용액에서 SP의 수축을 본 것이다. Ca²⁺없는 용액으로 바꾸었을 때 장관평활근의 자발적 수축은 감소하였고 2분후 완전히 사라졌다. 2.5

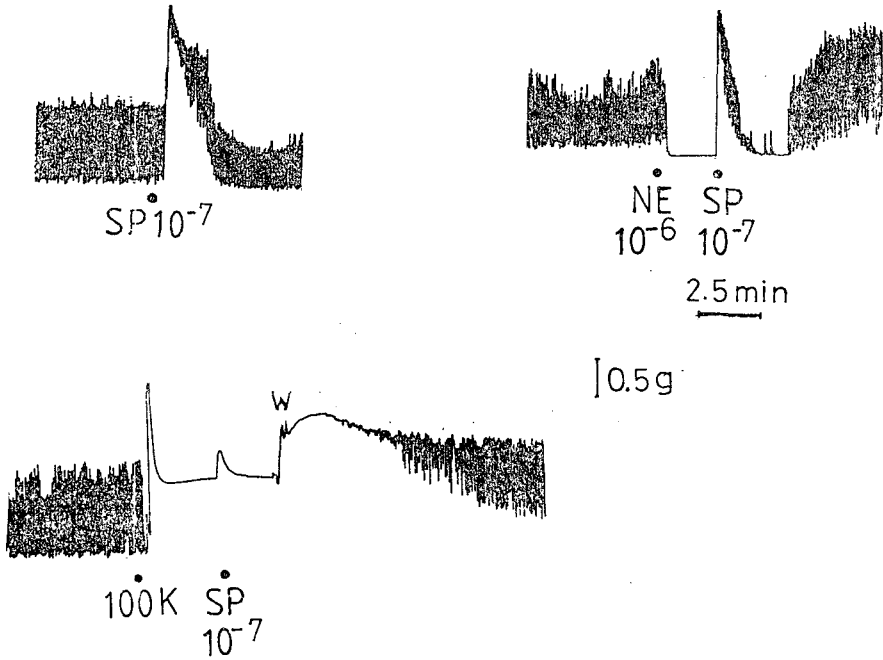


Fig. 7. Effects of 10^{-6} M norepinephrine and 100K solution on the contractile response to 10^{-7} M SP.

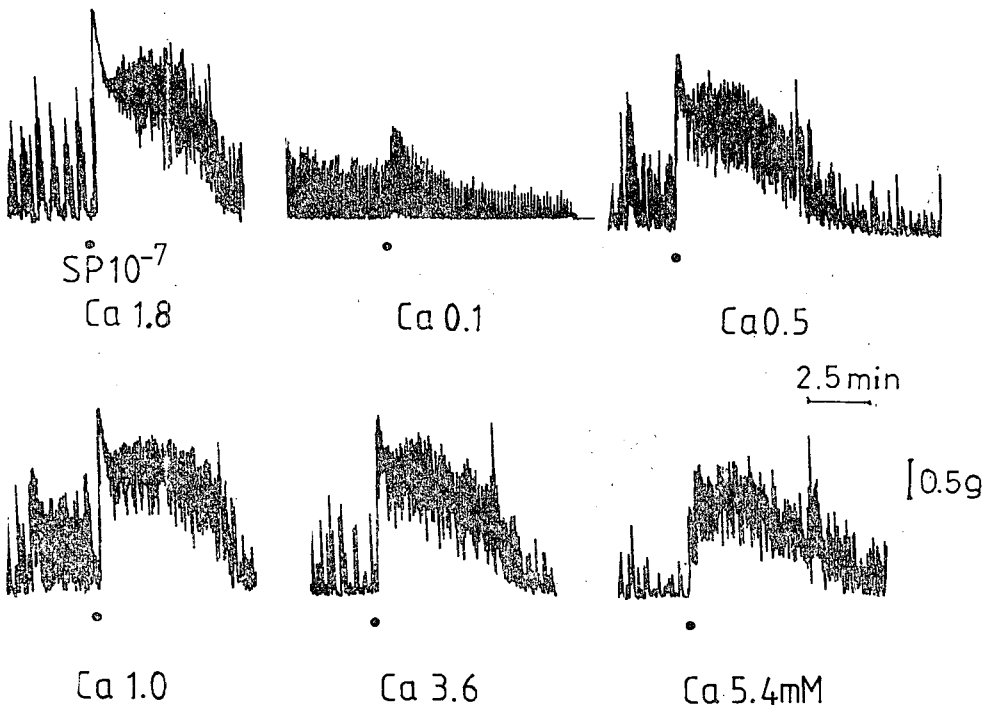


Fig. 8. Tracings of the response to 10^{-7} M SP under various Ca^{2+} concentrations.

