Korean J Physiol Pharmacol
Vol 1: 303-313, June, 1997

개 하부식도괄약근의 비아드레날린성, 비콜린성 이완반응에 있어서 Cyclic Nucleotide의 역할

김 영 태 · 임 병 용

부산대학교 의과대학 약리학교실

Regulatory Role of Cyclic Nucleotides in Non-Adrenergic Non-Cholinergic Relaxation of Lower Esophageal Sphincter from Dogs. **Young Tae Kim and Byung Yong Rhim** Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan 602-739, Korea

The role of the lower esophageal sphincter(LES) is characterized by the ability to maintain tone and to relax allowing the passage of a bolus. It is known that LES relaxation during swallowing may be induced by the cessation of the tonic neural excitation and the activation of non-adrenergic, non-cholinergic(NANC) inhibitory neurons. Furthermore, it is generally accepted that the relaxation of the smooth muscle is mediated primarily by the elaboration of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate(cyclic AMP) and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(cyclic GMP) via activation of adenylate cyclase and guanylate cyclase, respectively. It is thus possible that cyclic nucleotides might be a second messenger involved in neural stimulation-induced relaxation of LES, although a relationship between relaxation and changes in cyclic nucleotides after neural stimulation has not been established. The present study was performed to define the participation of cyclic nucleotides in the relaxation of LES of dog in response to neural stimulation. Electrical field stimulation(EFS) caused relaxation of the canine isolated LES strips in a frequency-dependent manner, which was eliminated by pretreatment with tetrodotoxin(1 μM), but not by atropine(100 μM), guanethidine(100 μM) and indomethacin(10 μM). The nitric oxide synthase inhibitors, N^G-nitro-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine methyl ester and N^G-monomethyl-L-arginine inhibited EFS-induced relaxation. Additions of sodium nitroprusside, a nitrovasodilator and forskolin, a direct adenylate cyclase stimulant, caused a dose-dependent relaxation of LES smooth muscle. Effects of sodium nitroprusside and forskolin were selectively blocked by the corresponding inhibitors, methylene blue for guanylate cyclase and N-ethylmaleimide(NEM) for adenylate cyclase, respectively. Dibutyryl cyclic AMP and dibutyryl cyclic GMP caused a concentration-dependent relaxation of the LES smooth muscle tone, which was not blocked by NEM or methylene blue, respectively. However, both NEM and methylene blue caused significant antagonism of the relaxation in LES tone in response to EFS. EFS increased the tissue cyclic GMP content by 124%, whereas it did not affect the tissue level of cyclic AMP. Based on these results, it is suggested that one of the components of canine LES smooth muscle relaxation in response to neural stimulation is mediated by an increase of cyclic GMP via the activation of guanylate cyclase. Additionally, an activation of cyclic AMP generation system was, in part, involved in the EFS-induced relaxation.

Key Words: Lower esophageal sphincter, Cyclic AMP, Cyclic GMP, Non-adrenergic non-cholinergic relaxation, Nitric oxide

서 론

하부식도괄약근(lower esophageal sphincter, LES)은 식도와 위를 연결하는 식도의 최하부위로 생체에서는 위의 기저부보다 훨씬 높은 압력을 유지함으로써 위 내용물이 식도로 역류하는 것을 방지하며, 음식물이 이 부위를 통과할 때에는 이완함으로써 식도로 부터 위로의 음식물 이송을 용이하게 하는 특성을 가지고 있다(Biancani et al, 1982). LES의 이완 기전으로서 근성 기전(Goyal & Rattan,

책임저자 : 임병용, ㉾ 602-739 부산시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 의과대학 약리학교실

1976), 긴장성 신경흥분(tonic neural excitation)의 억제(Miolan & Roman, 1987) 및 비아드레날린성 비콜린성(non-adrenergic non-cholinergic, NANC) 신경세포의 활성화(Goyal & Rattan, 1975) 등이 널리 알려져 있다. 뿐만 아니라 대부분 동물의 LES는 특징적으로 전기자극을 가하였을 때 이완하는 특성을 가지고 있음(Christensen, 1970)이 일찌기 알려짐으로써 LES의 이완에 NANC 신경매개에 의한 이완 기전이 크게 중요시되고 있다.

위장관 운동의 이완 기전에 관여하는 주된 억제성 신경전달계로서는 NANC 신경계가 중요한 역할을 함은 주지하는 바이다(Burnstock & Costa, 1973; Burnstock, 1981). 이러한 NANC 신경섬유가 LES에도 존재함이 증명되었고(Abrahamsson, 1986), 이의 흥분에 의하여 LES가 이완된다고 알려져 있다. NANC 신경계를 매개하는 신경전달물질로는 vasoactive intestinal polypeptide(VIP, Alumets et al, 1979; Bitar & Makhlouf, 1982; Zimmerman et al, 1989), ATP(Burnstock et al, 1978; Burnstock, 1979; Bitar & Makhlouf, 1982; Frew & Lundy, 1982), calcitonin gene-related peptide (CGRP, Rattan et al, 1988) 및 nitric oxide(NO, 한상영과 문한규, 1994) 등이 광범위하게 열거되고 있다. 또한 개의 회맹장 연결부(ileocecal junction)의 NANC 억제성 신경전달 물질로서 γ-aminobutylic acid (GABA, Burnstock, 1986)가 관여한다고 보고된 바도 있다. 그러나 아직까지 LES에 있어서 억제성 NANC 신경전달물질의 정확한 정체에 대하여는 논란의 여지가 많다.

한편 평활근의 이완반응은 일차적으로 adenylate cyclase와 guanylate cyclase의 활성화의 증가에 따른 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate(cyclic AMP)와 guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(cyclic GMP) 등 nucleotide의 증가에 의하여 매개된다는 점은 익히 알려져 있다(Janis & Diamond, 1979; Kukovetz et al, 1981; Ohlstein & Berkowitz, 1985; Murad, 1986). 따라서 cyclic nucleotide가 여러 종의 평활근에서 여러 가지 작용기전이 다른 이완 약물에 의한 이완반응에 대하여 세포내 2차 전달물질로서 역할을 한다는 것은 정설로 인정되고 있다.

근래에 Torphy 등(1986)은 LES 조직의 전기자극이나 VIP에 의한 이완반응에서 cyclic nucleotide의 관련성에 관하여 관찰하여 이러한 이완반응과 조직내 cyclic AMP와 cyclic GMP 등 cyclic nucleotide의 생성 정도는 서로 일치하지 않는다고 보고하였다. 나아가 Moummi & Rattan (1988)은 opposum의 내항문 괄약근을 이용한 실험에서 전기자극에 의한 이완반응에 cyclic GMP가 관련됨을 보고하였다. 한편, 한과 문(1994)은 전기자극에 의한 개의 LES의 이완반응을 관찰하였고, NANC 신경의 흥분에 의하여 억제성 신경전달 물질인 NO가 생성되고 이의 매개에 의하여 이러한 이완반응이 일어남을 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 개의 LES의 이완반응에 대한 cyclic nucleotide 관련 약물들의 작용을 검색하고 나아가 cyclic AMP 및 cyclic GMP의 생성의 변동을 관찰하여 LES의 운동성 조절 특히 NANC 이완반응에 있어서의 cyclic nucleotide의 역할을 밝히고자 하였다.

