

토끼 적출 위 평활근의 운동성에 대한 transmural stimulation의 효과

김주현 · 심철수* · 홍용근**

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소 · 경남도축산진흥연구소 동부지소*
경상대학교 자연과학대학 생화학과**
(1999년 3월 9일)

Effect of transmural stimulation to motility on isolated gastric smooth muscle

Joo-heon Kim, Cheol-soo Shim* , Yong-geun Hong**

*College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University
Eastern Branch, Gyeongnam Livestock Promotion Institute**
*Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Gyeongsang National University***
(Received Mar 9, 1999)

Abstract : To elucidate the action of the cholinergic and adrenergic nerve on isolated gastric fundus smooth muscle of rabbit, the effects of electrical transmural stimulation were investigated in the presence of atropine, cholinergic receptor blocker ; phentolamine, nonselective α -adrenergic receptor blocker ; propranolol, nonselective β -adrenergic receptor blocker and L-arginine from the isometric contraction of physiological recording system.

1. The contractile response induced by electrical transmural stimulation was increased as the frequency(1~32Hz)-dependent manner on the isolated gastric fundus smooth muscle.

2. The contractile response induced by electrical transmural stimulation was markedly inhibited by the pretreatment of atropine(1 μ M).

3. The contractile response induced by electrical transmural stimulation was inhibited by the pretreatment of phentolamine(1 μ M).

4. The relaxative response induced by electrical transmural stimulation on presence of atropine (1 μ M) was inhibited by the pretreatment of propranolol(1 μ M).

5. The relaxative responses on precontraction induced by histamine(10 μ M) with guanethidine (50 μ M) and atropine(1 μ M) by electrical transmural stimulation were increased by L-arginine (1mM).

These findings suggest that it was the excitatory action of cholinergic and α -adrenergic nerve, and the inhibitory action of β -adrenergic nerve and nonadrenergic noncholinergic nerve on the

이 논문은 1998년도 경상대학교 연구장학재단연구비에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Joo-heon Kim, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Republic of Korea.

isolated gastric fundus smooth muscle of rabbit.

Key words : electrical transmural stimulation, cholinergic, adrenergic nerve, NANC, gastric smooth muscle, rabbit.

서 론

자율신경계의 기능은 교감신경과 부교감신경의 길항 작용에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며 소화기계 에 있어서 자율신경계의 생리적기능은 촉진적 반응을 나타내는 부교감신경의 절후신경섬유인 cholinergic 신경 섬유와 촉진적 반응과 억제적 반응을 공히 가지고 있는 교감신경의 절후신경섬유인 adrenergic 신경섬유에 의해 조절되고 있다¹⁻³.

부교감신경의 촉진적 반응에 대해서는 acetylcholine이 potential sensitive ion channel에 작용하여 활동전위를 발생시키는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁶. 교감신경의 촉진적 반응과 억제적 반응에 대한 연구는 Alquist가 adrenoceptor를 α -, β -adrenoceptor로 분류한 이래 여러 평활근에서 α -, β -adrenoceptor의 존재가 증명되었다⁹⁻¹². 대체로 α -adrenoceptor는 촉진적 반응을 나타낸다고 알려져 있으며 β -adrenoceptor는 억제적 반응을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 α -adrenoceptor는 α_1 -adrenoceptor와 α_2 -adrenoceptor로 분류되어지며 α_1 -adrenoceptor는 촉진적 반응을 나타내는 반면 α_2 -adrenoceptor는 억제적 반응을 보이는 것으로 알려져 있다^{3,12}.

하지만 이들 adrenoceptor, cholinergic receptor의 생리적 의의를 추구하기 위한 연구들이 receptor에 선택적으로 작용하는 agonist와 antagonist들의 작용만으로 여러 동물에서 연구되어 왔다^{3,8,9}.

또한 Gonella¹³ 및 Cook와 Burnstock¹⁴의 전자현미경적 연구에서 밝힌 장관내 cholinergic, adrenergic 신경섬유의 말단소포인 large vesicle내에 신경전달물질들이 존재하고 있는 것이 밝혀짐으로서 이들 신경전달물질의 작용에 대한 연구를 병행하고 있다.

따라서 저자들은 위 평활근 절편에 전기적인 자극을 가해 평활근에 분포하는 신경의 흥분작용을 유도함으로써 신경섬유 말단 소포에 있는 내재성 신경전달물질의 유리를 통하여 자율신경계의 생리적 의의를 명확히 밝

히고져 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 2~3kg 내외의 임상적으로 건강하다고 인정되는 성숙한 토끼를 암·수 구별없이 20두 사용하였다.

