



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](#)

2022년 2월
석사학위 논문

대장 평활근의 **TRPC4** 이온통로
억제를 통한 삼환계 항우울제의
소화기 운동성 조절기전 연구

조선대학교 대학원

의 과 학 과

정 병 석

대장 평활근의 TRPC4 이온통로 억제를 통한 삼환계 항우울제의 소화기 운동성 조절기전 연구

The inhibitory mechanism of colonic motility by tricyclic
antidepressant via TRPC4 channel inhibition

2022년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

정 병 석

대장 평활근의 TRPC4 이온통로 억제를 통한 삼환계 항우울제의 소화기 운동성 조절기전 연구

지도교수 홍 찬 식

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

정 병 석

정 병 석의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 전 제 열 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 석 (인)

위 원 조선대학교 교수 홍 찬 식 (인)

2021년 12월

조선대학교 대학원

목 차

List of figures	iii
List of tables	v
Abstract	vi
제 1 장. 서 론	1
제 1 절 대장의 운동기전	1
제 2 절 과민성 장 증후군의 증상과 처방	2
제 3 절 삼환계 항우울제의 기전과 부작용	3
제 4 절 비 선택적 양이온 통로 TRPC4	5
제 2 장. 연구 재료 및 방법	6
제 1 절 세포 배양 및 발현	6
제 2 절 생쥐 대장 평활근 세포 분리	6
제 3 절 실험 용액 및 시약	7
제 4 절 단일세포 막전압 고정법	7
제 5 절 통계 및 유의성 평가	7

제 3 장. 결 과 10

제 1 절 삼환계 항우울제의 세포 외 처치에 의한 TRPC4 이온통로 활성의 직접 억제기전 10

1. 삼환계 항우울제 처치로 인한 TRPC4 활성 억제 10

2. 세포 외부에서 작용하는 삼환계 항우울제의 TRPC4 억제기전 16

3. 세포막 발현과 무관한 삼환계 항우울제의 TRPC4 억제 효과 20

제 2 절 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 의존적 TRPC4 이온통로 활성 억제 효과 23

1. 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 수용체 3 의존적으로 유발되는 TRPC4에 의한 m_{cat} 억제 23

2. 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 수용체 2 의존적으로 유발되는 TRPC4에 의한 m_{cat} 억제 30

3. 세포 외부에서 작용하는 삼환계 항우울제의 m_{cat} 억제기전 36

제 3 절 삼환계 항우울제로 인한 생쥐 대장 평활근의 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 의존적 TRPC4 활성 억제 39

제 4 장. 고 찰 44

참고 문헌 47

LIST OF FIGURE

Figure 1.	Molecular structure of TCAs	4
Figure 2.	Inhibition of GTP γ S-induced TRPC4 β current induced by AMI	12
Figure 3.	Inhibition of GTP γ S-induced TRPC4 β current induced by DES	13
Figure 4.	Inhibition of GTP γ S-induced TRPC4 β current induced by IMI	14
Figure 5.	TCA-induced half maximal inhibitory concentration of TRPC4 β current	15
Figure 6.	GTP γ S-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion	16
Figure 7.	GTP γ S-induced TRPC4 β current depending on intracellular DES infusion	18
Figure 8.	GTP γ S-induced TRPC4 β current depending on intracellular IMI infusion	19
Figure 9.	Surface level of TRPC4 β induced by TCA treatment for 5 min	21
Figure 10.	Surface level of TRPC4 β induced by TCA treatment for 16 hr	22
Figure 11.	TRPC4 β current induced by M ₃ R stimulation	25
Figure 12.	Inhibitory effect of M ₃ R-induced TRPC4 β activity by extracellular AMI treatment	26
Figure 13.	Inhibitory effect of M ₃ R-induced TRPC4 β activity by extracellular DES treatment	27
Figure 14.	Inhibitory effect of M ₃ R-induced TRPC4 β activity by extracellular IMI treatment	28

Figure 15.	Inhibitory effect of M ₃ R-induced TRPC4 β activity by extracellular TCA treatment	29
Figure 16.	TRPC4 β current induced by M ₂ R stimulation	31
Figure 17.	Inhibitory effect of M ₂ R-induced TRPC4 β activity by extracellular AMI treatment	32
Figure 18.	Inhibitory effect of M ₂ R-induced TRPC4 β activity by extracellular DES treatment	33
Figure 19.	Inhibitory effect of M ₂ R-induced TRPC4 β activity by extracellular IMI treatment	34
Figure 20.	Inhibitory effect of M ₂ R-induced TRPC4 β activity by extracellular TCA treatment	35
Figure 21.	M ₃ R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion	37
Figure 22.	M ₂ R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion	38
Figure 23.	Inhibition of the CCh-induced TRPC4 current by Pico145 in murine myocyte	41
Figure 24.	M ₃ R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion	42
Figure 25.	M ₂ R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion	43

LIST OF TABLE

Table 1.	Substance of solution for patch clamping	8
Table 2.	Chemical information	9

Abstract

The inhibitory mechanism of colonic motility by tricyclic antidepressant via TRPC4 channel inhibition

Byeongseok Jeong

Advisor: Prof. Chansik Hong

Department of Medical Science

Graduate school of Chosun university

Tricyclic antidepressants (TCAs) have been used to treat depression, however, side effects were reported in the central nervous system, cardiovascular, and reproductive system, making it difficult to prescribe. Recently, TCA has emerged as a treatment for irritable bowel syndrome (IBS) based on its analgesic effect and constipation symptom among side effects. However, the molecular mechanism of TCAs effect in IBS treatment poorly understood. Transient receptor potential channel canonical type 4 (TRPC4) which is Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel, is proposed as target molecules for the mechanism of TCAs. Herein, I investigated whether TCAs modulate TRPC4 channel activity. To determine the contribution of TRPC4 to colonic motility, I measured the electrical activity of heterologous or endogenous TRPC4 by TCAs using the patch clamp technique in HEK293 cells and murine colonic myocytes. In TRPC4-overexpressed HEK293 cells, I observed TCA-evoked direct inhibition of TRPC4. Compared with TRPC4-knockout mice, I identified that muscarinic cationic current (mI_{cat}) was suppressed through TRPC4 inhibition by TCA in isolated murine colonic myocytes. Collectively, I suggested that TCA action is responsible for the inhibition of TRPC4 channels in colonic myocytes, ultimately causing constipation. These findings provide clinical insights into abnormal intestinal motility and medical interventions aimed at IBS therapy.

제 1 장. 서 론

제 1 절. 대장의 운동기전

대장은 최종적으로 소장으로부터 소화된 음식물의 수분을 흡수하고 노폐물을 체외로 배출시키는 소화기관이다. 대장의 해부학적 구조는 크게 5가지로 상행결장 (ascending colon), 횡행결장 (transverse colon), 하행 결장 (descending colon), S자결장 (sigmoid colon) 그리고 직장 (rectum)으로 나뉘며, 상행결장으로 갈수록 수분 흡수에 용이하고 S자 결장으로 갈수록 운동성이 발달해 있다 [1].

이러한 기능의 수행은 대장벽 조직층에서 이루어지는데, 위장관 벽은 가장 안쪽 점막층 (mucosa), 점막하층 (submucosa), 고유근층 (muscularis propria)과 가장 바깥쪽 외막 (serosa) 이렇게 4개의 층으로 구성된다 [2]. 그리고 근육층은 다시 두 개의 층으로 구분되는데, 안쪽의 윤근층 (circular muscle layer)과 종근층 (longitudinal muscle layer)이다. 이 두 가지 층은 음식물과 소화효소 및 수분을 혼합하는 혼합운동 (haustral contraction)과 음식물의 이동 및 배변을 유도하는 연동운동 (peristalsis contraction)을 유발한다.

위장관 운동성의 조절은 자율신경계 (enteric nervous system, ENS), 사이간질세포 (interstitial cell of Cajal, ICC) 그리고 평활근 세포 (smooth muscle cell) 이렇게 3가지 주요한 세포군들의 복잡한 조정 과정을 통해 이루어진다 [3,4]. 교감, 부교감 신경에서 시작되어 ENS에서 수용된 신호는 ICC와 평활근으로 신호를 전달하고 ICC는 맥박 작용기 세포로써 서파 (slow wave)를 형성하여 평활근의 자발적 수축을 유발한다 [3,5]. 최종적으로 평활근 세포의 수축을 통해 위장관은 운동성을 유지할 수 있다 [6].

이러한 연속적이고 리드미컬한 자발적 수축 (spontaneous contraction)을 유지하는 데에는 ENS와 myenteric ICC (ICC-MY)의 균형 잡힌 박동기전이 중요하다. 하지만 ICC에 의해 탈분극의 빈도가 결정되는 근원성 서파 (myogenic slow wave)와는 달리, 대량 연동운동 (mass movement)은 상행결장부터 S자 결장까지 광범위하게 전달되는 신경 신호로 인해 단시간에 대량의 변 이동을 일으키는 수축기전이다 [7]. 음식물에 의해 활성화 된 감각 신경 (sensory neuron)이나 중추신경계 자극으로 ENS가 아세틸콜린 (acetylcholine, Ach)과 같은 신경전달물질 (neurotransmitter)를 분비하고,

Ach에 의해 유도된 평활근 세포의 탈분극 (depolarization)은 대량 연동운동을 유발하여 단시간에 많은 양의 노폐물을 체외로 이동시킨다. 이러한 운동성 기전들에 이상이 발생하면 변비나 설사와 같은 소화기 운동성 질환을 유발할 수 있다 [2].

제 2 절. 과민성 장 증후군의 증상과 처방

과민성 장 증후군 (irritable bowel syndrome, IBS)은 위장관의 운동성을 조절하는 세포 간의 신호전달에 이상이 생겨 발생하는 기능성 위장관 질환 중 하나이다. 전 세계 기능성 장 질환의 15%를 차지하고 있으며, 인구의 5~10%의 유병률이 유지될 정도로 흔한 질병이다 [8].

주요한 증상으로 소화기관의 경련, 복통, 복부팽만 등이 나타나며, 상반되는 증상인 변비와 설사가 모두 나타난다는 특징이 있다. 원인으로 스트레스로 인한 신경계 이상, 장 내 염증 반응, 병원균의 감염, 장내 미생물 환경 변화 등 다양한 주장이 제기되고 있지만, 아직 명확한 원인이 밝혀지지 않았다. 따라서 환자별 주요한 증상 중 배변 패턴을 기준으로 설사를 동반하는 IBS-D (IBS with diarrhea), 변비를 동반하는 IBS-C (IBS with constipation), 혼합형인 IBS-M (IBS with mixed bowel habit)으로 분류한다 [9].

원인이 불분명하므로, IBS 치료는 증상 완화를 목표로 한다. 1차 치료제로 완하제 (laxatives), 지사제 (antidiarrhoeals) 및 진경제 (antispasmodics) 등으로 변비, 설사, 경련 증상의 광범위한 개선을 유도한다. 하지만, 이러한 통상적인 처방은 치료 효과가 떨어지며, 오히려 증상을 악화시키는 보고도 있다 [10]. 따라서 최근의 치료 방향성은 개인별 구체적 증상을 구분하여 맞춤형 처방 대한 중요성을 강조하고 있다. 만성 환자의 경우 세로토닌 (serotonine) 수용체의 작용제 (agonist)와 길항제 (antagonist)를 사용하여 변비나 설사 증상을 개선하기도 한다. 또한 세로토닌 선택적 억제제 (serotonin selective reuptake inhibitor, SSRI)와 삼환계 항우울제 (tricyclic antidepressant, TCA) 등 항우울제가 IBS 치료제로써 대두되고 있으며, 이는 초기에 중추신경계의 안정화를 목적으로 처방되었다 [11]. 특히 세로토닌 선택적 억제제에 비해 삼환계 항우울제는 복통 개선에 효과적이며 설사 증상을 억제하는 기능이 보고되어 IBS-D 환자에게 처방되는 치료제로써 각광 받고 있다. 실제로 아미트립틸린과 이미프라민이 평활근 세포 수축을 억제한다는 보고가 있으며, 아미트립틸린이 항문 괄약근을 이완시켜 배변압력을 줄이는데 사용될 수 있음이 보고된 바 있다 [12].

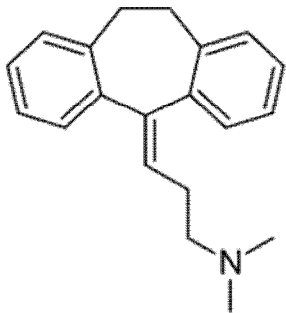
제 3 절. 삼환계 항우울제의 기전과 부작용

항우울제는 신경전달물질의 분비를 정상 수준까지 회복시키는 것을 목표로 우울증의 치료를 위해 처방되는 약물이다. 일반적으로 항우울제들은 작용기전에 따라 단가아민 산화효소 억제제 (monoamine oxidase inhibitors, MAOIs), 삼환계 항우울제, 선택적 세로토닌 재흡수억제제, 세로토닌 노르에피네프린 재흡수 억제제 (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, SNRIs) 등 대표적으로 4가지 약물군과 함께 그 외 나머지 약물군 (others)까지 총 5군으로 분류되고 있다 [13].

