

소(牛) 식도구 평활근의 Adrenergic receptor 존재부위에 관한 연구

강동목 · 조제열 · 박전홍* · 양일석

서울대학교 수의과대학

제주대학교 농과대학 수의학과*

(1993년 10월 3일 접수)

Localization of adrenergic receptors in bovine esophageal groove

Tong-mook Kang, Je-yoel Cho, Jun-hong Park*, Il-suk Yang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

College of Agriculture, Cheju National University*

(Received October 3, 1993)

Abstract : The preliminary studies on the localization of adrenoceptors were performed on smooth muscle strips of bovine esophageal groove. The mechanical activity of the muscle strips was recorded isometrically *in vitro*.

In the bottom circular muscle strips, the excitatory α -adrenergic responses were not blocked by tetrodotoxin ($2.1 \times 10^{-6}M$) and denervation which was carried by cold storage of strips for 48 hrs in Tyrode's solution at $5-6^{\circ}C$ without oxygen supply. These excitatory α -adrenergic responses were partially blocked by atropine. In the lip longitudinal muscle strips, the inhibitory β -adrenergic responses were not blocked by pretreatment of tetrodotoxin and atropine.

The results suggest that β -adrenergic receptors mediating relaxations are located on the postsynaptic smooth muscle cells, whereas β -adrenergic receptors mediating contractions are located both in the smooth muscle cells and in the cholinergic neurones.

Key words : Esophageal groove, adrenoceptor, smooth muscle.

서 론

소를 포함한 반추동물에서 식도구(esophageal groove)는 제2위벽에 존재하는 홈통모양의 구조물로서 어린 반추류의 경우 액상내용물을 분문부에서 제4위로 직접 통과시키는데 기여하는 중요한 구조물이다. 본 연구자들은 이 전의 연구에서 catecholamine에 의해 소의 식도구 윤상근은 장력이 증가된 이상성 수축을 보이고 이것은 흥분적인 작용을 유도하는 α -excitatory adrenoceptor 자극에 의한 것이었으며 또한 catecholamine은 종주근에서는 자동성을 억제하는 효과가 관찰되었으며 이것은

β -adrenoceptor에 의한 현상이었음을 밝힌 바 있다.¹

위장관 평활근에는 일반적으로 catecholamine에 대한 수용체로서 α -adrenoceptor와 β -adrenoceptor 두가지가 존재한다고 알려져 있으며, 평활근세포 혹은 신경세포 중 어느곳에 존재하는 어떤 종류의 수용체에 작용하는가에 따라 억제반응 또는 흥분반응이 달라질 수 있다고 알려져 있다. β -adrenoceptor는 거의 대부분의 경우 이완반응을 유도하며 일반적으로 그 수용체는 평활근 세포막에 존재하는 것으로 알려져 있다.^{2,3} 그러나 α -adrenoceptor는 수축력에 대해 억제와 흥분 두가지가 가능하며, 그 수용체는 neuron에 존재하기도 하고 평활근

세포막에 존재하기도 한다. noradrenaline과 adrenaline이 cholinergic neuron으로부터 acetylcholine의 분비를 감소시켜 평활근 이완을 일으키며 이것은 α -수용체 차단제에 의해 차단되는 사실로 부터 억제성 α -수용체는 neuron에 존재한다는 보고^{4,5}가 있다. 그러나 일부 연구자들에 의하면 adrenaline과 noradrenaline이 평활근 세포막에 있는 α -수용체에 직접 작용하여 억제작용을 유도하기도 하고⁶, 흥분작용을 유도하기도 한다고 하며^{7,8} 또 다른 연구자들은 α -수용체가 세포막 뿐만 아니라 cholinergic neuron에 존재하고 이를 통해 수축을 유발한다고 보고하였다.^{9,10} 이와같이 α -수용체는 동물에 따라 또 위장관 부위에 따라 상이하게 반응하고 상이하게 존재한다.

