creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263646

2013년 2월
博士學位 論文

마우스 대장 운동성 조절에 있어 항우울제의 효과

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

오 현 정

마우스 대장 운동성 조절에 있어 항우울제의 효과

Effects of Antidepressive Agents on the Modulation of Colonic Motility in Mouse

2012년 2월 25일

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

오 현 정

마우스 대장 운동성 조절에

있어 항우울제의 효과

지도교수 金 相 勳

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출 함

2012 년 10 월

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

오 현 정

오현정의 博士學位 論文을 認准 함

委員長　　朝鮮大學校　敎授　염철호　(인)

委　員　　全南大學校　敎授　김재민　(인)

委　員　　朝鮮大學校　敎授　박상학　(인)

委　員　　朝鮮大學校　敎授　전제열　(인)

委　員　　朝鮮大學校　敎授　김상훈　(인)

2012년　12월

朝鮮大學校 大學院

목 차

목 차 ---------- i

도 목 차 ---------- ii

초 록 ---------- iv

서 론 ---------- 1

실험방법 ---------- 5

실험결과 ---------- 11

고 찰 ---------- 29

참고문헌 ---------- 37

도 목 차

Figure 1. Typical tracings of pacemaker potentials and pacemaker currents in colonic interstitial cells of Cajal. ---------- 13

Figure 2. Effects of tetrodotoxin, nifedipine, tetraethylammonium, and DIDS on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. ---------- 14

Figure 3. Effects of glibenclamide, an ATP-dependent K^+ channels blocker, on the pacemaker potentials and on the pinacidil-induced effects in colonic interstitial cells of Cajal.---------- 16

Figure 4. RT-PCR analysis on the ATP-dependent K^+ channel subunits in c-Kit positive cells. ----------18

Figure 5. Effects of imipramine on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. ----------21

Figure 6. Effects of desipramine on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. ---------- 22

Figure 7. Effects of imipramine on the pinacidil-induced effects in colonic interstitial cells of Cajal. ----------24

Figure 8. Effects of 5-hydroxydecanoic acid, a mitochondrial ATP-dependent K^+ channels blocker on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. ----------26

Figure 9. Effects of imipramine and glibenclamide on the intracellular Ca^{2+} oscillations in colonic interstitial cells of Cajal. ----------28

ABSTRACT

Effects of Antidepressive Agents on the Modulation of Colonic Motility in Mouse

Oh Hyun Jung

Advisor: Prof, Sang Hoon Kim M.D. Ph.D.

Department of Medicine, Graduate School of Chosun University

Tricyclic antidepressants were beneficial to not only depression but also functional gastrointestinal motility disorders. This study was investigated to the antidepressants effects on spontaneous pacemaker activities of cultured colonic interstitial cells of Cajal (ICC) from mouse using whole-cell patch clamp technique in 30°C, RT-PCR and Ca^{2+}-imaging. Colonic ICC generated spontaneous periodic pacemaker potentials in currents-clamping mode. The pacemaker potentials were not modified by tetrodotoxin (a voltage-dependent Na^{+} channels blocker), nicardipine (a voltage-dependent Ca^{2+} channels blocker), or tetraethylammonium (a voltage-dependent K^{+} channels blocker). However, glibenclamide (an

ATP-sensitive K^+ channels blocker) depolarized the resting membrane and increased frequency of pacemaker potentials. Exposure of imipramine also depolarized the membrane and increased frequency of pacemaker potentials. Pinacidil, an opener of ATP-sensitive K^+ channels, hyperpolarized the membrane and inhibited the generation of pacemaker potentials. Pinacidil-induced effects were recovered to normal by glibenclamide or imipramine. However, 5-hydroxydecanoic acid, a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels blocker, had no effects on pacemaker potentials. In RT-PCR analysis, c-kit positive ICC expressed Kir 6.1 and SUR 2B subunits of ATP sensitive K^+ channels. In recording of intracellular Ca^{2+} concentrations using Fluo-4, imipramine or glibenclamide increased the Ca^{2+} oscillations. These results suggested that imipramine suppressed the basally activated ATP sensitive K^+ channels that are related intracellular Ca^{2+} oscillations. Therefore, it seems that imipramine may useful to improve the altered colonic motility, especially in decreased motility disorders.

Keywords: imipramine, colon, interstitial cells of Cajal, pacemaker potentials, ATP-sensitive K^+ channels.

서 론

위장관계는 자발적인 기계적 수축력을 보이는데 이는 평활근의 전기적 서파(slow waves)에 기인한다. 서파는 위장관 평활근의 안정막 전압과 흥분성을 결정하고 있다 (Szurszewski, 1987). 위장관내 신경전달 물질, 호르몬 및 약물 등은 서파의 발생빈도와 발생양상을 변화시켜 위장관 운동을 조절하고 있다 (Olsson and Holmgren, 2001). 서파는 위장관내 근육층과 신경총 사이 및 근육층 내 존재하는 카할 사이질 세포(Cajal cells)에 의해서 발생된다. 카할 사이질 세포는 태생학적으로 중배엽에서 기원하는 세포로 세포막에 특징적인 receptor tyrosine kinase인 c-kit를 함유하고 있어 이를 인지하는 방법을 사용하여 다른 세포들과 구별하고 있다 (Huizinga et al, 1995; Ward et al, 1994). 카할 사이질 세포는 위장관 운동을 조절하는 가장 주 된 세포로 다양한 생리학적

기능을 하고 있다. 카할 사이질 세포는 자발적으로 흥분성을 보이는 향도잡이 세포로 Gap Junction을 통하여 위장관내 서로 연결망을 형성하고 있으며 평활근과도 서로 연결되어 있다. 카할 사이질 세포는 향도잡이 전압을 통하여 평활근에서 서파를 발생시키고 전파하여 연동운동에 관여하고 있으며, 또한 신경계의 신호를 평활근으로 전파하는 매개역할과 더불어 장관에 음식물이 들어오는 경우 기계적 신장 수용체로서의 역할을 하고 있다 (Daniel, 2001; Sanders et al, 2006). 많은 연구들에서 여러 위장관 운동성 질환들, 즉 식도이완불능증, 당뇨병성 위장관 기능 장애, hypertropic pyloric stenosis, 가성 장 폐색, slow transit constipation, Hirschsprung's disease 및 염증성 위장관 질환등이 카할 사이질 세포의 수 적 감소 및 형태학적 이상과 깊은 관련이 있는 것으로 보고되어있다 (Farrugia, 2008; Jain et al, 2003; Strege et al., 2003).