분후 10^{-7} M의 SP를 주면 일시적인 수축이 나타났고 그 크기는 정상용액에 비하여 크게 감소하였다.

Tyrod 용액에서 SP는 매우 빠르게 수축을 일으켜 5초이내에 최고에 도달하는데 비하여 Ca^{2+} 없는 용액에

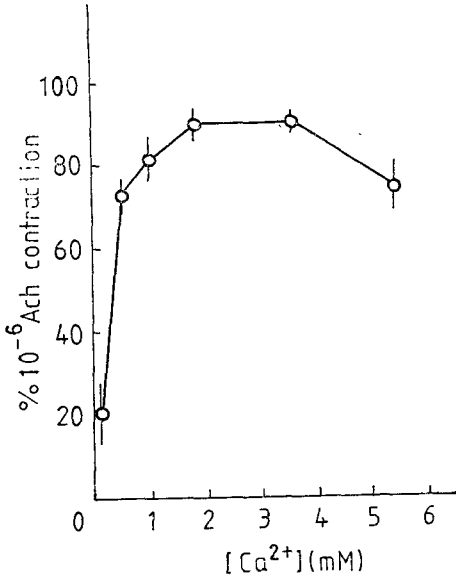


Fig. 9. Effect of external Ca²⁺ on the contractile response to 10⁻⁷M SP.

The results are expressed as a percentage of the response to 10⁻⁶M acetylcholine (Mean ± S.E.M., n=4).

서의 수축이 최고에 도달하는 속도가 대조군에 비해 느렸다. Ca²⁺없는 용액에 노출후 정상용액으로 바꾸면 현저한 수축이 나타났고 이 수축은 대략 1분후 사라졌다.

Fig. 11은 Ca²⁺없는 용액에서의 처리시간에 따른 SP 수축의 크기를 나타낸 것이다. Ca²⁺없는 용액으로 처리하는 시간이 증가함에 따라 그 수축력은 점차 감소하였고 10분내에 완전히 사라졌다.

7) 내부 Ca²⁺의 영향

외부에 Ca²⁺이 없을 때도 SP에 의한 수축이 일어나

므로 SP가 내부 Ca²⁺을 이용할 가능성이 있다. 이 가능성을 확인하기 위하여 다음 실험을 하였다.

Fig. 12는 Ca²⁺이 없고 1mM의 EGTA를 포함한 용액으로 2, 5 및 10분간 처리한 후 Ca²⁺과 SP를 동시에 가하여 대조군과의 수축의 크기를 비교한 것이다. 그런데 가토 회장평활근은 Ca²⁺없는 용액으로 10분 처리후 정상용액으로 바꾸면 부가된 1.8mM Ca²⁺에 의해 강력한 수축이 일어나므로(Fig. 10) 이 상태에서는 SP에 의한 수축의 크기를 비교하기가 어렵다. 따라서 SP에 의한 수축의 크기만을 비교하기 위해서는 Ca²⁺없는 용액에서 10분간 처리후에도 수축을 일으키지 않는 Ca²⁺농도를 사용해야 하고 0.5mM Ca²⁺이 이에 해당되었다. 또한 Fig. 9에서 볼 수 있는 것처럼 0.5mM Ca²⁺하에서 10⁻⁷M SP에 의한 수축력이 대조군보다 약간 적으나 큰 차이가 없기 때문에 0.5mM Ca²⁺을 사용하였다. Ca²⁺없는 용액으로 처리시간이 증가함에 따라 수축력이 감소하였고 10분후에는 정상 수축의 30%까지 감소하였다.

