

생쥐 소장 카할세포의 내향성 향도잡이 전압에 미치는 내소산의 억제효과에 관한 연구

홍누리 · 안태석 · 박현수 · 채 한 · 권영규 · 김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부

Inhibitory Effects of Naeso-san on Pacemaker Potentials in Interstitial Cells of Cajal of Murine Small Intestine

Noo Ri Hong, Tae Seok Ahn, Hyun Soo Park, Han Chae, Young Kyu Kwon, Byung Joo Kim*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

The purpose of this study was to investigate the effects of Naeso-san in interstitial cells of Cajal (ICCs) in murine small intestine. First, we isolated ICCs from murine small intestine. After that, we cultured these cells for 1 days. The patch-clamp technique was applied on ICCs that formed network-like structures in culture (1 days). Spontaneous rhythms were routinely recorded from cultured ICCs under current-clamp conditions, and the ICCs within networks displayed more robust electrical rhythms (pacemaker potentials). To understand the relationship between Naeso-san and pacemaker activity in ICCs, we examined the effects of Naeso-san on pacemaker potentials of ICCs. In current clamp mode ($I = 0$), the addition of Naeso-san (10 mg/ml – 50 mg/ml) decreased the amplitude and frequency of the pacemaker potentials of ICCs in a dose dependent manner. However, these effects were blocked by intracellular GDPβ S, a G-protein inhibitor, and glibenclamide, a specific ATP-sensitive K^+ channels blocker. Pretreatment with SQ-22536, an adenylate cyclase inhibitor, did not block the Naeso-san induced effects, whereas pretreatment with ODQ, a guanylate cyclase inhibitor, or L-NAME, an inhibitor of nitric oxide (NO) synthase blocked the Naeso-san induced effects. Our findings provide insight into unraveling the modulation of Naeso-san in pacemaker potentials of ICCs and developing therapeutic agents against gastrointestinal motility disorders.

keywords : Naeso-san, interstitial cells of Cajal, patch-clamp technique, gastrointestinal motility

서 론

위장관 운동 조절제는 기능성 소화불량이나 변비, 과민성 대장 증상뿐 아니라, 당뇨병성 위장운동장애, 화학요법으로 인한 위장운동장애, 소화관 운동장애로 인한 장폐색증, 근긴장성 이영양증 (myotonic dystrophy) 환자의 위장관 운동장애 등에 사용될 수 있다. 위장관의 운동은 교감신경, 부교감 신경 등과 같은 외인성 신경계, 위장관 자체내 내인성 신경계, 자체내 내인성 인자 및 약물 등에 의해 조절된다¹⁾. 위장관 운동은 위장관 평활근의 수축으로 시발된다. 이 평활근은 대표적인 내장 평활근(visceral smooth muscle)으로서 자동능을 보유하고 있다. 위장관 평활근세포에서 기록되는 자발적 흥분파를 서파(slow wave)라고 부르는데 위장관의 수축빈도는 바로 서파의 발생빈도에 의하여 결정된다. 사람에서 서

파의 발생빈도는 부위에 따라 다르다. 즉 위에서는 분당 3회, 상부 소장에서는 12회이나 하부소장으로 내려갈수록 감소된다²⁾. 서파의 발생기전에 대하여는 평활근 자체라는 설(근원설)과 특수한 간질세포인 카할세포(interstitial cells of Cajal: ICCs)라는 두가지 주장이 맞서고 있으나 최근에는 카할세포가 위장관 자발적 리듬의 향도잡이 세포 (pacemaker cell)이라는 많은 실험결과가 보고되고 있다^{3,4)}.

카할세포는 평활근과 함께 간충직(mesenchyme)의 전구세포에서 분화한 세포들로 위장관 평활근 및 신경망과 간극연접(gap junction)을 통해 연결되어 있다. 카할세포는 세포막의 티로신 인산 효소(receptor tyrosine kinase)인 키트(Kit)에 작용하는 c-kit 유전자를 가지고 있다⁵⁾. 평활근과 장관신경계는 키트 수용체(Kit receptor)가 존재하지 않아 c-Kit 항체를 이용한 세포면역학적방법이 카할세포를 확인하는데 결정적 역할을 하고 있다³⁾.

