

기니픽의 회장평활근에서 NANC 신경전달물질의 작용기전

이 영 호¹ · 김 종 훈² · 강 복 순¹

연세대학교 의과대학 ¹생리학교실 및 ²마취과학교실

Action Mechanisms of NANC Neurotransmitters in Smooth Muscle of Guinea Pig Ileum.
Young-Ho Lee¹, Jong-Hoon Kim², and Bok-Soon Kang¹ Department of ¹Physiology and ²Anesthesiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

The relaxation induced by stimulation of the inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic (iNANC) nerve is mediated by the release of iNANC neurotransmitters such as nitric oxide (NO), vasoactive intestinal peptide (VIP) and adenosine triphosphate (ATP). The mechanisms of NO, VIP or ATP-induced relaxation have been partly determined in previous studies, but the detailed mechanism remains unknown. We tried to identify the nature of iNANC neurotransmitters in the smooth muscle of guinea pig ileum and to determine the mechanism of the inhibitory effect of nitric oxide. We measured the effect of NO-donors, VIP and ATP on the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$), by means of a fluorescence dye (fura 2) and tension simultaneously in the isolated guinea pig ileal smooth muscle. Following are the results obtained.

1. Sodium nitroprusside (SNP: 10^{-5} M) or S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP: 10^{-5} M) decreased resting $[Ca^{2+}]_i$ and tension of muscle. SNP or SNAP also inhibited rhythmic oscillation of $[Ca^{2+}]_i$ and tension. In 40mM K^+ solution or carbachol (CCh: 10^{-6} M)-induced precontracted muscle, SNP decreased muscle tension. VIP did not change $[Ca^{2+}]_i$ and tension in the resting or precontracted muscle, but ATP increased resting $[Ca^{2+}]_i$ and tension in the resting muscle.

2. 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ: $1 \mu M$), a specific inhibitor of soluble guanylate cyclase, limited the inhibitory effect of SNP.

3. Glibenclamide ($10 \mu M$), a blocker of K_{ATP} channel, and 4-aminopyridine (4-AP: 5 mM), a blocker of delayed rectifier K channel, apamin ($0.1 \mu M$), a blocker of small conductance K_{Ca} channel had no effect on the inhibitory effect of SNP. Iberiotoxin ($0.1 \mu M$), a blocker of large conductance K_{Ca} channel, significantly increased the resting $[Ca^{2+}]_i$ and tension, and limited the inhibitory effect of SNP.

4. Nifedipine ($1 \mu M$) or elimination of external Ca^{2+} decreased not only resting $[Ca^{2+}]_i$ and tension but also oscillation of $[Ca^{2+}]_i$ and tension. Ryanodine ($5 \mu M$) and cyclopiazonic acid ($10 \mu M$) decreased oscillation of $[Ca^{2+}]_i$ and tension.

5. SNP decreased Ca^{2+} sensitivity of contractile protein.

In conclusion, these results suggest that 1) NO is an inhibitory neurotransmitter in the guinea pig ileum, 2) the inhibitory effect of SNP on the $[Ca^{2+}]_i$ and tension of the muscle is due to a decrease in $[Ca^{2+}]_i$ by activation of the large conductance K_{Ca} channel and a decrease in the sensitivity of contractile elements to Ca^{2+} through activation of G-kinase.

Key Words: NANC, Nitric oxide, K^+ channel blocker, VIP, ATP, Guinea pig ileum

서 론

장신경계(enteric nervous system)는 근층간신경총(myenteric plexus)과 점막하신경총(submucosal plexus)으로 구성되어 있는데, 이중 근층간신경총의 신경원들은 가까운 평활근층내로 그들의 신경섬유를 돌출하는 운동신경원(motor neuron)으로서 장관평활근을 주로 지배하고 있다(Gabella, 1974; Szurszewski, 1987; Costa & Furness, 1989). 근층간신경총의 운동신경원에서 분비되는 신경전달물질은 acetylcholine 및 tachykinin과 같은 흥분성 신경전달물질(Bartho et al, 1982; Grider, 1989)과 vasoactive intestinal peptide(VIP)등의 억제성 신경전달물질이 존재하는 것이 알려졌는데(Grider et al, 1985a), 이중 억제성 신경전달물질로서 대표적인 것이 non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) 신경전달물질이다(Makhlouf & Grider, 1993).

1960년대 Burnstock 등(Burnstock et al, 1963 및 1966)이 소화관 벽에 존재하는 어떤 종류의 신경을 자극했을 때 이완이 유발된다는 것을 발견한 이래 많은 연구의 결과로 오늘날 이를 NANC 신경, 이들 신경에서 유리되는 신경전달물질을 NANC 신경전달물질이라 명명하고 있다. 이들 신경들은 위장관에서 대부분의 억제성 반응을 중재하고, 연하(swallowing)시 하부괄약근의 이완, 음식물 섭취시 위 근위부의 이완 및 연동운동시 항문축 원위부 이완과 같은 많은 중요한 생리학적 반응을 조절하기 때문에 매우 중요하다(Desai et al, 1991). 따라서 지난 30년간 NANC 억제성 신경전달물질(inhibitory NANC neurotransmitter; iNANC neurotransmitter)의 본체 및 특성을 규명하기 위해 많은 연구를 했던 결과 현재는 어느 정도 규명이 된 상태이다(Hoyle & Burnstock, 1989). 즉, adenosine triphosphate(ATP)가 신경전달물질로 간주되는 purinergic phase에 이어 VIP가 신경전달물질로 더욱 더 적격이라는 peptidergic phase가 있었고 현재는 nitric oxide(NO)가 대표적인 NANC 신경전달물질이라고 주장되고 있다(Grider & Makhlouf, 1986; Bredt & Snyder, 1992). 그러나 이들 물질의 상대적 중요도는 연구자, 동물개체간 및 장관 부위에 따라 매우 다양하게 보고되고(Grider & Makhlouf, 1986) 있으며, 특정부위의 조직에서는 두 개 이상의 신경전달물질이 상호작용하는 결과도 보고되고 있다(Makhlouf & Grider, 1993; Belai & Burnstock, 1994). 한편, NANC 신경전달물질에 의한 평활근 세포의 이완기전은 각종 신호전달 차단제를 사용한 긴장도 실험 및 막전압고정법으로 일부 규명되어져 있다. 즉 NO 및 VIP의 경우, 이들 물질에 의해 활성화 된 G-kinase(NO) 및 A-kinase와 G-kinase(VIP) 등이 여러 부위에 작용하여 Ca^{2+} 농도를 낮추거나 Ca^{2+} 에 대한 수축단백질의 감수성을 감소시킴에 의해

이루어질 것이라 추측하고 있다(Kume et al, 1989; Lincoln et al, 1990). 또한 두 kinase 활성화에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소는 ① IP_3 형성 및 IP_3 -의존성 Ca^{2+} 유리를 억제하거나(Supattapone et al, 1988; Murphy et al, 1993a) ② sarcoplasmic Ca^{2+} ATPase를 활성화시켜 Ca^{2+} uptake를 촉진하거나(Rashatwar et al, 1987) ③ Ca^{2+} channel의 활성도를 감소시키거나 Ca^{2+} -dependent K^+ channel의 활성도를 촉진시켜 Ca^{2+} 유입을 감소시키거나(Kume et al, 1989) ④ plasmalemmal Ca^{2+} ATPase 나 Na^+ / Ca^{2+} exchange의 활성화로 인한 Ca^{2+} 유출의 활성화(Furukawa et al, 1991)에 의한 것이라 추측하고 있다. ATP의 경우 ATP에 의한 조직의 이완이 small conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel(small conductance K_{Ca} channel)의 선택적 차단제인 apamin에 의해서 억제된다는 것이 보고되어(He & Goyal, 1993) K^+ channel 활성화에 따른 막전압 과분극에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소가 그 기전일 것이라 추측하고 있다.

NANC 신경전달물질에 의한 이완의 기전이 일부 규명되었다고는 하나 이러한 결론에 몇 가지 문제점이 제기된다. 즉 이러한 결론의 도출이 대부분 전기자극에 의한 평활근 긴장도 실험의 결과로 유추되었을 뿐 긴장도에 중요한 역할을 하는 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 관해서는 거의 연구가 수행되지 않고 있다. 즉, 혈관 및 장관 평활근의 수축과 이완은 여러 가지 중간 단계의 신호전달체계를 거치나 결국에는 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가 또는 감소에 의하여 일어난다는 것은 명확한 사실이다. 따라서 NANC 신경전달물질들에 의한 이완의 기전을 명확하게 규명하기 위해서는 이들 신경전달물질을 외부에서 투여했을 때 평활근의 긴장도와 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 동시에 측정하여 이들 물질들에 의한 신호전달체계를 정확하게 규명해야 할 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 신경전달물질로 알려진 NO, VIP 및 ATP를 투여하여 평활근의 긴장도와 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 동시에 측정함으로써 guinea pig 회장평활근에서 iNANC 신경전달물질의 본체를 간접적으로 규명하고자 하였고, 평활근의 이완을 유발시키는 물질에 의한 이완의 기전을 확립하고자 하였다.