Fig. 13은 회장평활근을 Ca²⁺없는 용액에서 10분간 처리한 후 0.5, 1.0 및 1.8mM의 Ca²⁺을 가하고 일정 시간이 지난후 10⁻⁷M SP를 주어 수축 반응을 본 것이다. 10분간 Ca²⁺없는 용액으로 처리한 후 Ca²⁺을 0.5, 1.0 그리고 1.8mM을 가하면서 동시에 10⁻⁷M의 SP를 가하면 각각 대조군의 40%, 65%, 90%의 수축을 일으켰고 Ca²⁺을 준 후 SP를 주는 시간의 간격이 길 수록 수축의 크기가 증가하여 0.5mM의 Ca²⁺을 가한 경우 5분, 1mM의 Ca²⁺일 경우는 2분, 1.8mM의 Ca²⁺일 경우는 1분에 정상 수축으로 회복되었다.

고 찰

본 실험에서 10⁻⁷M의 SP는 가토 회장평활근에서 10⁻⁶M acetylcholine과 유사한 크기의 강력한 수축을

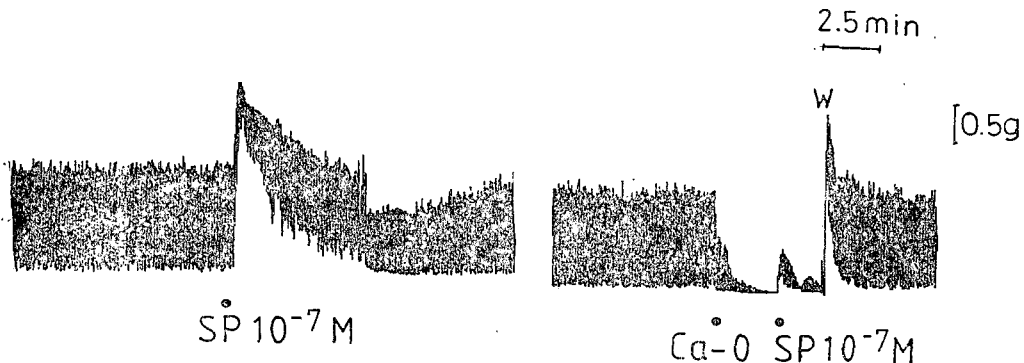


Fig. 10. The contractile response to 10⁻⁷M SP in Ca-free physiological salt solution(PSS).

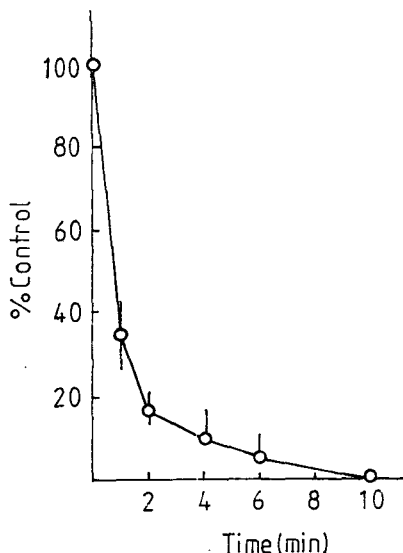


Fig. 11. Effect of removal of extracellular Ca^{2+} on the responsiveness to 10^{-7}M SP. The results are expressed as a percentage of the initial response to 10^{-7}M SP (Mean \pm S.E.M., $n=3$).

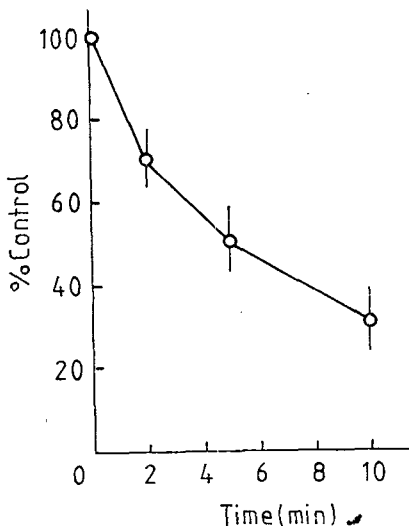


Fig. 12. The contractile response to the simultaneous addition of 10^{-7}M SP and 0.5mM Ca^{2+} after the treatment of longitudinal muscle of rabbit ileum in Ca-free PSS during variable time (Mean \pm S.E.M., $n=5$).