* Corresponding author

Byung Joo Kim, Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

E-mail : vision@pusan.ac.kr · Tel : +82-51-510-8469

Received : 2014/10/08 · Revised : 2014/11/17 · Accepted : 2014/11/20

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.17208/kjopp.2014.12.28.6.630>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

사람에게서도 여러 위장관 운동성 질환이 카탈세포와 크게 관련되어 있다는 많은 실험결과들이 보고되었다⁶⁻⁸⁾. 즉 카탈세포의 수가 감소하거나 형태학적 이상이 정상적인 위장관 운동성의 리듬을 유지하지 못함으로 인하여 운동성 장애를 일으킨다는 것이다. 이와 관련된 질환들로는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease), 만성특발성장가짜폐색(chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction), 식도이완불능증(achalasia), 선천성 거대결장증(Hirschsprug's disease), 유문협착(pyloric stenosis), 장 폐색(intestinal obstruction), 항문직장기형(anorectal malformations) 등이 있다⁴⁾.

내소산(內消散)은 급성위염을 치료하는데 사용하는 처방으로 날 음식, 찬음식, 딱딱한 음식물을 먹고 위에 손상을 입어 가슴이 답답하고 아픈 증상에 응용하여 좋은 효과가 있어 급성위염으로 음식이 위장내에 정체되어 배가 불룩하고 통증이 있는 증상을 치료하는데 사용된다⁵⁾. 이와 같이 내소산은 일반적으로 위장관 계통에 문제 발생시 사용되는 시약으로 널리 알려져 있는데 관련된 연구로는 내소산에 의해서 흰 쥐의 위 유문부 운동성 증가가 보고 되고 있으며⁵⁾ 위액분비와 위궤양 치료에 효능이 있다⁹⁾고 알려져 있다. 또한 항암, 소염, 항균작용을 보이고 있음이 알려져 있다^{10,11)}. 하지만 소장 운동성에 대한 내소산의 효능은 잘 알려져 있지 않다.

따라서, 본 실험에서는 위장관 운동 조절 기전에 관한 연구에 중요한 항도잡이 세포인 카탈세포를 이용하여 보험용 한약제제중에서 내소산의 카탈세포에 대한 효과와 작용기전을 알아보아 내소산의 소장 운동성에 미치는 영향을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

내소산은 진피, 반하, 백복령, 지실, 산사육, 신국, 사인, 향부자, 삼릉, 아출, 생강으로 이루어져 있으며 (Table 1), 아이월드 제약회사 (I-WORLD Pharmaceuticals; <http://i-pharm.koreasme.com>)에서 기증받아 사용하였다. 증류수에 0.5 g/mL의 농도로 녹인 후에 냉장고에 보관 사용하였다. 그 외 다른 모든 시약은 sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 사용직전에 원하는 농도로 만든 후 세포에 투여하였다.

2. 방법

1) 카탈세포 배양

카탈세포의 배양을 위해 주로 이용되는 마우스는 3-5일령 Balb/C를 사용하고 에테르 (ether)로 마취 시킨 후 개복하여 유문륜 (pyloric ring)에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출하였다. 실온에서 크랩스 링거 중탄산염 (Krebs-Ringer bicarbonate)용액으로 채워진 준비 용기 속에서 창자간막 가장자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 윤상근을 노출시킨후 분리된 소장 근육조직을 교원질(膠原質) 분해 효소 (collagenase) (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) 1.3 mg/mL, 소혈청알부민 (bovine serum albumin) (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA) 2 mg/mL, 트립신 저해제 (trypsin inhibitor) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 2 mg/mL 등이 들어 있고, Ca²⁺이 들어 있지 않은 헝크(Hank's) 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화시킨후 진탕시켜 세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 유리 커버 글라스 위에 분주하고, 10분후에 간상세포인자 (stem cell factor) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5 ng/mL와 2% 항생/항진균제(antibiotic/antimycotic) (Gibco, Grand Island, NY, USA)가 들어 있는 smooth muscle growth medium (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) 용액을 분주한 후, 37°C (95% O₂ - 5% CO₂) 배양기에서 배양 시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 항생/항진균제 (antibiotic/antimycotic)만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주고 실험은 배양 1일째 후부터 시행하였다.

2) 면역형광염색법

배양한 카탈 세포를 5분동안 아세톤 (acetone) (4°C)에 고정시킨 후, 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M, pH 7.4))로 희석하고, 0.3% Triton X-100를 투여하였다. 그 후에 실온에서 1% 소 혈청 알부민 (Bovine Serum Albumin)을 1시간동안 담근 후 c-kit 항체(phycoerythrin-conjugated rat anti-mouse c-kit monoclonal antibody; eBioscience, San Diego, CA, USA)를 결합하였다. 그 후에 인산완충식염수로 세척한 후 2차 항체 (fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled donkey anti-rabbit IgG secondary antibody; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bar Harbor, MN, U.S.A.)를 결합하였다. 세포는 컨포칼 현미경 (FV 300 laser scanning confocal microscope; Olympus, Tokyo)를 이용하여 자극 파장 (excitation wavelength)인 495 nm에서 관찰하였다.