위장관 운동성 질환은 빈번하게 발생되며 정상적인 위장관 운동은 건강한 삶의 질을 유지하는데 매우 중요하다. 과민성 대장증후군 (Irritable bowel syndrome; IBS)은 대표적인 위장관 기능성 질환으로 복통, 복부불편, 변비 및 설사가 특징인 질환이다. IBS에 대한 정확한 병태생리학적 기전은 알려져 있지 않으나 변이된 위장관 운동 및 내장 민감도의 증가가 관련되어 있는 것으로 생각 되고 있다 (Camilleri and Katzka, 2012). 항우울제는 우울증 및 감정의 변화인 정동 장애 치료제로서 구토 등 위장관 부작용을 보이기도 하지만 (Baldessarini, 1989) IBS을 가진 변비환자 및 설사 환자를 치료하는 데 효과적이며 위장관 운동 조절물질로도 제시되고 있다 (Clouse et al, 1994; Jackson et al, 2000). 그 기전 중의 하나는 위장관 평활근 세포막에 존재하는 여러 이온 통로들의 활동도 조절이다. 그러나 위장관 운동 조절에 가장 중요한

카할 사이질 세포에 대한 항우울제의 효과 및 작용 기전의 연구는 극히 제한적이다. 카할 사이질 세포에서 발생되는 향도잡이 전압에는 여러 이온 통로들이 관여한다 (Beyder and Farrugia, 2012). 따라서 항우울제가 카할 사이질 세포에 존재하는 이온통로들의 활동도에 변화를 주어 위장관 운동을 변화시키거나 조절할 수 있음을 시사한다. 최근 IBS 기전에 있어 카할 사이질 세포가 매우 중요한 역할을 담당한다는 보고가 있다 (Eshraghian and Eshraghian, 2011).

본 연구는 대장 카할 사이질 세포에서 발생되는 향도잡이 전압에 대한 imipramine의 효과와 작용기전을 규명하여 부작용으로 나타나는 위장관 이상의 기전과 더불어 위장관 운동을 조절할 수 있는 가를 알아보고자 하였다.

실험방법

1. 세포분리

암수 구별 없이 8 ~ 13일 된 마우스를 사용하였다. Ether로 마취 후 경추부위를 탈구시켜 희생시켰다. 개복하여 대장부위를 적출한 후 실온에서 Krebs-Ringer 용액으로 채워진 용기 속에서 장간연을 따라 절개하여 내용물을 제거 하였다. 핀으로 조직을 고정한 후 현미경하에서 미세가위를 이용하여 점막층을 제거하고 윤상근을 노출시켰다. 소장근 조직을 collagenase (1.3 mg/ml), bovine serum albumin (2 mm/ml), trypsin inhibitor (2 mg/ml) 및 ATP (0.25 mg/ml)를 포함하고 Ca^{2+}은 들어있지 않은 Hank's 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화시켰다. 소화시킨 후 다시 Ca^{2+}이 들어있지 않는 Hank's 용액으로 교체 후 끝이 무딘 유리피펫을 사용하여 조심스럽게 진탕시켜 단일세포를 분리하였다. 분리

된 세포들을 35 mm 배양용기내 murine collagen (2.5 μg/mL)으로 표면 처리된 멸균 커버글래스 위에 분주하였다. 10분 후에 stem cell factor (5 ng/mL), 2% antibiotic/antimycotic이 들어있는 배양액 (SmGm)을 분주한 후 37°C, 95% O_2 – 5% CO_2 배양기에서 배양시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 2 % antibiotic/antimycotic만 제외시켜 배양액을 교체하였다. 실험은 배양 2일부터 시행하였다. 배양된 카할 사이질 세포의 확인은 Kit 단백질에 대한 항체(ACK2)를 이용한 면역세포염색법을 이용하였다.

2. 세포막전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 도립현미경 위에 설치되어 있는 항온조절계에 옮긴 다음 분당 2 ~ 3 ml 속도세포외 용액을 관류시켰다. 세포막

전압고정법을 사용하여 향도잡이 전압과 전류를 기록하였다. 고정전압과 자극전압의 조정 및 전류의 기록은 pClamp (버전 6.0)와 컴퓨터를 사용하였다. 세포막 전류는 -70 mV의 유지전압에 고정하여 기록하였다. 얻어진 결과들은 Pclamp와 Grapad Prizm (버전 2.01)을 이용하여 분석 처리하였다. 모든 실험은 30°C 에서 시행하였다.

3. c-Kit 양성 세포에서의 RT-PCR

공초점 레이저 역상 현미경하에서 c-Kit 양성세포를 확인한 후 단일세포에 미세 유리전극을 접촉시킨 다음 음압을 이용하여 전극내로 흡인하였다. 곧바로 lysis buffer가 들어있는 PCR 튜브 속으로 전극내 c-Kit 양성세포를 배출하였다. Trizol reagent (Invitrogen) 를 사용하여 c-Kit 양성세포에서 total RNA를 분리하

였다. One-step RT-PCR Premix kit (iNtRON Biotechnology Inc.)을 사용하여 총 RNA로부터 cDNA를 만들어 냈다. All PCR product는 2% agarose gels을 이용하여 분석하였고 ethidium bromide 형광을 이용하여 확인하였다.

4. 세포 내 칼슘농도 측정

세포 내 칼슘농도 변화는 Fluo-3를 이용하여 측정하였다. 커버글래스에 놓여 있는 카할 사이질 세포는 정상 세포 밖 관류용액으로 2번 씻어낸 후 Fluo-4AM 1 μM이 들어있는 정상 세포 밖 관류용액에서 5분 동안 37°C에서 95% O_2 – 5% CO_2 로 배양하였다. 그런 다음, 2번을 정상 세포 밖 관류용액으로 씻어낸 후 관류 chamber에 고정시킨 후 0.4초마다 공초점 Scanner (Perkin-Elmer)를 사용하여 스캔 하였다. 형광은 488 nm와 515 nm에서

관찰하였으며, 세포 내 칼슘농도의 형광강도는 F1/F0로 표시하였으며 F0는 첫 번째 이미지에서의 형광강도를 나타낸다.

5. 실험용액 및 사용한 약물

세포 밖 관류용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM 단위임). KCl 5, NaCl 135, $CaCl_2$ 1.2, glucose 10, HEPES 10이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. 전극 내 용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM 단위임). K-aspartate 20, KCl 120, $MgCl_2$ 5, K_2ATP 2.7, Na_2GTP 0.1, creatine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다.

실험에는 tetrodotoxin, nicardipine, tetraethylammonium, imipramine, desipramine, pinacidil, 5-hydroxydecanoic acid 및 glibenclamide 등의 약물을 사용하였다.

6. 통계처리

실험 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고 유의성 검증은 Student's t-test를 시행하였으며 p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의 하다고 판정하였다.

실험 결과

1. 자발적 향도잡이 전압 및 전류

Current-clamping mode (I=0)에서 자발적인 주기적 막전압의 탈분극인 향도잡이 전압이 발생되었다 (Fig. 1A). 향도잡이 전압의 크기는 35 ~ 45 mV, 안정막 전압은 -60 ± 5 mV 그리고 발생빈도는 분당 6 ± 2 회를 보였다 (n=11). 유지전압 -70 mV로 고정된 voltage-clamping mode에서 카할 사이질 세포는 자발적 내향성 전류인 향도잡이 전류를 발생하였다 (Fig. 1B). 전류의 크기는 1200 ± 300 pA, 발생빈도는 분당 2.9 ± 2.6 회를 보였다 (n=15).