위저부 평활근 절편의 제작 : 실험동물을 타격에 의해 실신시킨 후 즉시 복강을 열고 위를 적출하여 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스가 공급되는 4℃의 냉한 정상생리적 영양액에서 길이 1.5cm, 폭 0.5cm 되게 위저부(gastric fundus)의 평활근 절편을 제작하였다.

영양액의 조성 : 정상 생리적 영양액은 NaCl, 136; KCl, 2.7; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.0; Glucose, 5.5; Tris, 24.0(mM)로 하여 37℃에서 pH 7.4가 되도록 조성하여 사용하였다.

운동성의 기록 : 제작된 평활근 절편을 20ml용 organ bath에 옮겨서 한쪽 끝은 organ bath 저부에 고정시키고 다른쪽 끝은 상하높이를 조절할 수 있도록 준비된 근수축변환기(isometric force transducer, FT03, Grass)에 연결하여 기록기(Potentiometric recorder, PR200, Bioscience)를 통하여 위 평활근의 등척성 수축(isometric contraction)을 기록하였다.

전기자극 방법 : 전기자극은 transmural stimulation으로서 위 평활근 절편의 양쪽 5mm 지점에 백금전극을 설치하여 자극기(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 M의 tetrodotoxin을 전처리하여 전기자극에 대한 반응이 완전히 사라지는 것으로 확인하였다. 전기자극의 간격은 5~10분으로 하였다.

또한 NANC(nonadrenergic noncholinergic)신경 효과를 관찰하기 위하여 adrenergic 신경차단제인 guanethidine (50 μ M)과 cholinergic 수용체 차단제인 atropine(1 μ M)을 전처리하고 histamine(10 μ M)에 의한 수축이 안정된 후 실험

을 실시하였다.

약물처리방법과 사용된 약물 : 약물처리는 20ml용 organ bath에 200 μ l 이하의 약물을 처리하여 100배 이상 희석되도록하였으며 약물처리후 정상 생리적 영양액으로 3회 이상 세척하여 1시간 이상 평형시킨 후 다음 실험을 실시하였다. 본 실험에 사용된 약물중 acetylcholine, guanethidine, atropine, phentolamine, propranolol, tetrodotoxin, L-arginine은 Sigma 제품이었으며 그외 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

결 과

위저부 평활근 절편에 대한 transmural stimulation의 효과 : Transmural stimulation을 0.5 msec, 10~60V, 1~32 Hz까지 20초동안 전기자극을 실시하여 그 반응을 관찰하였다.

전기자극에 대한 반응은 급속한 단일 수축현상을 나타내었으며 20V에서 frequency 1~32Hz까지 frequency 증가에 따라 수축정도가 증가하는 경향을 보였다(Fig 1).

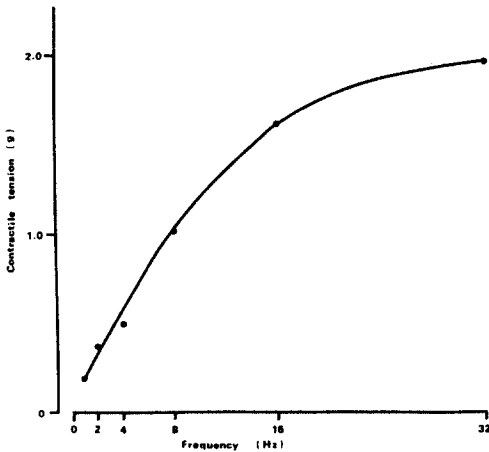


Fig 1. Frequency responses of electrical transmural stimulation (20V, 0.5 msec, 20 sec) on the isolated gastric smooth muscle of rabbit.

따라서 최적 전기자극치를 20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec의 자극으로 실험을 실시하였다. 그리고 전기자극에 대한 단일 수축현상이 1 μ M tetrodotoxin의 전처리에 의해 완전히 차단되어짐을 관찰하고 주어진 전기자극이 신경자극에 의한 효과임을 확인하였다.

Atropine이 전기자극의 수축효과에 미치는 영향 : 위저부 평활근 절편의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 cholinergic receptor 차단제인 atropine(1 μ M)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 수축현상이 심하게 억제되었다(Fig 2).