방 법

Guinea pig 회장평활근의 제조

guinea pig 회장의 분리를 위해 체중 300 g 내외의 기니픽을 cervical dislocation 방법으로 희생시킨 후 경동맥을 절단하여 실험시킨 다음 회장부위를 적출하였다. 적출한

회장을 95% O₂ 및 5% CO₂의 혼합기체로 포화시킨 Krebs-Henseleit용액(KH 용액; pH 7.4)에 담근 상태에서 장관내 내용물을 잘 씻어낸 후 외측종주근(outer longitudinal muscle)을 내측순주근(inner circular muscle)으로부터 분리하였다. 분리한 외측종주근을 절편으로 만들어 양 끝단을 실로 묶은 다음 KH 용액에서 1시간 정도 incubation 한 후 Fura-2 loading에 사용하였다. KH 용액의 조성은 NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.5, NaHCO₃ 25, glucose 11 mM 이고, high K⁺ 용액은 정상 KH 용액의 조성중 NaCl 농도를 감소시켜 KCl의 농도가 40mM되게 만들었다. 또한 일부의 실험에서 사용한 Ca²⁺-free KH용액은 정상 KH 용액에서 CaCl₂를 제거하고 0.5 mM EGTA를 첨가하여 만들었다.

긴장력과 세포내 유리 Ca²⁺ 농도의 동시 측정

분리된 회장 절편에서 평활근 긴장도와 세포내 유리 Ca²⁺ 농도 변화의 동시 측정은 조직의 surface fluorescence를 측정하기 위해 특별히 고안된 fluorimeter, 즉 Intracellular Ion Analyzer(JASCO Model CAF 110, Tokyo, Japan)를 이용하여 Ozaki 등(1991)의 방법에 따라 실시하였다.

Fluorescent Ca²⁺ indicator의 세포내 축적 방법: 긴장

도와 세포내 유리 Ca²⁺ 농도의 변화를 동시에 측정할 때 세포내 유리 Ca²⁺의 농도는 fluorescent Ca²⁺ indicator인 Fura-2를 이용하여 측정하였다. 따라서 Fura-2를 세포내에 축적하기 위해 외측종주근 절편을 5 μM Fura-2/AM이 존재하는 KH 용액(실내온도; 20~24°C)에서 3~4시간 incubation 한 후 4°C하에서 overnight 하여 Fura-2를 세포내에 축적시켰다. 이 때 Fura-2/AM의 용해도를 증가시키기 위해 noncytotoxic detergent인 cremophor EL(0.01%)을 용액내 첨가하였고, Fura-2의 세포내 축적을 촉진하기 위해 Fura-2와 cremophor EL이 포함된 KH 용액을 sonificator를 이용하여 sonification하였다.

긴장도와 세포내 유리 Ca²⁺ 농도의 측정: 분리된 외측종주근 절편에서 긴장도와 세포내 유리 Ca²⁺ 농도 변화의 동시 측정은 Intracellular Ion Analyzer(JASCO Model CAF 110)를 이용하여 Ozaki 등(1991)의 방법에 따라 실시하였다(Fig. 1). Fura-2가 축적된 근육 절편을 온도가 37°C로 조절되는 7 ml의 organ bath에 수직으로 고정하고, 한쪽 끝은 근육의 긴장도를 측정하기 위해 strain gauge transducer(Harvard)에 고정하였다. 근육의 다른 한쪽은 근육 조직에 UV light가 통과할 수 있도록 장력 측정의 반대쪽으로 고정하였다(Fig. 1).

따라서 근육에서 발생하는 등척성 장력은 force trans-

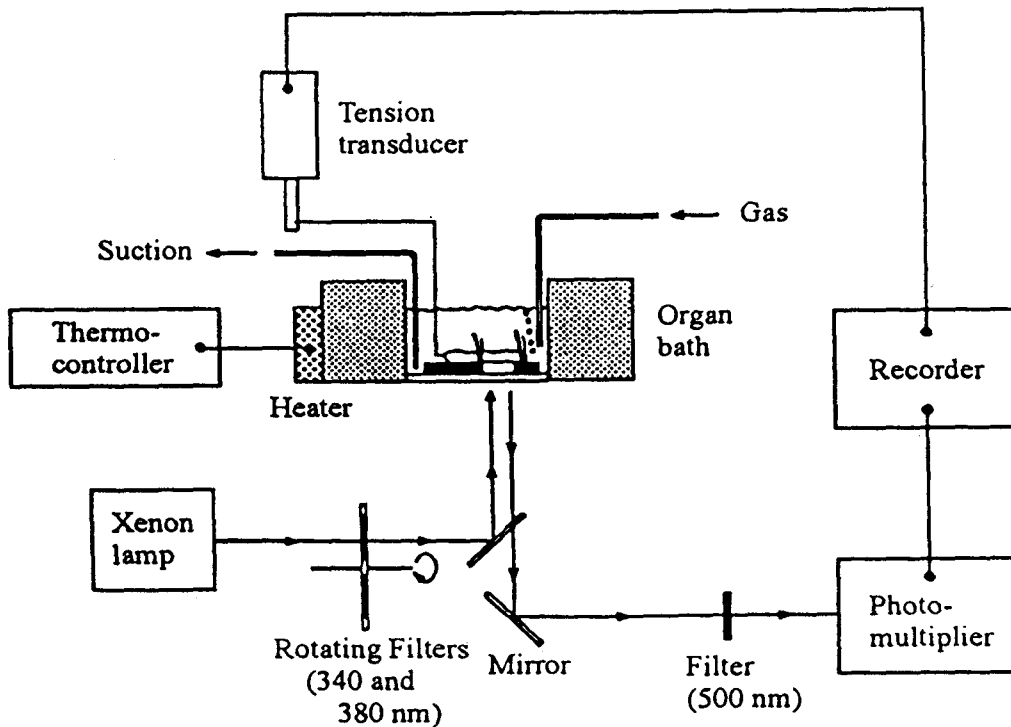


Fig. 1. Block diagram of the apparatus of fluorescence spectrometer specially designed for smooth muscle strip.

ducer를 통해 computer에 저장하고, 동시에 UV light 조사에 의해 발생하는 fluorescence(세포내 유리 Ca^{2+} 농도 측정)를 동일한 computer에 저장하여 결과를 분석하였다.

상기의 방법으로 고정된 근육절편에서 세포내 유리 Ca^{2+} 농도를 긴장도와 동시에 측정하기 위해서는 두개의 excitation light를 조직에 조사한 후 발생하는 emission light(fluorescence)를 측정하여 두 fluorescence intensity의 ratio를 계산하여 세포내 Ca^{2+} 농도의 척도로 하였다. 즉 excitation light는 rotating filter wheel(48Hz)이 장착된 xenon lamp에서 방사되는데, 이 때 filter wheel은 340 nm와 380 nm의 interface filter를 가지고 있다. 두 개의 excitation light의 조사에 의해 발생하는 emission light(fluorescence)를 500 nm filter를 통해 수집한 후 340 nm의 excitation light에 의한 fluorescence(F_{340})와 380 nm의 excitation light(F_{380})에 의한 fluorescence의 ratio(F_{340}/F_{380})를 계산하였다.

한편, 외측중추근을 organ bath에 고정하여 0.5 g의 기초장력을 가한 후 근육 절편 외부에 붙은 Fura-2를 세척한 다음 하고, 온도 및 기초장력을 안정화시키기 위해 15분간 KH 용액으로 incubation 한 후 본 실험을 실시하였고, 모든 실험은 신경으로부터 유리되는 신경전달물질의 영향을 배제하기 위해 ganglionic blocking agent인 hexamethonium이 존재하는 조건에서 실험을 실시하였다.

NO, VIP 및 ATP에 의한 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 변화의 측정: NO, VIP 및 ATP가 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도에 미치는 효과는 안정시와 수축된 근육에서 관찰하였다. 먼저 각각의 근육에 high K^+ 용액을 처치하여 긴장도 및 fluorescence intensity를 측정 후 정상 KH 용액으로 세척하였다. 이런 실험조건에서 sodium nitroprusside(SNP), *s*-nitroso-*N*-acetyl-penicillamine(SNAP), VIP, ATP, α, β -methylene adenosine 5' triphosphate(MeATP) 및 2-methylthio adenosine triphosphate(2-MeSATP)를 처치하여 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 변화를 관찰하였다. 수축된 근육에서 이들 약물의 효과는 40 mM K^+ 용액 및 carbachol(CCh)을 처치하여 근육을 수축시킨 다음 각 약물을 투여하여 관찰하였다.

NO에 의한 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 변화에 대한 각종 억제제의 효과 측정: 각종 신호전달체계 및 ion channel 억제제가 NO에 의한 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 변화에 미치는 효과는 안정시 근육에서 평가하였다. 즉 high K^+ 용액에 의한 긴장도 및 fluorescence intensity를 측정 후 정상 KH 용액으로 세척한 근육에 SNP를 처치하여 긴장도 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였다. 이후 guanylate cyclase inhibitor인 1H-[1, 2, 4] oxadizol[4, 3, -a] quinaxalin-1-one(ODQ), 각종 K^+

channel blocker인 glibenclamide, 4-amino pyridine(4-AP), apamin 및 iberiotoxin 그리고 sarcoplasmic reticulum(SR)으로부터 Ca^{2+} 의 유리나 재흡수를 억제하는 ryanodine 및 CPA 등을 전처치한 후 SNP의 효과를 관찰하여 각종 신호전달체계 및 억제제의 효과를 평가하였다.