2. 이온통로 차단제들의 효과

향도잡이 전압의 발생이 어떤 종류의 이온통로를 통하여 발생되

는지 알아보기 위하여 여러 이온통로 차단제를 투여하였다. 막전압-의존성 나트륨 통로 차단제인 tetrodotoxin (1 μM) (n=6), 막전압-의존성 칼슘 통로 차단제인 nicardipine (1 μM) (n=4) 및 막전압-의존성 칼륨 통로 차단제인 tetraethylammonium (2 mM) (n=5)는 향도잡이 전압의 크기, 안정막전압 및 발생빈도에는 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 2A, 2B, 2C).

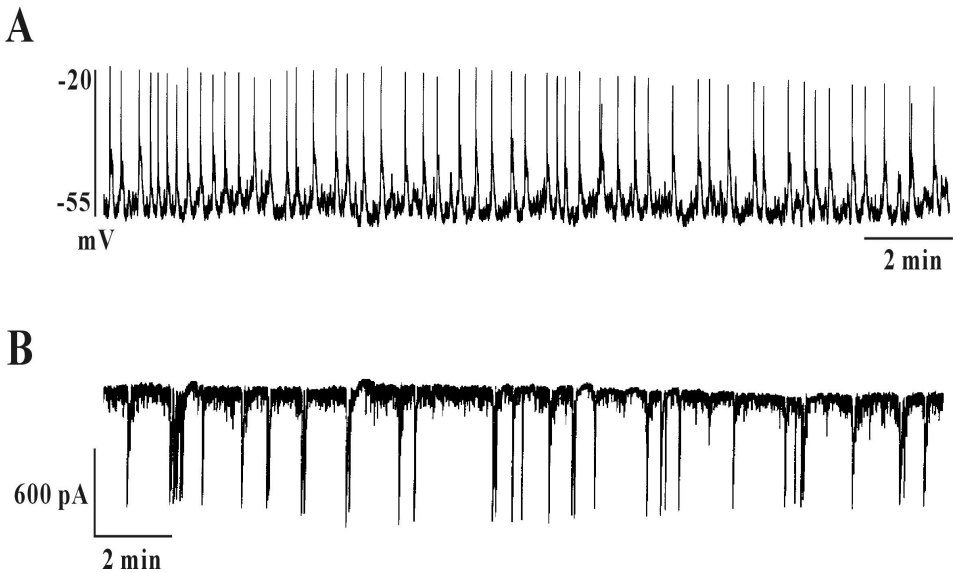

Figure 1. Typical trace of pacemaker potentials in current clamping mode (A) and spontaneous inward pacemaker currents in voltage clamping mode at a holding potential of -70 mV (B) in colonic interstitial cells of Cajal from mouse.

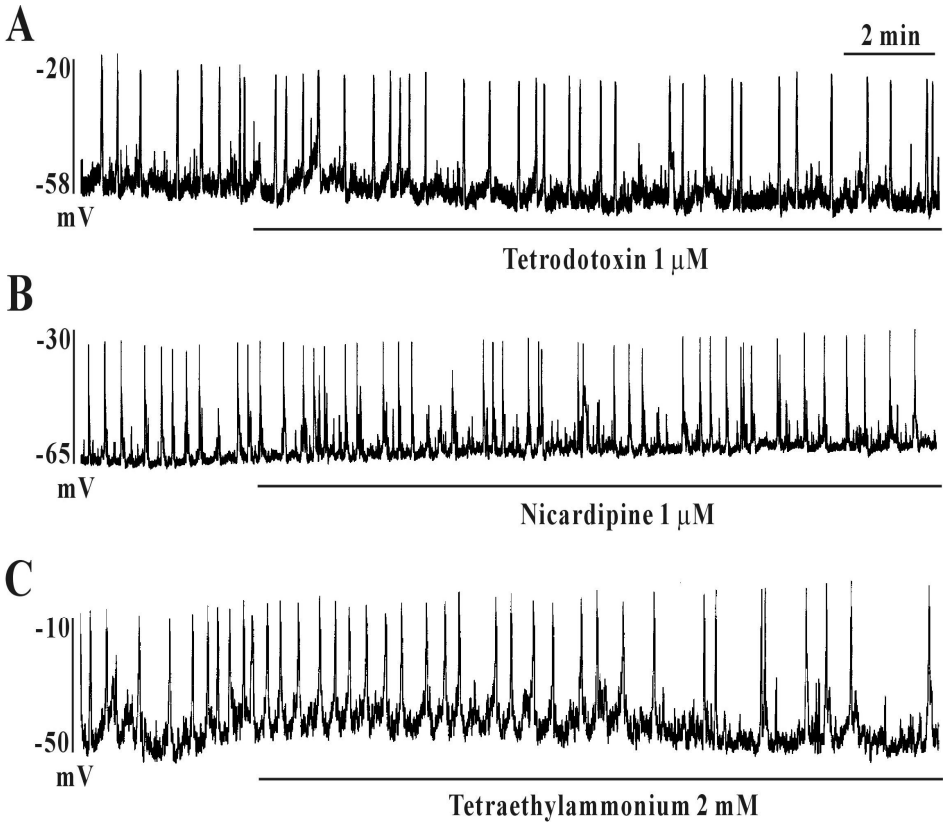

Figure 2. Effects of various channels blocker on pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. Tetrodotoxin (1 μM, voltage-dependent Na^+ channels blocker) (A), Nicardipine (1 μM, voltage-dependent Ca^{2+} channels blocker) (B) and tetraethylammonium (2 mM, voltage-dependent K^+ channels blocker) (C) did not modify the pacemaker potentials.

3. 향도잡이 전압에 대한 glibenclamide의 효과

소장 카할 사이질 세포에는 ATP-의존성 칼륨 통로가 존재하고 있는 바 ATP-의존성 칼륨 통로 차단제인 glibenclamide를 투여하여 대장 카할 사이질 세포에서의 존재를 확인하였다. Glibeclamide (10 μM) 투여 시 안정막 전압의 탈분극과 함께 향도잡이 전압의 발생빈도가 증가되었다 (Fig. 3A). ATP-의존성 칼륨 통로 개방제인 pinacidil (1 μM) 를 투여한 경우 안정막 전압의 과분극과 더불어 향도잡이 전압의 발생빈도가 감소하면서 차단되었고 이 효과는 glibenclamide 투여 시 정상으로 회복되었다 (Fig. 3B). Gibenclamide 및 pinacidil에 대한 glibenclamide의 효과에 대한 수치는 figure 3C, 3D, 3E에 표시하였다 (n=5).