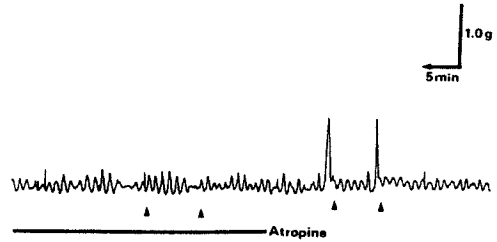


Fig 2. Effect of atropine(1 μ M) on neurogenic contraction by electrical transmural stimulation(\blacktriangle) on the isolated gastric smooth muscle of rabbit. Electrical transmural stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

Phentolamine이 전기자극의 수축효과에 미치는 영향 : 위저부 평활근 절편의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 α -adrenergic receptor 차단제인 phentolamine에 의해 어떤 영향을 받는지를 atropine(1 μ M)을 처리한 후에 phentolamine(1 μ M)을 첨가 처리하여 전기자극을 실시하였더니 전기자극에 의한 수축현상이 억제되었다(Fig 3).

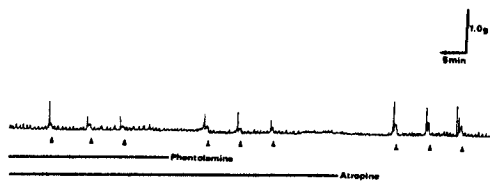


Fig 3. Effect of phentolamine(1 μ M) on neurogenic contraction with atropine (1 μ M) by electrical transmural stimulation(\blacktriangle) on the isolated gastric smooth muscle of rabbit. Electrical transmural stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

Propranolol이 전기자극의 수축효과에 미치는 영향 : 위저부 평활근 절편의 전기자극(20V, 10Hz, 0.5 msec, 20 sec)에 의한 수축현상이 β -adrenergic receptor 차단제인 propranolol에 의해 어떤 영향을 받는지를 atropine(1 μ M)을 처리하고 propranolol(1 μ M)을 첨가처리한 후 전기자극

을 실시하였더니 atropine 처리 후에 생긴 이완반응이 억제되는 경향을 보였다(Fig 4).

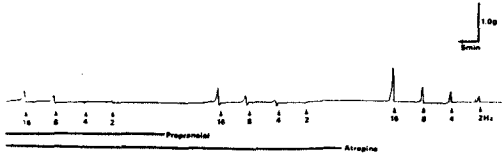


Fig 4. Effect of propranolol(1 μ M) on neurogenic contraction of frequency-responses with atropine(1 μ M) by electrical transmural stimulation(\blacktriangle) on isolated gastric smooth muscle of rabbit. Electrical transmural stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

NANC 신경의 효과에 대한 L-arginine의 영향 : NANC (nonadrenergic noncholinergic) 신경효과를 관찰하기 위하여 adrenergic 신경차단제인 guanethidine(50 μ M)과 cholinergic 수용체 차단제인 atropine(1 μ M)을 전처리하고 30분 후에 histamine(10 μ M)으로 위 절편 평활근을 전수축시켜 수축이 안정된 후 전기자극(20V, 0.5 msec, 20 sec)을 실시하였더니 frequency 의존적 이완반응을 관찰할 수 있었으며 이와같은 이완반응은 L-arginine(1mM)의 전처리에 의해 이완반응이 증가되어지는 경향을 나타내었다(Fig 5).

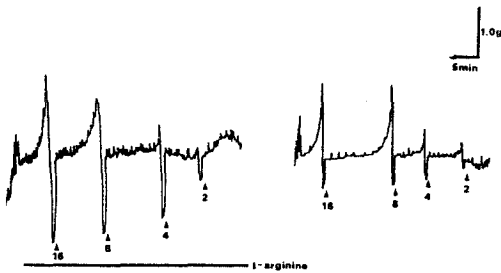


Fig 5. Effect of L-arginine(1mM) on neurogenic relaxation of frequency-responses with guanethidine(50 μ M) and atropine (1 μ M) by electrical transmural stimulation(\blacktriangle) on precontraction induced by histamine(10 μ M) in isolated gastric smooth muscle of rabbit. Electrical transmural stimulation at 20V, 10Hz, 0.5 msec pulse width for 20 sec and 5 min interval.

고 찰

자율신경계의 작용에 의한 생리현상을 규명하기 위하여 자율신경계의 수용체에 선택적으로 작용하는 agonist

와 antagonist를 이용하여 여러동물에서 실험이 진행되어 왔다^{3,8-12}. 그러나 활동전압을 쉽게 발생하는 평활근에서는 전기적 변화에 의해 유발되는 활동전압을 조정하는 것이 평활근 긴장을 변화시키는 가장 중요한 기전일 것으로 알려져 있다^{3-12,15}. 활동전압이 발생하는 주기전은 여러 원인에 의해 세포막의 탈분극 때문인 것으로 믿어지고 있다¹⁵. 그래서 본 연구에서는 평활근 자체에 존재하는 신경의 전기적 자극을 통하여 신경 절후섬유의 흥분으로 신경말단에서 내재성 신경전달물질을 분비하게 하여 평활근 운동성의 변화에 대하여 관찰하였다.