따라서 본 실험에서는 소 식도구 윤상근에서 수축성 흥분을 일으키는 α -adrenoceptor와 종주근에서 억제작용을 일으키는 β -adrenoceptor의 존재부위를 밝혀 보고 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 본 실험을 위해 수윈도축장에서 약 2세 가량의 건강한 수소 18두를 사용하였다. 타격법으로 도살된 직후 위를 열어 내용물을 비우고 2위벽에서 식도구를 찾아 분문부와 reticulomasoifice 사이의 가운데 부분에서 넓이 5cm가량을 잘라 Tyrode용액에 담겨 즉시 실험실로 운반하였다.

식도구 평활근 절편의 제작 : 실험실로 운반된 식도구 조직을 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스가 계속 공급되는 Tyrode 영양액이 담긴 넓은 초자용기에서 지방조직과 결합조직들을 제거한 다음, 식도구를 펼쳐 고정하였다. 펼쳐진 식도구에서 폭 2mm, 길이 20mm의 크기로 식도구 바닥 부위에서는 윤상근을 식도구 lip 부위에서는 종주근을 얻었다.

식도구 평활근 수축력 측정 : 윤상근 및 종주근 절편을 37°C로 일정하게 온도를 맞추면서 95% O₂와 5% CO₂로 평형을 이룬 영양액이 담긴 25ml 용 organ bath에 옮겨서 한쪽 끝은 고리끝에다 고정하고 다른쪽 끝은 상하, 좌우, 전후로 움직일 수 있는 manipulator에 달려있는 근수축 변환기(Narco Biosystem, isometric transducer F-60)에 연결하여 physiograph(Narco Biosystem, MK-I-V)로 등척성수축(isometric contraction)을 기록하였다.

매 표본마다 1.0g의 baseline tension을 걸어준 후 45분~1시간동안 평형을 시켜 baseline tension이 일정하게 유지되었을 때 실험을 수행하였으며 각 실험사이에는 정상 영양액으로 3회 세척한 후 일정한 장력이 유지되면 실험을 계속하였다.

영양액 및 사용약물 : 본 실험에 사용된 영양액은 CO₂/HCO₃⁻-buffered tyrode 용액으로서, 만들때 HCO₃⁻와 Ca²⁺이 chelate되는 것을 방지하기 위하여 NaCl과 NaHCO₃ 등을 미리 증류수에 넣어 잘 섞은 후 CaCl₂와 glucose를 넣어 다시 섞었으며, pH 7.4로 맞추어 사용하였다. 또 각 표본의 viability를 보기위해 100mM KCl의 high-K Tyrode영양액을 사용하였다. 이들의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Chemical compositions of Tyrode's solution for measurement of isometric tension of the smooth muscle in the oesophageal groove

	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ -buffered Tyrode's Soln. (mM)	High-K ⁺ Tyrode's Soln.(100mM KCl) (mM)
NaCl	136.9	39.8
KCl	2.9	100
CaCl ₂	1.8	1.8
NaHCO ₃	11.9	11.9
MgSO ₄	1.1	1.1
NaH ₂ PO ₄	0.4	0.4
Glucose	11.1	11.1
pH	7.4	7.4

각 약물은 Tyrode용액에서 녹였으며 phenoxybenzamine과 phentoamine같이 물에 대한 용해도가 낮은 약물은 alcohol에 녹인 후 영양액으로 희석하여 사용하였다. 약물은 micropipette로 투여하였으며 총용량이 250 μ l 이상(실험용기의 1/100배) 되지 않도록 하였고, 비가역적인 약물의 처치는 한번 처치한 후 실험을 마쳤으며 새로운 평활근 절편을 제작하여 실험하였다. 각 길항제는 agonist투여 5분전(tetrodotoxin은 10분전)에 적용하였다. 모든 실험은 5회이상 반복실험하였으며 전형적이고 대표적인 자료를 결과로 제시하였다.

본 실험에 사용된 약물은 아래와 같다.

