creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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]I804:24011-200000263838

2013년 2월

博士學位 論文

카할 사이질세포에 대한 cGMP의 효과

- Effects of cGMP on Cajal Cells –

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

정 유 진

카할 사이질세포에 대한 cGMP의 효과

- Effects of cGMP on Cajal Cells–

2013年 2月

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

정 유 진

카할 사이질세포에 대한 cGMP의 효과

- Effects of cGMP on Cajal Cells–

지도교수 박 찬 국

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

정 유 진

정 유 진의 博士學位論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校	敎授	김 만 우 (인)
委 員	朝鮮大學校	敎授	박 찬 국 (인)
委 員	全南大學校	敎授	김 현 수 (인)
委 員	朝鮮大學校	敎授	전 제 열 (인)
委 員	朝鮮大學校	助敎授	김 영 대 (인)

2013년 12월

朝鮮大學校 大學院

목 차

목 차 ---------- I

그 림 목 차 ---------- II

초 록 ---------- IV

서 론 ---------- 1

실험방법 ---------- 4

실험결과 ---------- 8

고 찰 ---------- 24

참고문헌 ---------- 29

그 림 목 차

Figure 1. Typical trace of pacemaker potentials in current clamping mode ---------- **9**

Figure 2. Effects of 8-bromo cGMP on pacemaker potentials in colonic ICCs. ---------- 11

Figure 3. Effects of zaprinast on pacemaker potentials in colonic ICCs. ---------- 13

Figure 4. Effects of ODQ on pacemaker potentials in colonic ICCs. ------- 15

Figure 5. Effects of SNAP on pacemaker potentials in colonic ICCs. ------ 17

Figure 6. Effects of L-NAME on pacemaker potentials in colonic ICCs. --- 19

Figure 7. Effects of KT 5823 on pacemaker potentials in colonic ICCs. --- 21

Figure 8. Effects of 8-bromo cGMP and zaprinast on the spontaneous intracellular Ca^{2+} oscillations in colonic ICCs. ---------- 23

ABSTRACT

Effect of cGMP on Cajal Cells

Jeong Yu Jin

Director: Prof, Park Chan Guk

Graduate School of Chosun University

Electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles is generated by interstitial cells of Cajal (ICC) and many transmitters and hormones are mediated via production of cyclic nucleotides (cyclic adenosine monophosphate; cAMP and cyclic guanosine monophosphate; cGMP). However, there is no report how cyclic nucleotides might affect pacemaker activity of ICC. For finding this, this study was investigated to cGMP action on spontaneous pacemaker activities of cultured colonic ICC from mouse using whole-cell patch clamp technique and live Ca^{2+}-imaging. Colonic ICC generated spontaneous regular pacemaker potentials or currents in currents or voltage-clamping mode. Cell permeable 8-bromo cGMP inhibited the pacemaker potentials in colonic ICC. Also, the inhibition of the pacemaker potentials was observed after the treatment of zaprinast, selective inhibitor of cGMP-specific phosphodiesterases V and VI. And, ODQ, a potent guanylyl cyclase inhibitor, itself increased the frequency of the spontaneous membrane potential. Furthermore, S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP),

a nitric oxide (NO) donor, inhibited pacemaker potentials in colonic ICC and L-NAME, an inhibitor of NO synthesis, itself increased the frequency of the pacemaker potentials in colonic ICC. In live cell intracellular Ca^{2+} imaging using Fluo-4, cGMP or zaprinast inhibited the Ca^{2+} oscillations.

In conclusion, cGMP or NO have inhibitory function on pacemaker activity in colonic ICC and also ICC itself control the level of cGMP or NO production in normal condition for regulating the frequency of pacemaker activity.

Keywords: cyclic guanosine monophosphate, colon, interstitial cells of Cajal, pacemaker potentials, nitric oxide.

초 록

의 학 과

정 유 진

오래전부터 위장관의 평활근에서 자율적으로 발생하는 규칙적 수축운동 (rhythmic contraction)은 연동운동이나 분절운동과 같은 위장관의 운동의 기본이 되는 것으로 알려져 왔다. 이러한 규칙적 수축운동은 서파 (slow wave)라는 현상으로 나타나는데, 서파의 기원을 평활근에서 찾으려는 노력은 예외 없이 모두 실패하였다 (Farrugia, 1999).

다양한 신경전달물질과 호르몬의 위장관 운동성에 대한 효과는 cyclic nucleotides 의 생성에 의해 유도된다. 이미 기존 연구 결과를 살펴보면 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)와 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 평활근 세포의 서파에 대한 효과가 보고 되었다 (Huizinga 등, 1991; Smith 등, 1993; Tsugeno 등, 1995). 하지만 기존의 연구들은 장 조직과 평활근 세포에서 기록된 실험을 시행하였다. 이러한 실험 결과들은 카할 간질 또는 평활근 세포에서 발생되는 현상인지를 정확하게 설명해주기 힘들다. 이에 본 연구에서는 카할 간질세포에서 기록된 향도잡이 전류에 대한 cGMP 의 효과를 명확하게 밝혀 보고자 한다.

본 연구는 대장 향도잡이 세포인 카할 간질세포에서 기록되는 향도잡이 전기적 활동도에 대한 NO 의 억제성 효과를 확인하였으며, 이 억제성 효과는 카할 간질세포내의 cGMP 와 밀접한 관련이 있다는 것을 제시한다. 또한 외부의 자극없이 카할 간질세포는 세포 자체적으로 cGMP 농도를 조절하면서 향도잡이 활동도의 빈도수를 조절한다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 기존 위장관 운동 조절에 평활근 수준이 아닌 카할 간질세포 향도잡이에 대한 기전의 기초자료를 제공함으로써, 풀리지 않은 위장관 운동성 기전에 많은 정보를 제공할 것이라 생각된다.