유발하였다(Fig. 1; 2). SP는 신경말단에서 유리되어 신경세포와 신경세포^{22, 24)}사이 뿐 아니라 신경세포와

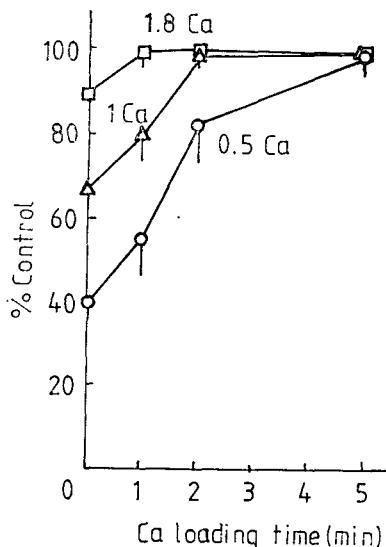


Fig. 13. The effect of the time interval between washout of CaCl_2 and applications of SP on the contractile response to 10^{-7}M SP after the treatment of the longitudinal muscle of rabbit ileum with Ca-free PSS for 10 min. Contractions are expressed as a percentage of the initial response of 10^{-7}M SP at each Ca^{2+} concentration (Mean \pm S.E.M., $n=6$).

평활근세포^{9, 16)} 사이의 교통에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 일부 학자들^{12, 15)}의 주장처럼 SP가 신경말단에서 acetylcholine을 유리시켜 수축을 일으킬 수 있으나 본 실험에서 10^{-6}M atropine 전처치에 의해 SP에 의한 수축이 영향을 받지 않으므로써(Fig. 5) SP에 의한 수축은 평활근에 대한 직접 작용임을 알 수 있고, 이는 von Euler와 Gaddum³¹⁾, Holzer¹⁴⁾ 그리고 Bury와 Mashford⁴⁾의 결과와 일치하였다. 트끼의 회장평활근에서 위상성수축의 빈도는 서파의 수에 거의 일치하는 것으로 알려져 있고²⁵⁾ 수축의 크기는 서파의 탈분극기에 생기는 spike potential의 수와 크기에 비례하는 것으로 알려져 있기 때문에²⁾ SP가 위상성수축의 빈도를 증가시키지 못하는 것은 SP가 장관의 근육 자체내에서 조절되는 spike potential에만 작용하기 때문으로 생각된다. 10^{-7}M 의 SP에 의한 수축은 최고에 도달한 후 급격히 감소하는 양상을 나타내었고 이 현상은 일차적으로 투여한 SP가 파괴되거나 실험용기에 들어붙음으로써 SP의 농도가 감소함으로써 나타나는 것으로 생각할 수 있다. 그러나

이 가능성은 Fig. 1B에 볼 수 있는 것처럼 SP를 부가적으로 가할 때 SP의 수축이 개별적으로 가할 때보다 현저히 감소되므로 배제될 수 있다. 따라서 수축의 감소현상은 SP에 장시간 노출시 회장평활근의 SP에 대한 반응도가 감소함을 의미하며 SP로 5분 처리후에도 Ach에 대한 반응은 거의 정상으로 유지되므로 (Fig. 3) 비교적 SP에 대해 특이적으로 작용하는 것으로 생각된다. SP가 평활근의 수축을 일으키는 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 일반적으로 평활근내 세포막에 있는 수용체에 SP가 결합함으로써¹¹⁾ 막전위의 탈분극을 일으키고 Ca²⁺이 유입됨으로써 일어나는 것으로 생각되고 있고 SP에 의한 탈분극은 K conductance 감소에 의해 일어나는 것으로 생각되고 있다.^{4,10,18)} 본 실험에서 장관 평활근에서 K conductance를 증가시키는 것으로 알려진^{5,27)} norepinephrine에 의해 SP의 수축이 감소하고 10⁻⁸M의 SP에 의한 수축에 미치는 Na-O, ouabain, K-O의 영향이 K conductance를 감소시켜 수축을 일으키는 것으로 알려진 TEA에 의한 수축에 미치는 영향과 유사하여 (Fig. 6, 7) 위 가설과 일치하는 것으로 볼 수 있으나 TEA 전처치시 SP의 수축은 수축력이 정상이거나 감소함으로써 (Fig. 5) Holzer¹⁴⁾ 및 Holzer와 Petsche가¹⁷⁾ TEA 전처치에 의해 SP 수축의 증가현상을 관찰한 결과와는 일치되지 않았다. 이는 TEA와 SP 사이에 cross desensitization 효과가 있는 것으로 알려져 있으므로¹⁷⁾ 단순히 K conductance 감소로만 SP와 TEA의 상호작용을 해석할 수 없는 어려운 문제가 있기 때문으로 생각할 수 있으나 SP와 TEA가 같은 기전으로 작용하여 효과를 나타낸다면 TEA 전처치에 의해 SP 작용이 증가한다는 것은 이해하기 어려운 결과라 하겠다. 또한 K없는 용액에서 10⁻⁸M SP에 의한 수축은 완전히 없어지나 3mM TEA에 의한 수축은 상당히 남아 있어 3mM TEA와 10⁻⁸M SP에 의한 수축이 전혀 동일한 기전은 아님을 알 수 있다.