실험재료 및 방법

근 장력의 측정

체중 5~15 kg의 잡종개를 암수 구별없이 사용하였다. 실험 전날부터 24시간 금식시킨 후 후두부를 강타하고 경동맥을 절개하여 출혈사시킨 후 흉부 및 복강 정중선을 절개하여 복강을 노출시키고 식도 및 위를 적출하였다. 적출한 식도 및 위를 위의 소만곡(lesser curvature)에 따라 절개하여 위 내용물을 씻은 후 95% O_2-5% CO_2를 포화시킨 생리적 영양액(physiological salt solution, PSS)이 담긴 왁스 그릇에 핀으로 고정한 후 내층의 점막층 및 외층의 장막층을 실체 현미경하에서 미세 수술기구로서 조심스럽게 제거하였다. LES는 식도와 위의 접합부의 8~12 mm 두께의 비후부(thickened circular smooth muscle)로서 동정한 후 윤상근 표본(길이 10~15 mm, 폭 2 mm)을 만들고 이 조직 표본을 PSS가 담긴 4 ml 용량의 근실(muscle chamber)에 설치한 백금 전극 사이에 현수하였다. 이때 조직의 한쪽 끝은 근실의 바닥에 장치된 고리에 고정하고 다른쪽 끝은 force displacement transducer(FT03, Grass)에 연결하고 2 g의 기본 장력을 가한 후 120분 동안 평형을 유지하였다. 근실내의 온도는 37°C로 유지하였고, 95% O_2-5% CO_2를 공급하였으며 매 15분마다 신선한 PSS로 바꾸어 주었다. Force-displacement transducer에 의하여 측정된 장력은 Polygraph(7E, Grass)에 기록하였다. 본 실험에서 사용하는 PSS는 NaCl 130, KCl 4.7, NaH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.17, $CaCl_2$ 1.5, $NaHCO_3$ 14.9 및 dextrose 5.5 mM이고 95% O_2-5% CO_2로 포화시키며 37 °C에서의 pH는 7.4로 보정하였다. 아드레날린성과 콜린성 신경 전달물질의 매개를 배제하기 위하여 atropine(1 μM)과 guanethidine(5 μM), prostaglandin의 관련성을 배제하기 위하여는 indomethacin 0.5 μM을 PSS에 첨가하여 사용하였다. 전기자극은 stimulator(Narco Bio-Systems, SI-10)을 사용하여 field stimulation법으로 가하였고 supramaximal voltage에서 2 msec duration으로 자극 빈도를 변동시키면서 2분 간격으로 5초간 자극하였다. 각종 전처치 약물은 전기자극 10~20분전에 전처치하였다.

Cyclic nucleotide의 측정

LES 조직의 cyclic AMP 및 cyclic GMP의 추출: LES 조직 절편을 근실에서 장력을 측정할 때와 동일한 방법으로 2시간 동안 평형을 유지시켰다. 평형기간 후 약물을 투여하고 전기자극을 가한 후 조직을 즉시 액체 질소통에 옮겨 반응을 정지시켰다. 냉동조직을 냉 6% trichloroacetic acid(10배 용량)를 가하고 4°C에서 Polytron homogenizer(Brinkmann)로 마쇄하여 10 % w/v의 균질액을 만들었다. 마쇄 조직을 4°C에서 2000 ×g로 15분간 원심분리시키고 상등액을 취하였다. 상등액을 5배의 water saturated diethyl ether를 사용하여 4번 씻고 상층부의 ether 층은 매번 제거하여 남아있는 액체 상태의 extract를 60°C에서 lyophilize시켰다. 이를 cyclic AMP와 cyclic GMP 분석전에 적절한 양의 assay buffer를 이용하여 용해시켰다.

cyclic AMP의 측정: Sample 500 μl에 acetic anhydride와 triethylamine을 1 : 2로 혼합한 acetylation reagent 25 μl를 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 100 μl를 취하여 [^{125}I]cyclic AMP와 antiserum을 각각 100 μl를 첨가하여 parafilm으로 tube를 봉하여 잘 혼합한 뒤 4°C 15~18시간 동안 incubate하였다. 이후 second antibody reagent 500 μl를 첨가하여 진탕하여 균질한 진탕액을 만든 후 실온에서 10분동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellets을 얻어 gamma scintillation counter(Packard, TriCarb)로 1분간 radioactivity를 측정하였다.

cyclic GMP의 측정: Sample 500 μl에 acetic anhydride와 triethylamine을 1 : 2로 혼합한 acetylation reagent 25 ul를 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 100 μl를 취하여 antiserum 100 μl를 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 한시간 incubate하였다. [^{125}I]cyclic GMP를 100 μl를 넣은 후 tube를 봉하여 잘 혼합한 뒤 4°C에서 15~18시간 동안 incubate하였다. Second antibody reagent 500 μl를 첨가하여 진탕한 후 실온에서 10분간 방치한 후 1,500 × g 이상에서 10분동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellets를 얻어 gamma scintillation counter(Packard, TriCarb)로 1분간 radioactivity를 측정하였다.

단백측정: 조직의 단백함량은 Bradford(1976)가 사용한 방법에 따라 protein assay kit(Bio-Rad)를 사용하여 측정하였고, 조직내 cyclic AMP와 cyclic GMP의 함량은 각각 pmoles/mg protein 및 fmoles/mg protein으로 표시하였다.

사용약물

Tetrodotoxin, guanethidine, atropine, indomethacin, N-ethylmaleimide(NEM), methylene blue, N^6,2'-O-dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate(dBcAMP) and N^2,2'-O-dibutyrylguanosine 3',5'-cyclic monophosphate(dBcGMP), soduim nitroprusside, forskolin, N^G-nitro-L-arginine(L-NNA), N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) 및 N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) 등은 Sigma Chemical Co.로 부터 구입하였다. 모든 시약들을 증류수로 희석하여 stock 용액을 만들었다. DBcAMP와 dBcGMP 희석시에는 0.2% bovine serum albumin을 첨가하여 희석 사용하였다.

통계처리

모든 실험치는 평균치±평균치의 표준오차로 표시하였고, 두 군사이의 유의성은 Student's t-test로 검정하여 P값이 0.05 이하인 것을 유의하다고 판정하였다.

실 험 결 과

LES의 자발적 긴장도의 발생

LES 조직을 근실에 현수하여 평형을 유지시킨 2시간 동안 시간이 경과함에 따라 자발적으로 근의 긴장도가 증가하였다. 이러한 자발적인 긴장도는 조직을 현수한 후 15분 경에 증가하기 시작하여 2시간 동안 지속적으로 증가하여 2시간 동안의 평형유지 시간 중에 평균 3.6 g 증가하였다(Fig. 1).

