



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](#)

2007年 8月
博士學位申請論文

소장 향도잡이 세포의 전기적 활동도에 대한
산화질소의 효과

朝鮮大學校 大學院

醫學科

金俊秀

소장 향도잡이 세포의 전기적 활동도에 대한
산화질소의 효과

Effects of nitric oxide on electrical activity in intestinal
pacemaker cells

2007 年 8 月 日

朝鮮大學校 大學院

醫學科

金 俊 秀

소장 향도잡이 세포의 전기적 활동도에 대한
산화질소의 효과

指導教授 全 濟 烈

이 論文을 醫學博士學位 申請論文으로 提出함

2007 年 4 月 日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 俊 秀

金 俊 秀 의 博士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 _____印

委 員 朝鮮大學校 教授 _____印

委 員 朝鮮大學校 教授 _____印

委 員 朝鮮大學校 教授 _____印

委 員 朝鮮大學校 教授 _____印

2006 年 5 月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

그림설명	2
영문초록	4
I. 서론	6
II. 실험방법	9
1. 사이질 세포의 배양	9
2. 세포막 전압 및 전류의 기록	9
3. 실험용액 및 약물	10
4. 실험결과의 통계적 처리	11
III. 실험 결과	12
1. ICC에서 기록되는 전기적 활동도	12
2. 서파 및 향도잡이 전류에 대한 산화질소의 효과	12
3. 미토콘드리아 ATP-민감성 K^+ 통로에 대한 NO의 효과	13
4. NO의 향도잡이 전류에 대한 효과의 신호전달 기전	13
IV. 고 찰	22
V. 결 론	25
VI. 참고문헌	26

Legends for Figures

Figure 1. Typical traces of slow waves and pacemaker currents recorded in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 2. Effects of SNAP on slow waves in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 3. Effects of SNAP on spontaneous inward pacemaker currents in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 4. Effects of pinacidil on slow waves and spontaneous inward pacemaker currents in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 5. Effects of 5-HD, a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels blocker, in SNAP-induced responses and effects of diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels opener, on pacemaker currents in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 6. Effects of ODQ in SNAP-induced responses and effects of cell permeable 8-bromo-cGMP on pacemaker currents in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

Figure 7. Effects of KT-5823, a protein kinase G inhibitor, in SNAP-induced responses on pacemaker currents in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

ABSTRACT

Effects of NO-donor on electrical activity in intestinal pacemaker cells

By Jun Soo Kim

(Advisor: Prof. Jae Yeoul Jun, M.D., Ph.D)

Department of Medicine, Graduate School of Chosun University

To investigate the role of nitric oxide (NO) on the pacemaker activity and the signal mechanism in cultured interstitial cells of Cajal (ICC) of mouse small intestine whole cell patch-clamp techniques performed at 30°C. ICC generated slow waves in current clamp mode ($I=0$) and pacemaker currents at a holding potential of -70 mV in voltage clamping mode. (\pm)-S-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP; a NO donor) produced the membrane hyperpolarization and inhibited the amplitude and frequency of pacemaker currents and increased resting currents in the outward direction. These effects were blocked by glibenclamide (an ATP-sensitive K^+ channel blocker), but not 5-hydroxydecanoic acid (5-HD; a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel blocker). ATP-sensitive K^+ channels openers showed the mimicked action with SNAP and antagonized by glibenclamide. Pretreatment of ODQ (a guanylate cyclase inhibitor) almost blocked the NO-induced effects. Also, a cell permeable 8-bromo-cyclic GMP showed the mimicked action with SNAP. However,

KT-5823 (a protein kinase G inhibitor) did not block the NO-induced effects. These results suggest that NO inhibits pacemaker activity by the activation of ATP-sensitive K^+ channels via cyclic GMP dependent mechanism in intestinal ICC

Key Words: ATP-sensitive K^+ channels, Interstitial cells of Cajal, Nitric oxide, Pacemaker currents, Slow waves