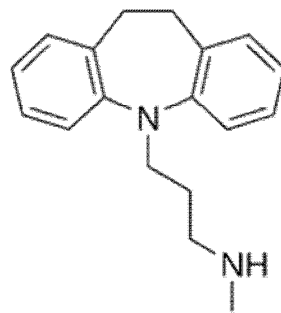
그중 초기에 개발되어 지금까지 이용되고 있는 삼환계 항우울제는 시냅스로 분비된 세로토닌과 노르아드레날린의 재흡수를 억제하는 것으로 항우울 효과를 나타낸다. 최초로 개발된 항우울제인 이미프라민 (imipramine, IMI)이 상용화된 후, 삼환계 항우울제의 유사한 분자 구조를 가지는 항우울제들이 연구 및 개발되었다. 대부분의 삼환계 항우울제는 유사한 분자 구조에 의해 약리적 작용 역시 비슷하다고 보고된다 (Fig. 1) [14]. 구조상 특징으로 작용기 아민 (amine) 종류에 따라 3급 아민계열의 아미트립틸린 (amitriptyline, AMI), 독세핀 (doxepine), 클로미프라민 (clomipramine) 등과 2급 아민계열의 데시프라민 (desipramine, DES), 노르트립틸린 (nortriptyline) 등이 있다. 일차 처방 권장 항우울제인 SSRI 등 다른 항우울제에 비해 항우울 효과가 크지만, 항우울 효과가 나타나는 농도로 처방 시 다양한 부작용이 보고되며 처방에 유의가 필요하다.

삼환계 항우울제의 부작용 중 가장 빈번하게 나타나는 증상이 ‘항콜린성 증후군 (anticholinergic effect)이다 [15]. 이는 삼환계 항우울제가 콜린성 수용체 (acetylcholinergic receptor)의 작용을 차단하여 나타나는 증상이라고 알려져 있으며, 주요한 증상으로 구강 건조와 시야장애가 보이며, 특히 변비가 심하게 나타난다. 그 밖에도, 과도한 졸음이나 체중 증가 등 신경계 이완성 질환들이 보고되며, 심장박동이 느려지거나 부정맥이 발생하는 심혈관계 질환에 대한 소견도 있다 [14].

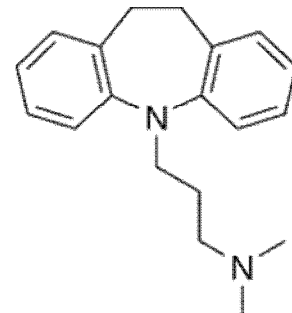
최근에는 이러한 부작용 증상을 이용하여 다른 여러 질병의 치료제로 이용되고 있다. posttraumatic Stress Disorder (PTSD)나 attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) 등 각성 장애의 치료나 파킨슨병 치료제로 이용되며 [16], 만성 통증의



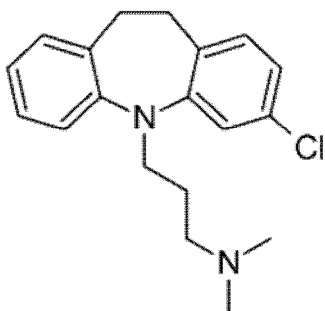
Amitriptyline (AMI; Elavil)



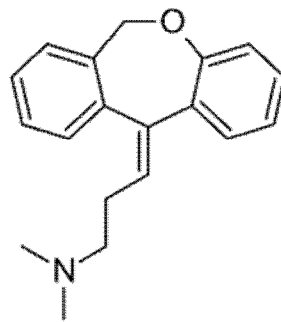
Desipramine (DES; Norpramin)



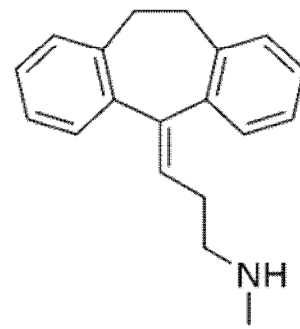
Imipramine (IMI; Tofranil)



Clomipramine (Anafranil)



Doxepine (Silenor)



Nortriptyline (Pamelor)

Figure 1. Molecular structure of TCAs

진통제로 사용되기도 한다 [17,18]. 특히, 부작용으로 나타나는 변비 질환과 진통 효과를 이용하여 과민성 장 증후군 (irritable bowel syndrome, IBS) [19]와 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease, IBD) [20]의 치료제로 새롭게 제안되고 있다.

제 4 절. 비 선택적 양이온 통로 TRPC4

현재까지 IBS 치료제로써 삼환계 항우울제의 효능을 조사하는 여러 전임상 실험 연구들이 있지만 이러한 효과의 생리학적 기전과 작용 분자에 관해서는 아직 연구가 미흡하다. 광범위한 부작용 증상이 나타나는 신체 기관 및 조직을 기반으로 삼환계 항우울제의 분자 표적 후보를 조사했고, 본 연구에서는 중추신경계 발현율과 위장관 평활근 운동성에 기능이 보고된 TRPC4 이온통로를 제시하였다.

Transient receptor potential (TRP) 이온통로의 그룹군 중 canonical 혹은 classical type으로 명명되는 TRPC (canonical or classical) 유형은, 대부분 세포막 (plasma membrane)에서 기능하는 7개의 단백질로 구성되어있다. TRPC1에서 TRPC7까지 7개의 이온통로는 디아실글리세롤 (diacylglycerol, DAG)에 의한 활성화기전에 따라 TRPC1/4/5, TRPC3/6/7, TRPC2에 해당하는 3개 하위 그룹으로 분류될 수 있다 [21,22].

이중 TRPC4 이온통로는 중추신경계에서 발현되어 있다고 알려진 칼슘 투과성의 비 선택적 양이온 채널이다. TRPC4는 최근 우울, 불안 및 공포와 같은 감정에 관여한다고 밝혀졌으며 [23,24], 특히 위장관 평활근에 발현되어 신경전달물질 아세틸콜린에 의한 무스카리닉 수용체에 의해 유도되는 양이온 전류 (muscarinic cation current, mI_{cat})를 유발하는 데 중요하다고 알려져 있다 [25].

본 연구는 TRPC4의 과발현 세포주와 생쥐의 결장을 이용하여 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 억제 효과를 보고한다. 삼환계 항우울제가 유발하는 변비 증상의 원인 기전중 하나로써 TRPC4 이온통로 억제 효과를 제안하였으며, 대장 평활근에서 TRPC4가 유발하는 mI_{cat} 를 차단하는 것은 대장 운동성을 감소시킬 것으로 생각된다. 나아가 이러한 발견은 IBS 치료를 목표로하는 비정상적인 장운동 및 의학적 처방에 대한 통찰력을 제공할 것으로 생각한다.

제 2 장. 연구 재료 및 방법

제 1 절. 세포 배양 및 발현

Human embryonic kidney (HEK) 293 세포 (ATCC, U.S.A.) 배양을 위해 열 비활성 처리된 10% 배아 소 혈청 (fetal bovine serum) (Gibco, U.S.A.), 100 units/ml 페니실린 (peniciline), 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (streptomycin)을 넣은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Welgene, republic of KOREA) 배양액을 사용하였으며, 37°C의 5% CO₂ 배양기 (incubator)에 배양되었다. 형질전환 벡터 (vector)는 전기생리학 실험기법에서 FuGENE 6 transfection reagent (Promega, U.S.A.)를 이용하여 형질주입 (transfection) 되었으며, 분자생물학 실험기법에서는 Lipofactamine 3000 (Invitrogen, U.S.A.)을 이용하여 형질주입 되었다. 모든 과발현 실험은 형질주입 후 24~36 시간 이후에 실험을 시행하였다.

제 2 절. 생쥐 대장 평활근 세포 분리

30~60일령의 C57BL/6N 생쥐의 대장 평활근 세포를 암수 구분 없이 채취하였다. Isoflurane으로 마취시킨 생쥐를 개복하여 상행결장부터 직장 부위에 해당하는 대장 부위를 적출하고 희생시켰다. 적출한 대장 조직은 Ca²⁺이 함유되지 않은 Hank's (Ca²⁺-free Hank's) 용액으로 채워진 용기에 옮겼다. Ca²⁺-free Hank's 용액의 조성은 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, and 5 mM HEPES이며, 산성도는 NaOH로 pH 7.4로 적정하였다. 실온에서 대장 조직의 창자간막 가장자리 (mesenteric border)를 따라 절개하여 점막층과 점막하층을 제거하고, 평활근을 분리했다. 분리된 평활근 조직은 0.1% collagenase (Worthington Biochemical Co., U.S.A.), 0.2% bovine serum albumin (Sigma), 0.1% trypsin inhibitor (Sigma), and 0.01% papain (Sigma)의 효소로 이루어진 용액 내부에서 37°C, 10~15분간 항온 소화 시킨 후 넓은 구경의 유리 스포이트로 진탕 시켜 단일 세포로 분리했다. 분리된 세포들은 chamber로 옮겨져 전류가 측정되었으며, 실험 시간은 상온에서 3시간을 넘기지 않았다.

제 3 절. 실험 용액 및 시약

Whole cell patch clamp 에 사용한 용액의 조성 및 농도는 table 1 에 수록했다. 형질주입 된 HEK293 세포와 생쥐 평활근 세포에서 각각 다른 조성으로 유리전극 내 용액 (pipette solution)이 사용되었고, 세포 외 관류 용액 (bath solution)은 normal Tyrode (NT)와 NT 용액의 1 가 양이온을 cesium 으로 대체한 Cs⁺-rich 용액을 사용하였다.

실험에 사용한 모든 화학품에 대한 정보는 Table 2.에 수록했다.

제 5 절. 단일세포 막전압 고정법

단일 세포주와 평활근 세포에 대한 전류측정을 위해 단일세포 막전압 고정법 (whole cell patch clamping, whole cell clamp)를 사용하였다. 12 well plate 에서 분리된 세포들은 도립현미경 재물대의 chamber 에 옮겨진 후 실온에서 10 분 뒤 측정되었다. 유리전극은 2~3 MΩ 의 저항을 사용하였다. Whole cell 전류 반응을 측정하기 위해 전압 램프를 10 초마다 +100 에서 -100 mV 까지 0.5 초 동안 가해주었으며, 막전압은 -60 mV 로 고정하였다. 이를 위해 Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, U.S.A), Digidata 1550B Interface (Axon Instruments)가 사용되었다. 전류의 기록 및 저장은 pCLAMP software 를 이용하였고, OriginPro 8 (OriginLab Co., U.S.A.)으로 분석되었다.

제 6 절. 통계 및 유의성 평가

모든 실험결과에 대한 통계 분석은 Prism 5.0 (GraphPad, U.S.A.)를 이용하였으며, 평균값 ± 표준오차 (mean ± S.E.M)로 표기하였다. 필요한 경우에는 one-way ANOVA 와 Student's t-test 를 사용하여 유의성을 검증하였다. 확률치 (probability value, P-value)가 0.05 보다 낮을 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

Substance of pipette solution (mM)	
Recording in HEK293	Recording in myocyte
140 CsCl	130 KCl
0.5 EGTA	10 NaCl
10 HEPES	0.5 EGTA
3 Mg-ATP	0.2 HEPES
0.2 Tris-GTP	3 Mg-ATP
	0.2 Na ₂ -GTP
	0.5 MgCl ₂
pH 7.2 with CsOH	pH 7.2 with KOH

Substance of bath solution (mM)	
Normal Tyrode solution	Cs ⁺ -rich solution
135 NaCl	140 CsCl
5 KCl	
10 HEPES	10 HEPES
10 Glucose	10 Glucose
2 CaCl ₂	2 CaCl ₂
1 MgCl ₂	1 MgCl ₂
pH 7.4 with NaOH	pH 7.4 with CsOH

Table 1. Substance of solution for patch clamping

Chemical			
Chemical	Abbreviation	Company	Function
Amitriptyline	AMI	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
Desipramine	DES	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
Imipramine	IMI	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
Carbacol	CCh	Sigma (U.S.A.)	Achetylcholine receptor agonist
GTPyS	GTPyS	Sigma (U.S.A.)	G-protein-activating analog of GTP
Pico145	Pico145	Probecem (China)	TRPC1/4/5 selective blocker

Table 2. Chemical information

제 3 장. 결 과

제 1 절. 세포 외 삼환계 항우울제 처치에 의한 TRPC4 이온통로 활성의 직접 억제기전

1. 삼환계 항우울제 처치로 인한 TRPC4 활성 억제

삼환계 항우울제는 중추신경계를 표적으로 항우울 효과와 항불안효과를 목적으로 처방되는 약물이다. 하지만, 항콜린성 증상과 부정맥 및 심실세동, 구토 및 소화 장애, 성 기능 장애 등 다수의 신체 기관에서 부작용이 나타나 처방에 어려움을 겪는다 [15]. 삼환계 항우울제의 부작용들이 나타나는 생리적 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았는데, 본 연구는 이러한 증상의 분자 표적으로 TRPC4 이온통로를 제시했다.