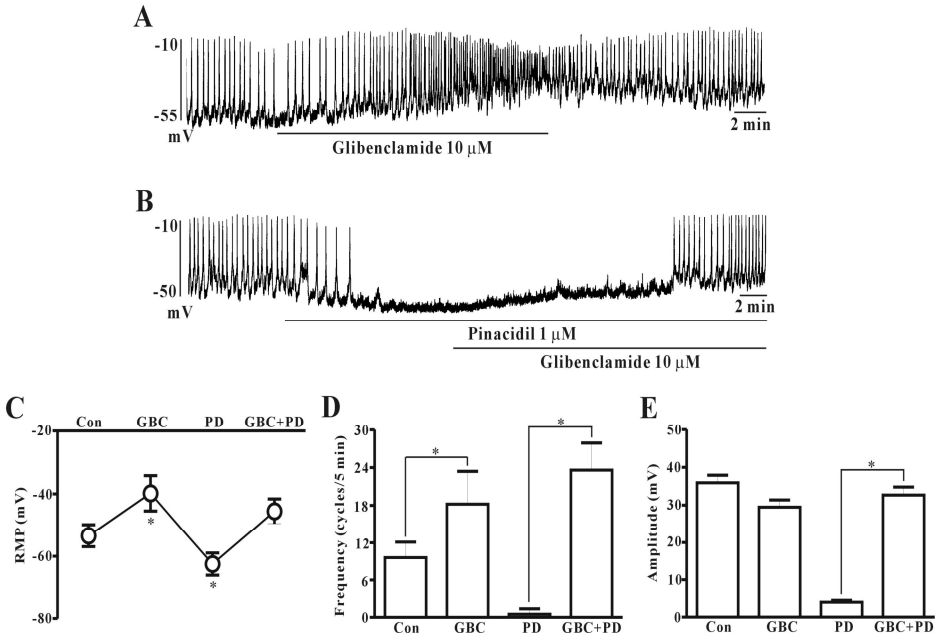

Figure 3. Effects of glibenclamide, an ATP-dependent K^+ channels blocker, on the pacemaker potentials and on the pinacidil-induced effects Glibenclamide (10 μM) (A) alone depolarized the membrane and increased the frequency of pacemaker potentials. Pinacidil (1 μM) (B), an ATP-dependent K^+ channels opener, hyperopolarized the membrane and inhibited of pacemaker potentials and these effects were recovered to normal by glibenclamide. Response to glibenclamide and pinacidil on pacemaker potentials are summarized in (C), (D), and (E). Bars represent mean values ± S.E.M. *($P<0.05$). Con : Control, GBC : Glibenclamide, PD : Pinacidil, RMP : Resting membrane potentials.

4. 대장 카할 사이질 세포에서 ATP-의존성 칼륨 통로 구성 단위의 발현

향도잡이 전압에 대한 약물 실험 결과 ATP-의존성 칼륨 통로가 기초적으로 작동하고 있음을 나타내는 바 ATP-의존성 칼륨 통로의 존재를 확증하기 위하여 대장 카할 사이질 세포에서 RT-PCR를 이용하여 ATP-의존성 칼륨 통로의 구성 아형 (subunits)을 발현하였다. RT-PCR 분석결과 c-Kit 양성세포에서 K_{ir} 6.1 과 SUR 2B가 발현된 반면 K_{ir} 6.2 과 SUR 1는 발현되지 않아 K_{ir} 6.1과 SUR 2B과 조합된 ATP-의존성 칼륨 통로가 존재함을 나타낸다 (Fig. 4) (n=6).

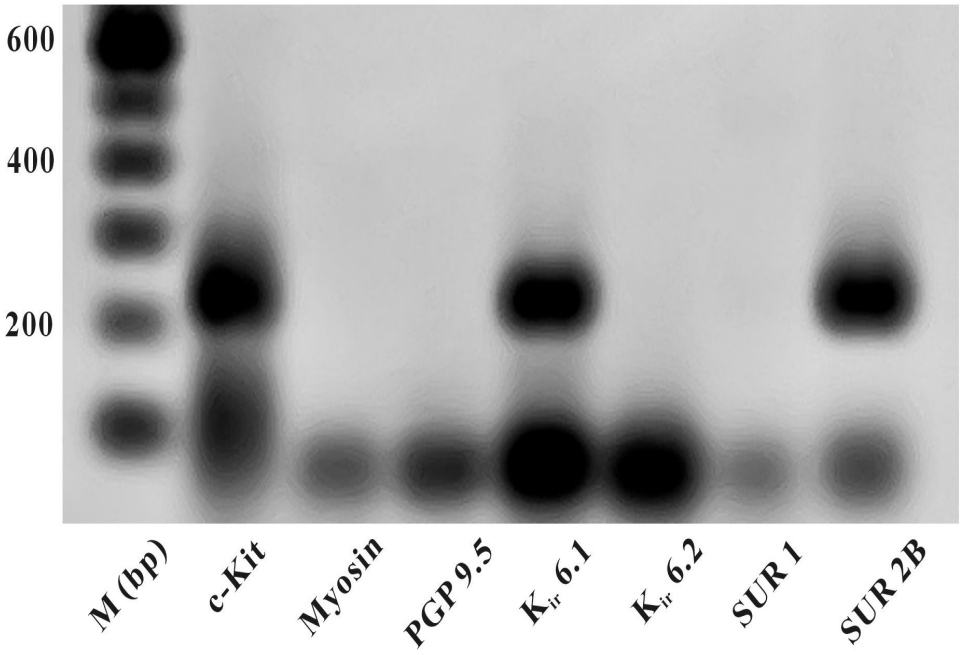

Figure 4. Agarose gels of the RT-PCR products of the subunits of ATP-dependent K^+ channels using colonic interstitial cells of Cajal. This representative 1.2% agarose gel was loaded with 5 μl of PCR product and stained with ethidium bromide. The markers shown in lane indicate bp. K_{ir} 6.1 and SUR 2B primers produced the expected products in c-Kit positive cells.

5. 향도잡이 전압에 대한 항우울제의 효과

향도잡이 전압에 대한 항우울제의 효과를 알아보기 위하여 imipramine과 desipramine을 투여하였다. Imipramine을 10 μM에서부터 20, 30, 50 μM로 농도를 높인 경우 농도-의존적으로 안정막전압의 탈분극이 증가되었으며, 발생빈도는 20 μM 에서 크게 증가한 반면 그 이상의 농도에서는 탈분극이 융합되면서 오히려 발생빈도가 감소되었다 (Fig. 5A, 5B, 5C, 5D). 향도잡이 전압에 대한 다양한 농도의 imipramine의 효과는 figure 5E, 5F, 5G에 보여주었다 (n=4~10). 그런 반면 desipramine는 10 ¥ìM에서 향도잡이 전압의 발생빈도가 약하게 증가하였지만 유의성 있는 효과는 보이지 않았다. 그 이상의 농도 (20 μM)에서는 오히려 향도잡이 전압의 발생을 억제하는 경향을 나타냈다 (Fig. 6A, 6B). Desipramine의 향도잡이 전압에 대한 효과는 figure 6C, 6D, 6E

에 보여주었다 (n=5).