본 실험에 이용된 전기자극이 김과 김¹⁶, 김 등¹⁷의 연구에서와 같이 neural blocker인 tetrodotoxin(1 μ M)의 전처리후 전기자극에 의한 수축현상이 완전히 차단되어진 것으로 보아 분명히 평활근에 존재하는 신경에 선택적으로 작용하여 나타난 흥분효과임을 확인할 수 있었다.

전기자극에 의한 위저부 절편 평활근의 단일 수축현상은 평활근에 존재하는 cholinergic 신경의 흥분으로 신경말단에서 분비된 acetylcholine에 의한 효과임을 알 수 있는 본 실험의 근거는 cholinergic 차단제인 atropine(1 μ M)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 완전히 억제되어진 것으로 보아 알 수 있었으며 이와같은 결과는 토끼의 회장¹⁸과 기니피크의 폐¹⁹, 쥐와 기니피크의 회장¹⁵에서 atropine에 의해 acetylcholine의 효과가 차단됨으로써 평활근에 강력한 cholinergic 수용체의 촉진적 반응이 존재한다고 밝힌 것과 유사한 결과로 사료되어진다.

Noradrenaline의 약물효과는 개체간 또는 실험당시의 동물의 생리적 조건에 따라서 많은 차이를 보이고 있는데^{3,20,21} α -adrenergic receptor 차단제인 phentolamine(1 μ M)의 전처리후 전기자극에 의한 수축현상이 억제되어진 것은 α -adrenergic receptor를 통한 촉진적 반응이 있음을 시사하고 있다. 이와같은 효과는 α_1 -adrenergic receptor 차단제인 prazosin의 전처리에 의해 noradrenaline의 촉진적 반응이 억제되어진다는 결과²²와 유사한 것으로 사료되어진다.

전기자극의 단일 수축현상이 β -adrenergic receptor 차단제인 propranolol(1 μ M)의 전처리에 의해 전기자극에 의한 이완반응이 억제되어지는 경향을 보인 것은 β -adrenergic receptor를 통한 수축의 억제효과가 존재함을 추측할 수 있다.

Noradrenaline의 효과는 실험조건에 따라 상당한 차이를 보이고 있는데 이와같은 현상은 noradrenaline의 작용

이 실험순간에 존재하는 각각의 수용체의 보존도에 따라서 크게 좌우된다고 한다. 하지만 일반적으로 α -adrenergic receptor는 촉진적 반응을 보이며 β -adrenergic receptor는 억제적 반응을 보인다는 결과¹⁵와 일치하는 결과로 사료되어진다.

본 실험에서 phentolamine의 전처리에 의해 전기자극에 의한 단일 수축현상이 억제되어지지만 atropine의 전처리에 의해서는 전기자극에 의한 단일 수축현상이 거의 완전히 차단되어진 것으로 보아 위저부 평활근에 있어서 cholinergic 신경의 촉진적 작용이 강력하게 나타나는 것으로 사료되어진다.

또한 guanethidine(50 μ M)과 atropine(1 μ M)의 전처리로서 adrenergic과 cholinergic 수용체의 차단후에 histamine(10 μ M)의 전수축에서 생겨난 전기자극에 의한 이완작용은 NANC 신경의 작용인 것으로 사료되어지며 반사성 수축효과도 관찰할 수 있었다. 또한 L-arginine(1mM)의 전처리로서 전기자극에 의한 이완반응이 증가되어진 결과는 랫트²³, 기니피크²⁴과 돼지²⁵의 위장관에서 NANC 신경의 이완작용이 nitric oxide(NO)가 관련되어 있다는 보고와 일치된 결과로 사료되어진다.

결 론

토끼 적출 위저부 평활근의 전기자극을 통한 cholinergic, adrenergic 신경 및 nonadrenergic, noncholinergic 신경에 의한 운동성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 토끼 적출 위저부 평활근에 대한 전기자극은 frequency(1~32Hz) 의존적 단일 수축현상을 나타내었다.
2. 전기자극에 의한 단일수축현상은 cholinergic 수용체 차단제인 atropine(1 μ M)에 의해 수축현상이 심하게 억제되었다.
3. 전기자극에 의한 단일수축현상이 adrenergic 수용체 차단제인 phentolamine(1 μ M)에 의해 억제효과를 보였다.
4. Cholinergic 수용체 차단제인 atropine(1 μ M)이 처리된 후 전기자극에 의해 생긴 이완반응이 β -adrenergic 수용체 차단제인 propranolol(1 μ M)에 의해 이완반응이 억제되었다.
5. 토끼 적출 위저부 평활근은 adrenergic 신경차단제인 guanethidine(50 μ M)과 cholinergic 수용체 차단제인 atropine(1 μ M)을 전처리로서 NANC 신경조건하에 있어서

histamine(10 μ M)에 의한 수축에서 전기자극에 의한 frequency 의존적 이완반응을 나타내었으며 이와같은 이완반응은 L-arginine(1mM)의 전처리에 의해 이완반응이 증가되어지는 경향을 나타내었다.