TRPC4 이온통로는 칼슘을 포함한 양이온을 비 선택적으로 투과시키며, 수용체에 의해서 활성 되는 수용체 작동 채널 (receptor operated channel)이다. TRPC4는 최근 우울, 불안 같은 감정에 관여한다고 보고되었으며, 중추신경계뿐만 아니라 심혈관계, 소화계, 생식계 등 여러 기관에 발현되어 기능하고 있다. 삼환계 항우울제의 작용 및 부작용 부위와 TRPC4가 발현된 조직이 겹치기 때문에 삼환계 항우울제의 작용이 TRPC4의 기능에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각하였다.

먼저, 삼환계 항우울제의 처치가 TRPC4의 활성을 조절하는지 확인하고자 HEK293 세포주에 TRPC4 β 를 과발현하고 단일세포 막전압 고정법을 이용하여 세포 전체의 전류 변화를 확인하였다. TRPC4에 의한 전류 변화를 보다 명확하게 관찰하기 위해 세포 내 용액에 200 μ M GTP γ S를 주입 시켜 내인성 (endogenous) G-단백질 활성을 통해 기저 전류를 증가시켰고, 세포 외 용액은 TRPC4에서 Na⁺ 보다 큰 투과성을 가지는 Cs⁺ 용액을 사용하였다. 세포의 초기 전류 크기를 측정 후 삼환계 항우울제를 노출 시키는 것으로 TRPC4의 전류 변화를 확인하였다.

가장 대표적인 삼환계 항우울제인 아미트립틸린을 10 μ M로 세포 외부에 노출 시켰을 때, 141.29 \pm 18.53 pA/pF로 측정되었던 TRPC4의 전류가 24.08 \pm 7.73

pA/pF 정도로 크게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 앞서 언급하였듯, 삼환계 항우울제들은 모두 다환 분자 구조 (polycyclic molecular structure)를 가지며, 유사한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Figure 1). 그 때문에 다른 타입의 삼환계 항우울제인 데시프라민과 이미프라민을 처치하는 것으로 모든 종류의 삼환계 항우울제가 유사하게 TRPC4를 억제하는 효과를 가지는지 확인하고자 했다. 예상대로, 데시프라민 처치는 TRPC4에 의한 전류를 110.20 ± 19.26 pA/pF에서 37.02 ± 8.05 pA/pF로 감소시켰으며 (Fig. 3), 이미프라민 역시 111.65 ± 26.05 pA/pF에서 39.93 ± 10.36 pA/pF로 감소시켰다 (Fig. 4).

TRPC4 직접에 대한 활성 억제 효과를 명확하게 판단하기 위해 사용한 모든 삼환계 항우울제에 대해 절반의 억제를 유도하는 농도 (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50})를 계산하였다 (Fig. 5). 삼환계 항우울제를 처치하기 직전 Cs^+ 에 의한 전류 크기를 기준으로 감소한 전류에 비례해 억제 정도를 측정하였을 때, 50%의 억제 수준을 가지는 농도를 각각 산출하였다. 아미트립틸린의 IC_{50} 은 $1.51 \mu M$ 로 계산되었으며, 데시프라민과 이미프라민은 각각 $5.37 \mu M$ 과 $6.12 \mu M$ 로 계산되었다.

결과적으로 세 가지 종류의 삼환계 항우울제는 $GTP\gamma S$ 에 의해 유도된 TRPC4의 내향성 전류를 농도 의존적으로 억제하였다.

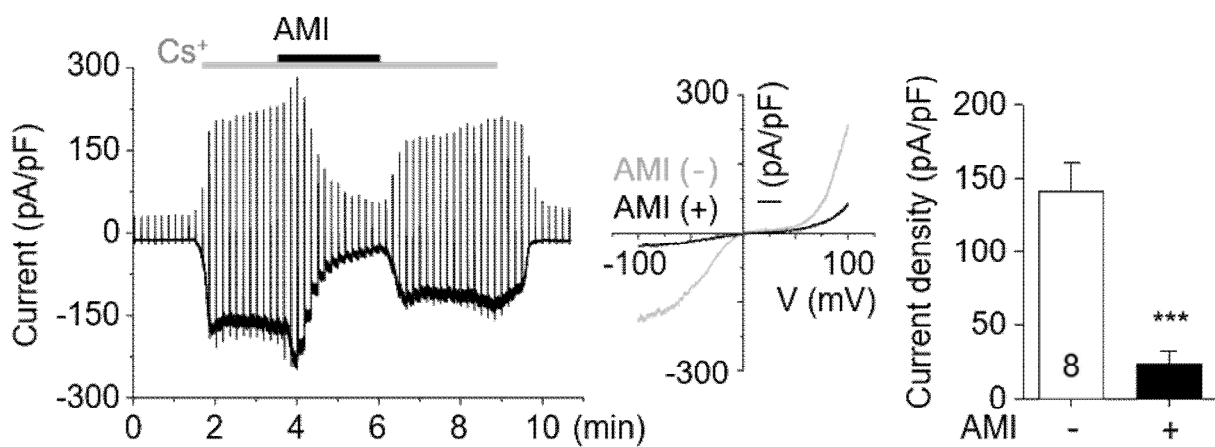


Figure 2. Inhibition of TRPC4 β current induced by AMI

Representative current trace (*left*) and current (I)-voltage (V) curve (*middle*) of 200 μ M GTP γ S-activated TRPC4 β current suppressed by 10 μ M AMI. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (white) and after (black) treatment with AMI.

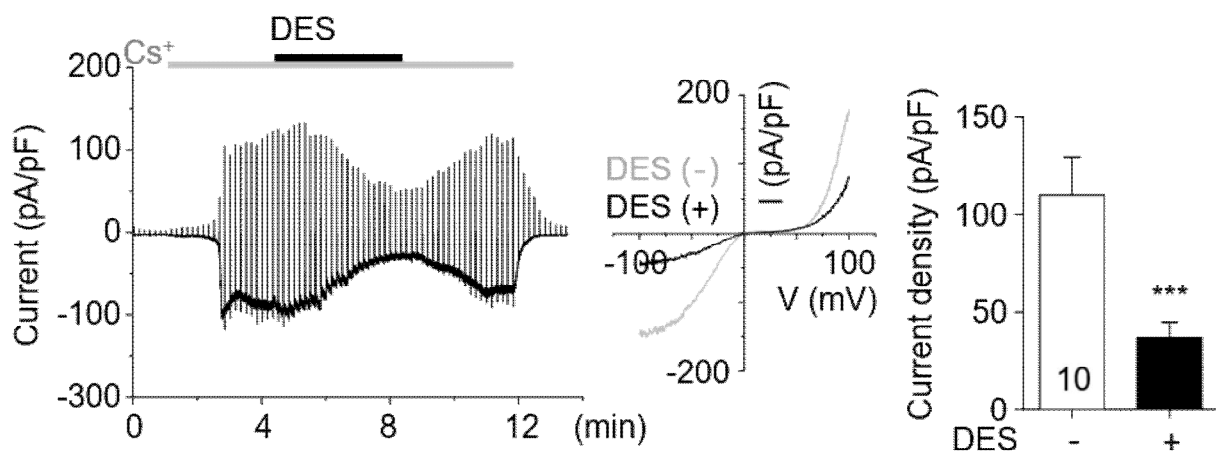


Figure 3. Inhibition of TRPC4 β current induced by DES

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of 200 μ M GTP γ S-activated TRPC4 β current suppressed by 10 μ M DES. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (white) and after (black) treatment with DES.

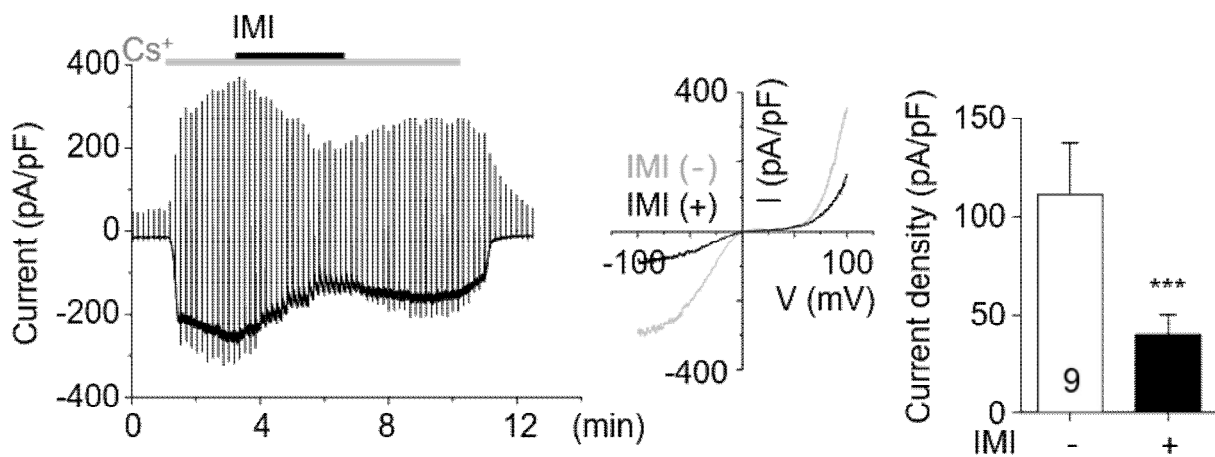


Figure 4. Inhibition of TRPC4 β current induced by IMI

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of 200 μ M GTP γ S-activated TRPC4 β current suppressed by 10 μ M IMI. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (white) and after (black) treatment with IMI.

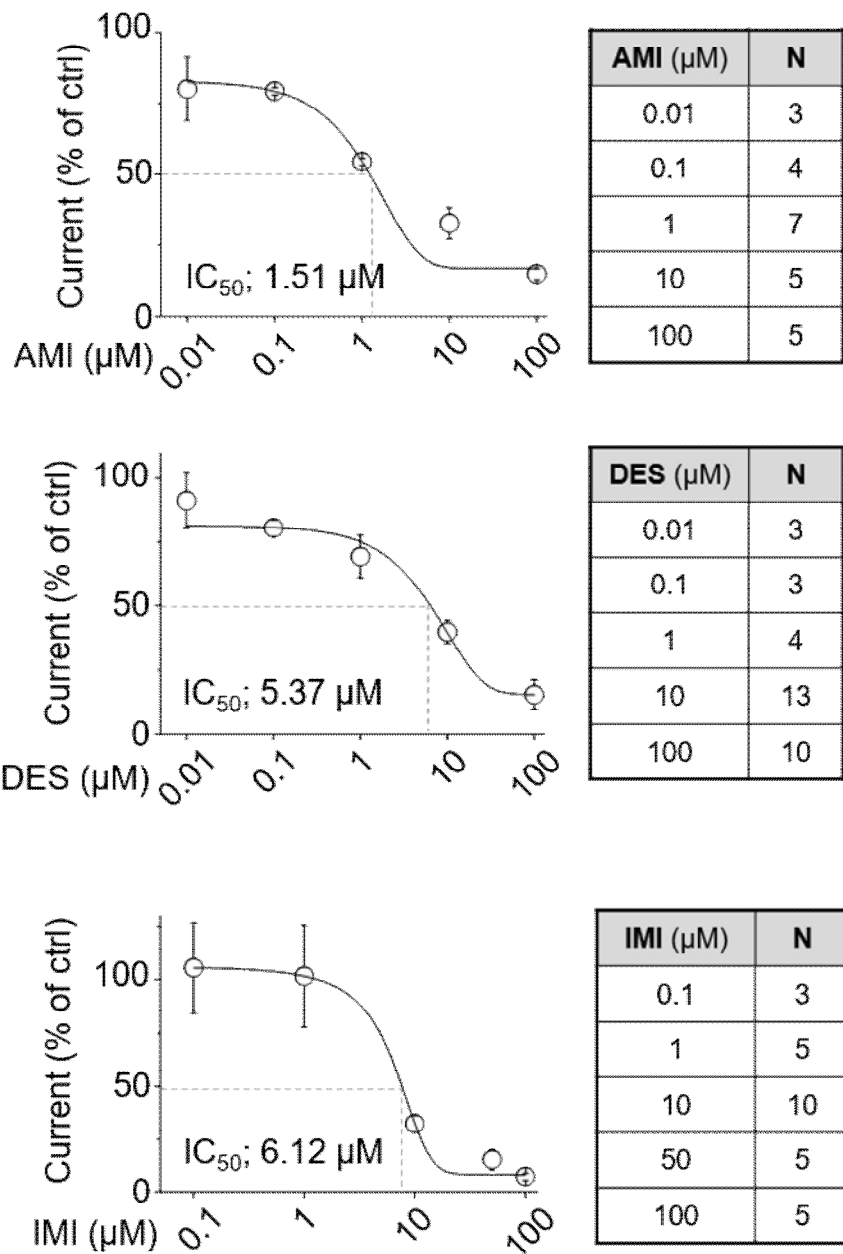


Figure 5. TCA-induced half maximal inhibitory concentration of TRPC4 β current

In the all panel, dose-dependent curves of the inhibition rate of TRPC4 β current depending on the TCA concentration. **A.** AMI. **B.** DES. **C.** IMI.