서 론

위장관 운동은 잘 알려져 있듯이 수많은 요인들에 의해 결정된다. 예로서 교감신경, 부교감 신경 등으로 대변되는 외인성 신경계, 위장관 자체의 내인성 신경계, endocrine 및 paracrine system 등이 관여한다. 그리고 이 외에도 위장관 자체의 자율적인 요소, 즉, 위장관 평활근의 자발적 활동도와 마지막으로 카할 사이질세포 (Interstitial cells of Cajal, ICCs)가 관여한다.

오래전부터 위장관의 평활근에서 자율적으로 발생하는 규칙적 수축운동은 연동운동이나 분절운동과 같은 위장관 운동의 기본이 되는 것으로 알려져 왔다. 이러한 규칙적 수축운동은 서파 (slow wave)라는 현상으로 나타나는데, 서파'로 불리게 된 이유는 수축과 관련된 세포막 전압의 탈분극 과정이 low frequency, long duration 으로 나타나기 때문이다 (Szurszewski, 1987; Tomita 등, 1981). 그러나 이러한 규칙적 수축운동은 단순한 위장관 평활근과 운동신경 지배만의 관계로는 설명되지 않으며, 이러한 서파의 기원을 평활근에서 찾으려는 노력은 예외 없이 모두 실패하였다 (Farrugia, 1999).

지난 15 여년 간 동물 모델을 중심 (mouse, guinea pig, canine 등)으로 한 집중적인 연구를 통해 위, 소장, 그리고 대장에서 전형적인 위상성 활동을 나타내는 평활근에서의 향도잡이(pacemaker) 역할은 카할 사이질세포에서 기원한다는 사실이 밝혀 졌다 (Sanders, 1996). 카할 사이질세포는 non-neuronal, mesenchymal origin 의 세포로서 3 차원적인 연결망을 형성하고 있으며, 동물의 종이나 위장관내 위치에 상관없이 유사한 구조를 가지고 분포한다. 카할 사이질세포는 proto-oncogene 인 c-Kit 유전자를 발현하고 있으며 (Ward 등, 1994), 이 유전자 산물인 Kit receptor 는 세포막에서 tyrosine kinase receptor 로 작용한다. 카할 사이질세포가 c-Kit 를 발현하고 있기 때문에 조직내에서 카할 사이질세포를 확인하는 데에는 c-Kit 에 대한 항체를 활용한 면역 조직학적 기법이 활용된다 (Ward 등 1995). 카할 사이질세포의 역할은 심장의 동방결절세포와 유사한 향도잡이 역할로서 자발적 내향성 전류 (spontaneous inward currents; pacemaker currents)를 생성하여 서파를 발생시킨다 (Koh 등, 1998; Thomsen 등, 1998). 카할 사이질세포는 장관내 gap junction 을 통해 서로 연결망을 형성하고 있으며 평활근과도 연결되어 있다. 따라서 발생된 서파는 카할 사이질세포 연결망을 통하여 연결되어 있으며 또한 평활근으로 전파된다 (Sanders, 1996). 카할 사이질세포는 또한 장관 신경계와 시냅스처럼 밀접하게

연결되어 있어 신경으로부터 평활근으로의 흥분성 및 억제성 신호전달과정을 매개하고 있다 (Burns 등, 1996; Wang 등, 2003; Ward 등, 2000; Ward 와 Sanders, 2001). 이와 같은 연구결과들은 위장관 운동에 있어서 카할 사이질세포의 그 중요성이 매우 크다는 것을 보여주고 있다.

다양한 신경전달물질과 호르몬의 위장관 운동성에 대한 효과는 cyclic nucleotides 의 생성에 의해 유도된다. 이미 기존 연구 결과를 살펴보면 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)와 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 평활근 세포의 서파에 대한 효과가 보고 되었다 (Huizinga 등, 1991; Smith 등, 1993; Tsugeno 등, 1995). 하지만 기존의 연구들은 장 조직과 평활근 세포에서 기록된 실험을 시행하였다. 이러한 실험 결과들은 카할 사이질 또는 평활근 세포에서 발생되는 현상인지를 정확하게 설명해주기 힘들다. 이에 본 연구에서는 카할 사이질세포에서 기록된 향도잡이 전류에 대한 cGMP 의 효과를 명확하게 밝혀 보고자 한다.

실 험 방 법

1. 실험동물의 윤리적 처리

본 연구에서는 3-5 일 된 ICR 생쥐를 암수구별 없이 실험동물로 사용하였다. 실험에 사용된 생쥐는 조선대학교 실험동물 윤리위원회에서 지시된 적용법에 따라 윤리적으로 처리되었다.

2. 카할 사이질세포의 배양

ICR 생쥐를 Ether 로 마취시킨 후 희생시킨 다음 개복하여 대장부위를 적출하였다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로 채워진 준비용기 속에서 창자간막 가장자리 (mesenteric border)를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 윤상근을 노출시켰다. 분리된 대장근 조직을 collagenase (Worthington type II, USA) 1.3 mg/ml, bovine serum albumin (Sigma, USA) 2 mg/ml, trypsin inhibitor (Sigma) 2 mg/ml, ATP 0.27 mg/ml 등이 들어 있고, Ca^{2+}이 들어 있지 않은 Hank's 용액에 옮긴 다음 37 ° C 에서 12 분간 항온 소화시킨 후, 진탕시켜 단일 세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 유리 cover glass 위에 분주하고, 10 분 후에 stem cell factor 5 ng/ml (Sigma)와 2 % antibiotic/antimycotic (Gibco,

USA)이 들어 있는 SMGM (smooth muscle growth medium; Clonetics Corp, USA) 용액을 분주 한 후, 37 ° C (95 % O_2 - 5 % CO_2) 배양기에서 배양시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 2 % antibiotic/antimycotic 만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주었다. 실험은 배양 2 일째 후부터 시행하였다. 배양된 카할 사이질세포의 확인은 Kit 단백에 대한 항체 (ACK2, Gibco-BRL)를 사용하였으며 면역형광염색된 세포표본을 공초점주사 현미경 (FV300, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

3. 세포막 전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 항온 조절계에 옮긴 후 분당 2-3 ml 속도로 세포외 용액을 관류시켰다. Whole-cell patch clamp 를 사용하여 배양된 카할 사이질세포에서 세포막 전압과 세포막 전류를 기록하였다. Patch clamp 증폭기 (Axopatch 1-D, Axon Instruments)를 통하여 나오는 신호는 디지털 오실로스코프, 생리적 기록기를 통해서 관찰하였고, 고정전압과 자극전압의 조정 및 전류의 기록은 pClamp (version 9.0, Axon Instruments, USA)를 사용하였다. 세포막 전류는 - 70 mV 의 유지전압에 고정하여 기록하였다. 막전압 고정실험에서 얻어진 결과는 clampex 와 GraphPad Prizm (version 2.01, USA)을 이용하여 분석 처리하였다. 모든 실험은 30 ° C 에서 시행하였다.