3) 전기생리학적 실험

배양한 카탈세포에서 막전압을 기록하기 위해 패치클램프 (patch clamp) 실험기법 중 전 세포(whole cell patch)방법을 이용하였다¹²⁾. 전압은 패치클램프 앰프(standard patch clamp amplifiers) (Axon Instruments, Foster, CA, USA)를 통해 증폭시키며, 나오는 신호는 컴퓨터 모니터 및 생리적 기록기 (Gould 2200, Gould, Valley View, OH, USA)를 통해서 관찰하였다. 막전압을 기록하는 동안 세포의 관류용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM 단위임): KCl 5, NaCl 135, CaCl₂ 1.2, glucose 10, HEPES 10이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 하고, 전극내 용액의 조성은 다음과 같이 하였다 (각 수치는 mM 단위임): KCl 140, MgCl₂ 5, K₂ATP 2.7, Na₂GTP 0.1, creatinine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 하였다. 배양된 카탈세포에서 세포막 전류 고정법 (Current clamp)을 시행하여 자발적으로 발생하는 내향성 항도잡이 전압을 기록한 후 내소산의 효능을 알아 보았다.

4) 통계 분석

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago)의 Independent t-test를 사용하였으며 유의수준 p<0.05를 사용하였다. 실험결과는 mean ± SD 로 기재하였다.

결 과

1. 내소산의 카할세포에 대한 효과

내소산에 의한 소장 카할세포의 기능을 확인하기 전에 먼저 배양한 세포가 카할세포인지를 *c-kit*항체를 이용한 면역형광염색방법을 이용하여 확인하였다(Fig. 1). 소장 카할세포의 항도잡이 기능(pacemaking activity)에서 내소산에 의한 조절능을 알아 보았다. 내소산은 농도 의존적으로 항도잡이 기능(pacemaking activity)의 진폭(amplitude)과 빈도(frequency)는 감소하지만 안정막전압(resting membrane potentials)은 거의 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 2). 진폭의 변화는 10 mg/ml 내소산에서는 거의 변화없지만 30 mg/ml 에서는 13.1 ± 2.2 mV (n = 10), 50 mg/ml 에서는 1.7 ± 1.3 mV (n = 8)정도로 진폭이 감소되었다(Fig. 2D). 빈도의 변화는 10 mg/ml 내소산에서는 거의 변화없지만 30 mg/ml 에서는 5.7 ± 1.2 cycles/min (n = 10), 50 mg/ml 에서는 1.1 ± 0.2 cycles/min (n = 8)정도로 빈도가 감소되었다(Fig. 2E).

Table 1. Amount and Composition of Naeso-san

Herb	Scientific Name	Amount(g)
Jin Pi	<i>Citri Pericarpium</i>	0.86 g
Ban Ha	<i>Pinellia ternate(Thumb.) Breit</i>	0.68 g
Baek Bok Ryung	<i>Poria cocos</i>	0.05 g
Ji Sil	<i>Citrus aurantium</i>	0.78 g
San Sa Yuk	<i>Crataegus pinnatifida</i>	0.95 g
Sin Kuk	<i>Massa mdicata fermentata</i>	1.35 g
Sa In	<i>amomum villosum Lour</i>	0.32 g
Hyung Bu Ja	<i>Cyperus rotundus L.</i>	0.86 g
Sam Ryung	<i>Sparganium stoloniferum</i>	0.35 g
A Chul	<i>Curcuma phaeocalulis</i>	0.24 g
Saeng Kang	<i>Zingiber officinale</i>	0.26 g
Total amount		6.7 g



Fig. 1. Cultured interstitial cells of Cajal of the murine small intestine. We identified the cells as ICCs with *c-kit* immunoreactivity in a single cultured ICC grown for 1 day. Scale bars : 50 μ m

2. 내소산의 카할세포 효과에 ATP의존성 칼륨 이온통로(ATP sensitive K⁺ channel)의 관련성

내소산에 의한 카할세포 조절에 ATP의존성 칼륨 이온통로(ATP sensitive K⁺ channel)의 관련성을 알아보기 위해서 억제제인 glibenclamide를 사용하여 보았다. 일단 카할세포에 의한 항도잡이 전압 (pacemaker potentials)에 glibenclamide는 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 3A). 내소산 (50 mg/ml)에 의해서는 진폭이

1.3 ± 1.2 mV (n = 6), 빈도가 2.1 ± 1.0 cycles/min (n = 6)의 반응을 보였는데, glibenclamide 투여 시에는 원래 상태로 회복이 되었다(Fig. 3B, 3C와 3D). 따라서, 이 실험으로 내소산은 ATP의존성 칼륨 이온통로(ATP sensitive K⁺ channel)를 통해서 카할세포의 항도잡이 기능(pacemaking activity)을 억제시킴을 알 수 있었다.