NO가 수축단백질의 Ca^{2+} 감수성에 미치는 효과의 측정; NO가 회장평활근에서 Ca^{2+} 에 대한 수축단백질의 감수성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 먼저 KH용액의 K^+ 농도를 달리하여 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 따른 긴장도의 변화를 측정하고, 동일한 실험을 SNP가 존재하는 실험조건에서 시행하여 비교하였다. 즉, 5×10^{-6} M SNP가 존재하는 그리고 존재하지 않는 실험조건에서 K^+ 농도가 10, 20, 40, 80, 120 mM인 KH용액을 첨가하였을 때 각 농도에서의 세포내 Ca^{2+} 농도와 긴장도를 측정하여 120 mM K^+ 용액 때의 값에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

결과 분석

실험결과의 전형적인 기록중 근육 긴장도의 변화는 절대장력으로서 g으로 표시하였고, 세포내 유리 Ca^{2+} 농도의 척도인 fluorescence intensity의 ratio는 high K^+ 용액에 의한 변화에 대한 백분율(%)로 표시하였다. 또한 약물 처치에 의한 긴장도 및 fluorescence ratio의 통계처리 결과는 high K^+ 용액에서의 측정치에 대한 백분율(%)로서 Mean \pm SE로 나타냈으며, 대조군과 약물처리군 간의 차이는 Student's paired *t*-test를 실시하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 간주하였다. 한편 SNP가 수축 단백질에 대한 Ca^{2+} 의 감수성에 미치는 영향은 120 mM K^+ 용액으로 유발된 fluorescence ratio 및 긴장도에 대한 백분율(%)로서 mean \pm SE로 표시하였다.

결 과

INANC 신경전달물질이 긴장도 및 세포내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향

NO가 안정시 및 수축된 회장평활근의 세포내 Ca^{2+} 농도와 긴장도에 미치는 영향은 Fig. 2 및 3에 나타낸 바와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 회장평활근의 외측중추근은 안정시에 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도가 비주기적이기는 하나 일정한 크기의 oscillation을 보였다. NO의 공여물질인 SNP(5×10^{-6} M) 및 SNAP(10^{-5} M)을 안정시 근육에 처치한 결과 두 약물 모두 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도를 감소시켰다. 즉 SNP 및 SNAP은 세포

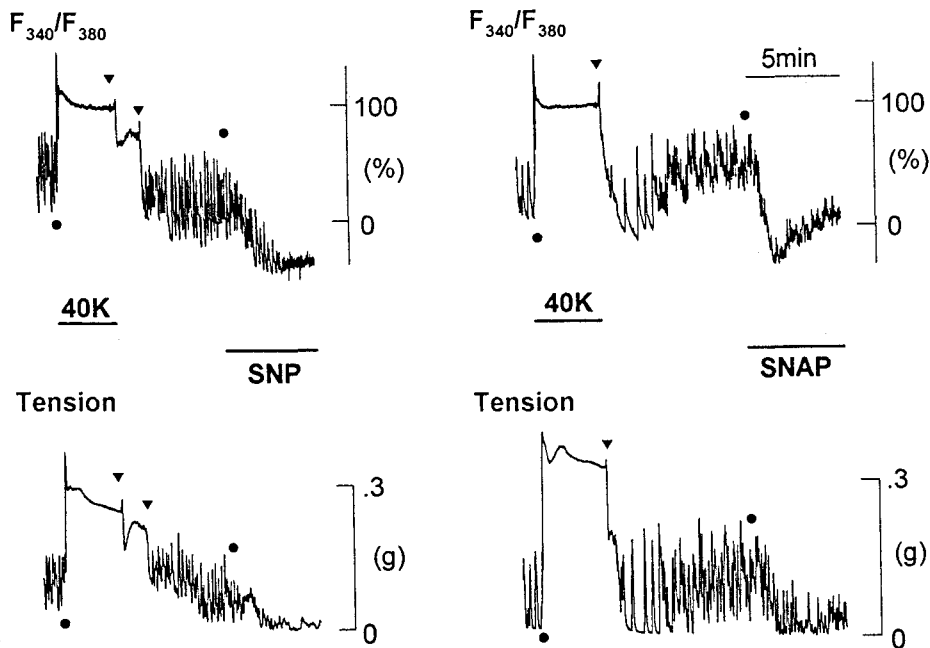


Fig. 2. Effect of sodium nitroprusside(left trace) and s-nitroso-N-acetyl-penicillamine(right trace) on the resting fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} : upper trace) and tension(lower trace). After the changes due to high- K^+ solution(40K:40 mM K^+) were measured the muscle was washed with normal KH solution. Sodium nitroprusside(SNP: 5×10^{-6} M) and s-nitroso-N-acetyl-penicillamine(SNAP: 10^{-6} M) was added to the resting muscle. 100% represents the high K^+ solution-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

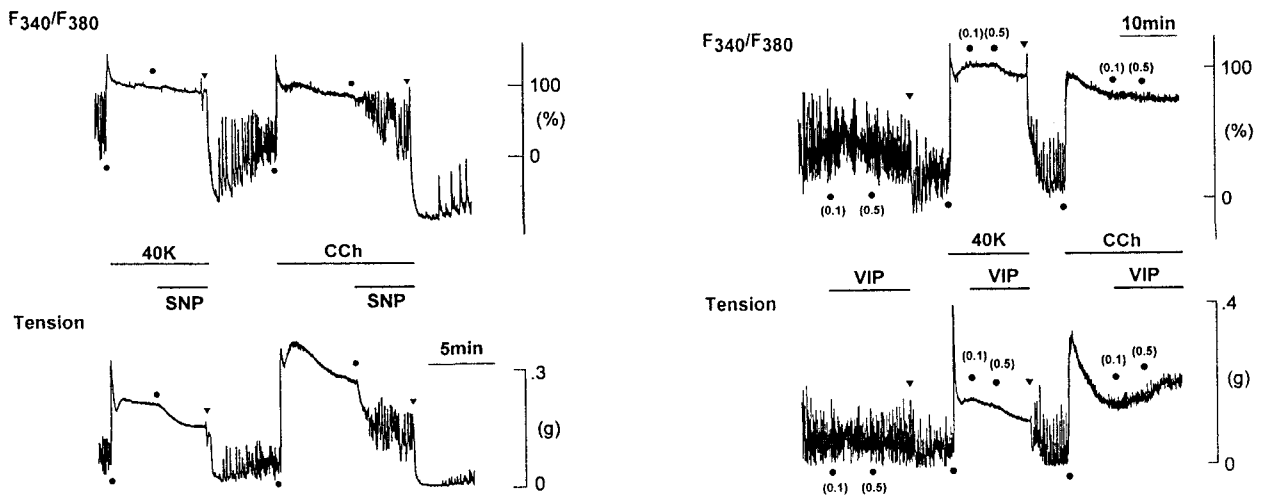


Fig. 3. Effect of sodium nitroprusside on the high K^+ solution- and carbachol-induced fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} :upper trace) and tension(lower trace). 5×10^{-6} M sodium nitroprusside(SNP) was added to the precontracted muscle with high K^+ solution(40K:40mM K^+) and carbachol(CCh: 10^{-6} M), respectively. 100% represents the high K^+ solution-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

Fig. 4. Effect of vasoactive intestinal peptide on the resting, high K^+ solution- and carbachol-induced fluorescence ratio (F_{340}/F_{380} :upper trace) and tension(lower trace). 0.1mM and 0.5 mM vasoactive intestinal peptide(VIP) was added to the resting, high K^+ solution(40K:40 mM K^+)-and carbachol (CCh)-induced precontracted muscle. 100% represents the high K^+ solution-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

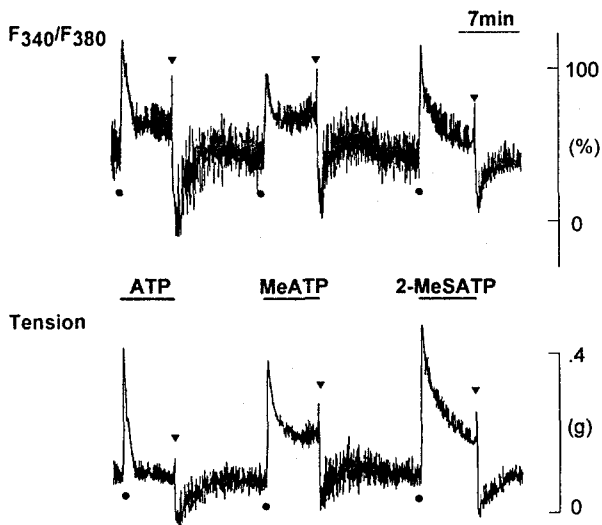


Fig. 5. Effect of adenosine triphosphate, α, β -methylene adenosine 5' triphosphate dilithium, 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium on the resting fluorescence ratio (F_{340}/F_{380} : upper trace) and tension (lower trace). 0.1 mM adenosine triphosphate (ATP), 0.1 mM α, β -methylene adenosine 5 triphosphate dilithium (MeATP) and 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium (2-MeSATP) was added to the resting muscle. 100% represents the high K^+ solution (40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

내 Ca^{2+} 농도를 각각 $41.8 \pm 7.1\%$, $34.8 \pm 6.2\%$ ($n=21$) 감소시키고 ($p < 0.05$), 긴장도의 경우 각각 $30.8 \pm 6.1\%$, $26.7 \pm 4.2\%$ ($n=21$) 정도 감소시켰다 ($p < 0.05$). 또한 SNP 및 SNAP은 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 oscillation 크기도 감소시킴을 알 수 있었다.