Atropine sulfate(Sigma), L-epinephrine(Sigma), L-norepinephrine bitartrate salts(Sigma), L-phenylephrine hydrochloride(Sigma), (\pm)Isoproterenol hydrochloride(Sigma), Phenoxybenzamine hydrochloride(TCI), Propranolol hydrochloride crystalline(Sigma), Tetrodotoxin(Sigma)

결 과

윤상근에서 수축성 흥분작용을 유도하는 α -adrenoceptor와 종주근에서 억제작용을 유도하는 β -adrenoceptor가 어디에 존재하는지(즉, neuron에 존재하는지 평활근세포에 존재하는지)를 알아보기 위해 아래 실험들을 수행하여 다음의 결과를 얻었다.

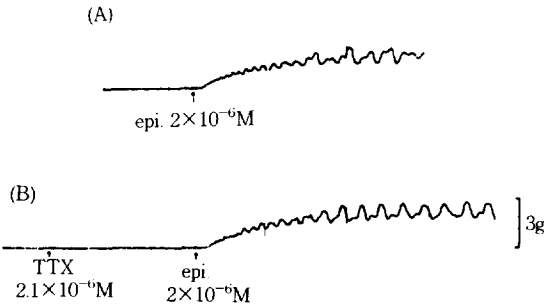


Fig 1 Effect of tetrodotoxin(TTX) on the excitatory response of epinephrine in the bottom circular smooth muscle strips. The excitatory α -adrenergic responses were not blocked by tetrodotoxin($2.1 \times 10^{-6}M$).

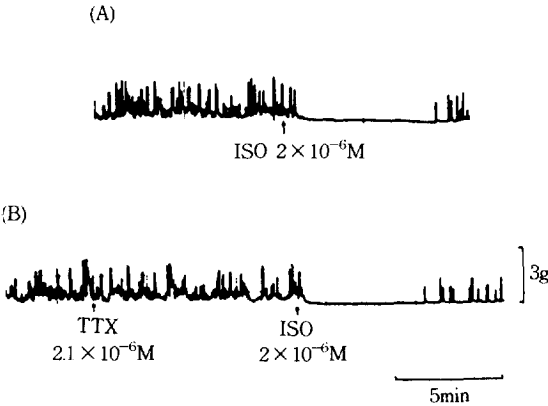


Fig 2 Effect of tetrodotoxin(TTX) on the inhibitory response to isoproterenol in the lip longitudinal smooth muscle strips. The inhibitory β -adrenergic responses were not blocked by tetrodotoxin($2 \times 10^{-6}M$).

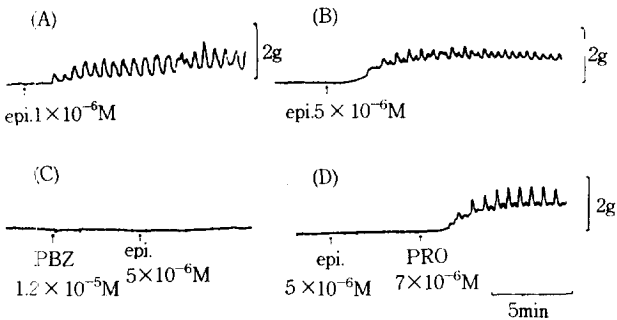


Fig 3 Denervation effect on the excitatory response to epinephrine in the bottom circular smooth muscle strips. Denervation was carried by cold storage of strips for 48hrs in Tyrode's solution at $5 \sim 6^{\circ}C$ without oxygen supply. Denervation did not affect the excitatory responses. (A) : before the denervation ; (B), (C), (D) : after the denervation.

