

개 적출 회장 평활근의 field stimulation에 의한 cholinergic 및 α_2 -adrenergic 신경의 효과

김주헌·심철수*·박상은**
경상대학교 수의과대학·경상남도 가축위생시험소 동부지소*
경상남도 가축위생시험소 중부지소**
(1993년 4월 10일 접수)

Effect of cholinergic and α_2 -adrenergic nerve on the isolated dog ileal smooth muscle by the electrical field stimulation

Joo-heon Kim, Cheol-soo Shim*, Sang-eun Park**
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
Eastern Branch, Gyeongsang Animal Health Institute
Central Branch, Gyeongsang Animal Health Institute
(Received Apr 10, 1993)

Abstract : To elucidate the action of the cholinergic and α_2 -adrenergic nerve on the isolated ileal smooth muscle of the dog, effects of electrical field stimulation were investigated on the pretreatment of the physostigmine ; cholinestrase inhibitor, yohimbine ; α_2 -adrenoceptor blocker, atropine ; cholinergic receptor blocker and phentolamine ; non-selective α -adrenoceptor blocker from physiograph.

1. The contractile response induced by electrical field stimulation was the frequency(2-40 Hz)-dependent manner.
2. The contractile response induced by electrical field stimulation was markedly increased by the pretreatment of physostigmine(1 μ M) ; cholinestrase inhibitor.
3. The contractile response induced by electrical field stimulation was increased by the pretreatment of yohimbine(1 μ M) ; α_2 -adrenoceptor blocker.

These finding suggest that it was powerful excitatory action by cholinergic nerve and inhibitory action by α_2 -adrenergic nerve on ileal smooth muscle of the dog.

서 론

동물의 복강내 유강장기는 평활근으로 이루어져 있으며, 다른 부위의 평활근과 같이 자율신경계의 지배를 받고 있다. 그들의 기능은 교감신경과 부교감신경의 길항작용에 의해 조절되어지는 것으로 알려져 있다. 장기에 따라서 교감신경과 부교감신경의 길항작용을 증명할 수 있는 명확하고 일관성 있는 실험적 근거는 매우 빈약

한 실정하기에 그 생리적 의의가 명확히 밝혀져 있지 않은 실정이다.

일반적으로 자율신경계의 소화기에 대한 생리적 기능은 부교감신경의 절후신경섬유인 cholinergic 신경섬유는 촉진적 반응을 나타내고, 교감신경의 절후신경섬유인 adrenergic 신경섬유는 촉진적 반응과 억제적 반응을 공히 가지고 있음이 알려져 있다.¹⁻³

부교감신경의 촉진적 반응에 대해서는 acetylcho-

line이 potential sensitive ion channel에 작용하여 활동전위를 발생시키는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶

교감신경의 촉진적 반응과 억제적 반응에 대한 연구는 Ahlquist⁷가 adrenoceptor를 α -, β -adrenoceptor로 분류한 이래 여러 평활근에서 α -, β -adrenoceptor의 존재가 증명되었다.⁸⁻¹² 대체로 α -adrenoceptor는 촉진적 반응을 나타내고, β -adrenoceptor는 억제적 반응을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 α_1 -, α_2 -adrenoceptor의 작용도 여러 평활근에서 α_1 -adrenoceptor는 촉진적 반응을 보이며, α_2 -adrenoceptor는 억제적 반응을 보인다고 알려져 있다.^{3,12}

하지만 이들 adrenoceptor, cholinergic receptor의 생리적 의의를 추구하기 위한 연구들이 receptor에 선택적으로 작용하는 agonist, antagonist들의 작용만으로만 여러 동물에서 추구되어 왔다.^{3,8-9}

그래서 본 저자는 평활근 절편에 대한 전기자극을 통하여 평활근에 분포하고 있는 신경의 흥분작용을 이용하여 endogeneous 신경전달물질의 유리를 이용하여 자율신경계의 생리적 의의를 보다 명확히 규명하고자 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물: 체중 20kg 내외의 임상적으로 건강하다고 인정되는 성숙한 잠종견을 암·수 구별없이 20두 사용하였다.