4. 실험용액 및 약물

세포외 관류용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM 단위임): KCl 5, NaCl 135, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1.2, glucose 10, HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]) 10 이며 Tris 를 첨가하여 pH 가 7.4 가 되도록 적정하였다. Ca^{2+}-free 용액은 위 조성에서 $CaCl_2$ 만을 제거하였다. 전극내 용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM 단위임): KCl 140, $MgCl_2$ 5, K_2ATP 2.7, Na_2GTP 0.1, creatinine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1 이며 Tris 를 첨가하여 pH 가 7.2 가 되도록 적정하였다.

실험에 사용된 모든 약물은 Sigma 로부터 구입하였다.

5. 세포내 칼슘 측정

24-30 시간 배양된 대장 카할 사이질세포를 세포외 관류용액으로 세 2-3 회 세척한 후 37 ℃ 에서 15 분 동안 적응시킨다. 최종 농도 1 μM fluo-4AM (Molecular Probe) 으로 10 분 동안 처치 후, 세포외 관류용액으로 세 2-3 회 세척시킨다. 세척된 세포는 Perkin-Elmer Ultraview Confocal Scanner 와 a Hamamatsu Orca ER 12-bit CCD camera 가 장착된 Nikon Eclipse TE200 위상차 현미경을 통해서 관찰한다. 세포는 매 0.4 초 간격으로 스캔되며 형광 파장은 488 nm excitation 을 가지고 emission 은 515 nm 이다. 형광 칼슘 측정은

카할 사이질세포를 항상 30 ℃ 를 유지시켰다. 세포내 칼슘에 대한 형광 강도의 변화는 첫번째 이미지의 강도를 F0 로 지정하고 각각의 형광의 강도를 F1/F0 로 표현하였다.

6. 실험결과의 통계적 처리

실험결과는 평균과 ± 표준오차 (mean ± SE)로 표기하였으며, 필요한 경우에는 ANOVA 또는 paired Student ‘s t-test 를 사용하여 유의성을 검증하였다.

실 험 결 과

1. 생쥐 대장에서 분리된 카할 사이질세포의 향도잡이 전압 및 전류

현미경으로 특징적인 카할 사이질세포의 형태를 확인 후, whole cell patch 기법을 시행하였다. 전류 고정법 (I=0)에서 카할 사이질세포는 자발적인 향도잡이 전압을 발생시켰다 (그림 1A). 향도잡이 전압의 평균은 36 ± 2.7 mV 를 보였고, 안정막 전압은 -55 ± 5 mV 였다. 본 향도잡이 전압의 빈도는 높은 빈도를 보여주는 세포와 더불어 낮은 빈도를 보여주는 세포도 보였다. 평균 향도잡이 전압의 빈도는 5 분에 9.7 ± 0.9 회를 보였다.

전압 고정법 (고정 전압 = -70 mV)에서 카할 사이질세포는 자발적인 내향성 전류인 향도잡이 전류를 발생시켰다 (그림 1B). 대장 카할 사이질세포에서 기록된 향도잡이 전류의 크기는 이전 보고된 소장 카할 사이질세포보다 큰 1000 ± 300 pA 를 보였고 빈도수는 5 분에 8.7 ± 1.7 회였다.

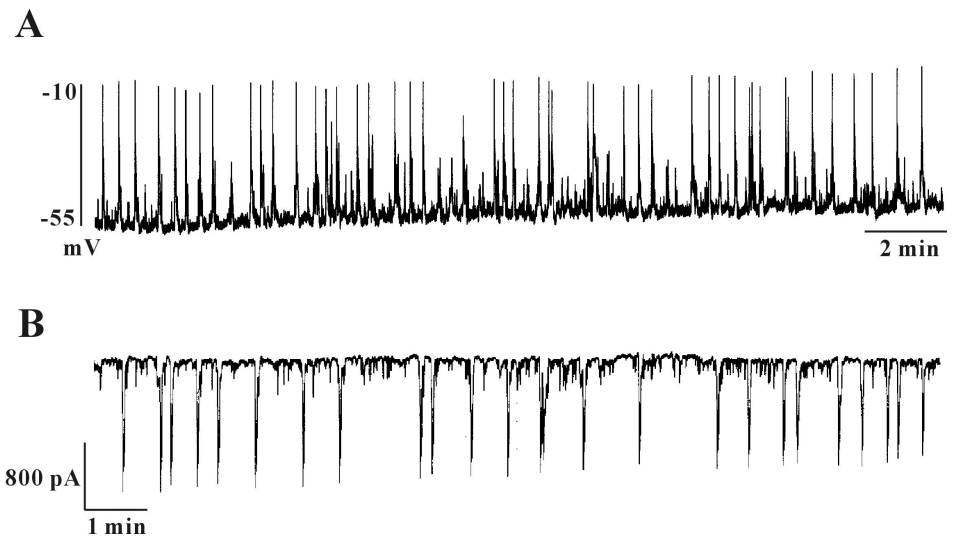

Fig. 1. Typical trace of pacemaker potentials in current clamping mode (A) and spontaneous inward pacemaker currents in voltage clamping mode at a holding potential of -70 mV (B) in colonic ICCs from mouse.

2. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 cyclic guanosine monophosphate의 효과

대장 카할 사이질세포의 향도잡이 활동도에 대한 cGMP 의 역할을 확인 하고자 세포막을 통과하는 8-bromo cGMP 를 사용하였다. 정상 상태하에서 카할 사이질세포는 자발적인 향도잡이 전압을 보여주었다. 정상적인 향도잡이 전압을 보이는 카할 사이질세포에 100 μM 8-bromo cGMP 를 투여한 결과, 향도잡이 전류가 사라지는 것을 알 수 있었다 (그림 2A). 8-bromo cGMP 효과로 인한 향도잡이 전압의 빈도는 5 분당 0.33 ± 0.1회로 줄어 들었고 안정막 전압은 과분극 되었다 (그림 2B, C; n=5).

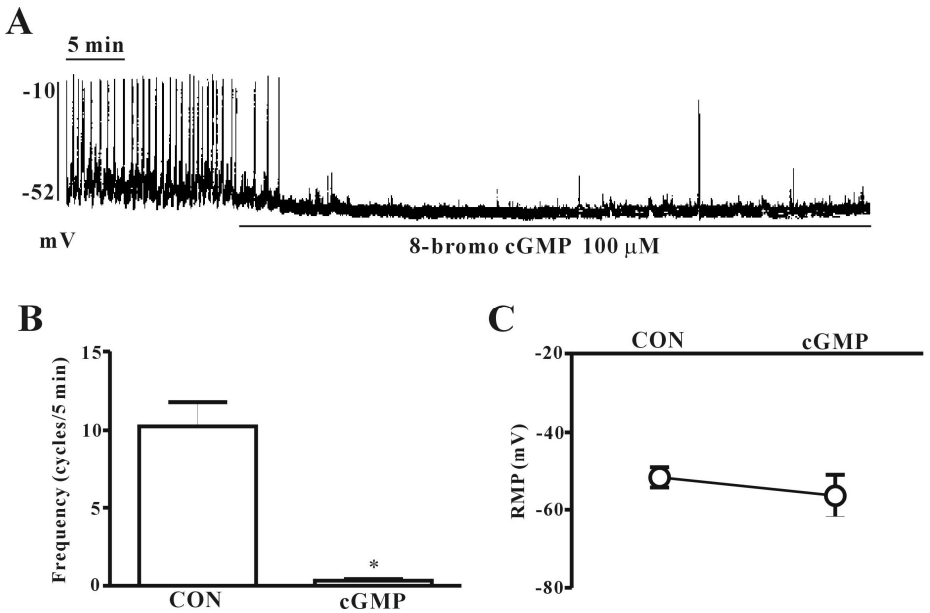

Fig. 2. Effects of 8-bromo cGMP on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 100 μM of 8-bromo cGMP in current-clamp mode. The effects of 8-bromo cGMP on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control, cGMP: 8-bromo cGMP. RMP: resting membrane potential

3. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 phosphodiesterase 억제제의 효과

Phosphodiesterase (PDE)는 세포내 cAMP 또는 cGMP 를 분해시키는 효소로 세포내 cAMP 또는 cGMP 의 농도 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 본 연구에서는 cGMP 분해효소 억제제인 zaprinast를 사용하였다. 카할 사이질세포에서 기록된 정상 향도잡이 전압 상태에서 100 μM zaprinast를 투여한 결과 향도잡이 전류가 사라지는 것을 알 수 있었다 (그림 3A). Zaprinast 투여로 억제된 향도잡이 전압의 빈도수는 5 분당 1.54 ± 0.8회 였으며 반면 안정막 전압에는 큰 변화를 보여주지 못했다 (그림 3B, C; n=4).

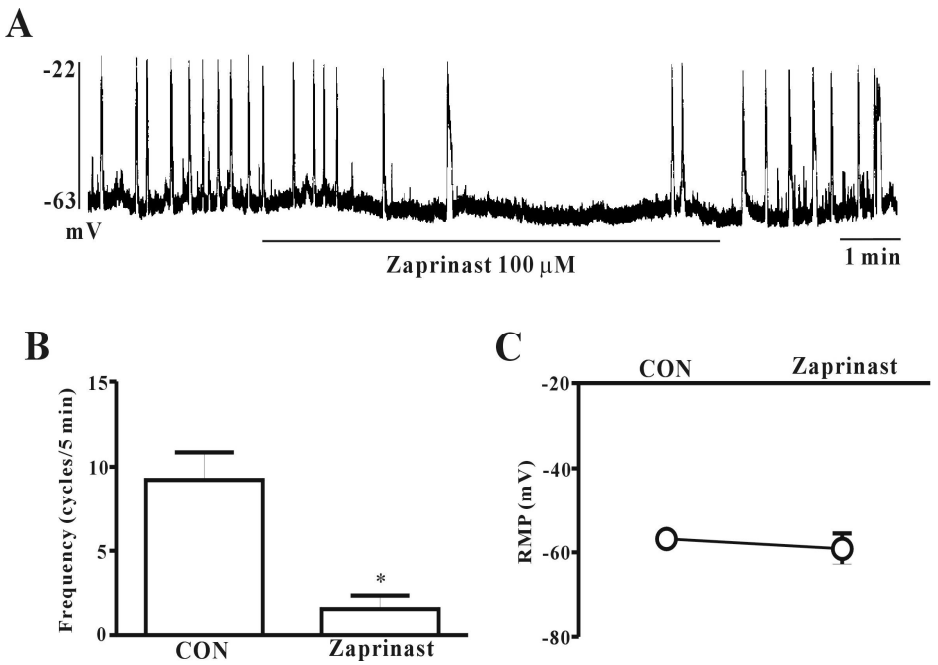

Fig. 3. Effects of zaprinast on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 100 μM of zaprinast in current-clamp mode. The effects of zaprinast on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control. RMP: resting membrane potential

4. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 guanylyl cyclase 억제제의 효과

위 결과에서 보여진 외부에서 투여된 cGMP 의 효과 이외에 카할 사이질세포의 자체에서 발생되는 cGMP 의 효과를 확인해 보고자 guanylyl cyclase 억제제인 ODQ를 사용하였다. 정상적인 향도잡이 전압에서 ODQ 100 μM 을 투여한 결과 ODQ 자체가 자발적인 향도잡이 전압의 빈도수를 증가시키는 것을 알 수 있었다 (그림 4A). 더불어 향도잡이 전압의 안정막 전압을 탈분극 시켰다. ODQ에 의해 증가된 향도잡이 전압의 빈도수는 5 분당 18.55 ± 1.3회 였으며 안정막 전압은 -38.62 ± 4.63 mV 을 나타냈다 (그림 4B, C; n=4).