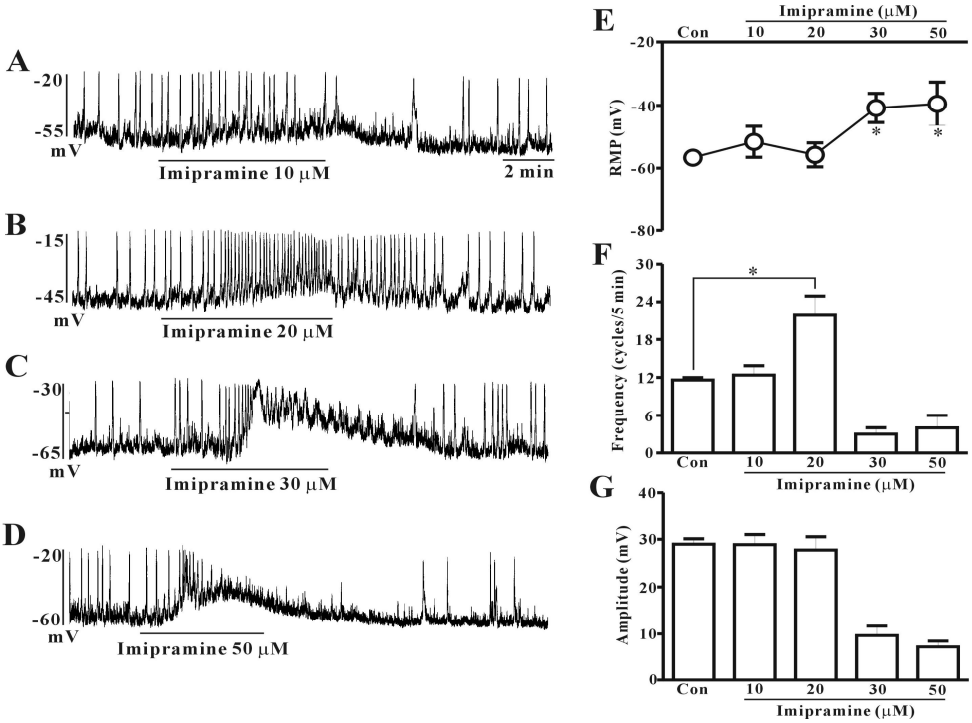

Figure 5. Effects of imipramine on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. (A), (B), (C), and (D) show pacemaker potentials to imipramine (10, 20, 30 μM or 50 μM respectively). 20 μM imipramine increased the frequency of pacemaker potentials and high concentration of imipramine (30 and 50 μM) depolarized membrane. Response to various concentration of imipramine on pacemaker potentials are summarized in (E), (F), and (G). Bars represent mean values ± S.E.M. *($P<0.05$) Significantly different from the untreated control. Con : Control, RMP : Resting membrane potentials.

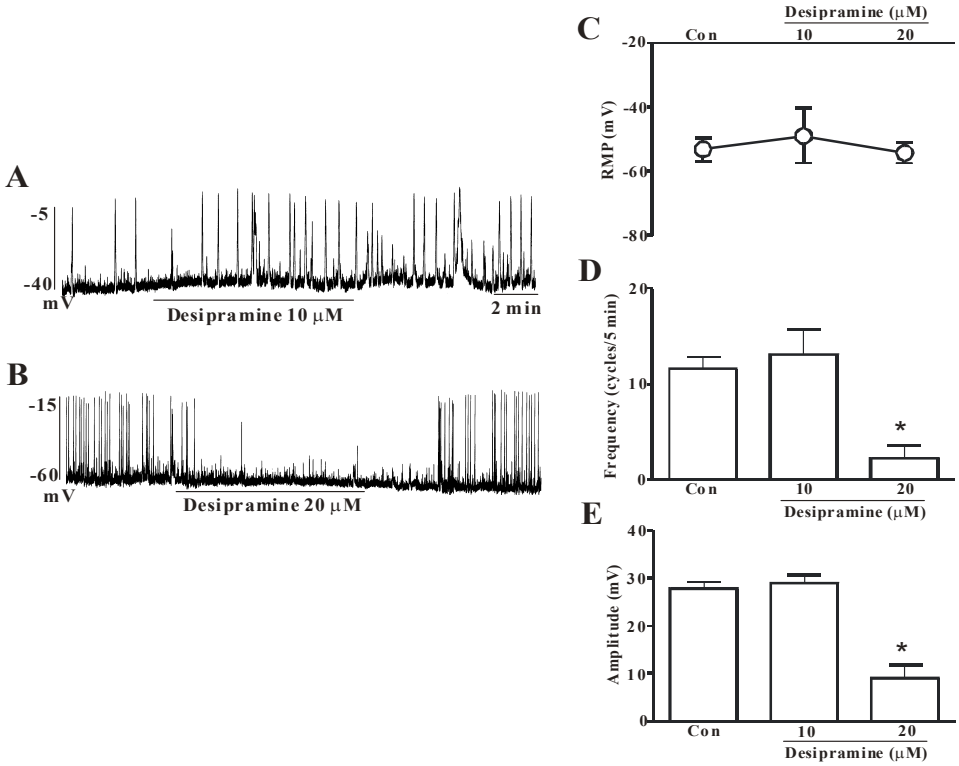

Figure 6. Effects of desipramine on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. Desipramine (10 μM) slightly increased the frequency of pacemaker potentials without change of resting membrane potential (A). At 20 μM of desipramine inhibited the generation of pacemaker potentials (B). Response to various concentration of desipramine on pacemaker potentials are summarized in (C), (D), and (E). Bars represent mean values ± S.E.M. *($P<0.05$) Significantly different from the untreated control. Con : Control, RMP : Resting membrane potentials.

6. ATP-의존성 칼륨 통로에 대한 imipramine의 효과

향도잡이 전압에 대한 imipramine의 효과가 glibenclamide와 유사하게 나타나는 바 ATP-의존성 칼륨 통로에 작용하는 가를 알아보기 위하여 pinacidil를 사용하여 imipramine의 효과를 검증하였다. ATP-의존성 칼륨 통로 개방제인 pinacidil (1 μM)을 투여한 경우 안정막 전압의 과분극과 더불어 향도잡이 전압의 발생빈도가 감소하다가 차단되었고 이러한 pinacidil의 효과는 imipramine (20 μM)의 동시 투여로 안정막 전압의 과분극과 향도잡이 전압의 발생빈도의 감소를 정상으로 회복시켰다 (Fig. 7A). Pinacidil에 대한 imipramine의 효과는 figure 7B, 7C, 7D에 보여주었다 (n=3).