최장 평활근 절편의 제작: 실험동물을 타격에 의해 실신시킨 후 즉시 복강을 열고 최장 말단부를 10 cm 정도 적출하여 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스가 공급되는 4°C의 냉한 정상 생리적 영양액에서 길이 1.5 cm, 폭 0.5 cm되게 평활근 절편을 제작하였다.

영양액의 조성: 정상생리적 영양액은 NaCl, 136; KCl, 2.7; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.0; Glucose, 5.5; Tris-HCl, 24.0 mM로 하여 37°C에서 pH 7.4가 되도록 조성하여 사용하였다.

운동성의 기록: 제작한 평활근 절편을 20 ml 용 organ bath에 옮겨서 한쪽 끝은 organ bath 밑바닥에 고정시키고 다른쪽 끝은 상하 높이를 조절할 수 있도록 준비된 근수축변환기(isometric force transducer, FT 03, Grass)에 연결하여 Potentiometric recorder(PR 200, Bioscience)를 통하여 최장 평활근의 등척성수축(isometric contraction)을 기록하였다.

전기자극 방법: 전기자극은 field stimulation으로서 평활근 절편의 양쪽 5 mm 지점에 백금 전극을 설치하여 stimulator(SM-1, Narco Biosystem)를 이용하여 0.5 msec(duration)에서 20초동안 전기자극을 실시하여 최적

전기자극치(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)를 찾아서 실험을 실시하였다. 전기자극의 신경자극에 대한 반응은 1 μ M tetrodotoxin을 전처리 하여 전기자극에 대한 반응이 완전히 차단되어지는 것으로 확인하였다. 전기자극의 간격은 5~10분으로 하였다.

약물처리 방법과 사용된 약물: 약물처리는 20 ml organ bath에 200 μ l 이하의 약물을 처리하여 100배이상 희석되도록 하였으며, 약물처리후 정상 생리적 영양액으로 3번이상 세척하여 1시간이상 평형시킨 후 다음 실험을 실시하였다. 본 실험에 사용된 약물은 acetylcholine, yohimbine, physostigmine, tetrodotoxin은 Sigma제품이었고, phentolamine은 Ciba제품을 사용하였다. 그외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

결과

최장 절편 평활근에 대한 field stimulation의 효과:

Field stimulation을 0.5 msec, 10~60V, 2~40Hz까지 20 sec동안 전기자극을 실시하여 그 반응을 관찰하였다.

전기자극에 대한 반응은 급속한 단일 수축을 나타내었으며, frequency 2~40Hz에서 frequency 증가에 따라 수축정도가 증가하는 경향을 보였으며, 20Hz에서 최대 수축을 나타내었다(Fig 1). 그래서 최적 전기자극치를 20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec의 자극으로 삼아서 실험을 실시하였다. 그리고 전기자극에 대한 단일 수축현상이 1 μ M tetrodotoxin 전처리에 의해 완전히 차단되어짐을 관찰하고(Fig 2), 주어진 전기자극이 신경자극에 의한 효과임을 확인하였다.

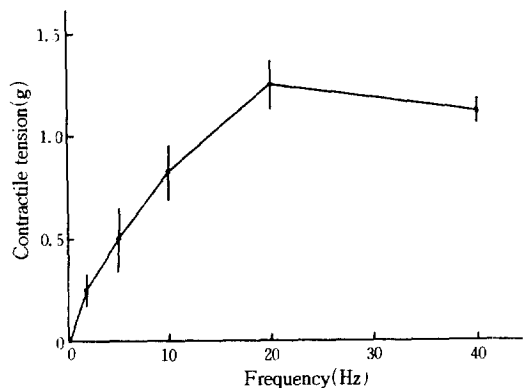


Fig 1. Frequency-responses for electrical field stimulation on the isolated ileal smooth muscle in the dog.