이와같은 결과들로서 토끼 적출 위 평활근에는 촉진적 반응을 보이는 cholinergic 및 α -adrenergic 신경과 억제적 반응을 보이는 β -adrenergic 신경과 nonadrenergic-noncholinergic 신경이 존재함을 추측할 수 있었다.

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*, 72:370-382, 1941.
2. Marshall JM. Effects of catecholamines on the smooth muscle of the female reproductive tract. *Am Rev Pharmacol*, 13:19-24, 1973.
3. Goodman LS, Gillman A. The Pharmacological basis of therapeutics, 6th ed. New York, MacMillan Pub. 67-74, 1980.
4. Bolton TB. The depolarizing action of acetylcholine or catecholamine in intestinal smooth muscle. *J Physiol*, 220:647-654, 1972.
5. Bolton TB. The permeability change produced by acetylcholine in smooth muscle. In drug receptor. London, MacMillan 87-102, 1973.
6. Joiner PD. Studies on the loss of acetylcholine sensitivity in ileal muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 186: 552-559, 1973.
7. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptor. *Am J Physiol*, 153:586-600, 1948.
8. Coleman AJ, Paterson DS, Smoerville AR. The beta adrenergic receptor of rat corpus luteum membrane. *Biochem Pharmacol*, 28:1003-1012, 1979.
9. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, et al. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 21:597-598, 1967.
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*, 12:556-

- 564, 1976.
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*, 12:409-415, 1976.
 12. William LT, Lefkowitz RJ. Alpha adrenergic receptor identification by ³H dihydroerocryptine binding. *Science*, 192:791-799, 1976.
 13. Gonella J. Modification of electrical activity of the longitudinal muscle of the rabbit duodenum following contraction of the circular muscle. *Rend Romani Gastroenterol*, 3:127-131, 1971.
 14. Cook RD, Burnstock G. The ultrastructure of Auerbach's plexus in guinea pig. I. Neural element. *J Neurocytol*, 5: 171-194, 1976.
 15. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*, 220: 606-718, 1979.
 16. Kim JH, Kim YK. Purinergic innervation on isolated renal artery of rabbit. *Korean J Vet Res*, 31:389-395, 1991.
 17. Kim JH, Shim CS, Park SE. Effect of cholinergic and α_2 -adrenergic nerve on the isolated dog ileal smooth muscle by the electrical field stimulation. *Korean J Vet Res*, 33:211-216, 1993.
 18. Kim JH, Kim CS. Effects of autonomic drugs on the motility of ileal smooth muscle in rabbit. *J Gyeongsang Natl Univ*, 23:157-161, 1984.
 19. Stoner J, Menganiello VC, Vanughan M. Guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanylate cyclase activity in guinea pig lung. Effects of acetylcholine and cholinestrase inhibitor. *Mol Pharmacol*, 10:155-163, 1974.
 20. Maughan GB, Shabanah EH, Toth A. Experiments with pharmacologic sympatholysis in the gravid. *Am J Obstet Gynecol*, 97:764-769, 1967.
 21. Tasi TH, Fleming WW. The adrenotropic receptor of the cat uterus. *J Pharmacol Exp Ther*, 143:268-273, 1964.
 22. Shim CS, Park SE, Jeon SC, *et al.* Cholinergic contraction to the perivascular nerve stimulation on the isolated coronary artery of pig. *Korean J Vet Res*, 35(2): 237-243, 1995.
 23. Boeckxstaens GE, Pelckmand PA, Bogerd JT, *et al.* Evidence for differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal peptide by non-adrenergic non-cholinergic nerves in rat gastric fundus. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 318:107-115, 1992.
 24. Lefebvre RA, Baert E, Barbier AJ. Influence of NG-nitro-L-arginine on nonadrenergic noncholinergic relaxation in the guinea pig gastric fundus. *Brit J Pharmacol*, 106:173-179, 1992.
 25. Lefebvre RA, Smits GJM, Timmermans JP. Study of NO and VIP as nonadrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Brit J Pharmacol*, 116:2017-2026, 1995.