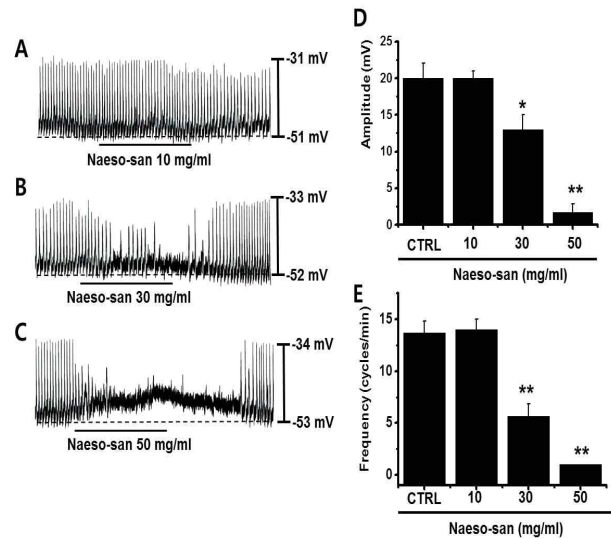


Fig. 2. Naeso-san decreased the amplitude and frequency of pacemaker potentials in cultured ICCs. (A-C) In current clamp mode ($I = 0$), the addition of Naeso-san (10 mg/ml - 50 mg/ml) decreased the amplitude and frequency of pacemaker potentials and however, there were no any changes in resting membrane potentials. (D) The histograms summarized the decrease of amplitude with Naeso-san concentration. (E) The histograms summarized the decrease of frequency with Naeso-san concentration. The values were expressed as the mean \pm S.D. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

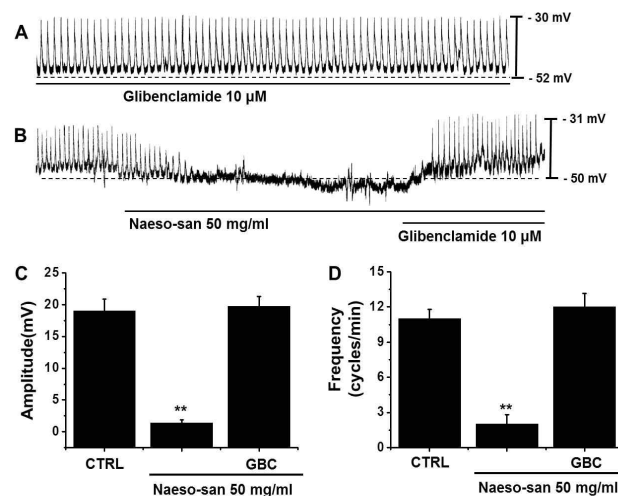


Fig. 3. Effects of ATP-sensitive K⁺ channel inhibitor on pacemaker potentials in cultured ICC from the murine small intestine. (A) Glibenclamide (10 μ M) had no effect on the spontaneous pacemaker potentials. (B) The decreased amplitude and frequency of pacemaker potential caused by Naeso-san were prevented by glibenclamide (10 μ M). Responses to Naeso-san were summarized in (C) and (D). Bars represented the mean values \pm SE. ** $P < 0.01$: significantly different from the untreated control. GBC, glibenclamide.

3. 내소산의 카할세포 효과에 G protein의 관련성

내소산에 의한 카할세포 조절에 G protein의 관련성을 알아보기 위해서 세포내 G protein의 기능을 억제 시키는 것으로 알려지고 있는 GDPβS를 사용하였다. 내소산의 카할세포에서의 진폭과 빈도의 억제가 GDPβS (1 mM)의 세포내 존재로 억제되었다(Fig. 4). 따라서 G protein이 내소산에 의한 카할세포 향도잡이 기능(pacemaking activity)의 억제에 관여함을 알 수 있었다.