Physostigmine이 전지자극에 의한 수축현상에 미치는

영향: 최장 절편 평활근의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 cholinestrase inhibitor인

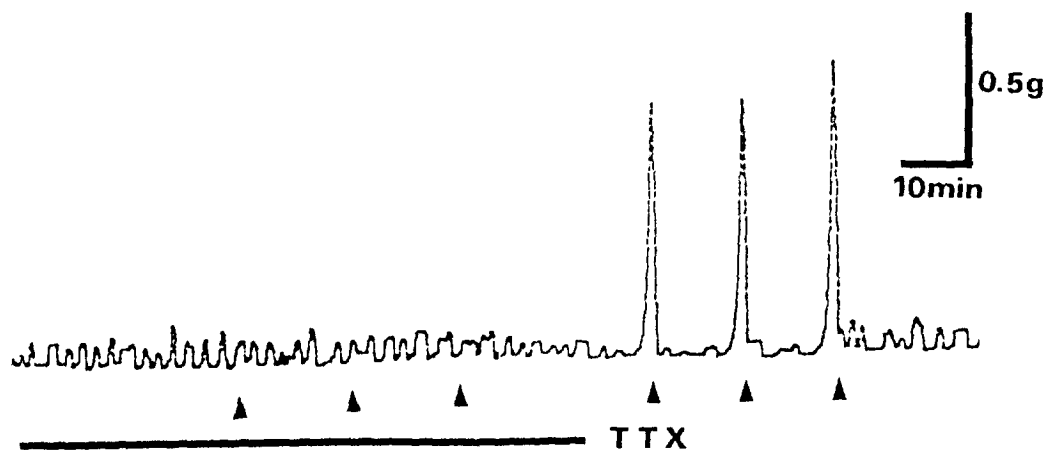


Fig 2. Effect of tetrodotoxin ($1 \mu\text{M}$) on the neurogenic contraction by the electrical field stimulation (\blacktriangle) in the isolated dog ileal smooth muscle. Electrical field stimulation at 20 V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

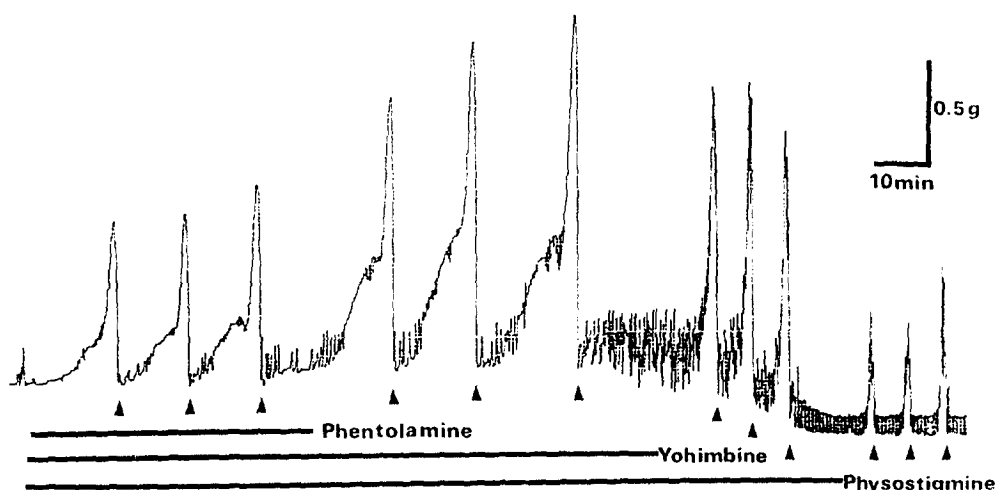


Fig 3. Effect of physostigmine, ($1 \mu\text{M}$) yohimbine ($1 \mu\text{M}$) and phentolamine on the neurogenic contraction by the electrical field stimulation (\blacktriangle) in the isolated dog ileal smooth muscle. Electrical field stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