Holzer와 Petsche¹⁷⁾도 고농도 K에 의해 탈분극시킨 guinea pig 회장평활근에서 SP와 TEA가 K유출을 감소시킴을 관찰하였으나 SP에 의한 K유출의 감소정도가 TEA에 비해 적음에도 불구하고 SP와 TEA는 유사한 수축을 일으키며 SP에 의한 수축은 매우 빠르게 감소하는데 비하여 K투과도의 감소는 유지됨을 관찰하여 SP에 의한 수축기전에 K conductance의 감소이외의 기전이 관여함을 시사하였다. 또한 본 실험에서 10⁻⁸M SP에 의한 수축은 100K, Na-O, K-O, ouabain에 의해 완전히 억제되나 10⁻⁷M SP에 의해서

는 상당한 수축이 일어났고 특히 100K 존재하에서도 10⁻⁷M SP는 수축을 일으킴으로써 막전위와 무관한 Ca²⁺의 이동이 10⁻⁷M SP의 수축에 관여함을 알 수 있다. 그리고 10⁻⁷M SP는 외부 Ca 제거후에도 그 크기는 상당히 감소하였으나 수축을 일으킬 수 있었다 (Fig. 10). 본 실험에서 Ca²⁺없는 용액에 1mM EGTA를 가하였고 lumen이 용액에 노출되어 있기 때문에 세포외액의 Ca²⁺이 제거되는 속도는 매우 빠를 것으로 생각된다. Keatinge²³⁾는 평활근의 세포외액에서 Ca²⁺의 diffusion constant는 173 μm²/sec라고 하였고 Hill¹³⁾에 의한 계산방법을 적용하면 50 μm 두께의 근육에서 세포외액 Ca²⁺이 90%감소하는데 12.5초가 걸린다. 또한 EGTA가 유리 Ca²⁺의 제거를 가속화시키지만 세포내에서 세포외액으로 빠져나오는 Ca²⁺이 유리 Ca²⁺의 제거를 지연시킬 수도 있다. 그러나 적어도 1분안에는 세포외부 Ca²⁺의 농도는 크게 감소할 것이다. 그래서 Ca²⁺없는 용액에서 적어도 1분 이후에 생기는 SP에 의한 수축은 세포외액과 다른 부위에서 동원된 Ca²⁺를 이용할 가능성이 있다. Ca²⁺없는 용액에 노출 시간에 따른 SP 수축의 감소정도는 Casteels과 Raeymaekers⁶⁾가 결정유에서 Ach로 관찰한 결과와 유사하였고 평활근 수축물질이 Ca²⁺없는 용액에서 수축을 일으킬 때 이 물질이 내부저장고의 Ca²⁺을 이용하여 수축을 일으킨다고 생각하는 것은 다른 연구자들에 의해서도 받아 들여지고 있다.^{3,8,30)}