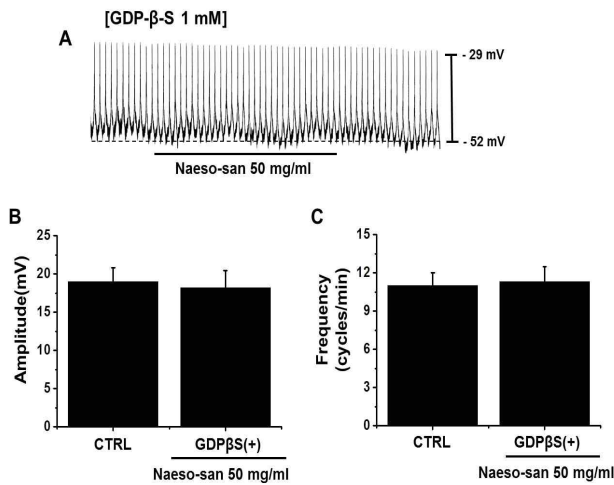


Fig. 4. Effects of GDPβS on the response to Naeso-san. (A) Pacemaker potentials of ICCs exposed to Naeso-san (50 mg/ml) in the presence of GDPβS (1 mM) in the pipette. GDPβS blocked the Naeso-san mediated inhibition of pacemaker potentials. The effects of Naeso-san in the presence of GDPβS in the pipette were summarized in (B) and (C). Bars represented mean values ± S.E.

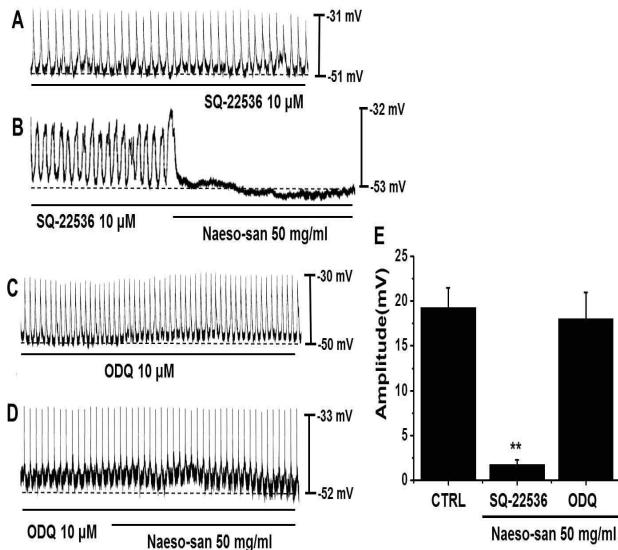


Fig. 5. Effects of an adenylyate cyclase and a guanylyate cyclase inhibitor on Naeso-san induced inhibition of pacemaker potentials. (A) SQ-22536 (10 μM) had no effect on the spontaneous pacemaker potentials. (B) Effects of Naeso-san on pacemaker potentials in the presence of SQ-22536 (10 μM). (C) ODQ (10 μM) had no effect on the spontaneous pacemaker potentials. (D) Effects of Naeso-san on pacemaker potentials in the presence of ODQ (10 μM). Responses to SQ-22536 or ODQ were summarized in (E). Bars represented mean values ± S.E. **P< 0.01; significantly different from the untreated control.

4. 내소산의 카할세포 효과에 cyclic GMP 와 nitric oxide의 관련성

adenylyate cyclase 억제제인 SQ-22536는 향도잡이 기능(pacemaking activity)자체에는 아무런 효과가 없고 (Fig. 5A), 이 상태에서 내소산 투여 시 내소산 단독 투여시 나타나는 현상과 동일하게 진폭과 빈도의 감소가 나타났다 (Fig. 5B와 5E). 하지만 guanylyate cyclase 억제제인 ODQ 투여시에는 향도잡이 기능(pacemaking activity) 자체에는 아무런 효과 없고 (Fig. 5C), 내소산에 의한 진폭과 빈도에도 아무런 효과가 나타나지 않았다 (Fig. 5D와 5E). 따라서 이러한 결과는 cyclic AMP는 내소산에 의한 진폭과 빈도의 감소에 관여하지 않고 cyclic GMP는 관여함을 알 수 있었다. 또 산화 질소 합성효소(nitric oxide (NO) synthase) 억제제인 L-NAME는 향도잡이 기능(pacemaking activity) 자체에는 아무런 효과 없고 (Fig. 6A), 전처치 시에도 내소산에 의한 변화가 나타나지 않아(Fig. 6B와 6C), NO가 내소산에 의한 변화에 관여함을 알 수 있었다.