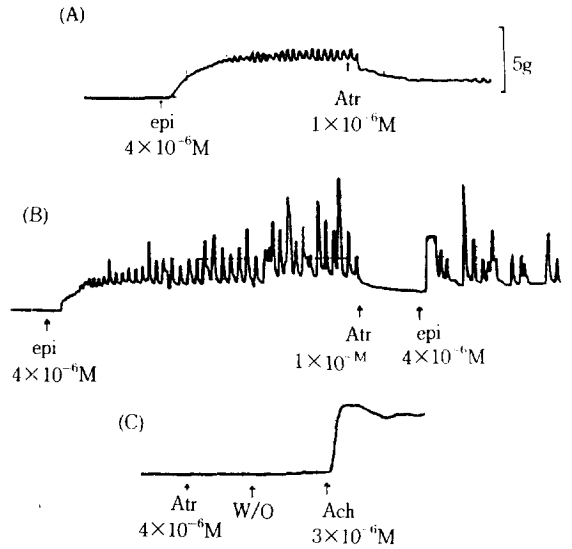


Fig 4 Effect of atropine on the excitatory response to epinephrine in the bottom circular smooth muscle strips. The excitatory α -adrenergic responses were partially blocked by atropine(A), but these inhibitory responses were recovered by addition of epinephrine(B). In the same preparations, atropine did not change the basal tone and acetylcholine induced contractions(C).

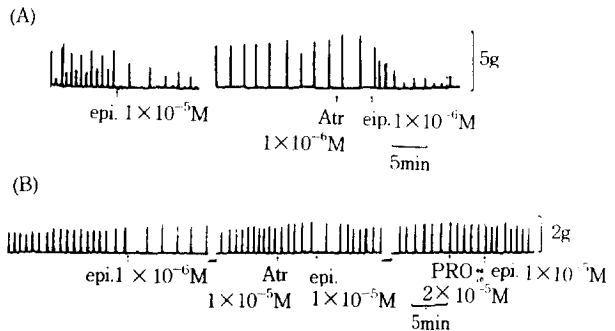


Fig 5 Effect of atropine on the β -inhibitory response to epinephrine in the lip longitudinal smooth muscle strips. The inhibitory β -adrenergic response were not blocked by atropine(A) and blocked by propranolol(B).

신경차단효과 : 윗상근의 α -adrenoceptor와 종주근의 β -adrenoceptor가 신경에 존재하는지를 알아보기 위해 tetrodotoxin을 epinephrine 적용 10분전에 투여하였다. 윗상근에서 epinephrine에 의해 유도된 수축을 tetrodotoxin은 차단하지 못하였으며(Fig 1), 종주근에서 isoproterenol의 억제작용 역시 tetrodotoxin이 차단하지 못하였다(Fig 2).

냉장 denervation 효과 : Lum 등¹¹의 방법에 따라 식도구 평활근을 영양액에 담구어 약 5~6°C에서 48시간 동안 냉장시켜 denervation을 유도한 후 윤상근절편에 epinephrine을 처치하였다. 냉장으로 denervation된 후에도 epinephrine에 의해 윤상근은 수축되었으며(Fig 3-B), 냉장 denervation전과 비교할 때 같은 정도의 수축 유발을 위해서는 5배정도 더 많은 양의 epinephrine이 필요했다(Fig 3-A, B). 이러한 수축은 역시 phenoxybenzamine에 의해 차단되었으나(Fig 3-C), propranolol에 의해서는 차단되지 않았다(Fig 3-D).

Atropine의 차단효과 : 윤상근에서 epinephrine의 α -수축작용을 atropine은 부분적으로 차단하였으며(Fig 4-A), tonic contraction보다는 phasic contraction에 더 많은 억제효과를 보였다. Atropine의 억제효과는 atropine의 전처리에 의해서는 나타났으며 이러한 억제효과는 고농도의 epinephrine투여에 의하여 극복되었다(Fig 4-B). Atropine은 자동성이 없는 윤상근 조직의 긴장도에 아무 영향을 주지 못하였으며 atropine이 전처리 되지 않은 같은 조직에서 acetylcholine은 수축을 유도하였다(Gif 4-C).

그러나 중주근에서 epinephrine의 β -억제작용(phasic contraction의 감소 및 빈도수 감소작용)을 atropine(1×10^{-6} M)은 차단하지 못하였으나(Fig 5-A), β -차단제인 propranolol은 차단하였다(Fig 5-B). 중주근에서도 윤상근과 마찬가지로 atropine은 조직의 긴장도에 영향이 없었다.