이 가능성은 SP에 의한 수축의 크기가 0.5mM 이상의 Ca²⁺농도에서 크게 증가하지 않고 (Fig. 8, 9) Ca²⁺없는 용액으로 처리시간이 길어질수록 SP의 수축이 감소하며 (Fig. 12) 그 회복시간이 외부 Ca²⁺농도 증가에 따라 빨라지므로 (Fig. 13) 더욱 뒷받침된다. 그리고 가토 회장평활근에서 SP가 이용하는 Ca²⁺의 저장고는 조직을 Ca²⁺없는 용액에 10분 노출한 후 감소되었던 SP에 의한 수축이 1.8mM Ca²⁺투여후 1분에 정상으로 회복되므로 (Fig. 13) 외부 Ca²⁺에 의해 매우 빨리 보충되는 것을 알 수 있다. 또한 100K 처리시 SP에 의한 수축이 현저히 감소하고 일시적인 수축만 나타나므로 고농도의 K⁺에 의한 탈분극시 저장고의 크기가 감소하는 것으로 생각되며 따라서 이 저장고가 세포막과 밀접한 관계가 있다는 것을 시사한다. 이것은 Bolton¹¹⁾이 제시한 가설, 즉 “일부 Ca²⁺은 여러 수축물질의 수용체 단백질에 결합되어 있거나 수용체 인접 세포막 내면에 결합되어 있어 수용체와 매우 밀접하게 연결되어 있고 이 Ca²⁺은 외부 Ca²⁺과는 평형상태에 있지 않고 chelating agent에 의해 영향을

받지 않는다"로 설명될 수 있겠다.

외부 Ca^{2+} 을 낮출 때 SP에 의한 수축의 감소 속도가 더욱 더 증가하므로 이 수축의 감소를 앞에 말한 Ca^{2+} 의 저장고의 고갈도로 설명할 수 있겠다. 그러나 이것이 사실이라면 외부 Ca^{2+} 농도를 증가시키면 수축의 감소정도가 감소해야 할 것이다. 그러나 본 실험에서 외부 Ca^{2+} 을 증가시키더라도 수축의 감소속도는 영향을 받지 않아 SP에 의한 수축의 감소를 이 기전으로는 설명하기 어렵다고 하겠다. 그리고 SP에 대한 노출시간이 길어져서 SP에 의한 수축이 감소하더라도 Ca^{2+} 유입과 K^+ 의 유출¹⁷⁾ 및 inositol phospholipid가 수분해²²⁾는 계속되는 것으로 알려져 있기 때문에 SP에 의한 autodesensitization 효과는 SP 수용체의 비활성화에 기인된다기 보다는 세포내에서 흥분수축의 연결 단계에 변화가 생겨 나타나는 것으로 추측된다.

요 약

가트의 회장평활근에서 substance P의 수축기전을 밝히기 위하여 본 실험을 시행하여 다음과 같이 요약하였다.

- 1) SP는 10^{-9} M부터 수축을 일으켜 10^{-7} M에서 최대수축을 나타내었고 그 정도는 10^{-6} M acetylcholine에 의한 수축의 90%에 달하였다.
- 2) SP를 농도별로 부가적으로 투여할 때는 SP를 각 농도마다 따로 투여할 때보다 수축의 크기가 크게 감소하였다.
- 3) 10^{-7} M SP로 5분간 처리한 회장평활근의 10^{-8} M SP에 대한 반응은 10^{-7} M과 10^{-8} M SP 투여시간의 간격이 클수록 증가하여 20분후 정상으로 회복되었다.
- 4) 10^{-7} M SP로 5분 처리후에도 10^{-6} M acetylcholine에 의한 수축은 영향을 받지 않았다.
- 5) 10^{-7} M SP에 의한 수축은 10^{-6} M atropine에 의해 영향을 받지 않았고 3 mM TEA 전처치시 10^{-7} M SP에 의한 수축은 정상이거나 약간 감소하였고 SP 전처치시 TEA 수축은 감소하였다.
- 6) 10^{-8} M SP와 3 mM TEA에 의한 수축은 Na 없는 용액, 10^{-4} M ouabain, 100 K 용액에 의해 완전히 억제되었고 10^{-6} M NE 존재시는 40% 정도 억제되었다. 10^{-7} M SP에 의한 수축은 각 조건에서 완전히 억제되지 않았다. K없는 용액에서 10^{-8} M SP에 의한 수축은 완전히 억제되었고 10^{-7} M SP와 TEA에 의한 수축은 완전히 억제되지 않았다.
- 7) SP에 의한 수축은 0.1 mM Ca^{2+} 존재시 상당히