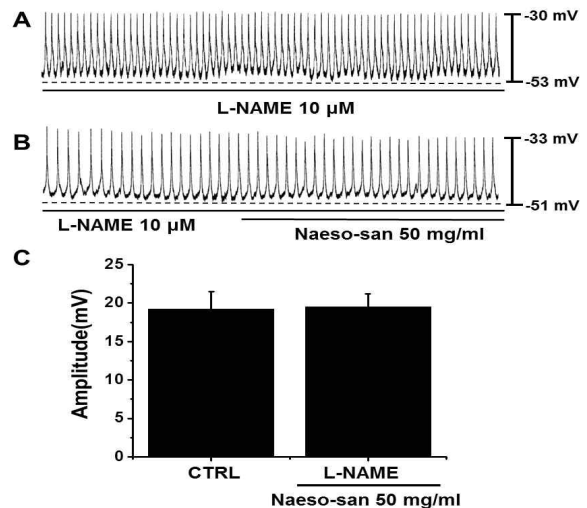


Fig. 6. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on the Naeso-san induced inhibition of pacemaker potentials. (A) L-NAME (10 μM) had no effect on the spontaneous pacemaker potentials. (B) Pacemaker potentials of ICCs exposed Naeso-san in the presence of L-NAME (10 μM). Responses to L-NAME were summarized in (C). Bars represented mean values ± S.E. **P< 0.01; significantly different from the untreated control.

고찰

위장관 평활근은 신경이나 호르몬의 외부적 자극 없이 자발적 수축을 나타내는데 이는 주기적인세포막 전압의 변화에 기인하며 이를 서파 (slow wave)라 불린다. 서파는 위장관 조직절편에서 위장관내 향도잡이 (pacemaker) 기전이 존재함을 시사한다²⁾. 향도잡이 (Pacemaker) 기전에 대한 연구는 오래 전부터 진행되어 왔지만 정확한 기원에 대해서는 알려져 있지 않았다. 그러나 최근 위장관 근육층내에서 카할세포 (interstitial cells of Cajal (ICCs))이 발견되고 연구되면서 카할세포가 위장관의 향도잡이 (pacemaker) 세포로 작용함이 알려져 위장관 운동생리 및 병태생리학적 연구의 주 초점이 되고 있다^{3,4)}. 지금까지 알려진 카할세포는 두 가지의 기능 즉, (1) 향도잡이로서 위장관 운동성의 기본적인 리듬을 유지하고

있으며 (2) 장관신경계와 평활근 사이에 존재하여 신경에 의한 평활근 활동을 조절하는 중간 가교 역할을 담당하고 있다^{13,14}). 그러나 이러한 실험결과들은 조직에서 실험한 결과들을 바탕으로 한 것으로 카할세포만의 정확한 생리학적 기능들을 이해하는데 어려움이 많았다. 이런 어려움을 극복하기 위하여 효소를 이용한 조직에서 단일세포를 분리한 후 형태학적으로 카할세포를 확인 한 다음 전기생리학적 방법을 이용하여 조직과 동일한 서파에 관련한 이온전류들을 기록 분석하고 있다¹⁵). 단일 카할세포에서 세포막 전류 고정법 (Current-clamp method)을 시행하면 자발적으로 향도잡이 전압 (pacemaker potentials)이 기록된다¹⁶). 향도잡이 전압 (Pacemaker potentials)의 발생기전은 세포내 Ca^{2+} 저장고인 내형질세망에서 IP3를 통한 주기적 Ca^{2+} 분비가 미토콘드리아로 Ca^{2+} 를 유입시켜 발생한다. Ca^{2+} 저장고인 내형질세망에서 IP3를 통하여 Ca^{2+} 이 분비되는 기전을 차단하는 약물과 내형질세망으로 Ca^{2+} 를 재흡수하는 기전을 차단하는 약물에 의해서 향도잡이 전압 (pacemaker potentials)이 억제되며, 미토콘드리아의 uncoupler와 호흡 연쇄 (respiratory chain) 억제제를 사용하면 미토콘드리아의 Ca^{2+} 농도가 감소하면서 향도잡이 전압 (pacemaker potentials)이 차단된다¹⁷). 이외에도 카할세포에는 Ba^{2+} 에 민감한 내부정류칼륨 이온 (inward rectifier K^{+})통로¹⁸)와 glibenclamide에 반응하는 ATP-의존성 K^{+} 통로¹⁹)도 존재한다.