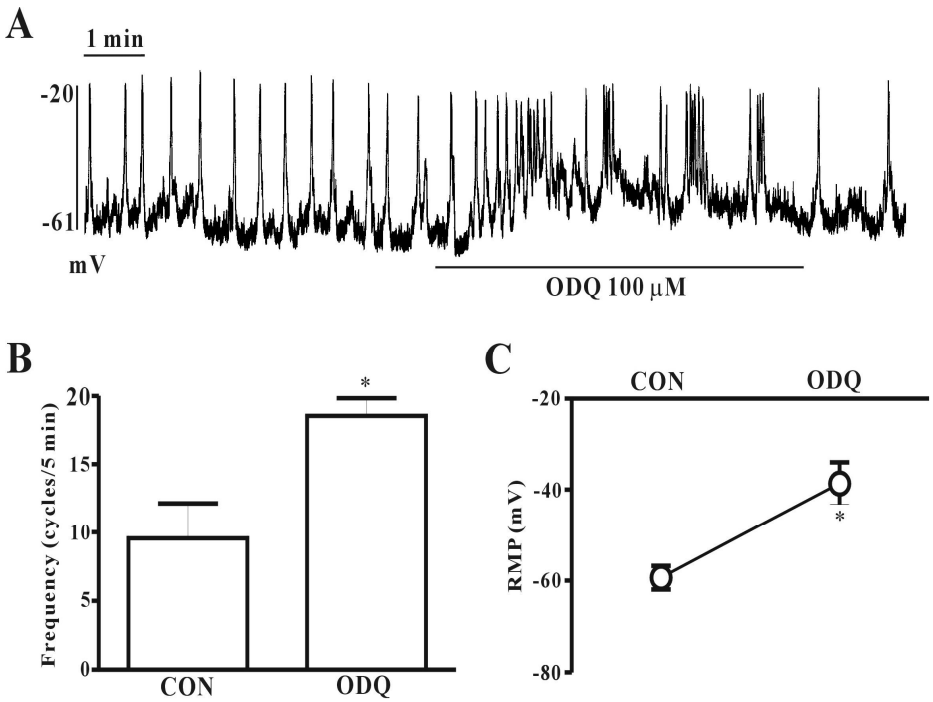

Fig. 4. Effects of ODQ on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 100 μM of ODQ in current-clamp mode. The effects of ODQ on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control. RMP: resting membrane potential

5. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 nitric oxide의 효과

기존의 모든 보고에 따르면 nitric oxide (NO)의 효능은 세포내 cGMP의 증가를 통해 나타난다고 알려져 있다. 그러므로, 카할 사이질세포에 대한 cGMP 의 효과는 NO가 대장 카할 사이질세포에 조절 역할을 담당할 수 있다는 증거가 될 수 있다. 따라서 이 실험에서는 NO donor 인 S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP)을 대장 카할 사이질세포에 투여하였다. 정상적인 향도잡이 전류에 SNAP 10 μM 을 투여한 결과, cGMP 에서 보여지는 효과와 유사한 결과가 초래되었다 (그림 5A). 억제된 향도잡이 전압의 빈도 및 안정막 전압의 수치는 그림 5B와 5C에 나타냈다 (n=4).

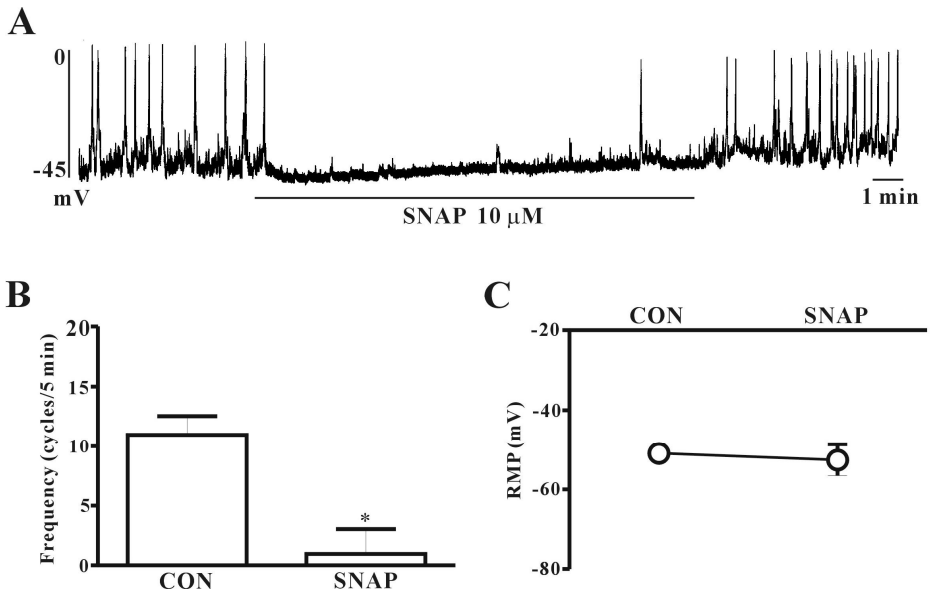

Fig. 5. Effects of SNAP on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 10 μM of SNAP in current-clamp mode. The effects of SNAP on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control. RMP: resting membrane potential

6. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 nitric oxide inhibitor의 효과

대장 카할 사이질세포의 향도잡이 활동도에 대한 SNAP 의 효과가 외부 투여가 아닌 카할 사이질세포 내에서 분비되는 SNAP 에 대한 효과를 확인해 보고자 NO 생성 억제제인 L-NAME 를 사용하였다. 정상 상태의 향도잡이 전압을 보이는 카할 사이질세포에 L-NAME 10 μM 을 투여한 결과, 향도잡이 전압의 빈도수가 현저히 증가되는 것이 확인되었다 (그림 6A). L-NAME 에 의해 변화된 향도잡이 전압의 빈도 및 안정막 전압의 수치는 그림 6B 와 6C 에 나타냈다 (n=4).