억제되었고 외부 Ca^{2+} 증가시 증가하여 1.8 mM Ca^{2+} 에서 최고에 달하였으며 그 이후는 오히려 감소하였다. SP 수축의 감소속도는 0.5 mM Ca^{2+} 에 의해 증가하였으나 1.8 mM 이상의 Ca^{2+} 농도에서는 영향을 받지 않았다.

8) Ca^{2+} 없는 용액에서 10^{-7} M SP는 수축을 일으켰고 그 수축의 크기는 Ca^{2+} 없는 용액으로 처리시간이 증가함에 따라 감소하여 10분후 완전 소실되었다.

9) Ca^{2+} 없는 용액으로 처리시간이 길어질수록 0.5 mM Ca^{2+} 에서 10^{-7} M SP에 의한 수축은 감소하였다.

10) Ca^{2+} 없는 용액에서 10분간 처리한 후 10^{-7} M SP에 의한 수축은 Ca loading time이 길수록 외부 Ca^{2+} 농도가 높을수록 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때 저농도의 SP는 주로 외부 Ca^{2+} 의 유입에 의해 수축을 일으키는 것으로 생각되며 이 Ca^{2+} 의 유입에 관여하는 기전은 K^+ 투과도의 감소에 의한 막전위의 탈분극만으로 완전히 설명할 수 없었고 고농도의 SP에 의한 수축에는 세포내부 Ca^{2+} 의 유리도 관여하고 이 Ca^{2+} 저장고는 세포막과 밀접하게 연결되어 있는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bolton, T.B.: *Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev.*, 59:606, 1979.
- 2) Bortoff, A.: *Intestinal slow-wave propagation velocity as a function of longitudinal muscle impedance. In Physiology of Smooth Muscle, edited by Bülbring, E. and Shuba, M.F., p.111, Raven Press, New York, 1976.*
- 3) Brading, A.F. and Sneddon, P.: *Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig taenia coli on stimulation with carbachol. Br. J. Pharmacol.*, 70:229, 1980.
- 4) Bury, R.W. and Mashford, M.L.: *A pharmacological investigation of synthetic substance P on the isolated guinea-pig ileum. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 4:453, 1977.
- 5) Bülbring, E., Ohashi, H. and Tomita, T.: *Adrenergic mechanisms. In Smooth Muscle: an Assessment of Current Knowledge, edited by Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and*