내소산은 항암 및 항염 효과 관련되어 많은 연구가 이루어지고 있고^{10,11}), 위장관과 관련되어 유문부 확장 흰 쥐의 위 운동성에 대한 효능⁵)과 위액분비 및 위궤양에 관한 연구⁹) 외에는 별로 이루어져 있지 않다. 또한 위장관 운동 조절에 중요한 카할세포에서의 내소산에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다. 본 실험에서는 위장관 질환 치료에 사용되는 내소산에서 위장관 운동 향도잡이 (pacemaker)인 카할세포에서의 효능을 알아 보았다. 카할세포에 의한 향도잡이 전압 (pacemaker potentials)에서 내소산에서는 안정막 전압은 큰 변화 없으며 진폭과 빈도가 감소됨을 알 수 있었고 (Fig. 2), 내소산에 의한 반응에 ATP 의존성 K^{+} 이온통로가 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 세포내 G protein이 내소산의 반응에 영향을 미치고 (Fig. 4), cyclic GMP와 NO가 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 5와 6). 결국 내소산은 카할세포의 안정막 전압의 큰 변화 없이 진폭과 빈도수를 억제하여 위장관 수축력 억제를 일으킨다고 사료되고 이때 세포내 G protein-cyclic GMP-NO 기전이 관여한다고 생각한다. 앞으로는 이런 반응에 관여하는 다양한 세포내 기전들과 in vivo 상태에서의 내소산에 의한 위장관 운동성 변화에 대해서 연구를 진행할 예정이다. 또한 카할세포에 의한 향도잡이 변화에는 비선택성 양이온 통로인 일과성 수용체 전압 (TRPM7; transient receptor potential melastatin 7) 이온통로¹²)와 칼슘에 의해 활성화되는 염소 (Ca^{2+} -activated Cl^{-}) 이온통로²⁰)가 관여하고 있음이 밝혀졌다. 따라서 내소산이 이들 이온통로에는 어떤 효과를 보이는지를 확인하고 실제로 내소산이 카할세포의 기능조절에 이들 이온통로를 조절하고 있는지를 연구할 예정이다. 카할세포의 바이오파커는 c-kit²¹)과 칼슘에 의해 활성화되는 염소이온통로²²)가 알려지고 있는데 내소산에 의한 in vivo 실험시 이러한 바이오파커의 카할세포 세포막 발현에 미치는 영향도 큰 의미 있는 실험 주제가 될 것

으로 생각된다.

그동안 다양한 한약제제를 이용하여 카할세포에서의 반응을 관찰하였다. 삼출견비탕²³), 이중탕²⁴), 소청룡탕²⁵), 삼황사심탕²⁶)에 의해서는 카할세포의 흥분성을 유발하는 즉, 탈분극(depolarization)시키는 방향으로 효능이 나타나 위장관 운동성을 증가시키는 쪽으로 나타났다. 삼출견비탕²³)과 이중탕²⁴)은 세포내외의 칼슘과 세포막 G-단백질 및 phospholipase C가 관여하여 탈분극을 시키고, 소청룡탕²⁵)과 삼황사심탕²⁶)은 5-HT 3번과 4번 수용체를 통한 Mitogen-Activated Protein Kinases에 의해서 효과가 나타났다. 하지만, 내소산에 의한 반응은 안정막 전압은 큰 변화없지만 진폭과 빈도가 감소함에 따라 위장관 운동성을 억제시키는 방향으로 효과가 나타나는 것으로 사료된다. 따라서 내소산은 위장관 경련, 통증, 일시적 기능억제나 다른 위장관 운동 이상과 관련된 질환에 대한 치료제 개발에 관여할 수 있음을 보여준다.

결 론

현재 카할세포에 대한 생리약리학적 실험 결과들은 극히 드물다. 카할세포에 의한 한약제들의 약리학적 연구는 위장관 운동 관련 치료제의 개발과 연관하여 특히 중요하다고 생각된다. 현재까지 알려진 위장관 운동과 관련된 질환은 카할세포의 수가 감소하거나 기능장애에 의한 향도잡이 기능의 손실로 인한 위장관 운동 장애로 추정하고 있다. 따라서 카할세포에 의한 한약제들의 약리학적 연구는 위장관 운동 관련 치료제의 개발과 연관하여 특히 중요할 것으로 사료된다. 본 연구에서 내소산은 위장관 카할세포에서 ATP 의존성 K^{+} 이온통로 의존적으로 G protein-cyclic GMP-NO 기전이 관여하여 향도잡이 기능을 억제하고 있다. 따라서 내소산은 위장관 운동 조절 치료제로서 개발 가능성 있는 한약제제라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (HI12C1886:B120008).

References

1. Jun, J.Y. Interstitial Cells of Cajal. Korean J Gastrointest Motil. 7: 70-72, 2001.
2. Park, K.J. Interstitial Cells of Cajal and GI Motility. J Neurogastroenterol Motil. 10: 93-99, 2009.
3. Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, H.B. The W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature 373: 347-349, 1995.
4. Sanders, K.M., Tamas, O., Kho, S.D., Torihashi, S., Ward, S.M. Development of interstitial cells of cajal. Neurogastrointestinal motility 11: 3-11, 1999.
5. Kim, J., Yoon, S. Effect of Naesosan on Gastric Motility