전기 자극에 의한 이완 반응의 특성

개의 LES 표본을 매달고 근 긴장도가 증가된 상태에서 전기 자극하였을 때 자극 빈도(frequency)에 의존하여 이완 반응이 야기되었다(Fig. 2). 10 Hz의 전기자극에 의하여 거의 조직 현수 직후의 자발적인 긴장도의 증가전 기저치 정도로 이완시켰다(>90%). Fig. 3에서 보는 바와 같이 전기자극에 의한 이완반응은 atropine을 100 μM까지 용량을 증가하여 전처치하여도 영향을 받지 아니하였고, guanethidine(100 μM)을 전처치하였을 때에도 영향을 받지 아니하였다. 뿐만 아니라 prostaglandin 생합성에 관여하는 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin(10 μM)의 전처치에 의하여도 영향을 받지 아니하였다(Fig. 3). 이상의 결과로 보아 개의 LES에서 전기자극에 의한 이완반응은 NANC 신경의 흥분에 의하여 매개됨을 알 수 있었고 또한 억제성 prostaglandin의 생성이 관여하지 않음을 확인하였다. 따라서 이 이후의 모든 실험에서는 아드레날린성 및 콜린성 신경섬유의 매개와 prostaglandin의 간섭을 배제하기 위하여 atropine(1 μM), guanethidine(5 μM) 및 indomethacin(0.5 μM)이 함유된 PSS를 사용하였다.

한편 tetrodotoxin(1 μM)을 전처치하였을 때에는 전기자극에 의한 이완반응이 거의 완전하게 소실되었다(Fig.

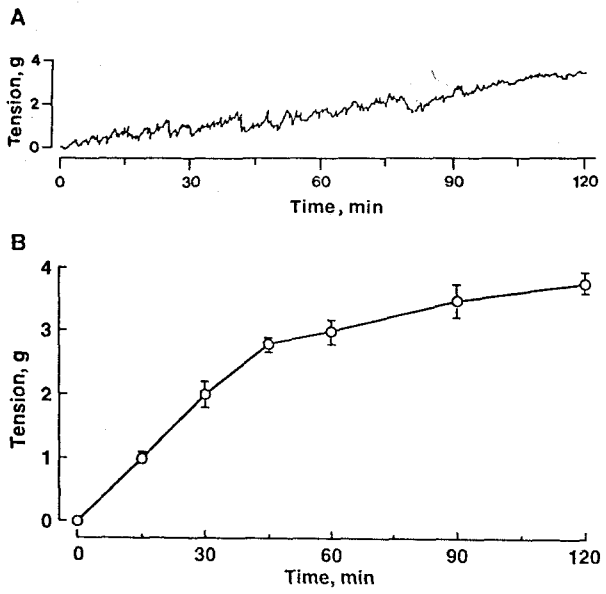

Fig. 1. Resting tension development of isolated canine lower sphincter (LES) strips. A: Representative tracing shows time course of tension development during 120-min equilibration period. B: Time cource of mean tension development. Each point represents mean±S.E.M. from 27 experiments. The strips were initially stretched 2 g of resting tension to bring it near conditions of optimal tension development.

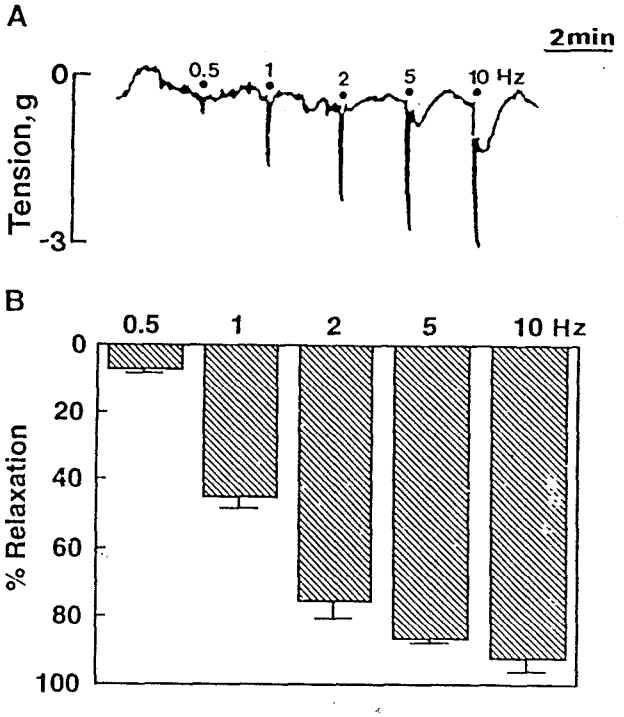

Fig. 2. Frequency-dependent relaxation of LES to EFS. A. Actual recording from typical experiments showing fall in resting of LES smooth muscle in response to stepwise increase in frequency from 0.5 to 10 Hz. B. Frequency-dependent responses were obtained from 8 different animals. All data are expressed as means±S.E.M. EFS parameters: 2 msec pulse duration at supramaximal voltage for 5 sec.

4). Tetrodotoxin의 전처치에 의하여 전기자극에 의한 이완반응의 소실은 이러한 전기자극에 의한 이완반응이 신경자극 전달물질의 유리에 기인함을 시사하였다.

NO synthase 억제제의 효과

본 실험에서는 이러한 NANC 신경매개에 의한 전기자극 이완반응이 매개물질로서 NO의 관련성을 확인하고자 하였다. 이에 따라 NO synthase 억제제인 N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA), N^G-nitro-L-arginine(L-NNA) 및 N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) 등의 전처치 효과를 관찰하였다(Fig. 5). 각 약물을 10 μM 농도로 전처치하였을 때 L-NNA와 L-NAME은 이완 억제 효과가 관찰되었으나($p<0.05$ vs. control), L-NMMA 전처치시에는 관찰되지 아니하였다. NO synthase 억제제의 농도를 100 μM로 증가시켜 전처치하였을 때에는 세가지 약물 모두 80% 이상의 이완 억제 효과를 나타내었고, 그 작용 강도는 L-NNA>L-NAME>L-NMMA 순이었다. 이러한 사실로 보아 전기자극에 의한 이완반응은 NO의 생성의 매개에

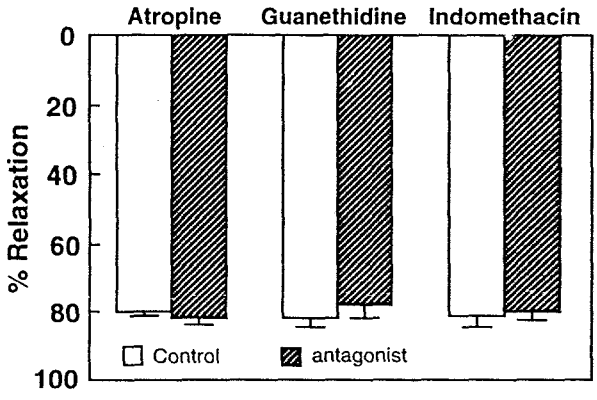

Fig. 3. Effects of 100 μM atropine, 100 μM guanethidine and 10 μM indomethacin on EFS-induced relaxations of the isolated dog LES strips. Each bar represents mean±S.E.M. from 4~6 experiments. EFS frequency: 5 Hz