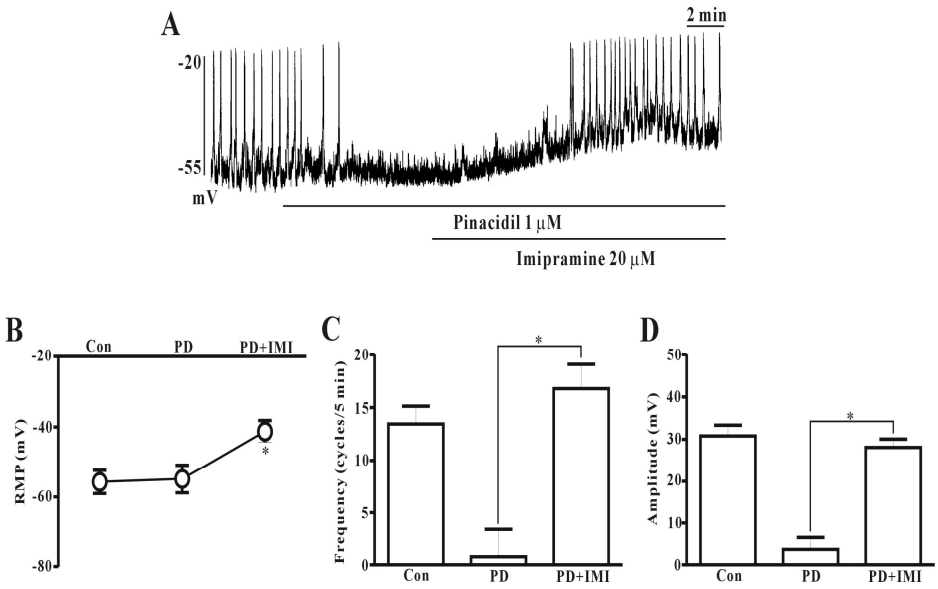

Figure 7. Effects of imipramine on the pinacidil-induced effects in colonic interstitial cells of Cajal. Pinacidil (1 μM) hyperpolarized the membrane and inhibited the generation of pacemaker potentials and these effects were recovered to normal by imipramine (20 μM) (A). Response to imipramine on pinacidil-induced effects are summarized in (B), (C), and (D). Bars represent mean values ± S.E.M. *($P<0.05$) Significantly different from pinacidil alone treatment. Con : Control, RMP : Resting membrane potentials, PD : Pinacidil, IMI : Imipramine.

7. 미토콘드리아 ATP-의존성 칼륨 통로 차단제의 효과

ATP-의존성 칼륨 통로는 세포막뿐만 아니라 세포 안 미토콘드리아에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 imipramine의 작용 위치를 구별하기 위하여 향도잡이 전압 발생에 미토콘드리아 ATP-의존성 칼륨 통로 차단제인 5-hydroxydecanoic acid (5-HD)를 투여하였다. 5-HD (10 μM) 투여 시 향도잡이 전압에 대해 아무런 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 8A). 향도잡이 전압에 대한 5-HD의 효과는 figure 8B, 8C, 8D에 보여주었다 (n=3).

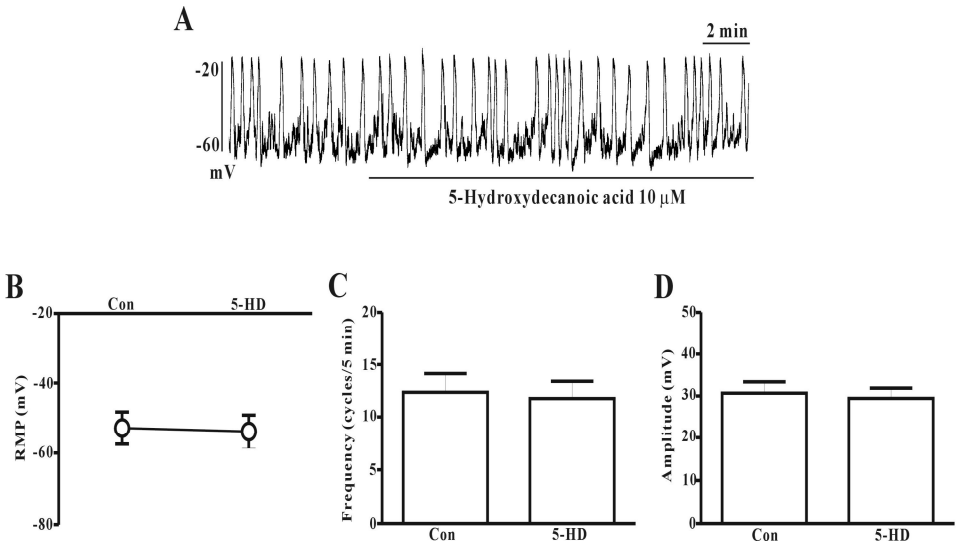

Figure 8. Effects of 5-hydroxydecanoic acid, a mitochondrial ATP-dependent K^+ channels blocker, on the pacemaker potentials in colonic interstitial cells of Cajal. 5-hydroxydecanoic acid (10 μM) did not modify the pacemaker potentials (A). Response to 5-hydroxydecanoic acid on pacemaker potentials are summarized in (B), (C), and (D). Con : Control, RMP : Resting membrane potentials, 5-HD : 5-hydroxydecanoic acid.

8. 세포 내 칼슘 진동에 대한 imipramine의 효과.

세포 내 주기적 칼슘 농도가 향도잡이 전압 발생에 일차적 요인으로 알려져 있다. 따라서 imipramine의 ATP-의존성 칼륨 통로 억제 효과가 세포 내 주기적 칼슘 농도 변화와 관련성이 있는지를 알아보려 세포 내 칼슘 농도를 측정하였다.

Imipramine (20 μM)과 glibenclamide (10 μM)를 투여 시 두 약물 모두 세포 내 주기적 칼슘 빈도를 증가시켰다 (Fig. 9A, 9B) (n=5).

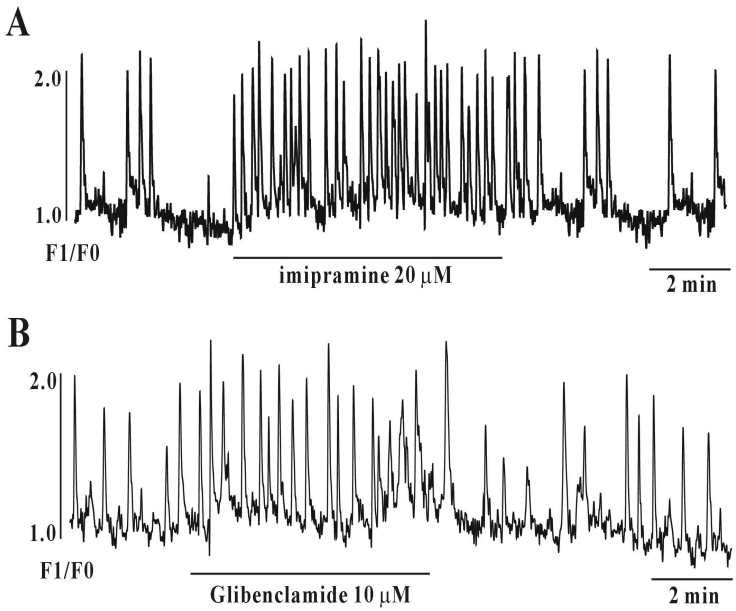

Figure 9. Effects of imipramine and glibenclamide on the spontaneous intracellular Ca^{2+} oscillations in colonic interstitial cells of Cajal. Glibenclamide (10 μM) (A) and imipramine (20 μM) (B) increased intracellular Ca^{2+} oscillations.