Table 1. Effect of physostigmine and yohimbine on the contraction by the electrical field stimulation (20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec) in the isolated dog ileal smooth muscle (g)

Control	Physostigmine (μM)		
	0.1	1	10
0.541 \pm 0.057 (100%)	0.550 \pm 0.080	0.844 \pm 0.117 (156%)	1.313 \pm 0.112 (243%)
Control	Yohimbine (μM)		
	0.1	1	10
0.717 \pm 0.024 (100%)	0.669 \pm 0.038	1.074 \pm 0.066 (149.7%)	1.375 \pm 0.147 (192%)

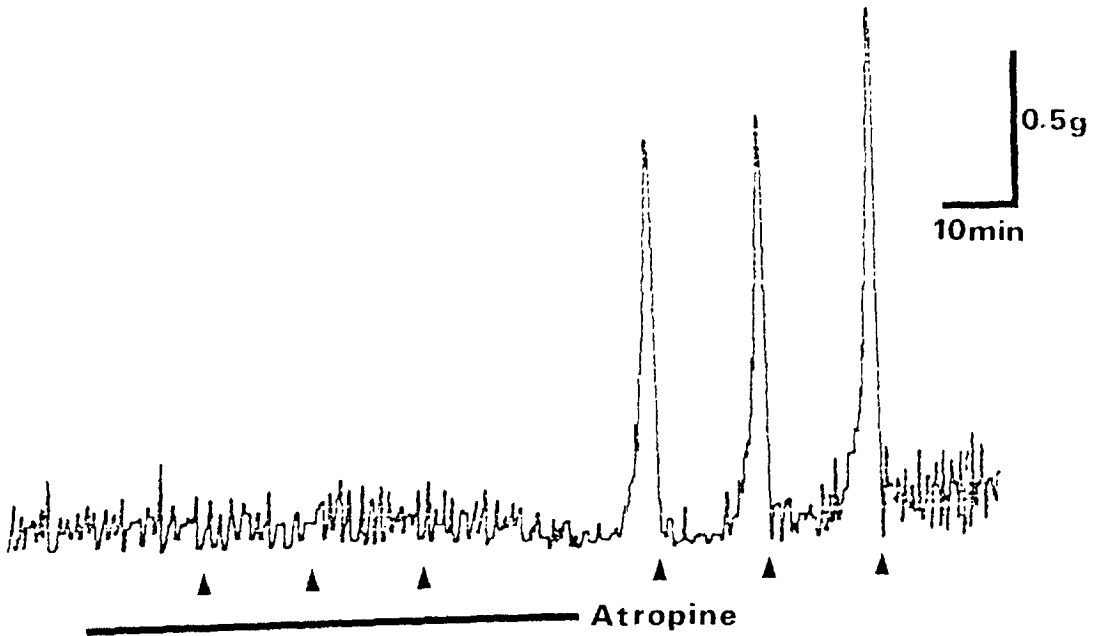


Fig 4. Effect of atropine($1\mu\text{M}$) on the neurogenic contraction by the electrical field stimulation(▲) in the isolated dog ileal smooth muscle. Electrical field stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

Table 2. Effect of physostigmine on the contraction by the acetylcholine in the isolated dog ileal smooth muscle (g)

Treatment	Control	Physostigmine($1\mu\text{M}$)	Physostigmine($10\mu\text{M}$)
Acetylcholine	0.833±0.147 (100%)	0.925±0.355 (111%)	1.430±0.411 (172%)

physostigmine 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 상당히 증가되어 나타났다(Fig 3).

Physostigmine $0.1\mu\text{M}$ 전처리에 의해서는 별 영향이 없었으나 physostigmine $1\mu\text{M}$ 전처리에 의해서는 약 56%의 수축력 증가가 나타났으며 physostigmine $10\mu\text{M}$ 전처리에서는 약 143%의 수축력 증가가 나타났다(Table 1).