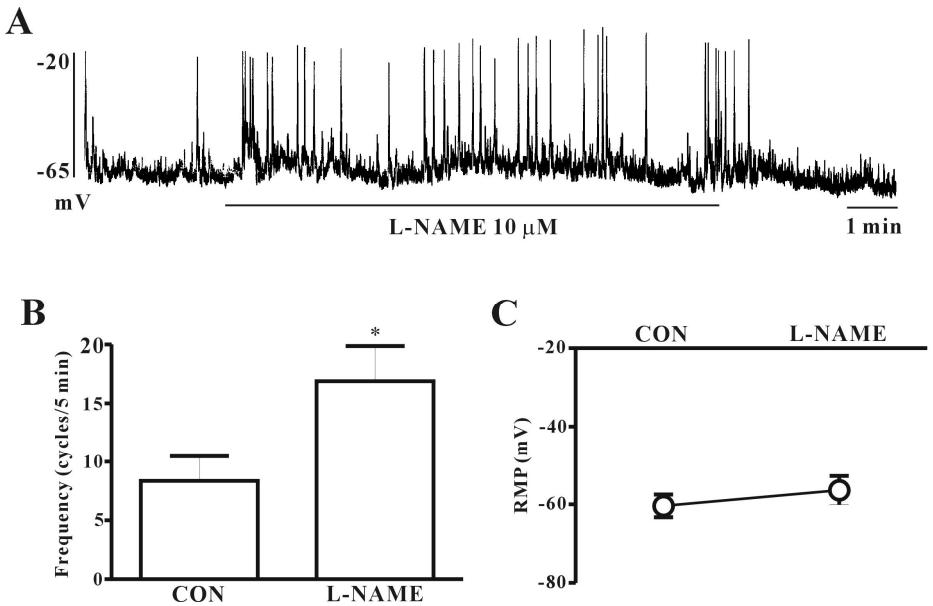

Fig. 6. Effects of L-NAME on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 10 μM of L-NAME in current-clamp mode. The effects of L-NAME on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control. RMP: resting membrane potential

7. 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 전압에 대한 protein kinase G 억제제의 효과

기존의 보고에서 protein kinases (PK)는 세포내 cAMP 또는 cGMP 가 조절하는 세포 기능에 큰 역할을 담당하고 있다. 본 연구에서 카할 사이질세포의 cGMP 가 그 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되어 cGMP-dependent kinase인 PKG가 카할 사이질세포의 향도잡이 활동도에 어떤 영향을 미치는지 확인해 보았다. 하지만, 실험결과에서 PKG 억제제인 KT 5823 1 μM을 사용한 결과, 정상적인 향도잡이 전압에 큰 영향을 주지 못하였다 (그림 7A, B, C; n=4). 이 결과는 cGMP 가 PKG와는 무관하게 직접적으로 카할 사이질세포의 향도잡이 활동도에 작용하는 것으로 생각된다.

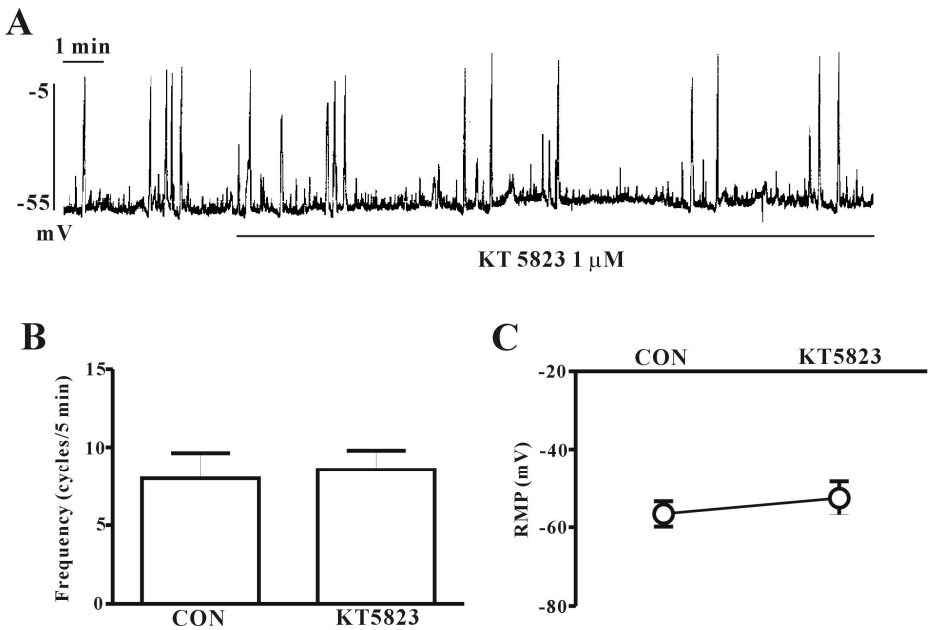

Fig. 7. Effects of KT 5823 on pacemaker potentials in colonic ICCs. (A) Pacemaker potentials of ICCs treated with 1 μM of KT 5823 in current-clamp mode. The effects of KT 5823 on pacemaker potentials in ICCs are summarized in (B) and (C). Bars represent mean ± SE values. $^{*}p < 0.05$: significantly different from control. CON: Control. RMP: resting membrane potential

8. 대장 카할 사이질세포의 세포내 칼슘 진동에 대한 cyclic guanosine monophosphate 및 phosphodiesterase 억제제의 효과

카할 사이질세포의 향도잡이 활동도의 개시는 세포내 칼슘 진동과 밀접한 관련이 있다. 따라서 본 실험에서는 칼슘 marker인 fluo-4AM을 이용하여 카할 사이질세포의 칼슘 변화를 확인하였고, 이러한 세포내 칼슘에 대한 8-bromo cGMP 및 zaprinast의 효과를 확인하였다. 정상상태에서 카할 사이질세포는 규칙적인 세포내 칼슘 진동을 보여주었고 이 진동의 빈도는 카할 사이질세포의 전기적 활동도인 향도잡이와 유사한 결과를 보였다. 더불어 정상적인 세포내 칼슘의 진동은 8-bromo cGMP 100 μM 또는 zaprinast 100 μM 투여로 인해 현저히 억제되었다 (그림 8A, B).