고 찰

항우울제는 IBS에 효과적이며 기능성 위장관 운동질환을 가진 환자들의 증상을 개선하는 것으로 알려졌다 (Gorad et al, 1995; Jacson et al, 2000). 본 연구는 대장 카할 사이질 세포는 자발적으로 ATP-의존성 칼륨 통로가 활성화 되어 있으며 항우울제인 imipramine은 이 통로를 억제하여 향도잡이 전압의 저분극과 발생빈도를 증가시켜 위장관 운동 조절에 관여할 수 있음을 규명한 것이다.

카할 사이질 세포의 자발적인 향도잡이 전압의 발생은 주기적인 내향성 전류, 즉 향도잡이 전류의 발생에 의해 이루어 진다 (Koh et al, 1998). Transient receptor potential (TRP) 통로가 카할 사이질 세포의 향도잡이 통로로 제시되고 있으며 (Kim et al, 2006) 면역조직화학적 방법 및 분자학적 연구를 통해 생쥐 및 사람의 소

장 및 대장에서 이 들 통로가 확인되었다 (Hwang et al, 2009). 이 외에도 카할 사이질 세포에서 막전압-의존성 나트륨 통로, 막전압-의존성 칼슘 통로, ERG 칼륨 통로 및 ATP-의존성 칼륨 통로가 보고되어 있다 (Nakayama et al., 2005; Mckay and Huizinga, 2006; Strege et al., 2003). 본 연구에서 대장 카할 사이질 세포에서 발생되는 향도잡이 전압은 막전압-의존성 나트륨 통로 차단제인 tetrodotoxin, 막전압-의존성 칼슘 통로 차단제인 nicardipine 및 막전압-의존성 칼륨 통로 차단제인 tetraethylammonium 에 의해 변화되지 않았다. 이러한 결과는 향도잡이 전압 발생에 막전압 의존성 나트륨 통로, 막전압 의존성 칼슘 통로 및 막전압 의존성 칼륨 통로가 관여하지 않음을 나타낸다. 그런 반면 ATP-의존성 칼륨 통로 차단제인 glibenclamide 투여 시 세포막 전압의 저분극과 더불어 발생빈도 수가 증가되었다. ATP-의존성 칼륨 통로는

대장 평활근 세포를 포함하여 여러 세포에 존재하고 있으며 안정막 전압을 유지시키고 세포의 흥분성을 결정하고 있다. 이 이온 통로의 억제 시 세포막 전압의 저분극과 더불어 세포의 흥분성이 증가하는 반면, 활성화 시 반대로 세포막 전압의 과분극과 더불어 세포의 흥분성이 저하한다 (Standen et al, 1989; Jun et al. 2001). ATP-의존성 칼륨 통로는 pinacidil, cromakalim, 및 diazoxide 등에 의해서 활성화 되며, sulfonylurea 계통의 약물인 glibenclamide 또는 tolbutamide에 의해서 차단된다 (Edwards and Weston, 1993). ATP-의존성 칼륨 통로의 구조는 K_{ir} 6 군의 내향정류성 칼륨 통로와 sulfonylurea receptor (SUR)의 조합으로 구성되어 있다 (Seino, 1999). 이 통로의 존재를 확인하기 위해 통로 개방제인 pinacidil을 투여한 경우 세포막 전압의 과분극과 더불어 향도잡이 발생이 크게 억제되었으며 glibenclamide에 의해서

정상으로 회복되었다. 또한 RT-PCR분석에서 c-Kit 양성세포인 카할 사이질 세포에서 ATP-의존성 칼륨 통로의 구성분자인 K_{ir} 6.2와 SUR 2B가 발현되었다. 따라서 이러한 결과들은 대장 카할 사이질 세포의 향도잡이 전압 발생에 ATP-의존성 칼륨 통로가 존재하며 기초적으로 작동하고 있음을 나타낸다. Imipramine 투여시 glibenclamide와 동일하게 세포막 전압의 저분극과 더불어 발생빈도 수가 증가되었으며, pinacidil에 의한 작용을 억제한 바 항우울제 또한 대장 카할 사이질 세포에 존재하는 ATP-의존성 칼륨 통로를 조절 할 수 있음을 나타낸다. 그러나 desipramine은 농도 증가 시 반대로 향도잡이 전압의 발생을 억제하였다. 그 이유에 대해서는 현 연구로는 알 수 없었으며 추 후 밝혀야 할 것으로 생각된다. Imipramine의 대장에서의 효과는 소장 카할 사이질 세포에서의 효과와 다른 양상을 나타낸다. 최 등은 (2006a)

소장 카할 사이질 세포에서도 ATP-의존성 칼륨 통로가 존재하나 기초 활성화는 없어 glibenclamide 투여시 향도잡이 전압에 대한 효과는 나타내지 않으며 imipramine 또한 아무런 효과를 나타내지 않았다고 보고하였다. 그러나 glibenclamide와 imipramine은 pinacidil에 의해서 유발된 막전압의 과분극과 더불어 억제된 향도잡이 전압발생을 차단하여 다시 정상으로 회복되었다. 이러한 소장과 대장 카할 사이질 세포 사이의 차이점에 대해서는 정확히 알 수 없으나 ATP-의존성 칼륨 통로의 분자구성이 다른 것이 한 이유일 것으로 생각된다. 왜냐하면 소장 카할 사이질 세포의 RT-PCR 분석에서 c-Kit 양성세포에서 K_{ir} 6.2와 SUR 2B가 발현되어 대장의 K_{ir} 6.1와 SUR 2B와 다르게 구성되어 있기 때문이다 (Choi et al, 2006b). 그러나 대장과 소장의 약물반응에 대한 차이는 더욱 연구해야 할 것으로 생각된다. ATP-의존

성 칼륨 통로는 세포 안 미토콘드리아에서도 존재하고 있다 (Edwards and Weston, 1993). 따라서 imipramine의 세포막 ATP-의존성 칼륨 통로에 대한 작용과 미토콘드리아 ATP-의존성 칼륨 통로에 대한 작용을 구별하기 위하여 미토콘드리아 ATP-의존성 칼륨 통로의 선택적 억제제인 5-hydroxydecanoic acid (5-HD)를 투여하였다. 5-HD는 glibenclamide와 달리 향도잡이 전압에 아무런 효과를 나타내지 않아 imipramine의 효과는 세포막에 존재하는 ATP-의존성 칼륨 통로에 작용하는 것으로 생각된다.