Yohimbine이 전기자극에 의한 수축효과에 미치는 영향: 회장 절편 평활근의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 α_2 -adrenoceptor 차단제인 yohimbine($1\mu\text{M}$)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 상당히 증가되어 나타났다(Fig 3).

Yohimbine $0.1\mu\text{M}$ 전처리에 의해서는 별 영향이 없었으나 yohimbine $1\mu\text{M}$ 전처리에 의해서는 약 50%의 수축력 증가가 나타났으며, yohimbine $10\mu\text{M}$ 전처리에서는 약 92%의 수축력 증가가 나타났다(Table 1).

Yohimbine의 전처리에 의해서는 단일 수축현상의 증가뿐만 아니라 수축 후반부의 긴장성 수축이 증가되어 진 것을 관찰할 수 있었다(Fig 3).

Phentolamine이 전기자극에 의한 수축효과에 미치는 영향: 회장 절편 평활근의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 α -adrenoceptor 차단제인 phentolamine($1\mu\text{M}$)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 억제되었다(Fig 3).

Atropine이 전기자극에 의한 수축효과에 미치는 영향: 회장 절편 평활근의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 cholinergic receptor 차단제인 atropine($1\mu\text{M}$)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 완전히 억제되었다(Fig 4).

Acetylcholine의 수축현상에 대한 physostigmine의 영향: Acetylcholine에 의한 수축현상이 cholinestrase inhibitor인 physostigmine의 작용으로 수축력이 어떤 변화를 일으키는 지를 관찰하였다.

Acetylcholine($1\mu\text{M}$)에 의한 수축현상이 physostigmine($1\mu\text{M}$)의 전처리에 의해 약 11%의 수축력 증가를 보였으며, physostigmine $1\mu\text{M}$ 의 전처리에 의해 약 11%의 수축력 증가를 보였으며, physostigmine $10\mu\text{M}$ 의 전처리에 의한 약 72%의 수축력 증가현상을 나타내었다

(Table 2).

고 찰

자율신경계의 생리현상을 규명하기 위하여 자율신경계 수용체에 선택적으로 작용하는 agonist와 antagonist를 이용하여 여러 동물에서 실험되어 왔다.^{3, 8~12} 평활근의 운동은 전기적 변화인 이온의 이동² 및 대사물질의 변화^{10, 11} 등의 요인에 의해서 이루어지고 있음이 알려져 있다. 특히 활동전압을 쉽게 발생하는 평활근에서는 전기적 변화에 의해 유발되는 활동전압을 조정하는 것이 평활근 긴장을 변화시키는 가장 중요한 기전일 것으로 알려져 있다.^{3~13} 활동전압이 발생하는 주기전은 여러 원인에 의해 세포막의 탈분극 때문인 것으로 믿어지고 있다.¹³ 본 연구에서는 평활근 자체에 존재하는 신경의 전기적 자극을 통해 절후섬유의 흥분으로 신경말단에서 신경전달물질을 분비하게 하여 관찰하였다.

본 실험에서 이용된 전기자극이 분명히 선택적으로 평활근에 존재하는 신경인 것은 김과 김¹⁴의 연구에서와 같이 neural blocker인 tetrodotoxin(1 μM)의 처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 완전히 차단되어지는 것으로 보아 분명히 field stimulation에 의한 전기자극이 신경자극에 의한 흥분효과임을 확인할 수 있었다.

이와같은 전기자극은 자율신경계 adrenergic, cholinergic 신경섬유 모두가 자극을 받아서 생기는 현상일 것이다.