2. 세포 외부에서 작용하는 삼환계 항우울제의 TRPC4 억제기전

앞선 결과에서 세포 외부 용액에 노출되어 일어났던 TRPC4 전류의 감소기전이 세포 외부 막 단백질에 작용하는 기전인지, 삼환계 항우울제가 세포 내부로 유입되어 다른 세포 내 신호를 조절하여 일어나는 기전인지 확인하고자 했다. 지금까지 TRPC4 β 가 과발현된 HEK293의 세포 외 용액에 삼환계 항우울제를 노출 시켰다면, 현 조건에서는 세포 내 용액에 아미트립틸린을 주입하고 Cs⁺ 투과에 의한 전체 세포의 전류 변화를 측정했다.

전극 용액에 아미트립틸린의 용매인 3차 증류수를 주입하고 전류를 측정했을 때, Cs⁺ 유입에 의한 전류의 크기는 105.52 ± 16.71 pA/pF 정도이며 전극 용액에 10 μ M 아미트립틸린을 주입한 후 측정한 전류의 크기는 106.85 ± 17.41 pA/pF 정도로 둘 사이에 유의미한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 6). 다른 삼환계 항우울제인 DES (Fig. 7)와 IMI (Fig. 8) 역시 세포 내 주입에 의해서 TRPC4의 활성을 감소시키지 않았다 (94.17 ± 24.16 to 95.50 ± 12.20 pA/pF of DES, 81.91 ± 17.52 to 82.83 ± 21.16 pA/pF of IMI).

결과적으로 세포 내 삼환계 항우울제 주입은 TRPC4의 전류 감소에 영향을 주지 않았으며, 세포 외 부위에서 TRPC4 이온통로의 활성을 직접 조절하는 것임을 시사한다.

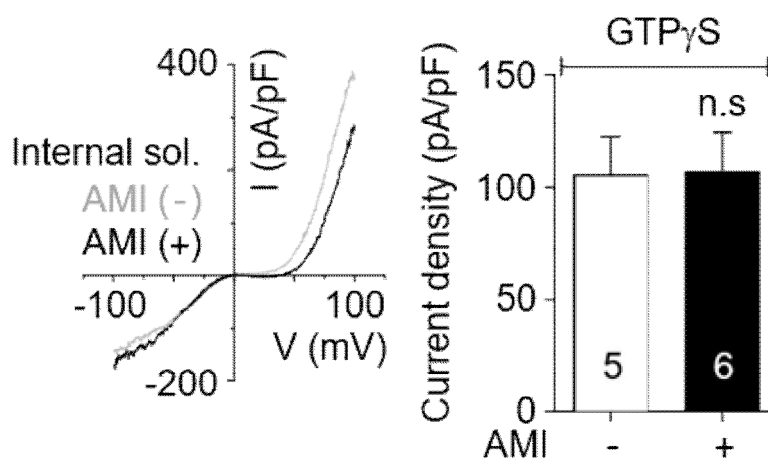


Figure 6. GTP γ S-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion

I-V curve (*left*) showed TRPC4 β current. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) deionized water- (white) and 1 μ M AMI- (black) infused pipette solution.

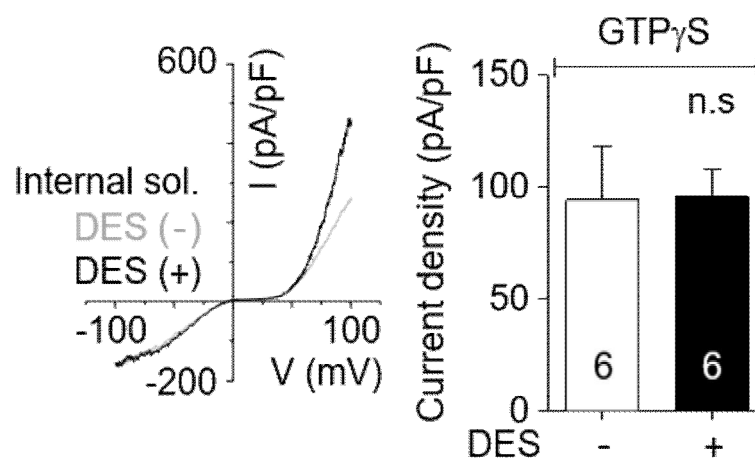


Figure 7. GTP γ S-induced TRPC4 β current depending on intracellular DES infusion

I-V curve (*left*) showed TRPC4 β current. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) DMSO- (white) and 1 μ M DES- (black) infused pipette solution.

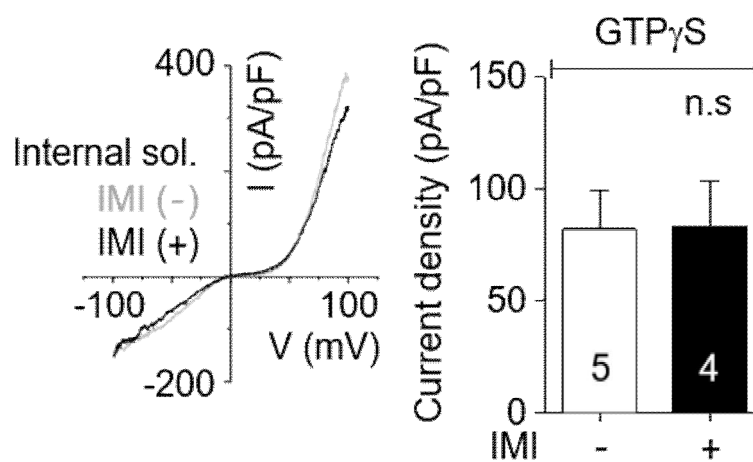


Figure 8. GTP_γS-induced TRPC4 β current depending on intracellular IMI infusion

I-V curve (*left*) showed TRPC4 β current. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) DMSO- (white) and 1 μ M IMI- (black) infused pipette solution.

3. 세포막 발현과 무관한 삼환계 항우울제의 TRPC4 억제 효과

삼환계 항우울제가 이온통로 활성을 억제시킨다는 이전의 보고에서, Dennis들은 삼환계 항우울제가 hERG 이온통로의 유비퀴틴화 (ubiquitination)와 분해 (degradation)을 통해 내제화 (internalization) 시키고 세포막 발현을 감소시키는 것으로 hERG 전류를 차단한다고 주장했다 [27]. 따라서 앞선 결과들에서 나타난 TRPC4의 전류 감소기전이 막 발현 조절에 의한 것인지 확인하고자 했다.

삼환계 항우울제 처치에 따른 TRPC4의 발현 수준을 측정하기 위해 Surface biotinylation 기법을 활용했다. 세포막 기준 단백질 (housekeeping gene)로 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 효소 (sodium-potassium ATPase, NKA)를 확인하였고 [26], 전체 단백질 정량 수준은 β -tubulin으로 검증하였다. TRPC4 β 에 부착된 GFP 형광 단백질을 표지할 수 있는 항체 (antibody)를 사용하여 세포막 발현 정도를 확인하였다.

전기생리학 결과에서 확인하였듯 TRPC4의 전류 감소는 일반적으로 2~3분 정도의 시간 내에 나타났다. TRPC4 β 를 과발현한 세포에서 5분 동안 3가지 종류의 삼환계 항우울제를 10 μM 농도로 처치하고 막 발현 수준의 변화를 확인하였다. TRPC4는 삼환계 항우울제 처치에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 9). 16시간 동안 비교적 장시간 처리를 한 경우에도 역시 막 발현 수준은 유의하게 변하지 않았다 (Fig. 10).

결과적으로 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4와 전류의 감소는 막 발현 수준을 감소시키지 않고 이온통로 개폐를 직접적으로 조절하여 일어나는 효과로 보여진다.

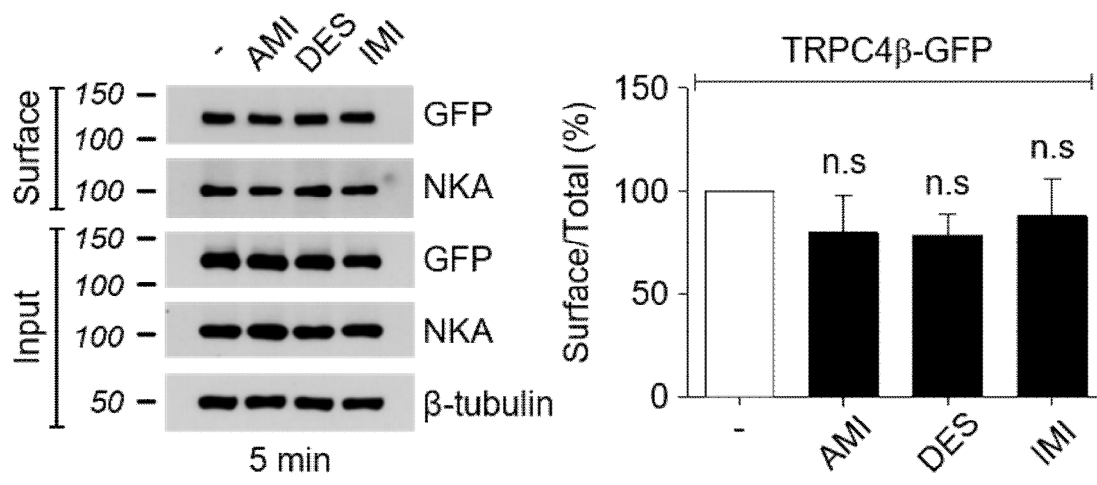


Figure 9. Surface level of TRPC4β induced by TCA treatment for 5 min

Representative western blot (*left*) and quantified data of the ratio (*right*) of the plasma membrane expression level of TRPC4β by 10 μM AMI, IMI and DES treatment for 5 min (n=5).

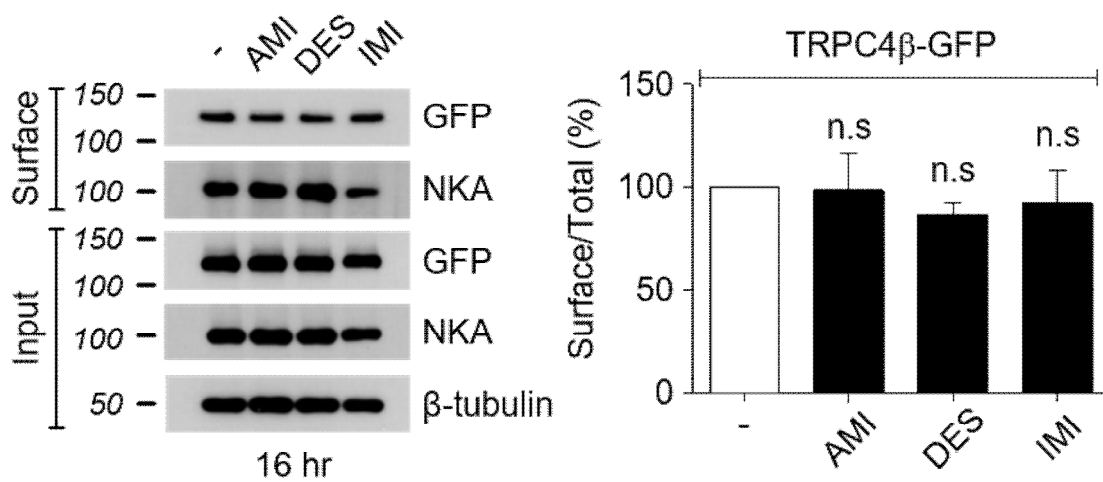


Figure 10. Surface level of TRPC4β induced by TCA treatment for 16 hr

Representative western blot (*left*) and quantified data of the ratio (*right*) of the plasma membrane expression level of TRPC4β by 10 μM AMI, IMI and DES treatment for 16 hr (n=5).

제 2 절. 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 의존적 TRPC4 이온통로 활성화 억제 효과

1. 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 수용체 M3 의존적으로 활성화되는 TRPC4에 의한 mI_{cat} 억제

삼환계 항우울제 복용 시 나타나는 부작용인 항콜린성 증후군은 구강 건조, 빛 번짐, 환각, 변비 등이 주요한 증상으로 보고되며 다양한 기관에서 나타난다 [15]. 최근에는 변비 부작용을 활용하여 설사 우세 과민성 대장 증후군 (IBS-D)의 치료제로써 삼환계 항우울제의 효과가 재조명되고 있으나 치료 원리에 대한 생리적 기전은 명확하지 않다 [11]. 변비와 설사 등의 장 질환은 일반적으로 소화기관 평활근 운동의 항상성이 무너졌을 때 나타나며, 이러한 대장 평활근 수축을 조절하는 중요 분자로서 TRPC4 이온통로가 잘 알려져 있다. 이전의 많은 연구에서 소화계의 TRPC4는 아세틸콜린 수용체에 의해 이온통로의 개폐가 조절되는 것으로 보고되었으며, 특히 Tsvilovskyy의 이전 논문에서 [26], 대장 내 평활근의 강한 수축을 유발하는 무스카리닉 양이온 전류 (mI_{cat}) 80%가 TRPC4에 의해 매개된다고 보고되었다. 이를 근거로 삼환계 항우울제가 유발하는 변비기전의 분자 표적으로써 TRPC4의 역할을 확인하고자 하였다.