위장관 염증시 위장관 운동성의 변화가 초래되며 위장관 평활근 내 ATP-의존성 칼륨 통로의 활성화와 유전자 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Jin et al, 2004). 또한 최근 그람 음성균의 세포막에 존재하여 염증을 유발하는 내독소인 lipopolysaccharide가 소장 카할 사이질 세포에 작용하여 프로스타글랜딘 E_2 (PGE_2)와

산화질소 (NO)를 분비하여 ATP-의존성 칼륨 통로를 활성화 시켜 향도잡이 전류의 발생을 억제한다고 보고 되었다 (Zuo et al, 2012). 따라서 염증 시 저하된 운동성을 개선하는데 항우울제가 하나의 치료제로서의 가능성을 생각할 수 있으며, 추 후 조직 및 동물 실험을 병행으로 시행하여 밝혀야 할 것으로 생각된다. 세포 안 칼슘 진동은 향도잡이 전류를 발생시키는 일차 기전으로 향도잡이 전류 발생과 일치하고 있다 (Ward et al, 2000). Nakayama 등(2005)은 sulfonylurea receptor 단위가 세포 안 칼슘 진동을 조절하여 카할 사이질 세포의 향도잡이 활동도를 조절한다고 보고하였다. 또한 PGE_2 는 소장 카할 사이질 세포에서 ATP-의존성 칼륨 통로를 활성화 시켜 향도잡이 전류의 발생을 억제하며 이러한 효과는 세포 내 칼슘 진동의 억제와 관련되어 있다 (Choi et al, 2006b). 본 연구에서 imipramine과 glibemclamide

는 세포 안 칼슘 진동을 증가시켰으며 전기적 현상과 일치하였다. 따라서 imipramine에 의한 ATP-의존성 칼륨 통로의 억제는 세포 안 칼슘 농도와 밀접한 관계가 있음을 나타낸다.

결론적으로 imipramine은 대장 카할 사이질 세포에서 기초적으로 활성화 되어 있는 ATP-의존성 칼륨 통로를 억제하며 이는 세포 내 칼슘 분비 기전과 밀접한 관계가 있다. 이러한 작용은 항우울제가 대장 운동성 장애, 특히 억제되어 있는 운동성 장애에 효과적일 수 있음을 시사한다.

참고문헌

Baldessarini RJ. Current status of antidepressants: Clinical pharmacology and therapy. J Clin Psychi 1989; 50: 117-126.

Beyder A, Farrugia G. Targeting ion channels for the treatment of gastrointestinal motility disorders. Therap Adv Gastroenterol 2012; 5: 5-21.

Camilleri M, Katzka DA. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Genetic epidemiology and pharmacogenetics in irritable bowel syndrome. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012;302:G1075-G1084.

Choi S, Park CG, Kim MY, Lim GH, Kim JH, Yeum CH, Yoon PJ, So I, Kim KW, Jun JY. Action of imipramine on activated ATP-sensitive K^+ channels in interstitial cells of Cajal from murine small intestine. Life Sci 2006a; 78: 2322-2328.

Choi S, Park DY, Yeum CH, Chang IY, You HJ, Park CK, Kim MY, Kong ID, So I, Kim KW, Jun JY. Activating of ATP-dependent K^+ channels comprised of $K_{ir}6.2$ and SUR 2B by PGE_2 through EP_2 receptor in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine. Cell Physiol Biochem 2006b; 18: 187–198.

Clouse RE., Lustman PJ. Antidepressants for irritable bowel syndrome. In: Camilleri, M., Spiller, R.C. (Ed.), Irritable Bowel Syndrome: Diagnosis and Treatment. WB Saunders, London, 2001, pp. 161-171.

Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle. Neurogastroenterol and Motil 2004; 1: 118-122.

Edwards G, Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. Annual Rev Pharmacol Toxicol 1993; 3: 597-637.

Eshraghian A, Eshraghian H. Interstitial cells of Cajal: a novel hypothesis for the pathophysiology of irritable bowel syndrome. Can J Gastroenterol 2011;25:277-279.

Farrugia G, 2008. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Neurogastroenterol Motil 2008; 20: 54-63.

Gorard DA, Libby GW, Farthing MJ. Effect of a tricyclic antidepressant on small intestinal motility in health and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. Dig Dis Sci 1995; 40: 86-95.

Huizinga JD, Thunberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene requried for intestinal pacemaker activity. Nature 1995; 373: 347-349.

Hwang SJ, Blair PJ, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM, Ward SM. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. J Physiol 2009; 587: 4887-904.

Jackson JL, O'Malley PG, Tomkins G, Balden E, Santoro J, Kroenke K. Treatment of functional gastrointestinal disorders with antidepressant medications: a meta-analysis. Am J Med 2000; 108: 65-72.

Jun JY, Kong ID, Koh SD, Wang XY, Perrino BA, Ward SM, Sanders KM. Regulation of ATP-sensitive K^+ channels by protein kinase C in murine colonic myocytes. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 281: C857-C864.

Jain D, Khalid M, Manishi T, Joan CM, Deborah DP. Role of Interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. Am J Gastroenterol 2003; 98: 618–624.

Jin X, Malykhina AP, Lupu F, Akbarali HI. Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K^+ channels in experimental colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 287: G274-G285.

Kim BJ, So I, Kim KW. The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. J Smooth Muscle Res 2006; 42: 1-7.

Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. J Physiol 1998; 513: 203-213.

McKay CM, Ye J, Huizinga JD.Characterization of depolarization-evoked ERG K currents in interstitial cells of Cajal. Neurogastroenterol Motil 2006; 18: 324-333.

Nakayama S, Ohya S, Liu HN, 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 Ca^{2+} activity and smooth muscle contractility. J Cell Sci 2005; 118: 4163-4173.

Olsson C, Holmgren S. The control of gut motility. Comp Biochem Physiol 2001; 128: 481–503.

Sanders KM, Koh SD, Ward SM: Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. Annu Rev Physiol 2006; 68: 307-343.

Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. Annu Rev Physiol 1999; 61: 337-362.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y. Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. Science 1989: 245: 177-180.

Strege PR, Ou Y, Sha L, Rich A, Gibbons SJ, Szurszewski JH, Sarr MG, Farrugia G. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 285: G1111-G1121.

Szurszewski JH. Electrical basis for gastrointestinal motility. In: Johnson, L.R.(Ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York, 1987, pp. 383-422.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. J Physiol 1994; 480: 91-97.

Ward SM, Ordog T, Koh SD, Baker A, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. J Physiol 2000; 525: 355–361.

Zuo DC, Choi S, Shahi PK, Kim MY, Park CG, Kim YD, Lee J, Chang IY, Lee HS, Yeom SC, Moon HJ, Seong SY, So I, Jun JY. Action of Lipopolysaccharide on Interstitial Cells of Cajal from Mouse Small Intestine. Pharmacology. 2012; 90: 151-159.