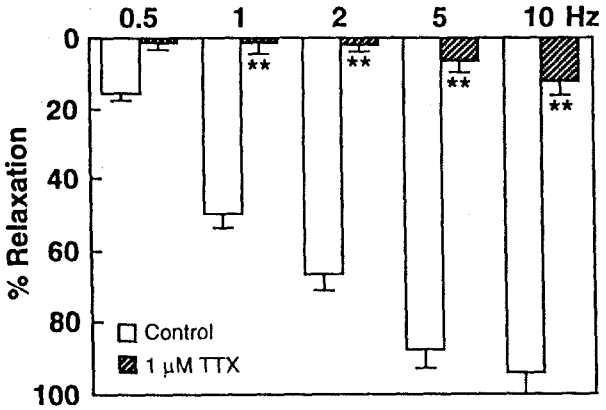

Fig. 4. Inhibitory effect of tetrodotoxin (TTX, 1 μM) on relaxation of LES strips in response to EFS. Each bar represents mean±S.E.M. from 4 experiments. **, P<0.01 vs. the corresponding control.

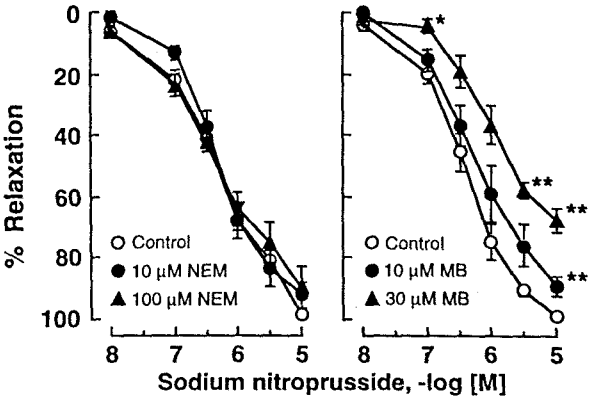

Fig. 6. Effect of N-ethylmaleimide (NEM, left panel) and methylene blue (MB, right panel) on relaxation of LES by soduim nitroprusside. Each point represents mean±S.E.M. from 4~6 experiments. *, P<0.05; **, P<0.01 vs. control. See others in Fig. 5.

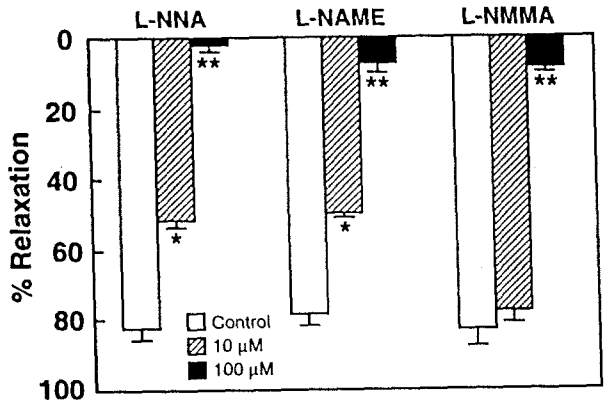

Fig. 5. Effect of NO synthase inhibitors on relaxations of LES in response to EFS. Each bar represents mean±S.E.M. from 5~7 experiments. *, P<0.05; **, P<0.01 vs. the corresponding control. NO synthase inhibitors were administered 20 min piror to EFS.

의함을 시사하고 있다.

Sodium nitroprusside와 forskolin의 이완반응에 대한 cyclic AMP와 cyclic GMP 생성 억제 약물의 효과

본 실험에서는 이러한 전기자극에 의한 이완반응에 대하여 cyclic AMP와 cyclic GMP의 생성 관련성을 검색하는 일환으로서 우선 nitrosovasodilator로 알려져 있으며 직접 NO를 생성하여 평활근 이완을 일으키는 sodium nitroprusside와 adenylate cyclase를 활성화하여 cyclic AMP 생성을 증가시키는 forskolin에 의한 이완반응을 관찰하고 이에 대한 cyclic AMP 생성 억제 약물인 N-ethylmaleimide(NEM)과 cyclic GMP 생성억제 약물인 methylene blue의 전처치 효과를 각각 관찰하였다. Sodium nitroprusside를 3배수 용량으로 용량 축적법(10 nM~10 μM)으로 투여하였을 때 용량 의존적으로 이완 반응을 일으켰고 10 μM 투여시에는 최대 이완반응이 거의 100%에 도달하였다(Fig. 6).

이러한 soduim nitroprusside에 의한 이완반응에 대하여 NEM의 전처치는 전혀 영향을 미치지 아니하였다. 그러나 methylene blue의 전처치시에는 용량 의존적으로 soduim nitroprusside에 의한 이완반응 곡선을 우측으로 이동시켰다(Fig. 6). Methylene blue에 의한 이완 억제 정도를 sodium nitroprusside의 ED_{50} 추정치로 비교하였을 때 대조군의 400 nM이 30 μM methylene blue 전처치시에는 2 μM로 증가되었고, 최대 이완반응도 대조군의 100%에서 약 65% 내외로 억제되었다.

한편 forskolin에 의한 이완반응의 경우에는 NEM 처치에는 용량 의존적으로 억제 작용을 일으켜 이완 반응 곡선이 우측으로 이동하였다. ED_{50}치를 비교시에는 대조군의 700 nM이 10 μM NEM 전처치시에는 1.5 μM로, 100 μM NEM의 경우에는 forskolin(10 μM) 처치시에도 이완반응이 50%에 도달하지 아니하였다. 그러나 methylene blue의 전처치시에는 forskolin의 이완반응은 영향을 전혀 받지

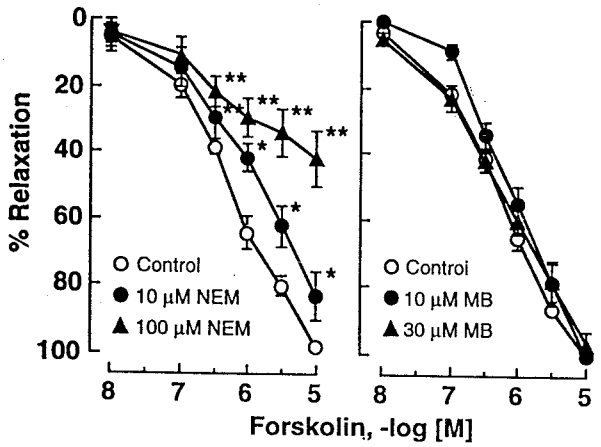

Fig. 7. Effect of N-ethylamaleimide (NEM, left panel) and methylene blue (MB, right panel) on relaxation of LES by forskolin. Each point represents mean±S.E.M. from 3~4 experiments *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs. the corresponding control. See others in Fig. 5.