Cholinergic 신경의 전기자극으로 신경말단에서 Ach의 유리에 의해 생긴 수축효과를 cholinesterase inhibitor인 physostigmine의 전처리로서 전기자극에 의한 단일 수축현상이 상당히 증가되어 나타난 것과 Ach에 의한 수축현상이 physostigmine 전처리로서 수축현상이 증가되어진 것 그리고 atropine 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 차단되어진 것을 관찰함으로써 전기자극에 의한 단일 수축현상이 cholinergic 신경섬유의 흥분으로 신경섬유 말단에서 Ach의 유리에 의한 효과임이 분명한 것으로 생각되어진다. 그리고 기니피의 폐장¹⁵과 가토의 회장¹⁶ 평활근에서 cholinergic receptor blocker인 atropine의 전처리에 의해 Ach의 작용이 완전히 차단되어지는 것으로 보아 평활근에 강력한 cholinergic 수용체의 촉진적 반응이 존재함을 밝힌 것과 유사한 결과인 것이다.

Noradrenaline의 약물효과는 개체간 또는 실험하의 생리적 조건에 따라서 많은 차이를 보이고 있는데^{17~20, 22} 특히 생식기의 경우는 estrogen과 progesterone의 농도에 따라서 자궁근의 noradrenaline에 대한 반응이 상당한

차이가 있음이 알려져 있다.^{2, 21, 23} 그리고 noradrenaline의 작용이 α-adrenergic과 β-adrenergic수용체의 보존도에 따라서 크게 좌우된다고 하지만 일반적으로 α-adrenergic 수용체는 촉진적 반응을 보이며, β₁-adrenergic 수용체는 억제적 반응을 보인다고 알려져 있다.^{2, 3, 9, 12, 23, 24} 또한 α₁-adrenergic 수용체와 α₂-adrenergic 수용체의 작용에 대해서는 동물별, 개체별 및 부위별에 따라서 많은 차이가 있음이 알려져 있다.^{3, 12}

본 실험에서 α₂-adrenergic 수용체 차단제인 yohimbine의 전처리에 의해 전기자극에 의한 수축현상이 증가되어진 것은 α₂-adrenergic 수용체를 통한 수축의 억제 효과가 있음을 알 수 있다. 이와같은 효과는 아마도 전기자극을 통한 noradrenaline의 분비에 의해 α₂-adrenergic 수용체의 억제효과가 차단되어지므로 단일 수축현상이 증가된 것으로 생각되어진다. 또한 yohimbine의 전처리에 의해 단일 수축현상의 후반부에서 긴장성 수축이 지속되어지는 것은 α₂-adrenergic 수용체의 작용이 회장 평활근의 긴장도에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 생각되어진다.

Phentolamine의 전처리에 의해서는 전기자극에 의한 단일 수축현상이 억제되어지지만 atropine의 전처리에 의해서 전기자극의 단일 수축현상이 거의 완전히 차단되어지는 것으로 보아 회장 평활근의 cholinergic신경의 작용이 보다 강력하게 나타나는 것으로 생각되어진다.

이상의 결과들로 개 회장 평활근에는 수축현상의 촉진적 효과를 cholinergic 신경섬유가 강력히 나타내고 있으며 α₂-adrenergic 수용체를 통한 수축현상의 억제 효과가 있는 것으로 사료되어진다.

결 론

개 적출 회장 평활근의 전기자극에 의한 cholinergic, adrenergic의 운동성에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 개 적출 회장 평활근에 대한 전기자극은 frequency-dependent한 단일 수축현상을 나타내었다.
2. 전기자극에 대한 단일 수축현상은 cholinesterase inhibitor인 physostigmine의 전처리에 의해 수축현상이 증가되었다.
3. 전기자극에 대한 단일 수축현상은 α₂-adrenoceptor차단제인 yohimbine의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 증가되었다.

이상의 결과들로 개 회장 평활근에는 수축현상의 촉진적 효과를 cholinergic 신경섬유가 강력히 나타내고 있으며, α₂-adrenergic 수용체를 통한 수축현상의 억제

효과가 있는 것으로 사료되어진다.