고 찰

Catecholamine을 외부에서 투여할 경우 나타나는 효과에 대한 분석은 매우 복잡하다. α -수용체와 β -수용체를 공유한 평활근에 대한 이 약물의 직접효과는 어느 쪽 작용이 우세한가에 따라 달라지며 부위별 또는 근층간에 따라 달라질 수 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 소화관 평활근조직에서는 α -수용체를 통하여 수축을 일으키고 억제된 효과는 α 와 β 수용체를 통하여 나타난다. 또한 평활근에 대한 직접작용 이외에 내인성 신경에 대한 작용을 통하여 간접적으로 그 효과를 나타낼 수도 있다.

Marti¹²는 송아지 식도구 평활근 절편을 이용한 실험에서 norepinephrine이나 epinephrine이 바다 부위에서는 α -2-adrenoceptor를 통해 수축을 일으키고 β -adrenoceptor를 통해 이완을 일으켰으며, lip 부위에서는 catecholamine이 β -adrenoceptor에 작용하여 이완시켰다고 보고

하였다. 이러한 결과는 식도구 윤상근에서 α -1-agonist(phenylephrine)은 초기수축을 유도하였고, α -2-agonist(clonidine)는 후기수축을 유도하여 α -1-adrenoceptor와 α -2-adrenoceptor 모두 수축을 일으킨다는 본 연구자들의 이전의 결과¹와 유사한 것이다. 본 결과에서도 식도구 윤상근에서 phenoxybenzamine에 의하여 epinephrine의 수축효과가 차단되는 양상을 보였으며 이러한 현상은 tetrodotoxin 처리나 냉장 denervation에 의하여 내재신경을 제거하여도 마찬가지로 나타났다. 이러한 사실은 식도구 윤상근에서 epinephrine에 의하여 유발된 수축현상이 평활근 세포막에 존재하는 α -receptor를 통하여 나타난 것으로 생각할 수 있다.

홍분성 α -수용체가 평활근 세포막에 존재하여 수축반응을 유도한다는 사실은 기니피프 위와 기니피프 회장에서 보고된 바 있으며^{13, 14, 15}, Haffner¹⁶는 본 실험과 유사하게 토끼 위 평활근에서 adrenergic agent의 홍분성 작용이 TTX와 hexamethonium에 의해서 영향을 받지 않고 또 24시간 냉장하더라도 영향을 받지 않는 것으로 보아 adrenergic agent가 평활근에 직접 작용할 것이라 하였다.

본 결과와 관련되어 흥미로운 사실은 epinephrine에 의한 수축이 atropine의 전·후 처치에 의하여 부분적으로 차단된다는 사실이다. 지금까지 adrenergic stimuli와 콜린성 신경과의 관계에 대한 연구들은 주로 억제성 α -adrenoceptor에 관하여 이루어져왔다. 기니피프 회장에서는 norepinephrine과 epinephrine이 cholinergic neuron에 존재하는 α -adrenoceptor를 자극하여 cholinergic neuron으로부터 acetylcholine의 자연적 유리를 감소시켜, α -수용체 매개성 억제작용을 유도한다고 보고되었으며^{4, 13}, 같은 조직에서 inhibitory presynaptic α -receptor는 phenylephrine보다 clonidine에 더 민감하게 반응하는 α -2-adrenoceptor이고 또 직접 평활근 세포에 존재하여 홍분반응을 유도하는 excitatory postsynaptic α -receptor가 존재하며 이것은 phenylephrine에 더 민감하게 반응하는 α -1-adrenoceptor임이 보고되었다.^{8, 15, 18} 이와는 달리 Christensen과 Daniel^{19, 10}은 고양이 식도하부에서 α -adrenoceptor 자극에 의한 홍분작용이 atropine에 의해 쉽게 차단되고, nicotine과 hexamethonium에 의해 차단되지 않음을 보아 α -adrenoceptor는 cholinergic neuron에 존재하고 이것은 자극되어 acetylcholine의 분비를 촉진하여 수축이 일어난다고 하였다. 그들은 이러한 사실이 위장관 평활근의 조직학적 자율신경분포 연구에서 adrenergic fiber가 cholinergic neuron 사이에 많이 분포하고 있다는 보고^{19, 20}에 의해 뒷받침된다 하였다.