Fig. 3은 수축된 근육에서 SNP의 효과를 관찰한 것으로 먼저 high K^+ 용액으로 수축된 근육에서 SNP ($5 \times 10^{-6} M$)는 high K^+ 용액으로 증가된 Ca^{2+} 농도를 거의 변화시키지 않았으나 ($2.2 \pm 2.1\%$) 긴장도는 감소시켰고 ($33.3 \pm 6.4\%$, $n=12$, $p < 0.05$), $10^{-6} M$ 의 CCh로 수축된 근육에서는 증가된 Ca^{2+} 농도 및 긴장도를 현저하게 감소시켰다 ($[Ca^{2+}]_i$: $35.3 \pm 5.9\%$, tension: $62.0 \pm 9.4\%$, $n=12$, $p < 0.05$)을 알 수 있었다. 따라서 SNP 및 SNAP은 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도를 감소시키는 억제성 효과가 있음을 알 수 있었다.

Fig. 4는 안정시 및 수축된 근육에 VIP의 효과를 관찰한 것으로 먼저, 안정시에 VIP 0.1 mM 및 0.5 mM을 각각 투여하였으나 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도는 거의 변화되지 않았다. 또한 high K^+ 용액으로 수축된 근육에서 0.1 mM VIP는 효과가 없었고, 0.5 mM VIP에 의해서만

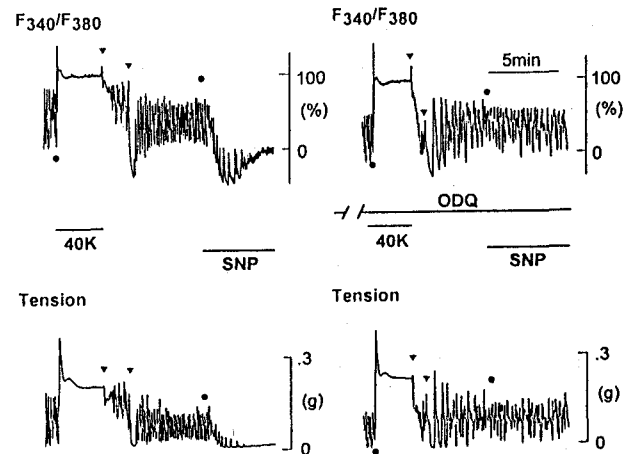


Fig. 6. Effect of 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3,-a]quinoxalin-1-one on the sodium nitroprusside-induced changes of resting fluorescence ratio (F_{340}/F_{380} : upper trace) and tension (lower trace). Sodium nitroprusside (SNP: $5 \times 10^{-6} M$) was added to the resting muscle without (left trace) or with (right trace) 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3,-a]quinoxalin-1-one (ODQ: 1 μM). The muscles were incubated in KH solution containing ODQ for 15 minutes. 100% represents the high K^+ solution (40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

증가된 Ca^{2+} 농도 및 긴장도가 각각 $9.1 \pm 2.3\%$, $21.4 \pm 5.1\%$ ($n=5$) 감소되었다. 그러나 $10^{-6} M$ CCh로 수축된 근육에서 0.1 mM 및 0.5 mM VIP는 아무런 변화를 보이지 않았다.

ATP가 안정시 및 수축된 근육의 세포내 유리 Ca^{2+} 농도와 긴장도에 미치는 영향은 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5는 안정시에 효과를 관찰한 전형적인 실험예로서 0.1 mM ATP, P_{2X} purinoceptor agonist인 MeATP (0.1 mM) 및 P_{2Y} purinoceptor agonist인 2-MeSATP (0.1 mM) 모두 초기에는 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도를 일시적으로 증가시킨 후 감소시켰으며 이후에는 세포내 Ca^{2+} 농도와 긴장도를 안정시보다 높은 상태로 유지시켰다. 이러한 결과는 5번의 실험에서 동일하게 나타났다.

NO에 의한 근육 이완 및 세포내 유리 Ca^{2+} 농도 감소의 기전

Guanylate cyclase의 선택적 억제제가 NO의 억제성 효과에 미치는 영향: Fig. 6은 NO의 억제성 효과가 cGMP 증가에 의한 G-kinase의 활성화를 통해 유발되는 것인지를 규명하기 위해 soluble guanylate cyclase의 선택적 억제제인 ODQ의 효과를 관찰한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 안정시 근육에서 $5 \times 10^{-6} M$ SNP 처치시 세포내 Ca^{2+}

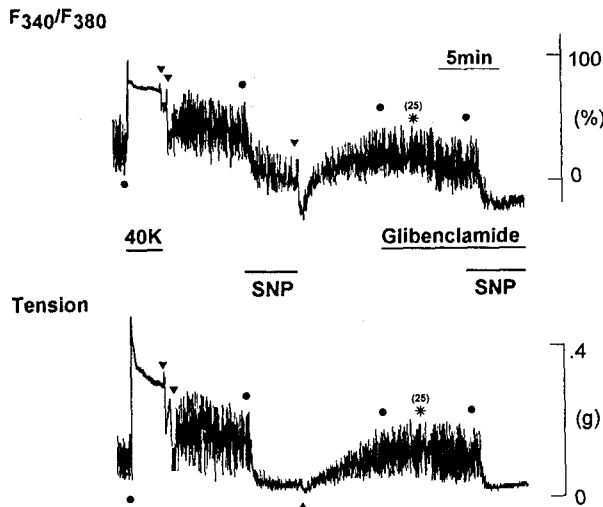


Fig. 7. Effect of glibenclamide on the sodium nitroprusside-induced changes of resting fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} : upper trace) and tension(lower trace). Sodium nitroprusside (SNP: 5×10^{-6} M) was added to the resting muscle without(left trace) or with(right trace) glibenclamide(10μ M). The muscles were incubated in KH solution containing glibenclamide for 30 minutes. 100% represents the high K^+ solution(40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution. Numbers of asterisk(*) represents time (minutes) that measurement of fluorescence was stopped.

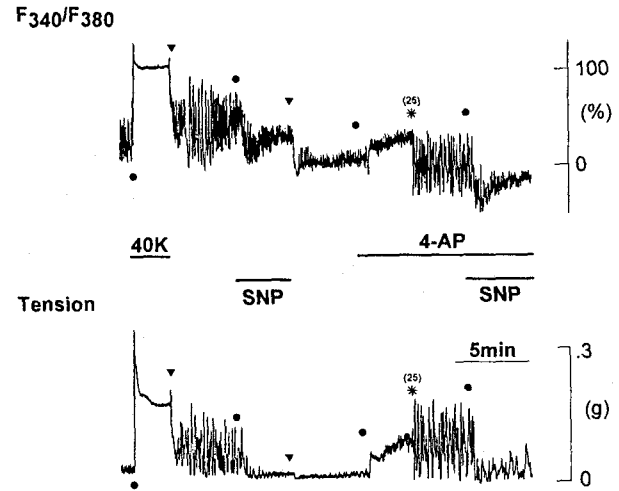


Fig. 8. Effect of 4-aminopyridine on the sodium nitroprusside-induced changes of resting fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} : upper trace) and tension(lower trace). Sodium nitroprusside (SNP: 5×10^{-6} M) was added to the resting muscle without(left trace) or with(right trace) 4-aminopyridine(4-AP:5 mM). The muscles were incubated in KH solution containing 4-AP for 30 minutes. 100% represents the high K^+ solution(40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution. Numbers of asterisk(*) represents time (minutes) that measurement of fluorescence was stopped.

농도는 $50.1 \pm 7.2\%$, 긴장도는 $28.4 \pm 5.1\%$ ($n=7$) 감소되어 억제성 효과가 관찰되었으나, 1μ M ODQ를 15분간 전처리하고 ODQ가 존재하는 상태에서 SNP의 효과를 관찰해 본 결과 SNP의 억제성 효과는 완전히 소실됨($[Ca^{2+}]_i$: $1.2 \pm 1.0\%$, tension: $2.2 \pm 1.1\%$, $n=7$, $p < 0.05$)을 알 수 있었다.

각종 K^+ channel blocker가 NO의 억제성 효과에 미치는 영향: NO에 의한 억제성 효과가 K^+ channel 활성화에 기인하는 것인지를 규명하고자 실험한 결과는 Fig. 7, 8, 9 및 10에 나타내었다.

Fig. 7은 ATP sensitive K^+ channel(K_{ATP})의 차단제인 glibenclamide가 NO의 억제성 효과에 미치는 영향을 관찰한 것으로 10μ M glibenclamide를 30분간 전처리하여도 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도에는 변화가 초래되지 않았다. 또한 glibenclamide가 존재하지 않을 때에 SNP(5×10^{-6} M)에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 감소($[Ca^{2+}]_i$: $40.1 \pm 6.3\%$, tension: $39.1 \pm 5.9\%$, $n=5$)는 10μ M glibenclamide를 30분간 전처리 하였을 경우에도 유사하게($[Ca^{2+}]_i$: $38.9 \pm 6.1\%$, tension: $36.7 \pm 4.9\%$, $n=5$) 나타남을 알 수 있었다.