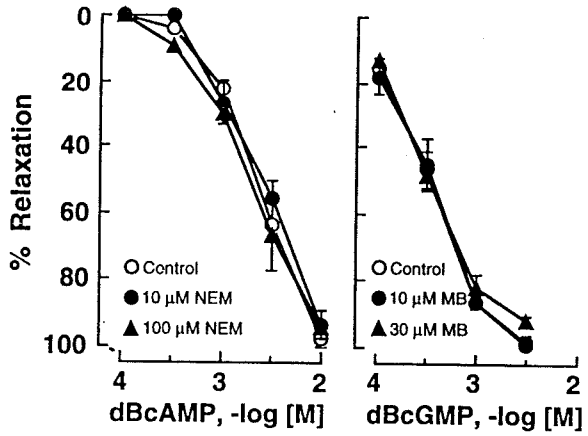

Fig. 8. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) and methylene blue (MB) on dibutyryl cyclic AMP (dBcAMP) and dibutyryl cyclic GMP (dBcGMP)-induced relaxation of LES, respectively. Each point represents mean±S.E.M. from 3~4 experiments.

아니하였다(Fig. 7).

투과성 cyclic nucleotide 유도체의 이완반응에 대한 NEM과 methylene blue의 전처치 효과

본 실험에서 저자는 dibutyryl cyclic AMP(dBcAMP)와 dibutyryl cyclic GMP(dBcGMP)의 이완효과를 검색하였다. dibutyryl cyclic nucleotide 유도체는 cyclic AMP와 cyclic GMP와는 달리 정상세포에서 투과성을 가져 세포내로 이동이 가능하다.

DBcAMP와 dBcGMP 모두 용량에 의존하여 이완반응을 일으켰고 각 약물의 추정 ED_{50}치는 각각 2 mM 및 0.4 mM 이었다. 따라서 dBcGMP의 이완반응이 dBcAMP의 이완반응에 비하여 5배 가량 강하였다(Fig. 8).

이러한 dBcAMP 및 dBcGMP에 의한 이완반응에 대하여 NEM과 methylene blue의 전처치효과를 각각 관찰하였던 바 두 약물 모두 dBcAMP와 dBcGMP의 이완반응에 하등의 영향을 미치지 아니하였다.

전기자극에 의한 이완 반응에 대한 methylene blue와 NEM의 전처치 효과

본 실험에서는 전기자극에 의한 이완반응에 대한 methylene blue와 NEM의 전처치 효과를 비교하였다. 10 μM methylene blue은 전기자극에 의한 이완 반응을 전혀 봉쇄하지 못하였으나, 30 μM methylene blue에 의하여는 이

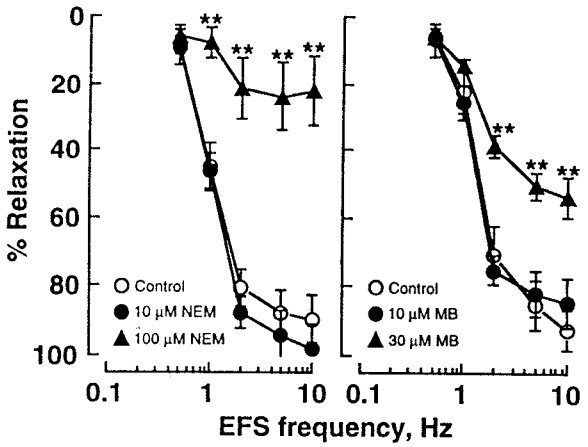

Fig. 9. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) and methylene blue (MB) on relaxation of LES in response to EFS. Each point represents mean±S.E.M. from 4~5 experiments. **, $P<0.01$ vs. the corresponding control.

완반응이 억제되었고 이러한 이완반응의 억제효과는 전기자극 빈도가 2, 5 및 10 Hz일 때 더욱 현저하였다.

한편 10 μM NEM은 전기자극에 의한 이완반응에 하등의 영향을 미치지 못하였고, 100 μM NEM의 경우에는 전기자극에 의한 이완반응을 모든 자극빈도에서 거의 소실시켰다(Fig. 9).

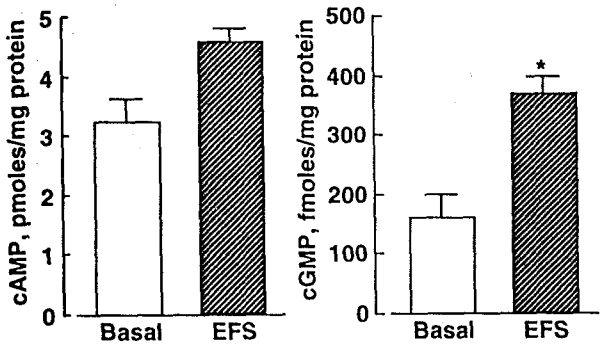

Fig. 10. Effect of the EFS on cyclic AMP (left panel) and cyclic GMP (right panel) generation in the LES strips from cats. Each bar represents mean±S.E.M. from 4 experiments in duplicate. EFS parameters: 2 msec pulse duration, 20 Hz for 2 min at supramaximal voltage. *, $P<0.05$ vs. basal.

LES 조직내 cyclic nucleotide 함량의 변동

한편 이러한 전기 자극에 의한 이완반응에 대한 cyclic nucleotide의 관련성을 직접적으로 확인하기 위하여 LES 조직의 cyclic AMP와 cyclic GMP의 함량을 대조군과 전기자극 후 조직에서 각각 비교 관찰하였다(Fig. 10). Fig. 10에서 보는 바와 같이 cyclic AMP 함량을 측정하였을 때 전기자극을 가하지 아니한 대조군의 경우에는 3.21±0.43 pmoles/mg protein이었고 supramaximal voltage에서 2 msec pulse duration으로 20 Hz로 20분간 전기자극을 가한 후의 함량은 4.51±0.25 pmoles/mg protein으로 증가하였으나 통계학적으로 유의성은 없다. 한편 cyclic GMP의 경우에는 대조군에서 166±35 fmoles/mg protein이었고, 전기자극 후에는 372±39 fmoles/mg protein으로 유의하게($P<0.05$) 증가하였다.

고 찰

위장관 운동성 조절에 억제성 신경이 관여한다는 사실이 일찌기 Burnstock 등(1966)에 의하여 처음으로 보고된 이래 위장관의 운동성 조절에 있어서 억제적으로 작용하는 매개물질의 성상에 대한 연구가 집중되었다. 특히, Tuch & Cohen(1973)이 6-hydroxydopamine으로 아드레날린성 신경 섬유를 파괴한 이후에도 미주신경에 전기자극을 가하였을 때 LES근에서 이완반응이 나타남을 보고한 이래 많은 연구자들에 의하여 LES를 비롯한 위장관 평활근에서 NANC 신경계의 존재를 증명 보고한 바 있다.