참 고 문 헌

1. Labate JS. Influence of cocaine on the uterine reactions induced by adrenaline and hypogastric nerve stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941 ; 72 : 370~382.
2. Marshall JM. Effects of catecholamines on the smooth muscle of the female reproductive tract. *Ann Rev Pharmacol* 1973 ; 13 : 19~24.
3. Goodman LS, Gillman A. The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed. New York, MacMillan pub. 1980 ; 67~74.
4. Bolton TB. The depolarizing action of acetylcholine or catecholamine in intestinal smooth muscle. *J Physiol* 1972 ; 220 : 647~654.
5. Bolton TB. the permeability change produced by acetylcholine in smooth muscle. In Drug Receptor. London, MacMillan. 1973 ; 87~102.
6. Joiner PD. Studies on the loss of acetylcholine sensitivity in ileal muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1973 ; 186 : 552~559.
7. Ahlquist RP. A study of the adrenergic receptor. *Am J Physiol* 1948 ; 153 : 586~600.
8. Coleman AJ, Paterson DS, Smoerville AR. The beta adrenergic receptor of rat corpus luteum membrane. *Biochem Pharmacol* 1979 ; 28 : 1003~1012.
9. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, et al. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967 ; 21 : 597~598.
10. Limbird LE, Lefkowitz RJ. Adenylate cyclase-coupled beta adrenergic receptors, Effects of membrane lipid-perturbing agents on receptor binding and enzyme stimulation by catecholamines. *Mol Pharmacol* 1976 ; 12 : 556~564.
11. Micky JV, Tate R, Mullikin D, et al. Regulation of adenylate cyclase coupled beta adrenergic receptor binding sites by beta adrenergic catecholamines *in vitro*. *Mol Pharmacol* 1976 ; 12 : 409~415.
12. William LT, Lefkowitz RJ. Alpha adrenergic receptor identification by ³H dihydroerryptine binding. *Science* 1976 ; 192 : 791~799.
13. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979 ; 220 : 606~718.
14. Kim JH, Kim YK. Purinergic innervation on isolated renal artery of rabbit. *Korean J Vet Res* 1991 ; 31 (4) : 389~395.
15. Stoner J, Manganiello VC, Vaughan M. Guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanylate cyclase activity in guinea pig lung. Effects of acetylcholine and cholinesterase inhibitors. *Mol Pharmacol* 1974 ; 10 : 155~163.
16. Kim JH, Kim CS. Effects of autonomic drugs on the motility of ileal smooth muscle in rabbit. *J Gyeongsang Nat Univ* 1984 ; 23(1) : 157~161.
17. Garrett WJ. The effect of adrenaline and noradrenaline on the intact nonpregnant human uterus. *J Obstet Gynec Brit Emp* 1966 ; 62 : 876~881.
18. Kaiser IH, Harris JS. The effect of adrenaline on the pregnant human uterus. *Am J Obstet Gynec* 1950 ; 59 : 775~779.
19. Kumer O, Wagatsuma T, Barnes AC. *In vitro* hyperpolarizing effect of adrenaline on human myometrial cell. *Am J Obstet Gynec* 1965 ; 91 : 575~581.
20. Lehrer DN. The effect of spasmolytic drugs on the isolated human myometrium. *J Pharmacol* 1965 ; 17 : 587~593.
21. Maughan GB, Shabanah EH, Toth A. Experiments with pharmacologic sympatholysis in the gravid. *Am J Obstet Gynec* 1967 ; 97 : 764~769.
22. Sandberg R, Ingelman-Sanberg AI, Ryden, G. *In vitro* studies of the motility of the human uterus. *J Obstet Gynec Brit Emp* 1968 ; 65 : 965~969.
23. Tasi TH, Fleming WW. The adrenergic receptor of the cat uterus. *J Pharmacol Exp Ther* 1964 ; 143 : 268~273.
24. Nesheim BI, Sigurdson. Effects of isoprenaline and dibutyryl c-AMP on the electrical and mechanical activity of the rabbit myometrium. *Acta Pharmacol Toxicol* 1978 ; 42 : 371~376.