Fig. 8은 voltage dependent K^+ channel(K_V)의 차단제인

4-AP가 NO의 억제성 효과에 미치는 영향을 관찰한 것으로 5 mM 4-AP를 30분간 전처리시 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도가 다소 증가되었다. 그러나 SNP(5×10^{-6} M)의 억제성 효과($[Ca^{2+}]_i$: $25.8 \pm 9.1\%$, tension: $21 \pm 7.1\%$, $n=5$)는 4-AP가 존재하는 실험조건에서도 유사하게($[Ca^{2+}]_i$: $26.2 \pm 7.4\%$, tension: $23.3 \pm 5.1\%$, $n=5$) 나타남을 알 수 있었다.

Fig. 9는 small conductance K_{Ca} channel의 차단제인 apamin이 NO의 억제성 효과에 미치는 영향을 관찰한 것으로 0.1μ M apamin을 30분간 전처리하여도 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도에는 변화가 초래되지 않았다. 또한 apamin이 존재하지 않을 때에 SNP(5×10^{-6} M)에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 감소($[Ca^{2+}]_i$: $39.3 \pm 6.6\%$, tension: $33.3 \pm 5.9\%$, $n=5$)는 0.1μ M apamin을 30분간 전처리 하였을 경우에도 유사하게($[Ca^{2+}]_i$: $35.7 \pm 5.1\%$, tension: $33.2 \pm 5.9\%$, $n=5$) 나타남을 알 수 있었다.

Fig. 10은 large conductance K_{Ca} channel의 차단제인 iberiotoxin이 NO의 억제성 효과에 미치는 영향을 관찰한 것으로 0.1μ M iberiotoxin을 30분간 전처리시 안정시 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도뿐만 아니라 세포내 Ca^{2+} 농도

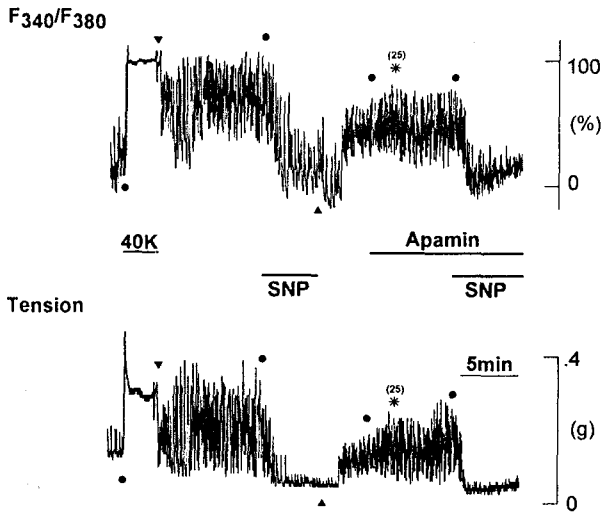


Fig. 9. Effect of apamin on the sodium nitroprusside-induced changes of resting fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} :upper trace) and tension(lower trace). Sodium nitroprusside(SNP: 5×10^{-6} M) was added to the resting muscle without(left trace) or with(right trace) apamin($0.1 \mu\text{M}$). The muscles were incubated in KH solution containing apamin for 30 minutes. 100% represents the high K^+ solution(40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution. Numbers of asterisk(*) represents time(minutes) that measurement of fluorescence was stopped.

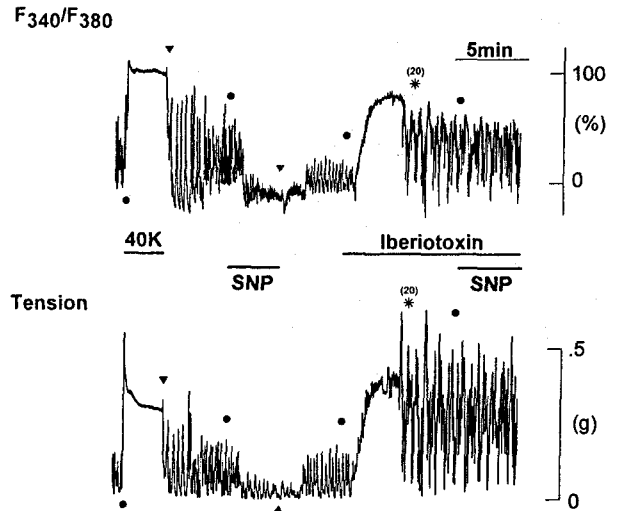


Fig. 10. Effect of iberiotoxin on the sodium nitroprusside-induced changes of resting fluorescence ratio(F_{340}/F_{380} :upper trace) and tension(lower trace). Sodium nitroprusside(SNP: 5×10^{-6} M) was added to the resting muscle without(left trace) or with(right trace) iberiotoxin($0.1 \mu\text{M}$). The muscles were incubated in KH solution containing iberiotoxin for 30 minutes. 100% represents the high K^+ solution(40 mM K^+)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution. Numbers of asterisk(*) represents time(minutes) that measurement of fluorescence was stopped.

및 긴장도의 oscillation 크기 또한 현저히 증가되었다. 그리고 iberiotoxin이 존재하지 않을 때에 SNP(5×10^{-6} M)에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 감소($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $33.3 \pm 5.1\%$, tension: $28.8 \pm 4.7\%$, $n=7$)는 $0.1 \mu\text{M}$ iberiotoxin을 30 분간 전처리 하였을 경우 현저히 소실됨($[\text{Ca}^{2+}]_i$: $3.2 \pm 2.1\%$, tension: $1.1 \pm 0.7\%$, $n=7$, $p < 0.05$)을 알 수 있었다.

각종 Ca^{2+} 이동 억제제가 NO의 억제성 효과에 미치는 영향: NO의 억제성 효과가 K^+ channel 활성화에 따른 과분극으로 인한 Ca^{2+} channel 활성화의 억제에 기인한다면 안정시에 Ca^{2+} channel이 활성화되어 있어야만 한다. 또한, NO가 세포내 Ca^{2+} 농도 감소에 따른 근육의 이완을 유발할 뿐 만 아니라, 세포내 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 oscillation 크기도 감소시키는데 이들을 규명하고자 하였다. 먼저 안정시 회장평활근 세포막에 존재하는 Ca^{2+} channel의 활성을 억제하였을 경우 긴장도와 세포내 유리 Ca^{2+} 농도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. Fig. 11은 4번의 실험결과중 전형적인 것으로서 Ca^{2+} channel blocker인 nifedipine($1 \mu\text{M}$) 과 Ca^{2+} 이 제거된 Ca^{2+} -free KH 용액을 처리하여 Ca^{2+} channel의 활성을 억제한 결과 SNP(5×10^{-6} M)의 효과와 유사하게 안정시 Ca^{2+} 농

도 및 긴장도가 감소하였을 뿐 만 아니라 Ca^{2+} 농도 및 긴장도의 oscillation도 감소되었다. 또한 Fig. 12에서 보는 바와 같이 세포내 농도 및 긴장도의 oscillation이 어떤 기전에 의해 나타나는 것인지를 확인하기 위해 실험하였다. 이러한 효과를 명확히 관찰하기 위해 $0.1 \mu\text{M}$ iberiotoxin을 전처리하여 oscillation의 크기를 증가시킨 다음 SR의 기능을 차단하기 위해 $5 \mu\text{M}$ ryanodine 및 $10 \mu\text{M}$ CPA를 처리시 oscillation이 소실되었고 이런 조건에서 $1 \mu\text{M}$ nifedipine을 처리시 iberiotoxin에 의해 증가된 Ca^{2+} 농도 및 긴장도가 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 실험 결과는 5번의 실험에서 동일하게 나타났다.

NO가 수축단백질의 Ca^{2+} 감수성에 미치는 영향: NO의 억제성 효과중 high K^+ 용액으로 수축된 근육에서 세포내 Ca^{2+} 농도는 거의 변하지 않으나 근육의 이완은 유발됨을 확인할 수 있었다. 따라서 NO가 회장평활근에서 Ca^{2+} 에 대한 수축단백질의 감수성을 감소시키는지 확인하기 위한 실험을 하여 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 10, 20, 40, 80 및 120 mM K^+ 용액에 의한 fluorescence ratio가 0, 26.3 ± 3.6 , 51.4 ± 5.5 , 74.8 ± 4.5 및 100(%; $n=5$)일 때 tension은 0, 21.8 ± 2.9 , 43.1

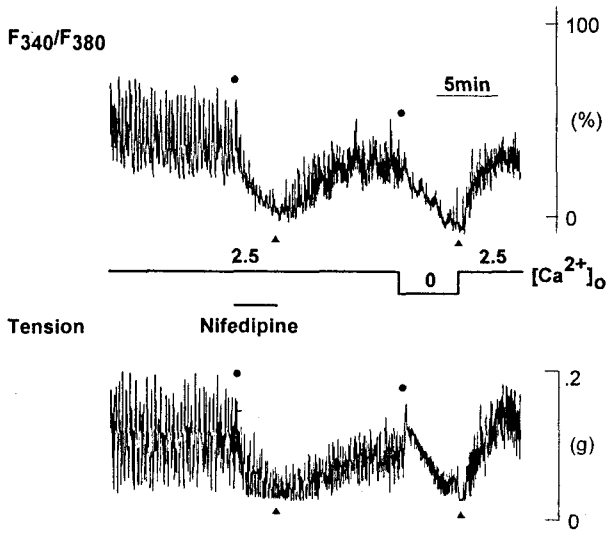


Fig. 11. Effect of nifedipine and elimination of external Ca^{2+} on the resting fluorescence ratio (F_{340}/F_{380} ; upper trace) and tension (lower trace). Nifedipine ($1 \mu M$) was added to the resting muscle in the presence of Ca^{2+} ($2.5 [Ca^{2+}]_o$). After the muscle was washed with normal KH solution, external Ca^{2+} was eliminated. 100% represents the high K^+ solution ($40 mM K^+$)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