본 실험에서는 개의 LES근에 전기자극을 가하였을 때 자극빈도에 의존하여 일과성 이완반응을 나타내었다. 이러한 일과성 반응은 neurotoxin인 tetrodotoxin에 의하여 봉쇄되었다. 그러나 guanethidine이나 atropine의 전처치에 의하여는 봉쇄되지 아니하였다. 이러한 실험결과는 개의 LES근에서 전기자극에 의한 이완반응에 억제성 NANC 신경계의 관련성을 시사하고 있다(Burnstock, 1986). 이러한 억제성 NANC 신경에서 자극전달물질로서는 고양이, 사람, 돼지 등 여러 종에서 VIP(Alumets et al, 1979; Bitar & Makhlouf, 1982), ATP(Burnstock, 1972), porcine histidine isoleucine(Grider & Makhlouf, 1987) 등이 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다.

한편 최근에는 위장관계에서도 NO가 NANC의 억제성 신경전달물질 중 한가지일 것이라는 연구가 많이 보고되고 있다(Boeckxstaens et al, 1990a; 1990b; Toda et al, 1990). 본 연구에서 NO synthase를 억제하여 NO 생성을 억제하는 L-NNA, L-NAME 및 L-NMMA(Ishii et al, 1990; Moore et al, 1990; Mülsch & Busse, 1990)에 의하여 개의 LES근에서도 전기자극에 의한 이완반응이 억제되었다. 성적에는 나타나 있지 아니하지만 NO synthase 억제제의 전처치에 의한 억제작용은 L-arginine 투여에 의하여 반전되었다. 이러한 실험결과는 개의 LES 평활근에서 신경자극에 의한 이완반응에는 NO가 신경전달물질로서의 역할을 함을 보여주고 있고 다른 위장관 조직을 이용한 실험에서와 동일한 결과였다(Bult et al, 1990; Toda et al, 1991; Huizinga et al, 1992; Shimamura et al, 1993). NO synthase 억제제를 100 μM 농도로 처치하였을 때에는 전기자극에 의한 이완반응이 크게 억제되었다는 점은 전기자극에 의한 NANC 신경계의 흥분에 의한 이완반응에는 NO의 생성이 주된 역할을 하고 있다고 시사된다.

본 연구에서 관찰한 전기자극에 의한 신경자극시의 개의 LES근의 NANC 신경성 이완반응을 매개하는 기전으로서는 크게 두가지 가능성을 고려할 수 있다. 한가지는 cyclic AMP 생성계의 활성에 의한 기전과 둘째는 cyclic GMP의 생성계의 활성화에 의한 기전이다.

Cyclic AMP의 생성계 활성에 의한 기전으로서 본 연구결과는 전기자극에 의한 신경자극시 LES에 의한 이완반응이 adenylate cyclase의 활성화에 의하여 일어남을 가정할 수 있다. 이러한 가정의 근거는 cyclic AMP 생성을 억제하는 NEM(Fredholm et al, 1985; 1986; Sigafoos & Aramowitz, 1986; Persson & Andersson, 1994)이 forskolin에 의한 LES의 이완반응 뿐만 아니라 전기자극에 의한 이완반응을 통계학적으로 유의하게 길항하였다는 사실로서 입증할 수 있다. 전기 신경자극에 의한 LES의 이완반응에 cyclic AMP가 세포내 2차 전달물질로서 매개작용

을 할 것이라는 사실은 매우 흥미롭고 새로운 사실이다. 그러나 이러한 사실은 Moummi & Rattan(1988)이 opossum의 내항문 괄약근을 이용하여 관찰한 실험에서도 유사한 작용을 관찰 보고한 바 있어 이의 가능성은 충분하다. 뿐만 아니라 전기자극에 의한 이완반응의 매개 기전으로서 전기 신경자극에 의한 이완반응이 cyclic AMP의 매개 뿐만 아니라 cyclic GMP도 이완반응을 매개함도 확인할 수 있었다. 이는 전기자극에 의한 반응이 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue에 의하여 길항되는 점으로서 확인할 수 있다.

일반적으로 LES에서 전기자극에 의한 이완반응과 다른 신경성 전달물질에 의한 이완반응(예로서 VIP나 CGRP 등)은 서로 다른 매개물질에 의하여 나타나는 것으로 보편적으로 인식되고 있다(Torphy et al, 1986). 신경자극에 의한 이완반응에는 cyclic GMP가 관련되어 있으며 VIP나 CGRP 등에 의한 이완반응에는 cyclic AMP가 주된 2차 전달물질일 것이라는 것이 주장이다. 본 연구의 결과에서 흥미있는 점은 전기자극에 의하여서도 cyclic AMP의 매개에 의한 이완반응이 나타났다는 점이다. 이러한 실험결과는 기존의 여러 학자들에 의하여 밝혀져 있는 사실과는 다르지만 opossum의 내항문 괄약근의 경우에는 본 연구와 유사한 반응이 관찰되었다는 보고(Moummi & Rattan, 1988)를 고려하면 본 연구결과도 충분히 가능성이 있다. 뿐만 아니라 흰쥐의 위 기저부를 이용한 in vitro 실험에서 5 Hz로 2분간 전기자극을 가하였을 cyclic GMP의 함량은 전기자극 후 20초에 최대에 도달하여 지속되었고, cyclic AMP치는 자극 20초 후부터 점진적으로 증가되었으며, 이러한 반응은 NO와 VIP사이에 co-transmission 역할을 가지고 있음을 시사한다고 주장된 바 있다(Ito et al, 1990). 이러한 보고를 종합하면 전기자극에 의하여 개의 LES근에서 cyclic GMP의 생성의 증가 뿐만 아니라 VIP의 유리에 의한 cyclic AMP의 생성이 증가하여 이완반응을 일으켰을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 이에 대한 정확한 세포내 기전이나 결론에 대하여는 아직 의문으로 남아있고 더 연구하여야 할 과제로 생각된다.

NEM의 전기자극에 의한 이완반응의 억제에 대한 기전으로서는 첫째 NEM의 비특이성적인 작용에 기인할 가능성이 있고, 두번째는 이 약물의 작용부위의 다양성에 기인할 가능성이 있다. 그러나 이러한 가능성에 대한 문헌적 고찰은 현재로서는 하기가 매우 힘들다. 단 본 연구에서 직접 조직내에서 cyclic AMP 및 cyclic GMP의 함량을 측정한 결과 전기자극에 의하여 cyclic GMP는 기저치의 150%이상 증가한 반면에 cyclic AMP의 농도는 통계학적으로 유의성 있는 증가는 보여주지 아니하였다. 이러한 결과는 NEM에 의한 전기자극 이완반응의 억제가 cyclic AMP 생성의 억제(Fredholm et al, 1985;1986 Sigafoos & Abramowitz, 1986; Persson & Andersson, 1994)에 기인하였다고 한다면 NEM에 의하여 전기자극에 의한 이완반응의 억제와 동반하여 cyclic AMP 생성도 억제되어야 할 것이다. 그러나 Torphy 등(1986)이 주장한 바와 같이 VIP나 전기자극에 의한 cyclic AMP나 cyclic GMP와 같은 cyclic nucleotide의 생성과 이완반응 사이에는 차이가 있다는 사실을 고려한다면 본 실험에서의 이완-cyclic AMP 생성 사이의 비상관성도 크게 의외의 결과는 아니다. 그러나 이에 대하여는 추후 정밀한 검토가 요구된다.