TRPC4가 평활근 세포에서 기능하기 위해서는 신경전달물질 아세틸콜린에 의한 활성화가 주요한 기전으로 알려져 있는데, 먼저 아세틸콜린 수용체에 의해 TRPC4가 활성화 될 수 있는 환경에서 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4의 전기적 특성 변화를 확인하고자 했다. HEK293 세포주에 TRPC4 β 와 장내에 발현량이 가장 높다고 알려진 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 M3 (muscarinic acetylcholine receptor 3, M₃R)을 공동 발현하고 단일세포 막전압 고정법으로 세포 전체 전류를 측정하였다. M₃R은 Gq-PLC 경로에 의해 TRPC4의 1차 활성화를 유발한다고 알려져 있으며, M₃R의 작용제가 노출되는 동안에 일시적인 활성화 (transient activation)을 보인다. 먼저 삼환계 항우울제의 용매 (solvent)인 DMSO를 2~3분간 노출 시킨 후, M₃R을 활성화시키는 작용제인 CCh를 100 μ M 농도로 세포 외 용액에 노출 시켰을 때, TRPC4에 의한 전류를 5.44 ± 1.54 pA/pF에서 103.77 ± 8.67 pA/pF로 크게 상승시켰으며,

TRPC4의 전형적인 전압-전류 곡선 (I-V curve)인 이중정류 전류 (doubly rectifying current)를 확인하였다 (Fig. 11).

그렇다면, 삼환계 항우울제를 노출 시켰을 때, mI_{cat} 의 변화를 확인하고자 했다. 아미트립틸린을 10 μ M로 세포 외부에 노출 시켰을 때, CCh에 의한 TRPC4 전류의 활성이 완전히 사라졌다 ($8.83 \pm 1.96 \sim 8.39 \pm 1.39$ pA/pF, Fig. 12). 다른 삼환계 항우울제 노출 시에도 mI_{cat} 의 억제가 유발되는지 확인하기 위해, 데시프라민과 이미프라민을 각각 노출 시켰다. 예상대로 세포 외부에 데시프라민과 이미프라민을 각각 10 μ M 처치했을 때, 아미트립틸린과 유사하게 mI_{cat} 을 억제시켰다 (Fig. 13, 14). 결과적으로 삼환계 항우울제가 전처리 되지 않는다면, CCh에 의한 M_3R 의 활성화는 TRPC4 전류를 증가시켰다. 하지만 3가지 종류의 삼환계 항우울제들 전처리할 경우 TRPC4의 내향성 전류 증가가 완전히 차단되었다 (Fig. 15). 결과적으로 TRPC4에 의해 유발되는 mI_{cat} 는 삼환계 항우울제에 의해 차단당할 수 있으며, 이는 평활근 세포의 신경원성 수축기전을 억제시킬 수도 있다는 것은 시사한다.

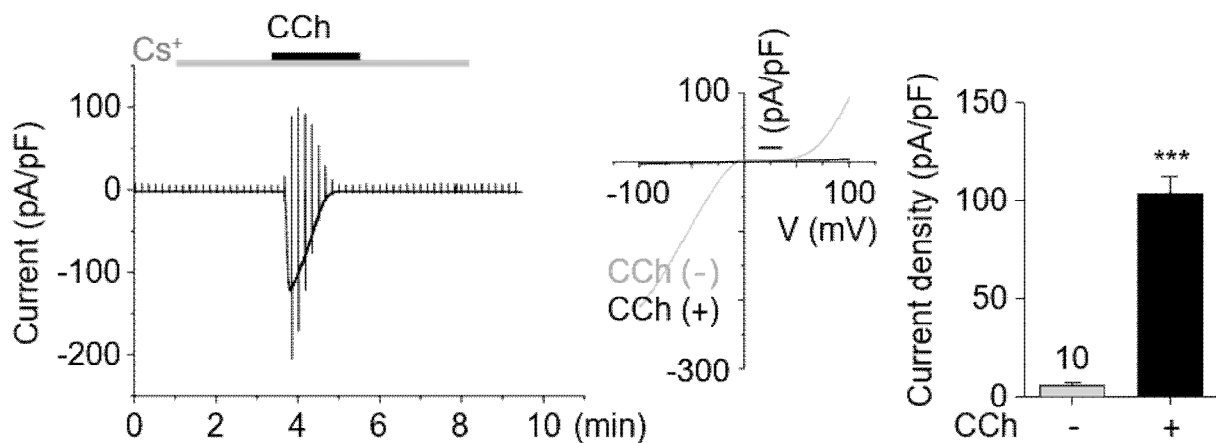


Figure 11. TRPC4 β current induced by M₃R stimulation.

Representative current trace (*left*) and current I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₃R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh.

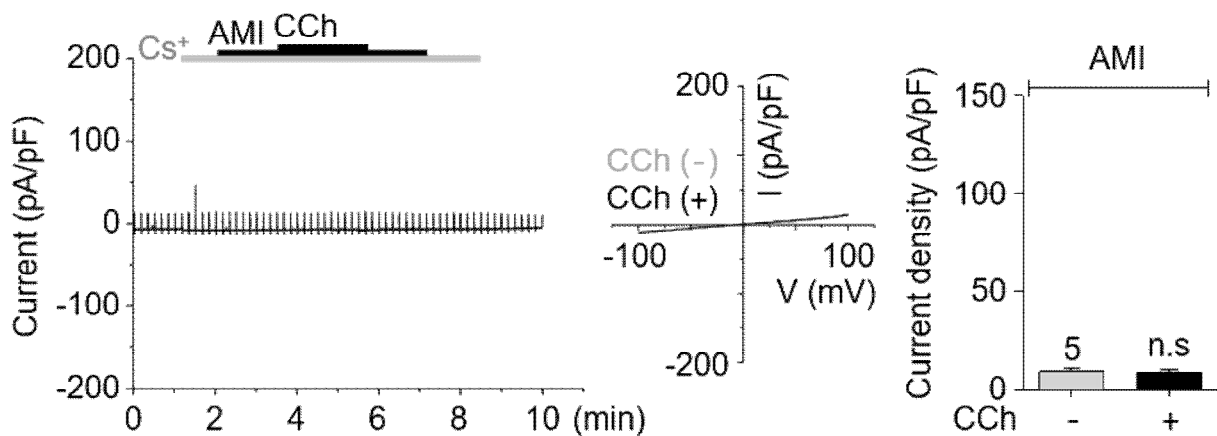


Figure 12. Inhibitory effect of M_3R -induced TRPC4 β activity by extracellular AMI treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M_3R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M AMI before CCh application.

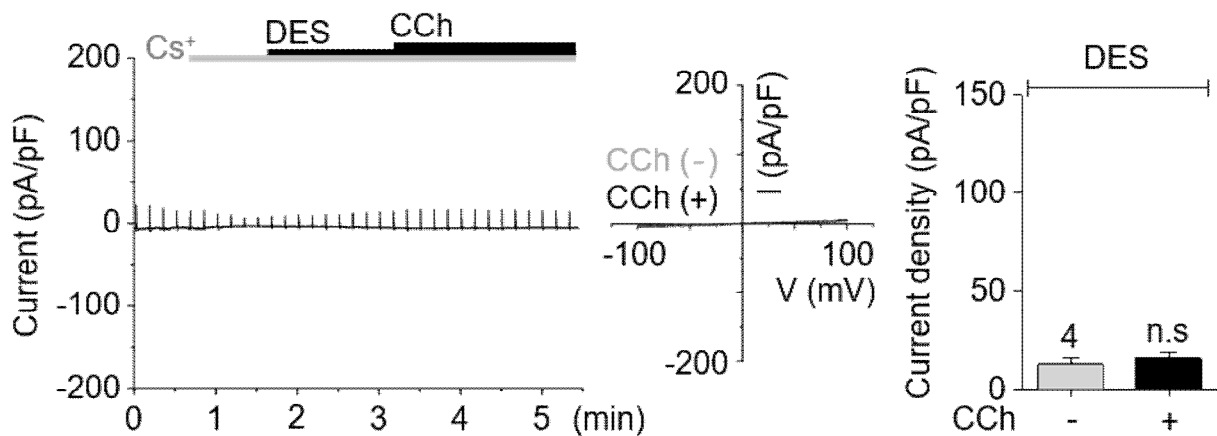


Figure 13. Inhibitory effect of M₃R-induced TRPC4 β activity by extracellular DES treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₃R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M DES before CCh application.

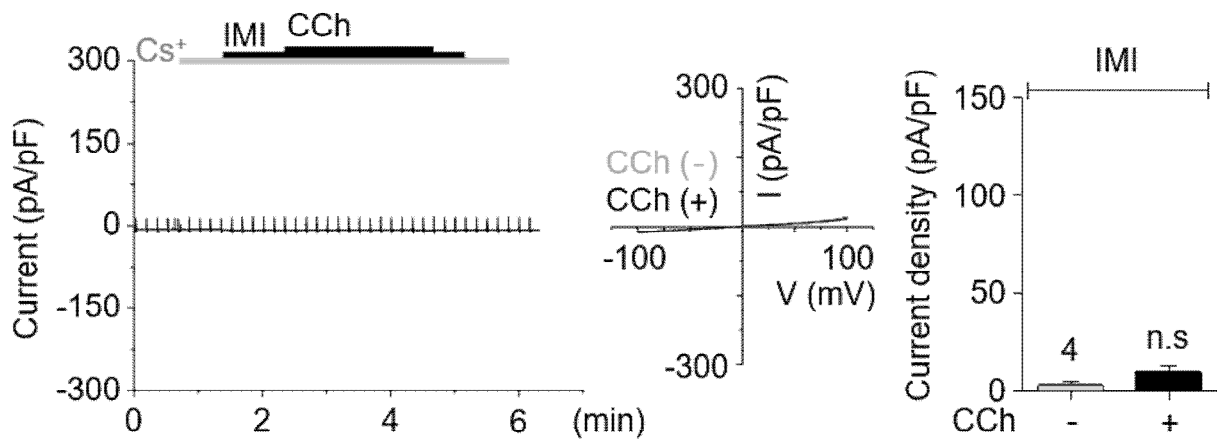


Figure 14. Inhibitory effect of M₃R-induced TRPC4 β activity by extracellular IMI treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₃R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M IMI before CCh application.

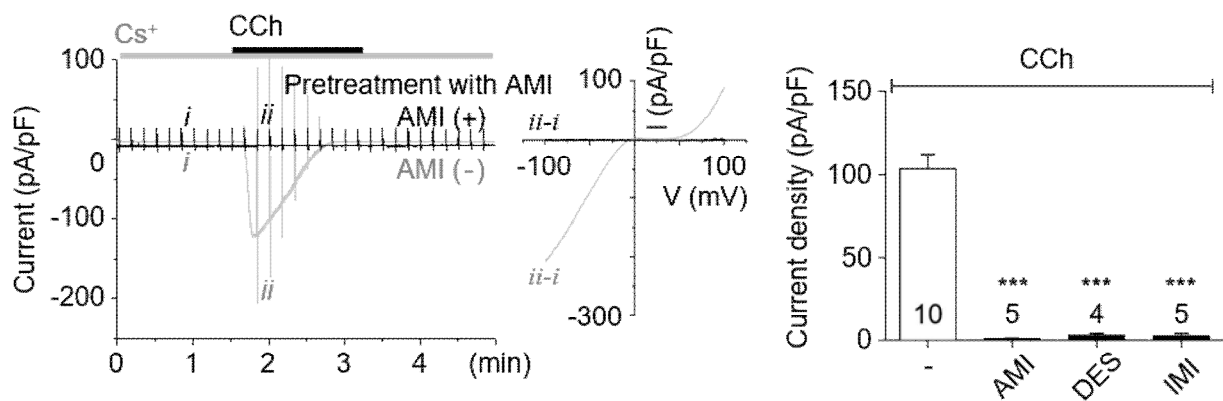


Figure 15. Inhibitory effect of M₃R-induced TRPC4 β activity by extracellular TCAs treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₃R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) by pretreatment with DMSO (white) or 10 μ M TCAs (black).