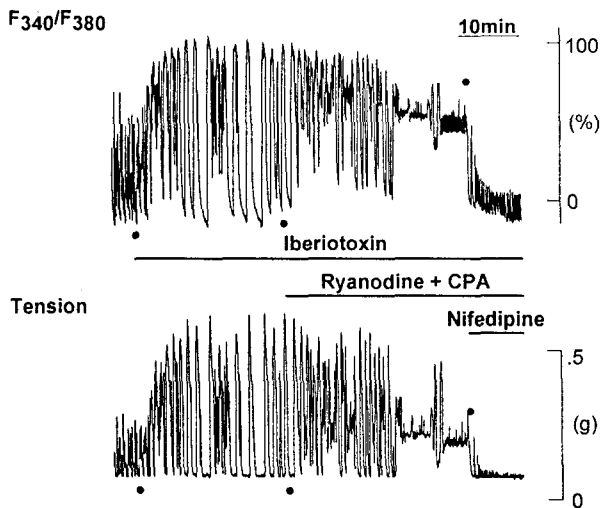


Fig. 12. Effect of ryanodine and cyclopiazonic acid on the resting and oscillatory fluorescence ratio (F_{340}/F_{380} ; upper trace) and tension (lower trace). After the changes due to iberiotoxin ($0.1 \mu M$) were measured ryanodine ($5 \mu M$) and cyclopiazonic acid (CPA: $10 \mu M$) were added to the muscle and then $1 \mu M$ nifedipine was added to the muscle. 100% represents the high K^+ solution ($40 mM K^+$)-induced fluorescence ratio measured before washout with normal solution.

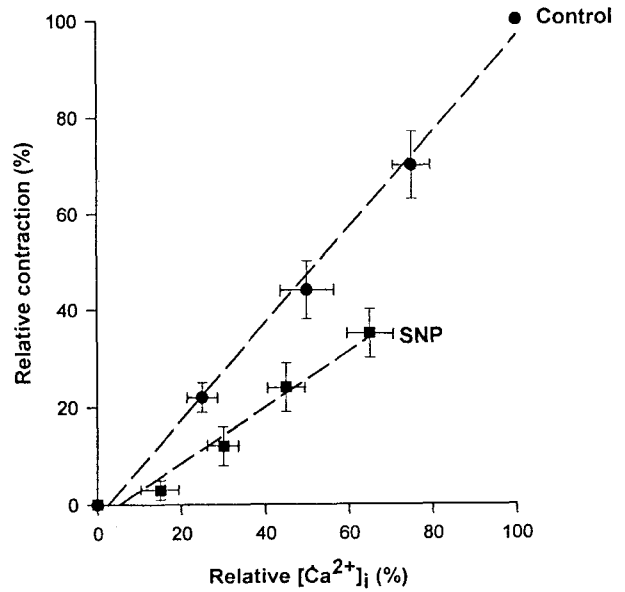


Fig. 13. Fluorescence ratio-tension relationship for high K^+ solution in the absence and presence of sodium nitroprusside. Ordinate: relative contraction, taking $120 mM K^+$ -induced contraction obtained before the cumulative addition of KCl as 100%. Abscissa: relative fluorescence ratio, taking the $120 mM K^+$ -stimulated fluorescence ratio measured before the cumulative addition of KCl as 100%. The concentration of KCl is 10, 20, 40, 80, 120 mM, respectively.

± 5.0 , 70.6 ± 6.6 및 100% ($n=5$)였고, SNP ($5 \times 10^{-6} M$)가 존재하는 실험조건에서는 fluorescence ratio가 0, 16.2 ± 5.7 , 31.4 ± 3.5 , 44.7 ± 4.8 , $64.9 \pm 5.7\%$ ($n=5$)일 때 tension은 0, 4.2 ± 2.5 , 12.7 ± 4.2 , 23.3 ± 5.2 , $35.6 \pm 5.0\%$ ($n=5$)으로서 SNP는 $[Ca^{2+}]_i$ -긴장도 곡선을 아래쪽으로 이동시켜 동일한 세포내 Ca^{2+} 농도에서 긴장도의 크기를 감소시킬 수 있었다 ($p < 0.05$).

고 찰

NANC 신경으로부터 유리되는 신경전달물질중 inhibitory junctional potential을 유발하고 평활근을 이완시키는 전달물질을 iNANC 신경전달물질이라고 명명하고 있으며, 현재 iNANC로부터 유리되는 신경전달물질로는 NO, VIP 및 ATP가 알려져 있다 (Costa & Furness, 1983; Grider et al 1985b; Ohno et al, 1993). 그러나 gastrointestinal tract에서 이들 물질의 상대적인 중요도는 연구자, 실험동물 및 근육종류에 따라 다르게 보고되고 있다 (Sanders & Ward, 1992). 또한 이들 물질에 의한 근육 이완의 기전을

규명하기 위한 대부분의 연구들이 근육의 긴장도에 중요한 역할을 하는 세포내 Ca^{2+} 농도는 측정하지 않고 단순히 장력의 실험결과들로 기전을 추정하고 있다(Jin et al, 1993). 따라서 본 연구에서는 guinea pig 회장평활근에서 세포내 Ca^{2+} 농도와 긴장도를 동시에 측정하여 iNANC 신경전달물질의 본체를 규명하고, iNANC 신경전달물질에 의한 이완의 기전을 규명하고자 하였다.

Guinea pig 회장평활근에서 iNANC 신경전달물질의 본체 규명

NO가 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)로서 처음 밝혀진 이래 많은 조직에서 근육을 이완시키는 억제성 물질로 작용하고 있고, 그 후에 iNANC 신경전달물질로서 역할을 할 것이라 제안되어 졌다(Rand, 1992). NO는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는데 이러한 과정에는 Ca^{2+} 과 reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)가 필요하다. NO가 iNANC 신경전달물질로서 작용을 할 것이라는 실험적 증거로는 많은 보고가 있다(Palmer et al, 1987; Brecht et al, 1990; Thornbury et al, 1991; Iversen et al, 1994). 즉 NANC 신경을 자극할 때 NO가 유리되는 것이 chemiluminescence 방법으로 확인되었고(Iversen et al, 1994), immunohistochemistry 방법으로 enteric neuron에서 NOS의 존재가 증명되어졌으며(Brecht et al, 1990), 외부에서 투여한 NO는 전기자극에 의해 유발되는 억제성 효과를 감소시킨다(Thornbury et al, 1991)는 것이 보고되었다. 또한 NO의 생성을 억제할 경우 lower esophageal sphincter(Tottrup et al, 1991), ileocolonic junction(Boeckxstanes 등, 1990) 및 canine pyloric sphincter(Allescher et al, 1989)등에서 iNANC의 반응이 감소되거나 소실된다는 것이 보고되었다. 따라서 많은 조직에서 NO는 iNANC 신경전달물질로서의 역할을 할 것이라 추측되고 있다. 본 연구에서도 NO donor인 SNP나 SNAP을 guinea pig ileum의 외측중주근에 처치시 안정시 $[Ca^{2+}]_i$ 을 감소시키고 그 결과 긴장도도 감소시키는 억제성 효과가 나타났으며 이러한 효과는 high K^+ 용액이나 CCh로 수축된 근육에서도 동일하게 나타났다. 본 연구에서 전기자극에 의한 NO의 유리를 확인한 것은 아니지만 iNANC 신경전달물질 유리는 최종적으로 근육의 이완을 유발할 것이므로 외부에서 투여한 물질에 의해 근육의 이완이 유발된다면 이러한 결과만으로도 NO가 iNANC 신경전달물질로 작용한다고 말할 수 있으리라 생각된다. 실제 guinea pig ileum의 총 myenteric neuron 중 20%의 신경이 NOS를 함유하고 있다는 것이 보고되었고(Furness et al, 1994), Ivancheva 및 Radomirov(1996)는 guinea pig ileum의 외측중주근에 elec-

trical field stimulation을 가했을 때 근육의 이완이 유발되는데 이러한 이완은 NOS 억제제인 N^G -nitro-L-arginine 투여시 억제되고, 이러한 억제효과는 NOS의 substrate인 L-arginine을 처치시 회복된다는 결과를 보고하였다. 또한 반복적인 transmural electrical stimuli를 guinea pig ileum의 외측중주근에 가했을 때 초기에 빠른 이완 후에 느린 수축이 유발되는데 NOS 억제제인 N^G -monomethyl-L-arginine, N^G -nitro-L-arginine 및 N^G -nitro-L-arginine methyl ester등을 처치하면 초기 이완이 억제될 뿐 아니라 후기 느린 수축이 증가된다는 실험결과가 보고되었다(Osthaus & Galligan, 1992). 따라서 이들의 보고와 본 연구의 결과들을 종합하여 볼 때 NO는 guinea pig ileum에서 myenteric plexus로 부터 유리되어 외측중주근의 $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시켜 근육을 이완시키는 iNANC로 작용할 것이라 추측된다.