I 서 론

위장관은 여러 종류의 다양한 세포들과 조직으로 구성되어 있으며 이 들은 소화, 흡수, 내분비 및 외분비, 운동성 기능을 담당하고 있다. 위장관 운동은 자발적 수축을 보이는데 이는 평활근 세포막 전압이 주기적으로 변화함으로써 발생되며 이를 서파 (slow waves)라 한다 (Szurszewski 1987). 서파는 위장관 부위 및 동물의 종에 따라 모양 및 빈도가 다르다. 예를 들어 사람의 위에서는 분당 3회, 십이지장에서는 분당 12회를 보이고 있다. 즉 서파는 평활근 수축의 빈도와 시기를 결정하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 서파는 상행성 흥분과 하행성 억제를 통하여 위장관 내용물을 항문방향으로 밀어내리는 연동운동에도 관여하고 있다. 따라서 서파의 이상은 바로 소화관 운동성 이상이 발생한다. 다양한 위장관 신경전달 물질, 호르몬 및 내인성 물질들이 서파의 빈도와 모양을 변화시킴으로서 위장관 운동을 조절하고 있다 (Olsson and Holmgren 2001). 서파의 발생 원인은 위장관 전장에 걸쳐 있는 interstitial cells of Cajal (ICC)의 존재 때문이다.

ICC는 위장관내 특수세포로 중간엽 (mesenchyme)에서 기원하며 위장관내 다른 세포들과는 달리 세포막에 receptor tyrosine kinase인 c-Kit를 가지고 있다 (Huizinga et al. 1995; Ward et al. 1994). 따라서 anti-c kit 항체를 사용하여 다른 세포로부터 ICC를 선택적으로 구분 하고 있으며 또한 유전학적 방법을 사용하여 그 역할을 밝히는데 이용되고 있다. ICC의 역할은 심장의 동방결절세포와 유사한 항도잡이 (pacemaker) 역할로서 자발적 내향성 전류 (spontaneous inward currents; pacemaker current)를 생성하여 서파를 발생 시킨다 (Koh et al. 1998; Thomsen et al. 1998). ICC는 평활근층에 존재하여 gap junction을 통해 서로 연결망을 형성하고 있으며 평활근과도 연결되

어 있다. 따라서 발생한 서파는 ICC 연결망을 통하여 coupled되며 또한 평활근으로 전파된다 (Sanders 1996). ICC는 또한 장관 신경계와 시냅스처럼 밀접하게 연결되어 있어 신경으로부터 평활근으로의 흥분성 및 억제성 신호전달과정을 매개하고 있다 (Burns et al. 1996; Wang et al. 2003; Ward et al. 2000; Ward and Sanders 2001). ICC에서 여러 신경전달 물질 및 내인성 인자들에 대한 수용체의 존재가 세포면역학적 방법과 생리학적 실험에 의해서 확인되었다 (Vannucchi et al. 1997; Sternini et al. 1997; Epperson et al. 2000; Burnstock and Lavin 2002; Jun et al 2004a; Choi et al. 2006). 또한 ICC의 기능 이상이 있거나 수적 감소하는 경우 임상적으로 운동성 질환이 초래되어진다 (Jain et al. 2003; Vanderwinden and Rumessen 1999). 따라서 ICC가 위장관 운동에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 위장관내 중요한 억제성 신경전달물질의 하나로서 분비시 평활근을 이완 시킨다 (Sanders 1992; eno et al. 2004). 또한 수술 후 장폐색증 (postoperative ileus)에서 보이는 운동성 이상에도 관련되어 있다. NO는 L-arginin으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성된다. 선택적으로 NOS를 억제하는 약물인 S-methylisothiurea를 투여한 경우 수술 후 장폐색증에서 소장 운동이 개선된다고 보고되어 있다(Uenoyama et al. 2004). NOS에 세포면역학적 반응을 보이는 신경말단이 ICC의 세포체와 밀접하게 연결되어 있으며(Ward and Sanders 2001) ICC가 NO를 매개하여 위장관 조직에서 억제성 효과를 나타내고 있다 (Nakamura et al. 2004; Salmhofer et al. 2001; Suzuki et al. 2003; Takeuchi et al. 2004) 또한 소장의 ICC 세포에서 NO가 자발적 내향성 전류를 억제하고 있다 (Koh et al. 2000). 게다가 ICC는 스스로 NOS를 함유하고 있다. 장관 신경에서 분비된 NO는 ICC에서 세포내 Ca^{2+} 를 증가시키며 이어 NOS가 활성화되어 NO 생성을 자극하여 평활근의 억제작용을 증폭시킨다(Publicova et al. 1993). ICC에

서 NOS에 대한 면역학적 반응은 위 결과들을 더욱 뒷받침한다(Vannucchi et al. 2002; Xue et al. 1994). 이러한 모든 실험 결과들은 NO가 ICC의 기능을 변화시켜 위장관 운동을 조절하고 있음을 강력히 시사한다.