본 실험에서 사용한 식도구 윤상근은 정상적으로 자

동성이 없는 조직으로서 atropine만의 단독투여에 의해서는 조직의 긴장도에 아무런 영향을 주지 않았다. 이러한 사실은 atropine에 의한 epinephrine의 수축억제가 비특이적인 현상이 아니며 또한 정상상태에서 조직의 긴장도 유지에 cholinergic component가 중요하지 않다는 것과 함께 atropine에 의한 epinephrine의 수축억제가 acetylcholine의 자연유리를 감소시켜 나타난 것이 아니라는 것을 말해준다. TTX 처리나 냉장 denervation 실험 결과에서 나타났듯이 흥분성 α -수용체가 평활근 세포막에 존재한다는 사실과 atropine의 전처치에 의하여 같은 정도의 수축을 유발하기 위해서는 더 높은 농도의 epinephrine이 필요하다는 점 그리고 다른 여러 위장관 신경계에서 콜린성 신경계에 아드레날린성 신경이 개재되었다는 보고를 종합해볼 때 식도구 윤상근에서 보이는 atropine에 의한 epinephrine의 수축억제 현상은 외부에서 투여된 epinephrine이 평활근 세포에 존재하는 흥분성 α -수용체에 주로 작용하여 수축을 일으키기도 하지만 일부는 내재신경계에 존재하는 콜린성 신경을 매개로 하여 acetylcholine의 분비를 증가시켜 나타난 현상으로 볼 수 있겠다.

그러나 아드레날린이 콜린성 내재신경에 직접적으로 작용하지 않고 다른 interneurons를 통해 2차적으로 콜린성신경에 작용할 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대한 상세한 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이다.

위장과 평활근에서 β -agonist는 일반적으로 평활근 세포에 직접 작용하여 억제반응을 유도함이 보고되어져 있다.^{2,21} 토끼의 장관과²² 기니피 쥐²³에서 TTX로 신경의 영향을 제거했을 때 norepinephrine의 억제작용을 감소시키지 못했고 또 cholinergic nerve를 hyoscine으로 차단하고 hexamethonium으로 신경절을 봉쇄한 장관에서도 교감신경자극이 이완을 유도함을 보아 norepinephrine이 평활근에 직접작용하여 이완을 일으킨 것이라고 보고하였다. 소의 식도구 중주근에서 TTX로 모든 신경을 봉쇄시켰음에도 β -inhibitory 작용을 차단하지 못하고 또 윤상근과는 달리 atropine이 β -수용체의 억제작용을 차단하지 못하는 것으로 보아 중주근의 β -inhibitory 수용체가 신경에 있지 않고 식도구 평활근 세포에 aks 있음을 알 수 있다.

결 론

소의 식도구 평활근에서 catecholamine에 의한 수축과 이완을 유도하는 adrenoceptor의 존재부위를 알아보기 위해 organ bath내에서 등척성 수축력을 측정하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 식도구 바닥 윤상근에서 흥분성 α -수용체에 의한

수축반응은 tetrodotoxin 및 냉장 denervation에 의하여 차단되지 않았으며 atropine에 의하여 부분적으로 억제되었다.