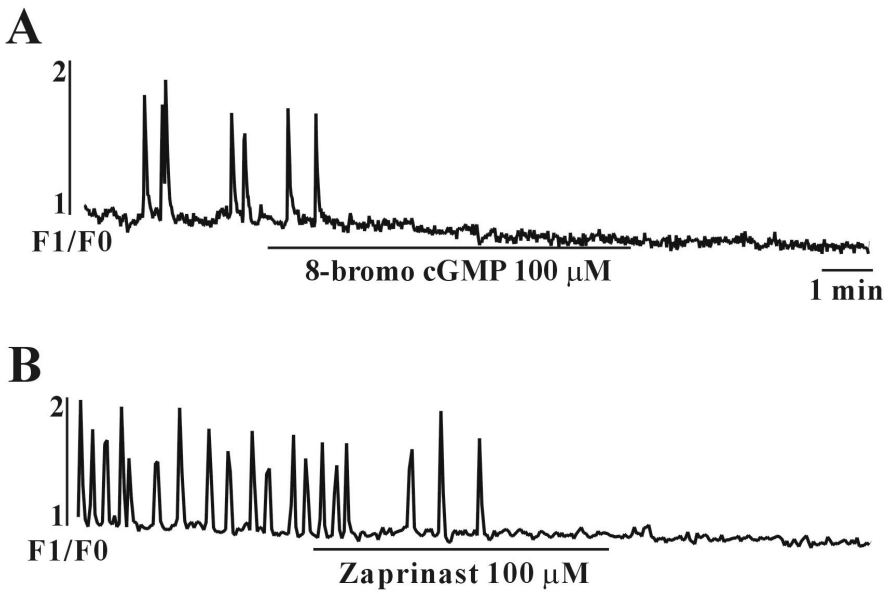

Fig. 8. Effects of 8-bromo cGMP and zaprinast on the spontaneous intracellular Ca^{2+} oscillations in colonic ICCs. 8-bromo cGMP (100 μM) (A) and zaprinast (100 μM) (B) inhibited intracellular Ca^{2+} oscillations.

고 찰

본 연구는 생쥐 대장에서 분리한 향도잡이 세포인 카할 사이질세포에서 향도잡이 전기적 활동에 대한 cGMP 의 역할을 확인해 보고자 하였다. cGMP 는 향도잡이 활동을 억제하는 것으로 확인되었고 자발적인 cGMP 생성은 카할 사이질세포에서 기초적으로 분비되는 NO 에 기인하는 것으로 생각된다.

위장관 평활근 운동성에 대한 기존의 보고들을 살펴보면, NO 는 개의 위 유문동를 포함한 여러 부위에서 서파의 빈도를 감소시킨다 (Ozaki 등 1992; Stark 등 1991). 서파의 기원은 위장관내 평활근 세포의 수준에서 일어나는 것이 아닌 카할 사이질세포에서 발생되는 향도잡이 전기적 활동에 기인한다 (Sanders, 1996). 본 연구에서 NO 는 카할 사이질세포에서 발생되는 향도잡이 활동을 억제하였다. 이는 NO 가 카할 사이질세포의 향도잡이 활동을 억제하여 gap junction 으로 연결되어 있는 평활근 세포로 신호전달을 차단함으로써 서파 발생을 억제하고 있음을 나타낸다. 또한 본 실험에서 이용된 대장의 카할 사이질세포뿐만 아니라 소장의 카할 사이질세포에서도 이미 NO 가 같은 결과를 보여주었다 (Park 등 2007). NO 의 작용은 세포내 이차 전령물질인 cGMP 를 생성하여

이루어진다 (Stark 등 1991; Ward 등 1994). 본 연구에서 cGMP 자체적으로 대장 카할 사이질세포의 향도잡이 활동을 억제하였다. 따라서 카할 사이질세포에 대한 NO 의 역할이 세포내 cGMP 와 밀접한 관련이 있다는 것을 나타낸다. NO 는 위장관내에서 기초적으로 분비하여 위장관 평활근 수축을 억제하는 방향으로 작용하고 있다. 본 연구에서도 L-NAME 를 투여한 경우 향도잡이 전압의 빈도가 증가하였다. 이러한 결과는 카할 사이질세포가 NO 를 기초적으로 합성하여 빈도 수를 조절하고 있음을 나타낸다. 이미 카할 사이질세포에서 NO 를 합성하는 효소인 NO synthase 가 확인 되어있어 이 결과를 뒷받침 된다.

본 연구에서 cGMP 분해효소 억제제인 zaprinast 의 투여시 cGMP 효과와 같은 억제성 결과를 나타냈으며 cGMP 생성 억제물질인 ODQ 를 투여 한 경우 반대로 발생 빈도 수가 증가하는 흡분성 결과를 나타냈다. 이 결과는 cGMP 가 기초적으로 분비하여 안정상태에서 향도잡이 전압의 발생빈도를 결정하고 있음을 나타낸다. 종합하면 카할 사이질 세포에서 NO 가 자발적으로 생성되고 이어서 guanylate cyclase 에 의해 이차전령물질인 cGMP 가 합성되어 안전상태의 향도잡이 전압 발생 빈도를 결정하고 있음을 시사한다. 흥미로운 사실은 기존 소장 카할 사이질 세포에서는 ODQ 와 L-NAME 는 향도잡이 전압에 아무런 변화를 초래하지 않아 NO 의 기초적 분비는