그러나 NO가 ICC에 작용하고 있지만 ICC의 기능에 미치는 효과와 그 작용기전에 대해서는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 생쥐 소장에서 배양된 ICC에서 향도잡이 기능에 대한 효과와 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

II 실험방법

1. 사이질 세포의 배양

8-13일 된 Balb/C 생쥐를 암수구별 없이 실험동물로 사용하였다. Ether로 마취시킨 후 희생시킨 다음 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출하였다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate용액으로 채워진 준비용기 속에서 창자간막 가장자리 (mesenteric border)를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 윤상근을 노출시켰다. 분리된 소장근 조직을 collagenase (Worthington type II), 1.3mg/ml; bovine serum albumin(Sigma), 2mg/ml; trypsin inhibitor(Sigma), 2mg/ml; ATP, 0.27mg/ml 등이 들어 있고, Ca^{2+} 이 들어있지 않는 Hank's 용액에 옮긴 다음 37°C에서 20분간 항온 소화시킨 후, 진탕시켜 단일세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 유리 coverglass위에 분주하고, 10분 후에 stem cell factor(SCF, 5ng/ml, Sigma)와 2% antibiotic/antimycotic(Gibco)이 들어있는 SmGm (smooth muscle growth medium; Clonetics Corp)용액을 분주한 후 37°C(95% O_2 - 5% CO_2) 배양기에서 배양시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 2% antibiotic/antimycotic만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주었다. 실험은 배양 2일째 후부터 시행하였다. 배양된 ICC의 확인은 Kit 단백질에 대한 항체(ACK2, Gibco-BRL)를 사용하였으며 면역형광염색된 세포표본을 공초점주사현미경(FV300, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

2. 세포막 전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 항온 조절계에 옮긴 후 분당 2-3ml 속도로 세포외용액을 관류시켰다. Whole-cell patch clamp를 사용하여 배양된 ICC에서 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, 6.0, Axon Instruments)를 사용하였다. 세포막 전류는 -70mv의 유지전압에 고정하여 기록하였다. 막전압 고정실험에서 얻어진 결과는 Pclamp와 GraphPad Prizm(version 2.01, San Diego, CA, USA)을 이용하여 분석 처리하였다. 모든 실험은 30°C에서 시행하였다.

3. 실험용액 및 약물

세포외 관류용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM단위임): KCl 5, NaCl 135, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.2, glucose 10, HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]) 10이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. Ca²⁺-free 용액은 위 조성에서 CaCl₂만을 제거하였다. 전극내 용액의 조성은 다음과 같다 (각 수치는 mM단위임): KCl 140, MgCl₂ 5, K₂ATP 2.7, Na₂GTP 0.1, creatinine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1 이며 Tris를 첨가하여 PH가 7.2가 되도록 적정하였다.

실험에 사용한 약물은 다음과 같다. (±)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), glibenclamide, 8-bromo-cyclic GMP, ODQ, 5-hydroxydecanoic acid (5-HD), diazoxide, KT-5823. 모든 약물은 Sigma로부터 구입하였다.

4. 실험결과의 통계적 처리

실험결과는 평균값 \pm 표준오차 (mean \pm SE)로 표기하였으며, 필요한 경우에는 ANOVA 또는 paired Student's t-test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

III 실험결과

1. ICC에서 기록되는 전기적 활동도

배양한 후 c-kit 항체를 이용하여 ICC를 확인한 후 실험을 시행하였다. Current-clamping mode($I=0$)에서 ICC는 세포막 전압이 주기적으로 변화하는 서파를 발생시켰다 (Fig. 1a). 안정막 전압은 -57 ± 4 mV ($n=16$), 서파의 크기는 24 ± 3 mV를 보였다. Voltage-clamping mode에서 유지전압 -70 mV로 막전압을 고정하면 자발적인 내향성 전류인 향도잡이 전류가 기록된다 (Fig. 1b). 기록된 향도잡이 전류의 발생빈도는 분당 16 ± 3 회, 전류의 크기는 -410 ± 60 pA, 안정 전류는 -40 ± 34 pA ($n=19$)를 나타냈다.

2. 서파 및 향도잡이 전류에 대한 산화질소 (NO)의 효과

서파를 기록하면서 NO를 발생시키는 SNAP (10^{-4} M)를 투여하게 되면 막 전압의 과분극이 초래되고 서파의 크기가 현저히 감소하였다 (Fig. 2a). SNAP의 존재 하에서 안정막 전압은 -64.2 ± 2 mV로 과분극 되었으며 서파의 크기는 3 ± 1 mV를 나타냈다 (Fig. 2b & c) ($n=6$). SNAP에 의한 서파의 변화는 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 차단되었다. Glibenclamide(10^{-5} M)의 투여에 의해 서파의 크기(23 ± 2 mV) 및 안정막 전압 (-58 ± 3 mV)이 대조군 수준으로 회복되었다.