2. 삼환계 항우울제에 의한 무스카리닉 수용체 2 의존적으로 유발되는 TRPC4에 의한 mI_{cat} 억제

M_3R 와 같은 무스카리닉 수용체의 다른 아형인 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 2 (M_2R) 역시 위장관 평활근에 발현율이 높은 수용체이다 [27]. 지금까지 보고된 M_2R 의 기능은, G_{α_i} 타입의 GPCR 작용기전으로 아데닐산고리화효소 (adenylyl cyclase, AC)의 활성을 저해하여 cAMP 생성을 억제한다는 것이 잘 알려져 있다. 하지만 우리 그룹의 이전 논문에서 TRPC4가 Gi-couple 수용체에 활성화 된다고 밝혔으며 [28], 때문에 M_2R 에 의한 평활근 수축기전으로 TRPC4의 역할이 있을 중요한 것으로 생각하였다. 그리고 삼환계 항우울제의 작용이 M_2R 의존적 TRPC4 활성화로 인한 mI_{cat} 을 조절하는지 확인하였다.

마찬가지로, HEK293 세포에 M_2R 와 TRPC4 β 를 공동 발현하고 세포 전체 전류를 측정하였다. 100 μ M CCh를 세포 외 용액에 노출 시켰을 때, 전류가 크게 상승하였으며 (4.42 ± 0.98 - 206.34 ± 19.80 pA/pF, Fig. 16), TRPC4의 전형적인 이중정류 전류가 나타났다. 반면, 10 μ M AMI를 먼저 처치하면, CCh에 의한 내향성 전류 증가가 완전히 사라지는 것을 확인할 수 있었고 (1.40 ± 0.35 - 1.05 ± 0.25 pA/pF, Fig. 17), DES (7.84 ± 1.97 - 10.63 ± 4.41 pA/pF, Fig. 18)과 IMI (7.30 ± 1.39 - 10.04 ± 0.92 pA/pF, Fig. 19) 역시 유사한 수준의 차단 효과를 보였다. 결국, 삼환계 항우울제의 전처리는 CCh에 의해 증가하는 TRPC4의 전류를 완전히 억제하였다 (Fig 20).

정리하자면, 삼환계 항우울제는 장에서 기능하는 두 가지 타입의 무스카리닉 수용체에 의한 TRPC4의 활성을 완전히 차단하였다. 이는 Ach과 같은 신경전달물질에 의한 평활근의 수축을 억제함으로써 장의 신경원성 운동을 차단할 수 있는 생리적 근거가 될 수 있다.

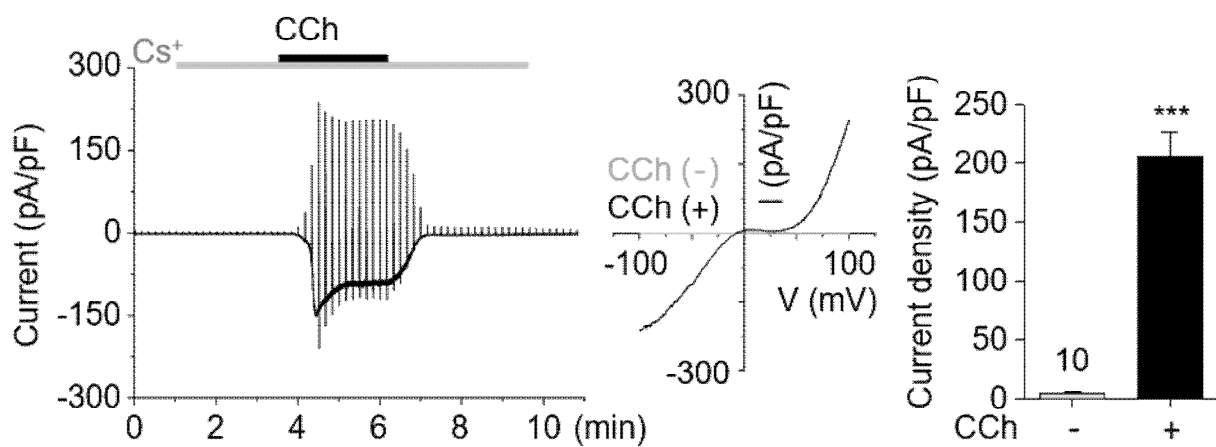


Figure 16. TRPC4 β current induced by M₂R stimulation.

Representative current trace (*left*) and current I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₂R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh.

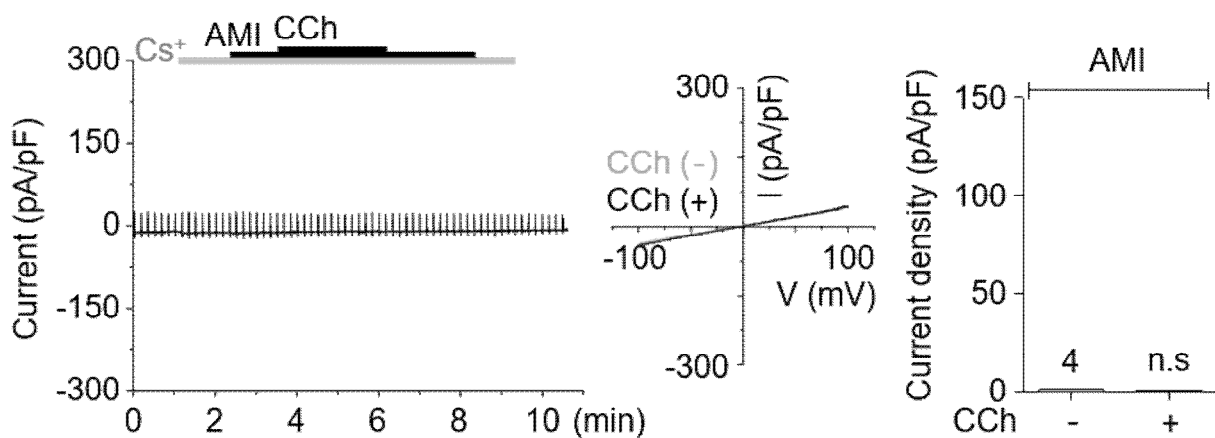


Figure 17. Inhibitory effect of M₂R-induced TRPC4 β activity by extracellular AMI treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₂R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M AMI before CCh application.

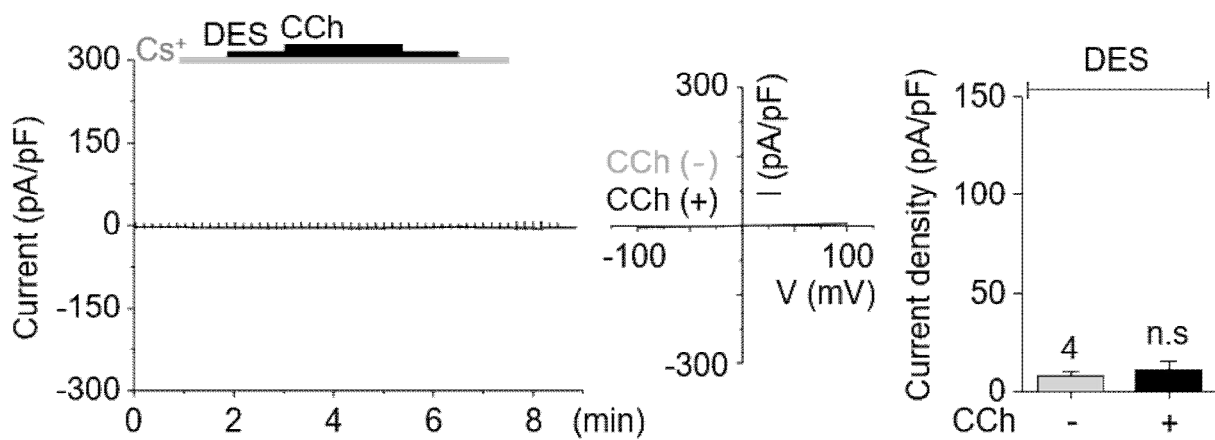


Figure 18. Inhibitory effect of M_2R -induced TRPC4 β activity by extracellular DES treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M_2R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M DES before CCh application.

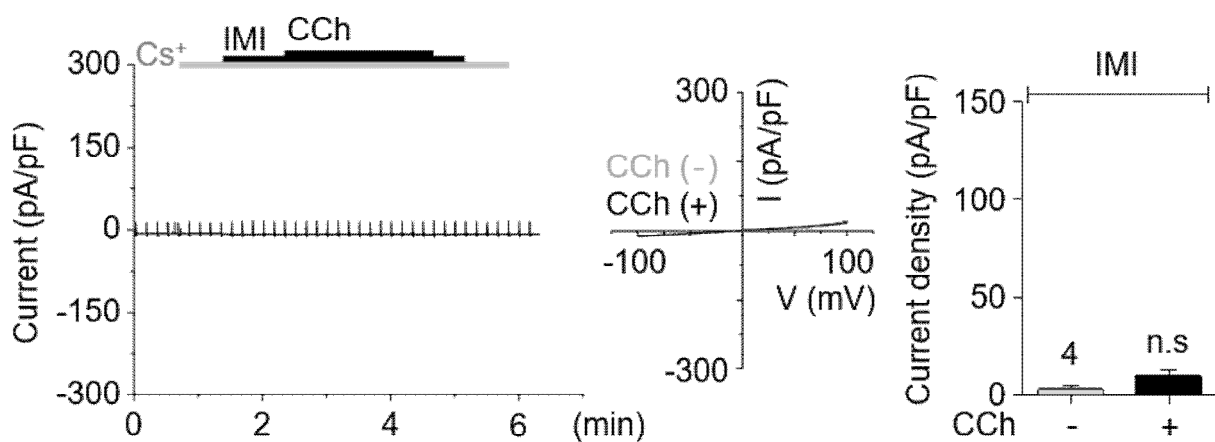


Figure 19. Inhibitory effect of M₂R-induced TRPC4 β activity by extracellular IMI treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M₂R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (gray) and after (black) treatment with 100 μ M CCh. Pretreatment with 10 μ M IMI before CCh application.

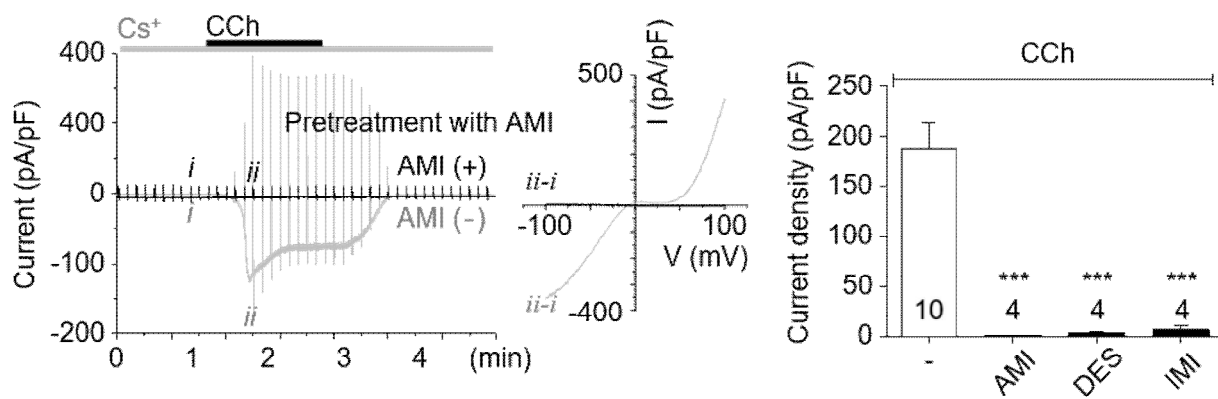


Figure 20. Inhibitory effect of M_2R -induced TRPC4 β activity by extracellular TCAs treatment.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed TRPC4 β current induced by M_2R stimulation. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) by pretreatment with DMSO (white) or 10 μ M TCAs (black).

3. 세포 외부에서 작용하는 삼환계 항우울제의 mI_{cat} 억제기전

앞선 결과에서 세포 외부 용액에 노출되어 일어났던 mI_{cat} 의 억제기전이 세포 외부 막 단백질에 작용하는 기전인지, 삼환계 항우울제가 세포 내부로 유입되어 다른 세포 내 신호를 조절하여 일어나는 기전인지 확인하고자 했다. 마찬가지로, M_2R , M_3R 와 $TRPC4\beta$ 를 공동발현한 세포에서 유리전극 내 용액에 $1 \mu M$ AMI를 주입하고 CCh에 의한 전체 세포의 전류 변화를 측정했다.

M_3R 에 의한 $TRPC4$ 전류의 증가는 세포 내부로 유입된 AMI의 영향을 받지 않았다 (Fig. 21). AMI의 용매를 주입한 전극 용액에서 CCh에 의한 전류는 78.18 ± 18.89 pA/pF 만큼 증가하였으며, AMI를 주입하였을 때 역시 68.06 ± 20.31 pA/pF 증가로 용매를 넣은 것과 유의한 차이를 보이지 않았다.

M_2R 에 의한 $TRPC4$ 의 활성화 역시 세포 내 AMI의 영향을 받지 않았다 (Fig. 22). 전극 용액에 용매를 주입했을 때, CCh에 의한 $TRPC4$ 전류는 95.33 ± 14.05 pA/pF 만큼 증가했고, AMI를 주입한 것에서 마찬가지로 유의한 차이를 보이지 않았다. (95.50 ± 12.20 pA/pF).