- between Normal Intact and Antral Dilatated Rats. *Korean J. Orient. Int. Med.* 29: 117-129, 2008.
6. Nakahara, M., Isozaki, K., Hirota, S., Vanderwinden, J.M., Takakura, R., Kinoshita, K., Miyagawa, J., Chen, H., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Shinomura, Y., Matsuzawa, Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 666-670, 2002.
 7. Jain, D., Moussa, K., Tandon, M., Culpepper-Morgan, J., Proctor, D.D. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol* 98: 618-624, 2003.
 8. Kenny, S.E., Connell, M.G., Rintala, R.J., Vaillant, C., Edgar, D.H., Lloyd, D.A. Abnormal colonic interstitial cells of Cajal in children with anorectal malformations. *J Pediatr Surg* 33: 130-132, 1998.
 9. Hong, K.C., Ryu, B.H., Jang, I.K., Park, D.W., Ryu, K.W. A Study on the Effects Naesosan and Gaminaesosan on Secretion of Gastric Juice and Gastric Ulcer Rats. *The Journal of Kyung Hee University Medical Center* 6(3):313-320, 1990.
 10. Park, S., Choi, J. Experimental study of Naesosan on the Effects of Anti-cancer. *The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology* 14(1):154-166, 2001.
 11. Kim, J., Hwang, C., Lim, K. A Study on the Anti-inflammatory, Analgesic and Anti-bacterial Activity of Hwanhonsan Water extract and 20% Ethanol extract. *The Journal of Wonkwang Oriental medicine* 4(1):361-378, 1994.
 12. Kim, B.J., Lim, H.H., Yang, D.K., Jun, J.Y., Chang, I.Y., Park, C.S., So, I., Stanfield, P.R., Kim, K.W. Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaking activity. *Gastroenterology* 129(5):1504-1517, 2005.
 13. Malysz, J., Huizinga, J.D. Searching for intrinsic properties and functions of interstitial cells of Cajal. *Current Opinion in Gastroenterology* 15: 26-32, 1999.
 14. Sanders, K.M. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterolgy* 111: 492-515, 1996.
 15. Lee, H.K., Sanders, K.M. Comparison of the electric currents from interstitial cells and smooth muscle cells of canine proximal colon. *J Physiol* 460: 135-152, 1993.
 16. Kho, S.D., Sanders, K.M., Ward, S.M. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 513: 203-213, 1998.
 17. Ward, S.M., Ordog, T., Koh, S.D., Baker, S.A., Jun, J.Y., Amberg, G., Monaghan, K., Sanders, K.M. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 525: 355-361, 2000.
 18. Flynn, E.R., McManus, C.A., Bradley, K.K., Koh, S.D., Hegarty, T.M., Horowitz, B., Sanders, K.M. Inward rectifier potassium conductance regulates membrane potential of canine colonic smooth muscle. *J Physiol* 518: 247-256, 1999.
 19. Nakayama, S., Ohya, S., Liu, H.N., Watanabe, T., Furuzono, S., Wang, J., Nishizawa, Y., Aoyama, M., Murase, N., Matsubara, T., Ito, Y., Imaizumi, Y., Kajioka, S. Sulphonylurea receptors differently modulate ICC pacemaker Ca²⁺ activity and smooth muscle contractility. *J Cell Sci* 118: 4163-4173, 2005.
 20. Zhu, M.H., Kim, T.W., Ro, S., Yan, W., Ward, S.M., Koh, S.D., Sanders, K.M. A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* 587: 4905-4918, 2009.
 21. Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H.B., Bernstein, A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373: 347-349, 1995.
 22. Sanders, K.M., Zhu, M.H., Britton, F., Koh, S.D., Ward, S.M. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability. *Exp Physiol* 97: 200-206, 2012.
 23. Kim, J.N., Kwon, Y.K., Kim, B.J. Effects of Samchulkunbi-tang in Cultured Interstitial Cells of Cajal of Murine Small Intestine. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 27: 112-117, 2013.
 24. Hwang, M.W., Kim, J.N., Song, H.J., Lim, B., Kwon, Y.K., Kim, B.J. Effects of Lihong Tang on cultured mouse small intestine interstitial cells of Cajal. *World J Gastroenterol* 19: 2249-2255, 2013.
 25. Hwang, M.W., Lee, H.J., Song, H.J., Kim, B.J. Involvement of MAPKs and PLC pathways in modulation of pacemaking activity by So-Cheong-Ryong-Tang in interstitial cells of Cajal from murine small intestine. *Scientific World Journal* 2013: 536350, 2013.
 26. Kim, B.J., Kim, H., Lee, G.S., So, I., Kim, S.J. Effects of San-Huang-Xie-Xin-tang, a traditional Chinese prescription for clearing away heat and toxin, on the pacemaker activities of interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J Ethnopharmacol* 155: 744-752, 2014.