작용부위의 관련성으로서는 NEM이 신경자극에 의한 LES의 이완반응 억제는 직접 평활근에 작용하여 발현하였을 가능성을 배제할 수 없다. 일찌기 cyclic AMP가 2차 전달물질로서 다른 신경전달물질의 유리에 작용(Standaert, 1979) 할 것이라는 보고에 근거하고 있다. 이러한 가능성은 본 실험에서 forskolin에 의한 이완반응이 직접적으로 평활근에 작용하여 나타난다는 점과 이러한 forskolin에 의한 이완반응이 NEM의 전처치에 의하여 봉쇄되었다는 점으로서 그 가능성을 고려할 수 있다.

한편 기니픽 회장 평활근에서 NO synthase가 VIP-함유 신경세포에 주로 존재하고 NO가 신경자극시에 VIP와 동반하여 유리된다는 점(He & Goyal, 1993)을 관찰한 점과 VIP가 LES근에서 cyclic AMP의 생성을 증가시킨다는 점(Torphy et al, 1986; Szewczak et al, 1990)을 고려한다면 개의 LES근을 이용한 본 실험에서 NEM에 의하여 전기자극에 의한 이완반응이 억제된다는 점은 전기자극에 의한 이완반응이 VIP의 유리에 의한 cyclic AMP의 생성의 관련성도 완전히 배제할 수 없다. 즉 VIP와 NO가 위장관 평활근에서 기능적으로 연계되어 있는 co-transmitter이며 postjunctional regulators인 점을 시사한다(Murphy et al, 1995). 그러나 이러한 NO와 co-transmission에 대하여 VIP가 직접 관련이 있는지는 본 실험에서 검정하지 아니하였다.

Cyclic GMP의 매개에 의한 LES근을 비롯한 평활근 이완에 대한 기전은 명쾌하게 밝혀져 있지 아니하지만 세포질내 calcium 농도의 감소와 관련이 있을 것으로 추측되고 있다(Murad et al, 1992). 만약에 NO 또는 NO 관련물질이 NANC에서 유리되어 이완반응을 매개한다면 전기자극에 의하여 cyclic GMP의 근세포내 생성의 증가가 기대될 수 있다. 이러한 NANC 신경의 자극에 의한 cyclic GMP의 생성은 본 실험에서도 관찰되었고 이러한 사실은 다른 여러 조직에서도 증명되었다(예: opossum의 LES (Torphy et al, 1986; Barnette et al, 1989; Conklin & Du,

1992), 흰쥐의 항문미골근(Mirzazadeh et al, 1991), 개의 상부 대장 평활근(Ward et al, 1992), 흰쥐 회장(Kanada et al, 1992)). 나아가 NO 유사물질이 억제성 NANC 신경자극에 의하여 유리된다는 사실은 superfusion법을 이용하여 검증되어져 있다(Bult et al, 1990; Wiklud et al, 1993). 그러나 NO가 평활근세포에 직접 작용하여 LES근의 이완반응을 매개하는 외에도 다른 중간 신경전달물질의 유리의 조절에 관여하리라는 추측은 쉽게 할 수 있다. 본 연구에서 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue(Gruetter et al, 1981)가 10 μM 농도에서 soduim nitroprusside에 의한 이완반응 곡선을 우측으로 이동하여 억제시켰으나 NANC 신경자극에 의한 이완반응은 전혀 영향을 미치지 못하였다. 이러한 작용의 차이점은 NANC 자극에 의한 생성되는 신경전달물질이 cyclic GMP 생성 증가 뿐만 아니라 다른 매개 물질의 유리에 의하여도 이완반응을 일으킴을 시사하고 있다. 물론 methylene blue가 guanylate cyclase 억제에 비특이적인 작용을 가지고 있을 가능성도 전혀 배제할 수 없다.

이상의 실험결과로 보아 개의 LES근에서 NANC 신경계의 자극에 의한 이완반응에 NO의 생성에 따른 guanylate cyclase의 활성화가 주된 역할을 할 것으로 시사된다. 나아가 이와 동반하여 co-transmitter로서 알려지지 아니한 물질이 유리되어 cyclic AMP의 생성에 의한 이완반응도 일으킬 것으로 추측된다. 그러나 이에 대하여는 본 연구로서는 결론을 짓기 힘들고 이에 대하여는 추후 더 연구하여야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

한상영, 문한규: 개의 하부 식도 괄약근의 비아드레날린성 비콜린성 이완반응의 특성. 부산의대학술지 34(1): 147－158, 1994

Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacodyn* 280(suppl.): 50－61, 1986

Alumets J, Fahrenkrug J, Hakanson R, Schaffalitzky DMO, Sundler F, Uddman R. A rich VIP nerve supply is characteristic of sphincters. *Nature* 280: 155－156, 1979

Barnette M, Torphy TJ, Grous M, Fine C, Ormsbee III HS. Cyclic GMP: A potential mediator of neurally- and drug-induced relaxation of opossum lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 524－528, 1989

Biancani P, Zabinski M, Kerstein M, Behar J. Lower esophageal sphincter mechanics: Anatomic and physiologic relationships of the esophagogastric junction of cat. *Gastroenterology* 82: 468－475, 1982

Bitar KN, Makhlouf GM. Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* 216: 531－533, 1982

Boeckxstaens GE, Bult H, De Man JC, Herman AG, Pelckmans PA, Van Maercke YM. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ilecolonic junction. *Eur J Pharmacol* 190: 239－246, 1990a

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Ruytjens IF, Bult H, De Man JC, Herman AG, Van Maercke YM. Bioassay of nitric oxide released upon stimulation of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in the canine ileocolonic junction. *Br J Pharmacol* 103: 1085－1091, 1990b

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248－254, 1976

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346－347, 1990

Burnstock G, Campbell G, Rand MJ. The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum. *J Physiol(Lond)* 182: 504－526, 1966

Burnstock G, Cocks T, Kasakov L, Wong K. Direct evidence for ATP release from non-adrenergic non-cholinergic (purinergic) nerves in the guinea-pig taenia coli and bladder. *Eur J Pharmacol* 19: 145－149, 1978

Burnstock G. Adenosine triphosphate. In: Burnstock G, Gershon MD, Hokfelt T, Iversen LL, Kosterlitz HW, Szurszewski JH ed, *Neurosciences Research. Non-adrenergic, Non-cholinergic Autonomic Neurotransmission Mechanisms.* ed. MIT Press, Cambridge, 17: 406－414, 1979

Burnstock G, Costa M. Inhibitory innervation of the gut. *Gastroenterology* 64: 141－144, 1973.