결과적으로 앞선 결과들을 통해 삼환계 항우울제가 유발하는 무스카리닉 수용체 의존적 mI_{cat} 의 억제기전은 세포 외부에서 작용하는 기전인 것을 확인하였다. 이러한 mI_{cat} 의 감소는 신경전달물질이 유발하는 평활근 수축을 크게 위축시킬 수 있으며, TCA의 부작용 증상인 변비 유발의 원인이 될 수 있다는 것을 시사할 수 있다.

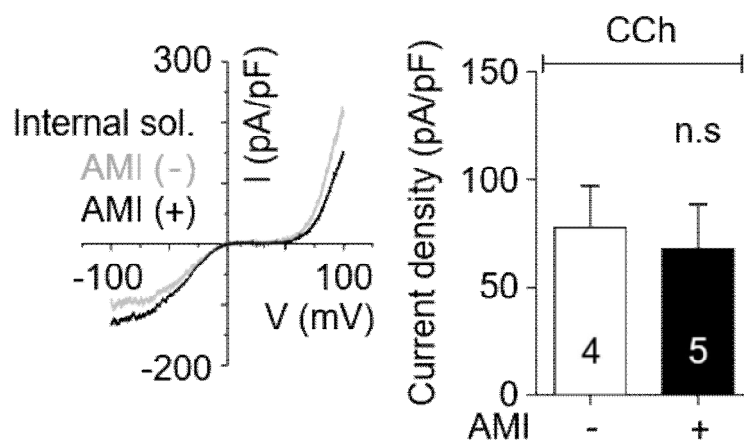


Figure 21. M₃R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion.

I-V curve (*right*) showed M₃R-coexpressed TRPC4 β current induced by 100 μ M CCh treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of deionized water- (white) and 1 μ M AMI- (black) infused pipette solution.

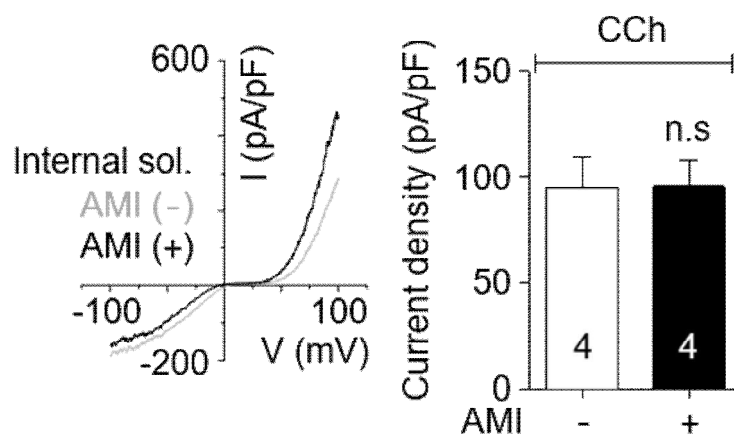


Figure 22. M₂R-induced TRPC4 β current depending on intracellular AMI infusion.

I-V curve (*right*) showed M₂R-coexpressed TRPC4 β current induced by 100 μ M CCh treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of deionized water- (white) and 1 μ M AMI- (black) infused pipette solution.

제 3 절. 삼환계 항우울제로 인한 생쥐 대장 평활근에서 무스카리닉 수용체 의존적 TRPC4의 활성 억제

위장관의 운동 신호를 조절하는 기전은 다양하지만, 결국 물리적 수축을 통해 신호를 구현하는 마지막은 평활근 세포이다. 평활근 세포에의 막전위 상승은 Ca^{2+} 의 유입을 유도하여 수축을 발생시키며, 이중 큰 수축을 위한 내향성 전류는 신경 신호를 통한 mI_{cat} 의 유발이 주요하다. 생쥐 대장 평활근 세포에서 TRPC4가 유도하는 mI_{cat} 은 잘 알려져 있다. 삼환계 항우울제가 CCh에 의한 대장 근 세포 반응의 mI_{cat} 을 차단하는지, 그리고 TRPC4 억제기전이 근세포의 내향성 전류에 어떻게 작용하는지 확인하고자 했다. 대장 부위 중 S자 결장 쪽으로 갈수록 운동성이 발달해 있으므로, 생쥐의 대장에서 하행 결장에서 S자 결장 부분에 해당하는 조직을 분리해 이용하였다. 점막층과 점막하층을 제거하고 평활근을 단일 세포로 분리하여 막전압 고정법으로 전류를 측정하였다.

III-1~2에서 기록한 TRPC4의 최적화된 조건에서 평활근 세포의 전류가 측정되었으며, CCh에 의한 mI_{cat} 에서 TRPC4에 의한 전류 기여도를 명확히 판단하고자 다음과 같은 실험을 하였다. (1) CCh에 의한 I-V curve의 이중정류 측정, (2) TRPC4의 선택적인 억제제인 Pico145에 의한 mI_{cat} 의 차단, (3) TRPC4 knockout 생쥐 평활근에서 mI_{cat} 차이 확인.

먼저, 100 μ M CCh 처리로 4.32 ± 1.36 pA/pF 정도 상승한 대장 평활근 세포의 전류는 100 nM Pico145 처리에 의해 0.21 ± 0.09 pA/pF 정도로 완전히 억제되었다 (Fig. 23). 특히, CCh이 처리된 후의 전압-전류 곡선에서 처리되기 전 곡선을 수학적으로 뺀 때 TRPC4의 전형적인 이중정류 곡선을 볼 수 있었으며, Pico145를 처리하면 이 곡선이 완전히 사라졌다. 결과적으로 무스카리닉 수용체에 의한 평활근의 막전위 증가는 TRPC4의 역할이 주요할 수 있다는 것을 확인하였다.

그렇다면 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4의 억제가 대장 평활근 막전위 조절에 기여 하는 수준을 측정하고자 했다. 먼저 CCh에 의해 평활근 막전위를 4.91 ± 1.90 pA/pF까지 증가시킨 후 10 μ M의 아미트립틸린을 처리했을 때 0.34 ± 0.71 pA/pF 수준으로 막 전위의 감소를 확인할 수 있었다 (Fig. 24). 아미트립틸린 역시 이중정류

전류 곡선이 보이지 않았으며, Pico145와 동일한 수준으로 막 전위를 감소시킨다는 것을 확인하였다.

평활근에서 TRPC4에 의한 기여도를 더 명확하게 확인하기 위해, TRPC4가 knockout된 생쥐의 평활근에서 CCh과 아미트립틸린에 의한 전류 변화를 확인하였다. 동일한 조건에서 CCh에 의한 막전위의 상승과 아미트립틸린에 의한 감소가 모두 나타나지 않으며, wild type에서 보였던 이중정류 곡선 역시 보이지 않았다 (Fig. 25).

결론적으로 대장 운동성에 중요한 아세틸콜린에 의한 대장 평활근 탈분극에는 TRPC4의 활성이 기여한다. 신경원성 수축기전이 일어나는 근세포에 삼환계 항우울제가 노출되어 있다면, TRPC4 활성을 억제하는 것으로 신경 신호전달기전에 혼란을 야기할 수 있다. 삼환계 항우울제 복용 시 나타나는 변비 증상의 원인기전 중 하나로 신경원성 수축 억제에 따른 운동성 감소가 일어날 수 있으며, 이는 탈분극을 유발하는 중요한 이온통로인 TRPC4를 억제하여 평활근 수축을 차단하는 것이 주요하게 작용할 수 있다.

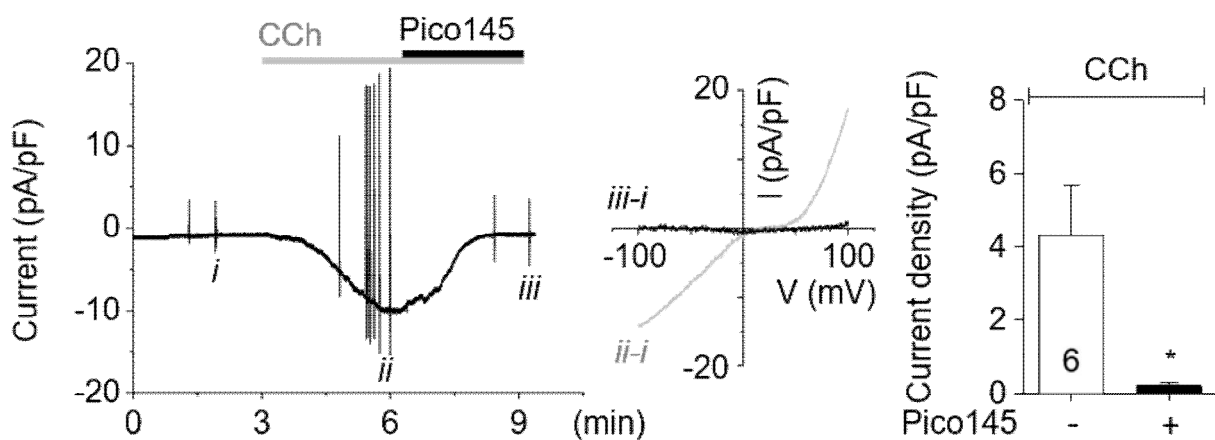


Figure 23. Inhibition of the CCh-induced TRPC4 current by Pico145 in murine myocytes.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed whole-cell current in murine sigmoid colonic myocytes evoked by 100 μ M CCh. Summarized data (*right*) showing the current density (pA/pF) at -60 mV before (white) and after (black) 1 nM Pico145 treatment.

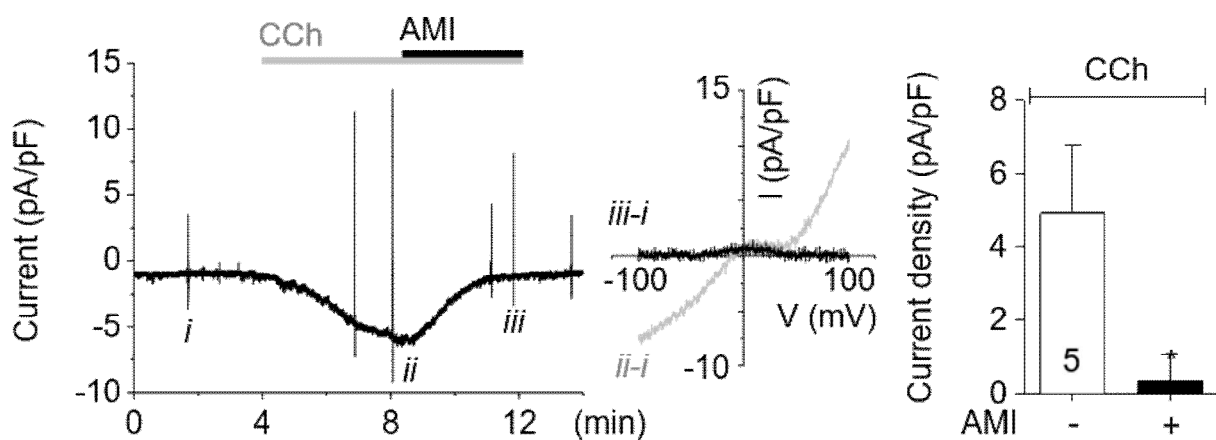


Figure 24. Inhibition of the CCh-induced TRPC4 current by AMI in murine myocytes.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed whole-cell current in murine sigmoid colonic myocytes evoked by 100 μ M CCh. Summarized data (*right*) showing the current density (pA/pF) at -60 mV before (white) and after (black) 10 μ M AMI treatment.

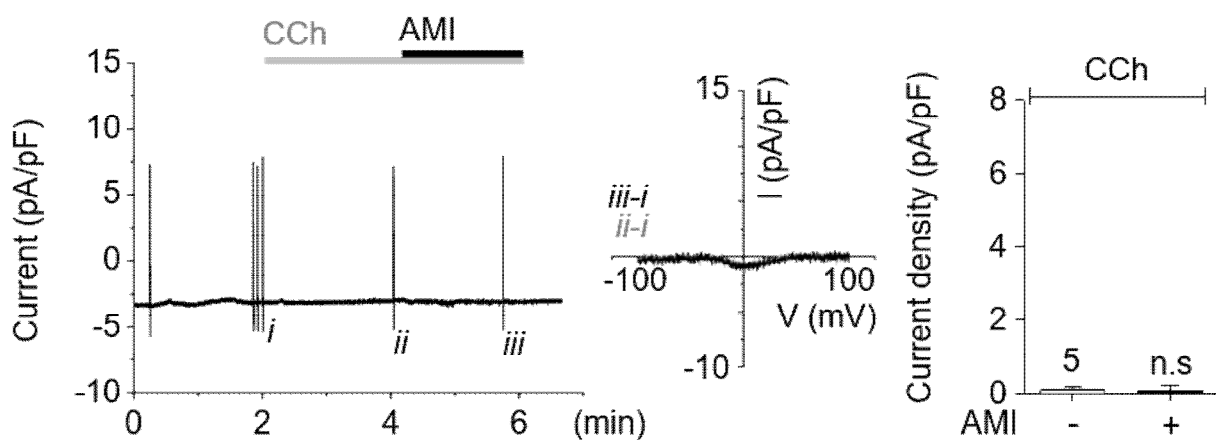


Figure 25. Inhibition of the CCh-induced TRPC4 current by AMI in TRPC4-knockout murine myocytes.