- Tomita, T., p.219, Edward Arnold, London, 1981.
- 6) Casteels, R. and Raeymaekers, L.: *The action of acetylcholine and catecholamines on an intracellular calcium store in the smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli.* *J. Physiol.*, 294:51, 1979.
 - 7) Costa, M., Cuello, A.C., Furness, J.B., et al.: *Disiribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum.* *Neuroscience*, 5:323, 1980.
 - 8) Durbin, R.P. and Jenkinson, P.H.: *The effect of carbachol on the permeability of depolarized smooth muscle to inorganic ions.* *J. Physiol.*, 157:74, 1961.
 - 9) Franco, R., Costa, M. and Furness, J.B.: *Evidence for the release of endogenous substance P from intestinal nerves.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.*, 306:195, 1979.
 - 10) Fujisawa, K. and Ito, Y.: *The effects of substance P on smooth muscle cells and on neuro-effector transmission in the guinea-pig ileum.* *Br. J. Pharmac.*, 76:279, 1982.
 - 11) Hanley, M.R. and Iversen, L.L.: *Substance P receptors.* In *Neurotransmitter Receptors, part 1*, edited by Enna, S.J. and Yamamura, H.I., p.72, Chapman and Hall, London, 1980.
 - 12) Hedqvist, P. and von Euler, U.S.: *Effects of substance P on some autonomic neuroeffector junction.* In *Substance P. Nobel Symp. No. 37*, edited by von Euler, U.S. and Pernow, B., p. 89, Raven Press, New York, 1977.
 - 13) Hill, A.V.: *Diffusion of oxygen and lactic acid through tissues.* *Proc. R. Soc. B.*, 104: 39, 1928.
 - 14) Holzer, P.: *An enquiry into the mechanism by which substance P facilitates the phasic longitudinal contractions of the rabbit ileum.* *J. Physiol.*, 325:377, 1982.
 - 15) Holzer, P. and Lembeck, F.: *Neurally mediated contraction of ileal longitudinal muscle by substance P.* *Neurosci. Lett.*, 17:101, 1980.
 - 16) Holzer, P., Lembeck, F. and Donnerer, J.: *Caerulein, substance P, serotonin, and cholino-*
mimetics induce rhythmic contractions of the intestinal circular muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's, Arch. Pharmac.*, 312:131, 1980.
 - 17) Holzer, P. and Petsche, U.: *On the mechanism of contraction and desensitization induced by substance P in the intestinal muscle of the guinea-pig.* *J. Physiol.*, 342:549, 1983.
 - 18) Hosli, L., Hosli, E., Zehntner, C., et al.: *Effects of substance P on neurones and glial cells in cultured rat spinal cord.* *Neurosci. Lett.*, 24:165, 1981.
 - 19) Huidobro-Toro, J.B., Chelala, C.A., Bahouth, S., et al.: *Fading and tachyphylaxis to the contractile effects of substance P in the guinea-pig ileum.* *Eur. J. Pharmac.*, 81:21, 1982.
 - 20) Ito, Y., Kuriyama, H. and Sakamoto, Y.: *Effects of tetraethylammonium chloride on the membrane activity of guinea-pig stomach smooth muscle.* *J. Physiol.*, 211:445, 1970.
 - 21) Kamikawa, Y. and Shimo, Y.: *Contractile responses to substance P and related peptides of the isolated muscularis mucosae of the guinea-pig esophagus.* *Br. J. Pharmac.*, 81: 143, 1984.
 - 22) Katayama, Y., North, R.A. and Williams, J. T.: *The action of substance P on neurones of the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine.* *Proc. R. Soc.*, B206:191, 1979.
 - 23) Keatinge, W.R.: *Ca²⁺ concentrations and fluxes in Ca-deprived arteries.* *J. Physiol.*, 224: 35, 1972.
 - 24) Leander, S., Hakanson, R., Rosell, S., et al.: *A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation.* *Nature, Lond.*, 294:467, 1981.
 - 25) Mills, R.G. and Taylor, G.S.: *Studies of intestinal slow wave activity with a double sucrose gap apparatus.* *Life, Sci., Oxford*, 10:347, 1971.
 - 26) Nilsson, G., Larsson, L.-I., Hakanson, R., et al.: *Localization of substance P-like immunoreactivity in mouse gut.* *Histochemistry*, 43:

- 97, 1975.
- 27) Ohashi, H.: *The relative contribution of K and Cl to total increase of membrane conductance produced by adrenaline on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli.* *J. Physiol.*, 212: 561, 1971.
- 28) Pearse, A.G.E. and Polak, J.M.: *Immunocytochemical localization of substance P in mammalian intestine.* *Histochemistry*, 41:373, 1975.
- 29) Rosell, S., Bjorkroth, U., Chang, D., et al.: *Effects of substance P and analogs on isolated guinea-pig ileum.* In *substance P*, edited by von Euler, U.S. and Pernow, B., p.83, Raven press, New York, 1977.
- 30) Van Breemen, C., Aaronson, P., Loutzenhiser, R., et al.: *Calcium fluxes in isolated rabbit aorta and guinea-pig taenia coli.* *Fed. Proc.*, 41:2891, 1982.
- 31) von Euler, U.S. and Gaddum, J.H.: *An unidentified depressor substance in certain tissue extracts.* *J. Physiol.*, 72:74, 1931.
- 32) Watson, S.P. and Downes, C.P.: *Substance P induced hydrolysis of inositol phospholipids in guinea-pig ileum and rat hypothalamus.* *Eur. J. Pharmacol.*, 93:245, 1983.