없었다 (Park 등 2007). 소장과 대장에서 발생되는 서파의 크기 및 빈도 수는 매우 다르다. 따라서 대장에서의 기초적인 NO 생성이 소장과 대장 사이의 서파 차이의 한 기전이 될 수 있으리라 생각되며 이는 추 후 더 연구해야 할 내용으로 생각된다.

cGMP 는 세포내에서 PKG 를 생성하여 작용을 나타내거나 이와 무관하게 cyclic nucleotide-gated 이온통로에 직접 작용한다 Hofmann 등 2000; Mergia 등 2006). 본 연구에서 PKG 억제제를 투여한 경우 향도잡이 발생 빈도 수에는 아무런 변화가 초래되지 않았다. 따라서 cGMP 의 효과는 PKG 와는 무관 하며 직접적으로 향도잡이 발생빈도를 조절하고 있음을 알 수 있다. 본 실험으로는 카할 사이질세포내에서 정확한 cGMP 의 표적은 알 수 없지만, 향도잡이 전압 발생에 관여한 이온 통로가 표적이 될 수 있음을 의심할 수 있다. 실제로 소장 카할 사이질세포에서 비선택성 양이온 통로와 칼슘의존성 Cl^- 통로가 향도잡이 활동을 결정한다고 알려져 있다(Koh 등 1998; Huizinga 등 2002). 그러나 대장 카할 사이질세포에서의 향도잡이 이온 통로에 대한 연구 결과는 미진한 바 추 후 이온 통로 규명이 선행된 후 cGMP 의 효과를 확인 해야 되리라 생각된다.

소장 카할 사이질세포에서 발생되는 향도잡이 활동도는 세포내 칼슘과 밀접한 관련을 가지고 있다고 알려졌다. 향도잡이 전기적

활성은 inositol 1,4,5-triphosphate 수용체로부터 칼슘의 주기적인 방출에 의존한다고 알려졌다. 칼슘의 방출은 미토콘드리아로 다시 재흡수 되면서 향도잡이 전류가 발생된다 (Ward 등 2000). 이와 같은 칼슘의 주기적인 현상이 위장관의 자동 운동리듬을 결정짓는 주요 과정이다. 그러므로, 카할 사이질세포의 향도잡이 현상은 내형질세망과 미토콘드리아 그리고 세포막에 분포하는 이온통로와 물질이동의 조화를 통해 나타난다고 여겨진다 (Suzuki 등 2000). 본 연구에서 향도잡이 활동에 대한 칼슘의 중요성 때문에 cGMP 가 실제로 세포내 칼슘에 어떠한 영향을 주는지 확인 한 결과, 향도잡이 전기적 활동에 대해 작용과 유사한 결과를 얻었다. 카할 사이질세포내 칼슘은 향도잡이 활동의 개시에 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 바 cGMP 에 의한 세포내 칼슘 주기 억제는 세포내 칼슘분비가 cGMP 의 주요 타깃이 될 수 있다는 가능성을 나타낸다.

요약하면 본 연구는 대장 향도잡이 세포인 카할 사이질세포는 기초적으로 NO 를 분비 한 후 CGMP 를 생성하여 안정 상태에서 향도잡이 전압의 발생 빈도 수를 억제하는 방향으로 작용하고 있으며, 이 효과는 세포내 칼슘 분비와 관련되어 있는 반면 PKG 와는 무관하다. 이와 같은 결과는 기존 위장관 운동 조절에 평활근 수준이 아닌 카할 사이질세포의 향도잡이에 대한 기전의 기초자료를

제공함으로써, 풀리지 않은 위장관 운동성 기전에 많은 정보를 제공할 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM (1996) Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. Proc Natl Acad Sci 93: 12008-12013.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000) Rising behind NO: cGMP–dependent protein kinases. J Cell Sci 113, 1671-1676.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995) W/*kit* gene required for intestinal pacemaker activity. Nat 373, 347-349.

Huizinga ZD, Zhu Y, Ye J, Molleman A (2002) High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal. Gastroenterology 123, 1627-1636.

Koh SD, Bradley KK, Rac MG, Keef KD, Horowitz B, Sanders KM (1998) Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cells. Biophys J 75: 1793-1800.

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

Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D (2006) Spare guanylyl cylase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. J Clin Invest 116, 1731-1737.

Ozaki H, Blondfield DP, Hori M, Publicover NG, Kato I, Sanders KM (1992) Spontaneous release of nitric oxide inhibits electrical Ca^{2+} and mechanical transients in canine gastric smooth muscle. J Physiol 445, 231-247.

Park CG, Kim YD, Kim MY, Kim JS, Choi S, Yeum CH, Parajuli SP, Park JS, Jeong HS, So I, Kim KW, Jun JY (2007) Inhibition of pacemaker currents by nitric oxide via activation of ATP-sensitive K^+ channels in cultured interstitial cells of Cajal from the mouse small intestine. Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol 373, 175-184.

Smith TK, Ward SM, Zhang L, Buxton ILO, Gerthoffer WT, Sanders KM, Keef KD (1993) β-Adrenergic inhibition of electrical and mechanical activity in canine colon: Role of cyclic AMP. Am J Physiol 264, G708-717.

Stark ME, Bauer AJ, Szurezewski JH (1991) Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. J Physiol 444, 743-761.

Suzuki H, Takano H, Yamamoto Y, Komuro T, Saito M, Kato K, Mikoshiba K (2000) Properties of gastric smooth muscles obtained from mice which lack inositol triphosphate receptor. J Physiol 525, 105-111.

Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Farraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD (1998) Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. Nat Med 4, 848-851

Tsugeno M, Huang SM, Pang YW, Chowdhury JU, Tomita T (1995) Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous electrical activity (slow waves) in guinea-pig gastric muscle. J Physiol 485, 493-502.

Wang XY, Paterson C, Huizinga JD (2003) Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. Neurogastroenterol Motil 15:531-543

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

Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM (2000) Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. J neurosci 20, 1393-1403.

Ward SM, Sanders KM (2001) Interstitial cells of Cajal: primary Targets of enteric motor innervation. Anat Rec 262, 125-135.