VIP는 1980년대에 iNANC 신경전달물질중 가장 적합한 물질로 알려졌고(Allescher et al, 1989) 그 동안 많은 연구가 진행되어 몇몇 조직에서 iNANC 신경전달물질로서의 역할을 증명하는 결과들이 보고되었다. 즉 guinea pig small intestine의 myenteric plexus에서 VIP가 합성된다는 것이 증명되었고(Costa & Furness, 1983), 위 평활근에서 electrical field stimulation에 의해 myenteric neuron으로부터 VIP가 유리되어 내측윤주근을 이완시키는데 이러한 반응은 VIP antiserum에 의해 소실된다는 것이 보고되어(Grider et al, 1985a) iNANC 신경전달물질로서 VIP의 중요성이 인식되어져 왔다. 그러나 본 연구에서는 guinea pig ileum의 외측중주근에 VIP를 외부에서 투여한 경우 high K^+ 용액으로 수축된 근육에서 일부 $[Ca^{2+}]_i$ 감소 및 이완을 유발하였다고 하나 미약하였고 본 실험에서 투여한 VIP는 다른 연구자들(Grider et al, 1985b)에 비해 고농도로 사용되었음을 감안한다면 이러한 이완은 무시될 수 있다고 본다. 또한 VIP투여시 안정시 $[Ca^{2+}]_i$ 및 긴장도는 거의 변화되지 않거나 일부의 실험에서는 오히려 다소 증가되는 경향을 보였다. 본 연구의 결과는 외부에서 투여한 VIP가 guinea pig ileum의 내측윤주근에서 이완을 유발시킨다는 보고(Katsoulis et al, 1992)와는 상반되나 이 보고에서도 VIP는 iNANC 신경전달물질로서 작용하는 것이 아니라 직접 myogenic effect를 통해 이완은 유발시킨다고 추측하여 VIP가 iNANC 신경전달물질로서의 역할은 의문시된다. 또한 guinea pig ileum의 외측중주근에 VIP를 투여하였을 경우 농도 의존적으로 수축이 유발되는데 이는 VIP가 myenteric plexus의 postganglionic nerve fiber로 부터 peptidergic transmitter인 substance P를 유리시켜 일어난 결과로 보고하였다(Katsoulis et al, 1992). 이러한 사실을 종합하여 볼 때 VIP가 guinea pig

ileum의 외측중주근에서 iNANC 신경전달물질로서 작용할 가능성은 미약할 것으로 추측된다.

ATP가 iNANC 신경전달물질로서의 역할을 할 것이라는 것은 1970년대 주장되었다가 최근의 연구에서 실험적인 증거들이 보고되고 있다(Makhlouf & Grider, 1993). 즉, rat ileum, colon 및 anococcygeus muscle의 myenteric plexus에 ATP가 NO와 동시에 존재한다는 것이 보고되었고(Belai & Burnstock, 1994), rat portal vein에서 electrical field stimulation에 의한 근육의 이완이 purinoceptor blocker인 suramin에 의해 억제되며(Brizzolara et al, 1993) rat pyloric sphincter에 ATP를 투여시 근육의 이완이 유발된다는 것이 보고되어(Soediono & Burnstock, 1994) iNANC 신경전달물질로서 ATP의 역할이 재 강조되고 있다. 또한 ATP는 P_{2X} receptor를 통해서는 주로 수축을 그리고 P_{2Y} receptor를 통해서는 이완을 유발한다는 것이 보고되었다(Kennedy, 1990). 그러나 본 연구에서는 ATP, P_{2X} purinoceptor agonist인 α, β -methylene adenosine 5'-triphosphate dilitium 및 P_{2Y} purinoceptor agonist인 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium을 투여하였을 경우 근육의 이완은 유발되지 않고 초기 빠른 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 따른 수축을 동반하고 이후 $[Ca^{2+}]_i$ 와 긴장도가 급격히 감소하였으나 안정시보다는 증가된 상태로 유지되었다. 이러한 결과는 guinea pig ileum에서 ATP가 basal tension은 증가시키고 histamine으로 수축된 근육은 이완시킨다는 보고(Matusak & Bauer, 1988)와 일치하고, guinea pig ileum의 외측중주근에서 ATP, α, β -methylene adenosine 5'-triphosphate dilitium 및 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium이 모두 농도 의존적으로 수축을 유발한다는 보고(Kennedy & Humphrey, 1994)와 잘 일치한다. 또한 ATP에 의한 근육의 이완이 small conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel(small conductance K_{Ca} channel)의 선택적 차단제인 apamin에 의해서 억제된다는 것이 보고되어(He & Goyal, 1993) K^+ channel 활성화에 따른 막전압 과분극에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소가 근육 이완의 기전일 것이라 추측하고 있다. 그러나 본 연구에서는 apamin을 처치하여도 $[Ca^{2+}]_i$ 및 긴장도가 증가되지 않았다. 이것은 guinea pig ileum의 외측중주근에 small conductance K_{Ca} channel이 존재하지 않음을 의미한다. 따라서 guinea pig ileum의 외측중주근에서 iNANC 신경전달물질로서 ATP의 역할은 미약할 것으로 추측된다.

한편, 본 연구의 결과로 볼 때 NO가 guinea pig ileum의 외측중주근에서 iNANC 신경전달물질로 가장 중요하게 작용할 것이라 추측되나 본 연구는 외부에서 투여한 물질에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 및 이완의 효과를 관찰한 것이기 때문에 전기자극을 실시할 경우 NO 이외의 신경전달물질이

중요한 역할을 할 가능성을 배제할 수는 없다. 즉 최근의 연구결과를 볼 때 전기자극시 VIP가 NO의 유리를 증가시킨다든지, NO와 ATP가 상호 작용을 한다는 보고가 있다(Makhlouf & Grider, 1993). 따라서 guinea pig ileum의 외측중주근에서 이들 물질간의 상호 작용은 더욱 더 규명되어야 할 과제이다.

NO에 의한 근육의 이완 기전

NO가 EDRF의 본체로 규명된 이래 NO에 의한 이완의 기전을 규명하기 위한 연구는 각 신호전달체계의 단계를 억제하는 억제제를 사용한 긴장도 실험으로 혈관 평활근을 중심으로 활발히 진행되어 많은 부분이 밝혀졌다. 이러한 연구결과는 iNANC 신경전달물질로 작용하는 NO의 기전을 규명하는데 기초가 되었고, 위-장관계에서도 NO에 의한 이완 기전은 혈관평활근에서와 유사하다는 사실이 밝혀졌다. 그러나 NO에 의한 이완의 기전을 명확히 규명하기 위해서는 긴장도에 중요한 인자인 $[Ca^{2+}]_i$ 를 긴장도와 동시에 측정해야 할 필요성이 있다.

NO에 의한 이완은 거의 G-kinase의 활성화에 따른 K^+ channel의 활성화에 따라 발생하는 세포막의 과분극으로 인한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소나 수축단백질의 Ca^{2+} 에 대한 감수성의 감소에 기인한다(Kume et al, 1989; Lincoln et al, 1990). 본 연구에서도 NO 공여물질인 SNP를 처치시 $[Ca^{2+}]_i$ 감소에 따른 근육의 이완이 유발됨을 확인할 수 있었다. 이러한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소가 G-kinase를 통해서 유발되는 것인지를 확인하기 위해 soluble guanylate cyclase의 선택적 억제제인 ODQ(Cellek et al, 1996)를 전처리 하여 SNP의 효과를 관찰해 본 결과 SNP의 억제성 효과가 완전히 소실됨을 관찰할 수 있었다. 또한 G-kinase 활성화에 따른 $[Ca^{2+}]_i$ 감소가 K^+ channel의 활성화에 기인하는 것인지를 확인한 결과 SNP의 억제성 효과는 ATP-sensitive K^+ channel, voltage-dependent K^+ channel 및 small conductance K_{Ca} channel의 선택적 억제제에는 영향을 받지 않았으나 large conductance K_{Ca} channel의 선택적 억제제인 iberiotoxin에 의해 소실됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 SNP에 의한 G-kinase의 활성화는 large conductance K_{Ca} channel을 활성화 시켜 세포막을 과분극 시키고 이로 인해 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입이 억제될 것으로 추측된다. 만일 이러한 NO에 의한 억제성 효과의 기전이 사실이라면 안정시에도 세포막에 존재하는 Ca^{2+} channel이 활성화되어 있어야 되는데, 본 연구에서 Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine을 처치하거나 외부 Ca^{2+} 농도를 제거하였을 경우 SNP에 의한 억제성 효과와 유사하게 $[Ca^{2+}]_i$ 와 긴장도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소는 G-kinase 활성화에 따른 large

conductance K_{Ca} channel의 활성화로 세포막이 과분극되고 이로 인해 세포막에 존재하는 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 유입이 억제되어 일어난 것으로 추측된다. 그러나 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소는 sarcoplasmic Ca^{2+} ATPase를 활성화에 의한 Ca^{2+} uptake의 촉진(Rashatwar et al, 1987), plasmalemmal Ca^{2+} ATPase 나 Na^+/Ca^{2+} exchange의 활성화를 통한 Ca^{2+} 유출의 활성화(Furukawa et al, 1991)등에 기인할 수도 있으므로 NO에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 감소의 다양한 기전은 더욱 더 규명해야 할 필요성이 있다.