Burnstock G. Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol* 313: 1－35, 1981

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509－581, 1972

Burnstock G. The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. *Arch int Pharmacodyn* 280(Suppl): 1－15, 1986

Conklin JL, Du C. Guanylate cyclase inhibitors: effect of inhibitory junction potentials in esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* 263: G87－G90, 1992

Christensen J. Pharmacological identification of lower esophageal sphincter. *J Clin Invest* 49: 681－691, 1970

Fredholm BB, Fastbom J, Lindgren E. Effects of N-ethylmaleimide and forskolin on glutamate releases from rat hippocampal slices. Evidence that prejunctional adenosine receptors are linked to N-proteins, but not to adenylate cyclase. *Acta Physiol Scan* 127: 381－386, 1986

Fredholm BB, Lindgren E, Lindstrom K. Treatment with N-ethylmaleimide selectively reduces adenosine receptor mediated decreases in cyclic AMP accumulation in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 86: 509−513, 1985

Frew R, Lundy PM. Effects of arylazido aminopropionyl ATP(ANAPP$_3$), a putative ATP antagonist, on ATP responses of isolated guinea-pig smooth muscle. *Life Sci* 30: 259−267, 1982

Goyal RK, Rattan S. Genesis of basal sphincter pressure: effect of tetrodotoxin on lower esophageal sphnincter pressure in opossum in vivo. *Gastroenteroloy* 71: 62−67, 1976.

Goyal RK, Rattan S. Nature of the vagal inhibitory innervation to the loweer esophageal sphincter. *J Clin Invest* 55: 1119−1216, 1975

Grider JR, Makhlouf GM. Prejunctional inhibition of vasoactive intestinal peptide release. *Am J Physiol* 253: G7−G12, 1987

Gruetter AA, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerine, sodium nitrate and amyl nitrite. *Can J Physiol* 59: 150−156, 1981

He XD, Goyal RK. Nitric oxide is involved in the peptide VIP associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *J Physiol(Lond)* 461: 485−499, 1993

Huizinga JD, Tomlinson J, Pintin-Quezada J. Involvement of nitric oxide in nerve-mediated inhibition and action of vasoactive intestinal peptide in colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 803−808, 1992

Ishii K, Chang B, Kerwin JF, Huang JrZ-J, Murad F. N^G-nitro-L-arginine, a potent inhibitor of endothelium-derived relaxation factor formation. *Eur J Pharmacol* 176: 219−223, 1990

Ito S, Kurokawa A, Ohta A, Sawabe K. Mechanical, electrical and cyclic nucleotide responses to peptide VIP and inhibitory nerve stimulation in rat stomach. *J Physiol* 430: 337−353, 1990

Janis RA, Diamond J. Relationship between cyclic nucleotide levels and drug-induced relaxation of smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 211: 480−484, 1979

Kanada A, Hata F, Suthamnatpong N, Machara T, Ishii T, Takeuchi T, Yagasaki O. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. *Eur J Pharmacol* 216: 287−292, 1992

Kukovetz WR, Poch G, Holzmann S. Cyclic nucleotides and relaxation of vascular smooth muscle. In: Vanhoutte PM, Leusen I ed, *Vasodilation.* Raven, New York, p 339−353, 1981

Miolan JP, Roman C. Activite des fibres vagales efferentes destinees a la musculature tissue du cardia du chien. In: Johnson LR ed, *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2nd ed. Raven, New York, p 521, 1987

Mirzazadeh S, Hobbs AJ, Tucker JF, Gibson A: Cyclic nucleotide content of the rat anococcygeus during relaxations induced by drugs or by non-adrenergic, non-cholinergic field stimulation. *J Pharm Pharmacol* 43: 247−251, 1991

Moore PK, Al-Swayeh OA, Chong NWS, Evans RA, Gibson A. L-N^G-nitro arginine(L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inihibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol* 99: 408−412, 1990

Moummi C, Rattan S. Effect of methylene blue and N-ethylmaleimide on internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 255: G571−G578, 1988

Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invset* 78: 1−5, 1986

Murad F, Forstermann U, Nakane M, Schmidt H, Pollock J, Sheng H, Matsumoto T, Warner T, Mitchell J, Tracey R, Buechler W. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction pathway in vascular smooth muscle preparations and other tissues. *Jap J Pharmacol* 58: 150, 1992

Murphy KS, Grider JR, Jin JC, Makhlouf GM. Interplay of VIP and nitric oxide in the regulation of neuromuscular activity in the gut. *Arch int Pharmacodyn* 329: 27−38, 1995

Mülsch A, Busse R. N^G-nitro L-argine(N^5[immuno(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilatations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeb Arch Pharmacol* 341: 143−147, 1990

Ohlstein EH, Berkowitz BA. Cyclic guanosine monophosphate mediates vascular relaxation induced by atrial natriuretic factor. *Hypertension(Dallas)* 7: 306−310, 1985

Persson K, Andersson KE. Non-adrenergic, non-cholinergic relaxation and levels of cyclic nucleotides in rabbit lower urinary tract. *Eur J Pharmacol* 268: 159−167, 1994

Rattan S, Gonella P, Goyal RK. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide and calcitonin on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* 94: 284−293, 1988

Szewczak SM, Behar J, Billett G, Hillemeier C, Rhim BY, Biancani P. VIP-induced alterations in cAMP and inositol phosphates in the lower esophageal sphincter. *Am J Physiol* 259: G239−G244, 1990

Sigafoos JF, Abramowitz J. effect of N-ethylmaleimide on gonadotropin and beta-adrenergic receptor function coupled to rabbit luteal adenylyl cyclase. *Endocrinology* 119: 1432−1438, 1986

Shimamura K, Fujisawa A, Toda N, Sunano S. Effect of N^G-nitro-L-arginine on electrical and mechanical responses to stimulation of non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory

nerves in circular muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 231: 103－109, 1993

Standaert FG. Cyclic neucleotides and synaptic function. *Federation Proc* 38: 2182－2202, 1979

Toda N, Baba H, Okamura T. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jap J Pharmacol* 53: 281－284, 1990

Toda N, Tanobe Y, Baba H. Suppression by N^G-nitro-L-arginine of relaxations induced by non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation in dog duodenal longitudinal muscle. *Jap J Pharmacol* 57: 527－534, 1991

Torphy TJ, Fine CF, Burman M, Barnette MS, Ormsbee III HS. Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increase cyclic nucleotide content. *Am J Physiol* 251: G786－G793, 1986

Tuch A, Cohen S: Lower esophageal sphincter relaxation: Studies on the neurogenic inhibitory mechanism. *J Clin Invest* 52: 14－20, 1973

Tard SM, Dalziel HH, Bradley ME, Buxton ILO, Keef K, Westfall DP, Sanders KM. Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br J Pharmacol* 107: 1075－1082, 1992

Wiklund NP, Leone AM, Gustafsson LE, Moncada S: Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. *Neuroscience* 53: 607－611, 1993

Zimmerman RP, Gates TS, Mantyh CR, Vigna SR, Boehmer CG, Mantyh PW. Vasoactive intestinal peptide(VIP) receptors in the canine gastrointestinal tract. *Peptides* 9: 1241－1253, 1989