2. 식도구 입술 중주근에서 억제성 β -수용체에 의한 수축억제반응은 tetrodotoxin 및 atropine에 의해 차단되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 보아 식도구 바닥 윤상근에서 흥분작용을 유도하는 α -adrenoceptor는 주로 식도구 평활근 세포막에 존재하고, 일부는 콜린성 내재신경계에 존재하는 것으로 생각되며 식도구 중주근에서 억제작용을 유도하는 β -adrenoceptor는 평활근 세포막에만 존재하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 조제열, 양일석. 소(牛)의 식도구 평활근 절편에 대한 catecholamine의 작용. 大韓獸醫學會誌 1991 ; 31(2) : 171~178.
2. Kosterlitz HW, Watt AT. Adrenergic receptors in the guinea-pig ileum. *J Physiol(London)* 1965 ; 177 : 11~12.
3. Anderson AA, Lees GM. Investigation of occurrence of tolerance to bronchodilator drugs in chronically pretreated guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 1976 ; 56 : 331~338.
4. Paton WDM, Vizi ES. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol* 1969 ; 35 : 10~28.
5. Kosterlitz HW, Lydon RJ, Watt AJ. The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1970 ; 39 : 398~413.
6. Belisle S, Gagnon DJ. Stimulating action of catecholamines on isolated preparations of the rat colon and human and rabbit taenia coli. *Br J Pharmacol* 1971 ; 41 : 361~366.
7. Bailey DM. The action of sympathomimetic amines on circular and longitudinal smooth muscle from the isolated esophagus of the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol* 1965 ; 17 : 782~787.
8. Bauer V. Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum : the action of α - and β -adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol* 1981 ; 72 : 201~210.

9. Christensen J, Daniel EE. Effects of some autonomic drugs on circular esophageal smooth muscle. *J Pharmac Exp Ther* 1968 ; 159(2) : 243~249.
10. Cheistensen J, Daniel EE. Electric and motor effects of autonomic drugs on longitudinal esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* 1966 ; 211(2) : 387~394.
11. Lum BB, Kermani MH, Heilman RD. Intestinal relaxation produced by sympathomimetic amines in isolated rabbit jejunum : selective inhibition by adrenergic blocking and by cold storage. *J Pharmac Exp Ther* 1966 ; 154 : 463~471.
12. Marti J. Steuerung der schlundrinnenmotorik beim kalb. *Schweizer-Archiv für Tierheilkunde* 1988 ; 131(1) : 49~50.
13. Ohkawa H. Evidences for alpha excitatory action of catecholamines on the electrical activity of the guinea-pig stomach. *Jpn J Physiol* 1976 ; 26 : 41~52.
14. Bauer V. Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum : the action of α - and β -adrenoceptor blocking agents. *Br J Pharmacol* 1982 ; 76 : 569~578.
15. Broadley KJ, Grassby PF. Alpha- and beta-adrenoceptor mediated responses of the guinea-pig ileum and the effects of neuronal uptake inhibition. *Arch Pharmac* 1985 ; 331 : 316~323.
16. Haffner JFW. The adrenergic receptors in isolated rabbits stomach muscle. *Acta Pharmac Tax* 1971 ; 29 : 327~338.
17. Gillespie JS, Khoyi MA. The site and receptors responsible for the inhibition by sympathetic nerve of intestinal smooth muscle and its parasympathetic motor nerves. *J Physiol* 1977 ; 267 : 767~789.
18. Wikberg JES. Pharmacological classification of adrenergic α -receptors in the guinea pig. *Nature(London)* 1978 ; 273 : 164~166.
19. Jacobowitz D. Histochemical studies of the autonomic innervation of the gut. *J Pharmac Exp Ther* 1965 ; 149 : 358~364.
20. Norberg KA, Sjoqvist F. New Possibilities for adrenergic modulation of ganglionic transmission. *Pharmac Review* 1966 ; 18 : 743~751.
21. Wikberg J. Localization of adrenergic receptors in guinea-pig ileum and rabbit jejunum to cholinergic neurons and to smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1977 ; 99 : 190~207.
22. Eowman WC, Hall MT. Inhibition of rabbit intestine mediated by α -and β -adrenoceptors. *Br J Pharmac* 1970 ; 38 : 399~415.
23. Gershon MD. Inhibition of gastrointestinal movement by sympathetic nerve stimulation : the site of action. *J Physiol* 1967 ; 1890 : 317~327.