한편 본 연구에서는 NO가 안정시 $[Ca^{2+}]_i$ 및 긴장도를 감소시키는 외에 $[Ca^{2+}]_i$ 및 긴장도의 oscillation 크기 또한 감소시키는데 이는 세포막을 통한 Ca^{2+} 유입의 감소에 따른 SR내 이용 가능한 Ca^{2+} 의 감소에 기인하는 것으로 사료된다. 즉, nifedipine이나 외부 Ca^{2+} 제거시 oscillation의 크기가 감소하였을 뿐 만 아니라 SR의 Ca^{2+} release channel을 활성화 상태로 고정시키는 ryanodine과 SR의 Ca^{2+} pump를 억제시키는 CPA 처치시 oscillation의 크기가 감소하는 것을 본 연구에서 확인할 수 있었다.

NO에 의해 G-kinase가 활성화되었을 때 수축단백질의 Ca^{2+} 에 대한 감수성의 변화가 초래될 수 있다(Kume et al, 1989; Lincoln et al, 1990). 본 연구에서도 high K^+ 용액으로 수축된 근육에서 SNP를 처치하였을 경우 $[Ca^{2+}]_i$ 는 감소되지 않고 긴장도만 감소되어 NO가 수축단백질의 Ca^{2+} 에 대한 감수성을 감소시킬 것이라 추측할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 실험한 결과 동일한 $[Ca^{2+}]_i$ 농도에서도 SNP가 존재할 때 high K^+ 용액으로 유발되는 긴장도의 크기가 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 NO에 의해 G-kinase가 활성화되었을 때 수축단백질의 Ca^{2+} 에 대한 감수성 감소가 근육 이완에 하나의 기전으로 작용할 것이라 추측된다. 그러나 Ca^{2+} 에 대한 감수성 감소가 어떤 기전에 의해서 야기되는 것인지는 본 연구에서 규명되지 못하였고 이는 추후에 규명되어야 할 과제라 생각된다.

따라서 guinea pig ileum의 외측종주근에서 iNANC 신경전달물질의 본체는 NO인 것으로 추정되고 NO에 의한 근 이완의 기전은 세포내 Ca^{2+} 농도 감소와 Ca^{2+} 에 대한 수축단백질의 감수성 감소인 것으로 생각된다. 또한 NO에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 감소는 G-kinase 활성화로 인한 large conductance K_{Ca} channel의 활성화에 따른 Ca^{2+} 유입의 억제에 의한 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 "1996년도 교육부 지원 기초의학 학술연구

조성비(과제번호 140)"에 의해 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- Allescher H, Daniel E, Dent J, Fox J. Inhibitory function of VIP/PHI and galanin in the canine pylorus. *Am J Physiol* 256: G789-G797, 1989
- Bartho L, Holzer P, Donnerer J, Lembeck F. Evidence for the involvement of substance P in the atropine-resistant peristalsis of the guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 32: 69-74, 1982
- Belai A, Burnstock G. Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic(NANC) inhibitory neurons in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle. *Cell Tissue Res* 278: 197-200, 1994
- Boeckxstanes G, Pelckmans P, Bult H, De Man J, Herman A, Van Mearcke Y. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur J Pharmacol* 190: 239-246, 1990
- Bredt DS, Paul MH, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770, 1990
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11, 1992
- Brizzolara AL, Crowe R, Burnstock G. Evidence for the involvement of both ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in the rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* 109: 606-608, 1993
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature* 200: 581-582, 1963
- Burnstock G, Campbell G, Rand MJ. The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum. *J Physiol* 182: 504-526, 1966
- Cellek SC, Kasakov L, Moncada S. Inhibition of nitrergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 118: 137-140, 1996
- Costa M, Furness JB. The origins, pathways and terminations of neurons with vip-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 8: 665-676, 1983
- Costa M, Furness JB. Structure and neurochemical organization of the enteric nervous system. In Makhlof GM, ed. Handbook of physiology, section 6. Gastrointestinal physiology, vol 2. Washington DC. *Am Physiological Society* pp97-109, 1989
- Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 351: 477-479, 1991

- Furness JB, Li ZS, Young HM, Forstermann U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res* 277: 139–149, 1994
- Furukawa K, Oshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266: 12337–12341, 1991
- Gabella G. Special muscle cells and their innervation in the mammalian small intestine. *Cell Tissue Res* 153: 63–77, 1974
- Grider JR. Tachykinin as transmitter of ascending contractile component of the peristaltic reflex. *Am J Physiol* 257: G709–G714, 1989
- Grider JR, Cable MB, Bitar KN, Said SI, Makhlof GM. Vasoactive intestinal peptide: relaxant neurotransmitter in taenia coli of the guinea pig. *Gastroenterology* 89: 36–42, 1985a
- Grider JR, Cable MB, Said SI, Makhlof GM. Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *Am J Physiol* 248: G73–G78, 1985b
- Grider JR, Makhlof GM. Colonic peristaltic reflex: identification of VIP as mediator of descending relaxation. *Am J Physiol* 251: G40–G45, 1986
- He XD, Goyal RK. Nitric oxide is involved in the peptide VIP associated inhibitory junction potential in the guinea pig ileum. *J Physiol* 461: 485–499, 1993
- Hoyle CHV, Burnstock G. Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In: handbook of Physiology, The Gastrointestinal System. Motility and Circulation. *Bethesda MD, Am Physiol Soc* 1: 435–464, 1989
- Ivancheva C, Radomirov R. Met-enkephalin-dependent nitric oxide mediated relaxation in the guinea pig ileum. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18: 521–525, 1996
- Iversen HH, Wiklund NP, Gustafsson LE. Nitric oxide-like activity in guinea pig colon as determined by effector responses, bioassay and chemiluminescence analysis. *Acta Physiol Scand* 152: 315–322, 1994
- Jin JG, Murphy KS, Grider JR, Makhlof GM. Activation of distinct cAMP- and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol* 264: G470–G477, 1993
- Katsoulis S, Schmidt WE, Clemens A, Schworer H, Creutzfeldt W. Vasoactive intestinal polypeptide induces neurogenic contraction of guinea-pig ileum. Involvement of acetylcholine and substance P. *Regul Pept* 38: 155–164, 1992
- Kennedy C. P₁- and P₂-Purinoceptor Subtypes-An Update. *Arch Int Pharmacodyn* 303: 30–50, 1990
- Kennedy I, Humphrey PPA. Evidence for the presence of two types of P₂ purinoceptor in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Eur J Pharmacol* 261: 273–280, 1994
- Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T. Regulation of Ca^{2+} dependent K^+ channel activity in tracheal myocytes phosphorylation. *Nature* 341: 152–154, 1989
- Lincoln TM, Cornwell TN, Taylor AE. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 258: C399–C407, 1990
- Markhlouf GM, Grider JR. Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitters of the gut. *NIPS* 8: 195–199, 1993
- Matusak O, Bauer V. Action of histamine on nerve mediated responses of the guinea-pig ileum. *Agents Actions* 23: 244–246, 1988
- Murphy KS, Severi C, Grider JR, Makhlof GM. Inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate(InsP_3)-dependent Ca^{2+} mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol* 264: G967–G974, 1993a
- Murphy KS, Zhang KM, Jin JG, Grider JR, Makhlof GM. VIP-mediated G protein-coupled Ca^{2+} influx activates a constitutive NO synthase in dispersed gastric muscle cells. *Am J Physiol* 265: G660–G671, 1993b
- Ohno N, Ito KM, Yamamoto Y, Suzuki H. Suramin electively inhibits the non-adrenergic inhibitory junction potential in the guinea-pig stomach. *Eur J Pharmacol* 249: 121–123, 1993
- Osthaus LE, Galligan JJ. Antagonists of nitric oxide synthase inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 140–145, 1992
- Ozaki H, Randel JS, David PB, Nelson GP, Sansers KM. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic Ca^{2+} , and tension in intact smooth muscles. *Am J Physiol* 260: C917–C925, 1991
- Palmer RMJ, AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526, 1987
- Rand M. Nitroergic transmission: Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 147–169, 1992
- Rashatwar SS, Cornwell TN, Lincoln TM. Effect of 8-bromo cGMP on Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca^{2+} ATPase regulation by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5685–5689, 1987
- Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmitter. *Am J Physiol* 262: G379–G392, 1992

- Soediono P, Burnstock G. Contribution of ATP and nitric oxide to NANC inhibitory transmission in rat pyloric sphincter. *Br J Pharmacol* 113: 681–686, 1994
- Supattapone S, Danoff SK, Theibert A, Joseph SK, Steiner J, Snyder SH. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8747–8750, 1988
- Szurszewski JH. Electrical basis for gastrointestinal motility. In Johnson IR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd ed. *New York, Raven Press* pp383–422, 1987
- Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM. Nitric oxide and nitrocytosteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 261: G553–G557, 1991
- Tottrup A, Knudsen M, Gregersen H. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in relaxation of the opossum lower esophageal sphincter. *Br J Pharmacol* 104: 113–116, 1991
-