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) showed whole-cell current in TRPC4-knockout murine sigmoid colonic myocytes evoked by 100 μM CCh. Summarized data (*right*) showing the current density (pA/pF) at -60 mV before (white) and after (black) 10 μM AMI treatment.

제 4 장. 고 찰

본 연구 과정에서 확인된 삼환계 항우울제의 특성은 TRPC4 활성을 직접 억제하는 것으로 평활근 세포의 흥분성을 감소시킬 수 있으며, 이는 변비 증상을 일으키는 생리적 원인기전 중 하나가 될 수 있음을 보였다. 결과를 간략히 정리하자면 다음과 같다.

1. 삼환계 항우울제는 세포 외부에 작용하여 TRPC4의 전류를 억제시켰으며, 세포막 발현과 무관하게 개폐를 조절한다.
2. 삼환계 항우울제는 M₂R과 M₃R에 의해 증가 된 TRPC4의 mI_{cat} 역시 완전히 억제시켰다.
3. 무스카리닉 수용체 활성화로 증가 된 생쥐 대장 평활근 세포의 막 전위는 TRPC4/C5 억제제인 Pico145에 의해 기저 수준으로 줄어들었으며, 삼환계 항우울제 역시 유사한 수준으로 막 전위를 감소시켰다.
4. 대장 평활근 세포에서 TRPC4가 기능하지 않는다면, 아세틸콜린 수용체 자극에도 막 전위가 증가 되지 않으며, 삼환계 항우울제에 의한 억제도 나타나지 않는다.

변비는 음식물이 소화된 후 대장에 잔류하는 시간이 과하게 길어져, 수분이 과도하게 흡수되거나 고형화되어 배변 되지 않는 증상이다. 변비가 유발되는 원인에 대한 보고는 다양하지만, 크게 신경계 이상이나 감염에 따라 대장의 운동성 장애로 일어나는 기능성 변비와 약제 복용에 의한 이차성 변비로 구분된다 [29].

경구 투여 약물 복용 (고혈압 치료제, 항우울제, 철분 보충제, 마약성 진통제 등) 시 가장 흔하게 보고되는 이차성 변비 증상은 일반적인 경구 투여 약물의 특성상, 소화계 조직으로의 노출은 혈관을 통한 체순환보다 더 빠르고 고농도로 이루어진다. 삼환계 항우울제의 항우울 효과를 나타낼 수 있도록 처방되는 양은 하루에 100~200 mg 정도 여야 하지만 [30], IBS-D 치료를 위한 처방 농도는 하루 25~125 mg 으로 훨씬 저농도에서도 치료 효과를 보인다 [19]. 이는 물론 복용 개선을 위해 신경에 작용하는 농도가 낮은 이유일 수도 있으나, 대장 평활근에 직접 작용할 수 있는 약물 특성상 실제 작용농도는 혈청 농도보다 더 높기 때문일 수 있다. 본 연구에서 사용된 농도

역시 삼환계 항우울제의 예상 혈청 농도인 (100~300 ng/ml)보다 약간 높은 농도를 사용하였다 [30]. 결론적으로 위장관 벽에 노출된 삼환계 항우울제는 평활근 조직의 TRPC4 활성을 더 빠르고 광범위하게 억제하기 쉬운 환경에 있다. 그렇다면 대조적으로, 이온통로를 표적으로 하는 경구 투여 약물치료는 타 약물보다 장 운동성 질환을 개선하는데 더 효과적일 수 있다고 생각되며, 그중 TRPC4를 억제하는 것은 설사 증상 치료에 이용되는 삼환계 항우울제의 원인기전으로 제시될 수 있다. 다만, IBS 치료 표적으로써 TRPC4의 가능성을 더 명확히 하기 위해서는 IBS 질환의 동물 모델을 이용하는 등 추가 연구가 필요할 것이다.

삼환계 항우울제가 다양한 분자 표적들에 작용하여 기전을 조절한다는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 본 연구는 삼환계 항우울제들에 의한 TRPC4 억제 효과가 평활근 신경원성 수축에 기여할 것이라고 보고하지만, 중추신경계 및 ENS나 ICC, 대장 평활근 세포에서 삼환계 항우울제는 TRPC4에 선택적으로 작용하지 않는다. 지금까지 보고에서 삼환계 항우울제는 신경전달물질 수용체인 히스타민 수용체 (Histamine receptor type 1), 아드레날린 수용체 (adrenoceptor α_1 , α_2)와 세로토닌 수용체 (5-HT receptor type 2A)를 억제한다고 알려져 있으며 [14], 신경에서 특히 중요하게 기능하는 전압 의존성 Na^+ 이온통로의 억제를 유발하기도 한다 [31]. 삼환계 항우울제에 의한 ATP 의존적 K^+ 이온통로 [32]나 L형 Ca^{2+} 이온통로의 억제 [33]는 위장관에서 ICC 활성화와 평활근 세포 수축에 중요하게 관여한다고 보고되어 있고, 중추신경계와 위장관에 기능하는 아편계 수용체 (opioid receptor)에 미치는 삼환계 항우울제의 영향도 무시할 수 없다 [34]. 이 같은 보고들에 근거하여 삼환계 항우울제가 일으키는 변비 증상이 본 연구에서 제안하는 TRPC4 억제기전에 국한된 것이라고 단정할 수 없으며, ENS나 ICC에서의 작용에 관한 추가 연구는 필수적이다.

삼환계 항우울제가 IBS-D 치료에 특히 효과적인 이유는 진통 효과를 통해 복통을 완화 시키고 [35] 설사 증상을 개선하는 병용치료의 효과를 한 가지 약물의 처방으로 보일 수 있다는 것이었다. 하지만 IBS-D 치료를 위한 삼환계 항우울제의 처방은 앞서 제시한 on-off target 효과를 비롯한 생리적 기전을 명확히 규정하지 못하고 임상적 결과 및 통계에만 의존해 왔다. 즉각적으로 나타나는 증상 개선은 충분히 효과적일 수 있으나, 설사와 변비 등 상반되는 증상들이 나타나는 IBS의 경우 오히려 증상을 악화시킬 수 있으며, 특히 뚜렷한 원인을 제시할 수 없는 경우 예기치 못한 부작용을 야기할 수 있다. TCA가 가지는 모든 기전을 밝혀낼 수는 없겠으나, TRPC4를 표적

하는 억제효과와 같이 지속적으로 제시되는 과학적 근거는 부작용을 예방하는 관점에서 분명히 필수적일 것이다.

본 연구는 삼환계 항우울제에 의한 장운동 억제의 원인기전 중 하나로써 신경원성 수축을 조절하는 TRPC4를 제시하고, IBS 치료를 위한 표적 단백질로 제안했다. 삼환계 항우울제의 처방에 TRPC4를 억제한다는 생리기전과 IC₅₀를 밝힘으로써, IBS 처방 가이드라인에 안정성을 더할 수 있는 과학적 근거를 제시하였다. 기존에 IBS-D 치료를 위한 삼환계 항우울제 처방이 충분히 효과적이라는 보고가 이미 많이 밝혀지고 있으나, 삼환계 항우울제의 on-off target 효과를 고려한다면 아직 처방에 난항을 겪는 것이 사실이다. 장 운동을 조절하는 이온통로인 TRPC4를 선택적으로 표적 할 수 있는 치료제를 개발하는 것은 IBS를 비롯한 장 운동성 질환들의 처방에 안정적이고 효과적인 약물로 대두될 수 있다.

참 고 문 헌

1. Azzouz, L.L. and S. Sharma, *Physiology, Large Intestine*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
2. Rao, J.N. and J.Y. Wang, in *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*. 2010: San Rafael (CA).
3. Sanders, K.M., S.M. Ward, and S.D. Koh, *Interstitial cells: regulators of smooth muscle function*. *Physiol Rev*, 2014. 94(3): p. 859-907.
4. Schneider, S., C.M. Wright, and R.O. Heuckeroth, *Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function*. *Annu Rev Physiol*, 2019. 81: p. 235-259.
5. Al-Shboul, O.A., *The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract*. *Saudi J Gastroenterol*, 2013. 19(1): p. 3-15.
6. Sanders, K.M., et al., *Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. 9(11): p. 633-45.
7. Sarna, S.K., *Physiology and pathophysiology of colonic motor activity (2)*. *Dig Dis Sci*, 1991. 36(7): p. 998-1018.
8. Rey, E. and N.J. Talley, *Irritable bowel syndrome: novel views on the epidemiology and potential risk factors*. *Dig Liver Dis*, 2009. 41(11): p. 772-80.
9. Kibune Nagasako, C., et al., *Irritable bowel syndrome subtypes: Clinical and psychological features, body mass index and comorbidities*. *Rev Esp Enferm Dig*, 2016. 108(2): p. 59-64.
10. Ford, A.C., et al., *Irritable bowel syndrome*. *Lancet*, 2020. 396(10263): p. 1675-1688.
11. Clouse, R.E., *Antidepressants for irritable bowel syndrome*. *Gut*, 2003. 52(4): p. 598-9.
12. Siproudhis, L., et al., *Differential effects of two types of antidepressants, amitriptyline and fluoxetine, on anorectal motility and visceral perception*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. 20(6): p. 689-95.
13. Hillhouse, T.M. and J.H. Porter, *A brief history of the development of*

- antidepressant drugs: from monoamines to glutamate.* Exp Clin Psychopharmacol, 2015. 23(1): p. 1-21.
14. Gillman, P.K., *Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated.* Br J Pharmacol, 2007. 151(6): p. 737-48.
 15. Moraczewski, J. and K.K. Aedma, *Tricyclic Antidepressants*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
 16. Paumier, K.L., et al., *Tricyclic antidepressants delay the need for dopaminergic therapy in early Parkinson's disease.* Mov Disord, 2012. 27(7): p. 880-7.
 17. Sansone, R.A. and L.A. Sansone, *Pain, pain, go away: antidepressants and pain management.* Psychiatry (Edgmont), 2008. 5(12): p. 16-9.
 18. Szok, D., et al., *Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain.* Behav Neurol, 2019. 2019: p. 8685954.
 19. Clouse, R.E., *Antidepressants for irritable bowel syndrome.* Gut, 2003. 52(4): p. 598-9.
 20. Iskandar, H.N., et al., *Tricyclic antidepressants for management of residual symptoms in inflammatory bowel disease.* J Clin Gastroenterol, 2014. 48(5): p. 423-9.
 21. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels.* Annu Rev Biochem, 2007. 76: p. 387-417.
 22. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels.* Genome Biol, 2011. 12(3): p. 218.
 23. Riccio, A., et al., *Decreased anxiety-like behavior and Galphaq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels.* J Neurosci, 2014. 34(10): p. 3653-67.
 24. Riccio, A., et al., *Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior.* Cell, 2009. 137(4): p. 761-72.
 25. Tsvilovskyy, V.V., et al., *Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo.* Gastroenterology, 2009. 137(4): p. 1415-24.
 26. Suzuki-Yagawa, Y., K. Kawakami, and K. Nagano, *Housekeeping Na,K-ATPase alpha 1 subunit gene promoter is composed of multiple cis*

- elements to which common and cell type-specific factors bind.* Mol Cell Biol, 1992. 12(9): p. 4046-55.
27. Tanahashi, Y., et al., *Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice.* Int J Mol Sci, 2021. 22(2).
 28. Jeon, J.P., et al., *Selective Galphai subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels.* J Biol Chem, 2012. 287(21): p. 17029-17039.
 29. Tack, J., et al., *Diagnosis and treatment of chronic constipation--a European perspective.* Neurogastroenterol Motil, 2011. 23(8): p. 697-710.
 30. Brunton, L.L., *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 2006.
 31. Rey, E. and N.J. Talley, *Irritable bowel syndrome: novel views on the epidemiology and potential risk factors.* Dig Liver Dis, 2009. 41(11): p. 772-80.
 32. Choi, S., et al., *Imipramine inhibits A-type delayed rectifier and ATP-sensitive K⁺ currents independent of G-protein and protein kinase C in murine proximal colonic myocytes.* Arch Pharm Res, 2006. 29(11): p. 998-1005.
 33. Zahradnik, I., I. Minarovic, and A. Zahradnikova, *Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by antidepressant drugs.* J Pharmacol Exp Ther, 2008. 324(3): p. 977-84.
 34. Onali, P., S. Dedoni, and M.C. Olianas, *Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes.* J Pharmacol Exp Ther, 2010. 332(1): p. 255-65.
 35. Sansone, R.A. and L.A. Sansone, *Pain, pain, go away: antidepressants and pain management.* Psychiatry (Edgmont), 2008. 5(12): p. 16-9.