향도잡이 전류에 대해서 SNAP (10^{-4} M)은 자발적 내향성 전류의 크기 및 발생빈도를 억제하였으며 외향성 방향으로 전류를 활성화 시켰다 (Fig. 3a). SNAP의 존재 하에서 안정 전류의 크기는 120 ± 20 pA, 발생빈도와 자발적 전류의 크기는 각각 분당 2 ± 1 회, 30 ± 20 pA ($n=20$)을 보였다 (Fig.

3b-d). SNAP에 의한 향도잡이 전류의 변화 또한 glibenclamide에 의해서 차단되었다 (Fig. 3e). 이는 NO가 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화시킴을 시사한다. 따라서 이를 더욱 확증하기 위해 ATP-민감성 K^+ 통로 개방제인 pinacidil을 서파와 향도잡이 전류를 기록하면서 투여하였다. Pinacidil (10^{-5} M)은 SNAP가 동일한 작용을 보였으며 glibenclamide에 의해서 차단되었다 (Fig. 4a & b).

3. 미토콘드리아 ATP-민감성 K^+ 통로에 대한 NO의 효과

NO가 미토콘드리아 세포막에 존재하는 ATP-민감성 K^+ 통로를 통하여 서파 및 향도잡이 전류에 대한 효과를 나타내는 지 알아보하고자 미토콘드리아 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 5-hydroxydecanoic acid (5-HD)와 개방제인 diazoxide를 각각 투여하였다. 5-HD는 SNAP를 투여하기 전 10분 동안 전 처치하였다. 5-HD (5×10^{-4} M)는 SNAP에 의한 향도잡이 전류의 효과를 차단하지 못하였다 (Fig. 5a) (n=7). 또한 diazoxide (10^{-5} M)는 향도잡이 전류에 대해 아무런 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 5b) (n=6). 5-HD 존재 하에서 SNAP에 의한 안정전류는 128 ± 21 pA, 빈도와 전류의 크기는 각각 분당 5 ± 2 회, 29 ± 24 pA를 나타냈다.

4. NO의 향도잡이 전류에 대한 효과의 신호전달 기전

SNAP의 향도잡이 전류에 대한 효과가 cyclic GMP를 통하여 매개되는지를 알아보하고자 guanylate cyclase 억제제인 ODQ와 세포막을 투과할 수 있는 8-bromo-cGMP를 투여하였다. ODQ는 SNAP를 투여하기 전 10분 동안 전 처치하였다. ODQ (10^{-5} M)는 SNAP의 향도잡이 전류에 대한 효과를 크게

차단하였다 (Fig. 6a). ODQ 존재 하에서 SNAP (10^{-4} M)에 의한 안정전류의 크기는 -30 ± 20 pA, 빈도와 크기는 각각 분당 16 ± 2 회, 400 ± 40 pA를 보였다 (n=7). 이 값은 ODQ가 존재하지 않은 상태에서 SNAP만 투여하여 얻은 대조군과 유의성을 나타냈다. 또한 8-bromo-cGMP (10^{-4} M)를 투여한 경우 SNAP과 동일한 효과를 보였으며 glibenclamide에 의해서 차단되었다 (Fig. 6b). 8-bromo-cGMP의 존재 하에서 안정전류의 크기는 110 ± 20 pA, 빈도와 크기는 각각 분당 3 ± 1 회, 40 ± 18 pA를 보였다(n=7). 게다가 8-bromo-cGMP는 안정막 전압을 과분극 시켰으며 서파의 크기도 감소시켰다 (Fig. 6c) (n=6). 이러한 결과들은 NO가 cyclic GMP를 생성하여 효과를 나타냄을 시사한다.

다음은 NO가 cGMP를 생성한 후 protein kinase G (PKG)를 활성화 시키는 가를 알아보려고 PKG를 선택적으로 차단하는 약물인 KT-5823을 투여하였다. KT-5823 (10^{-5} M)는 SNAP를 투여하기 전 10분 동안 전 처치하였다. KT-5823은 SNAP의 향도잡이 전류에 대한 효과를 차단하지 못하였다 (Fig. 7a). KT-5823 존재 하에서 SNAP (10^{-4} M)에 의한 안정전류의 크기는 132 ± 36 pA, 빈도와 크기는 각각 분당 3 ± 1 회, 23 ± 20 pA를 보였다 (Fig. 7b-d) (n=7).

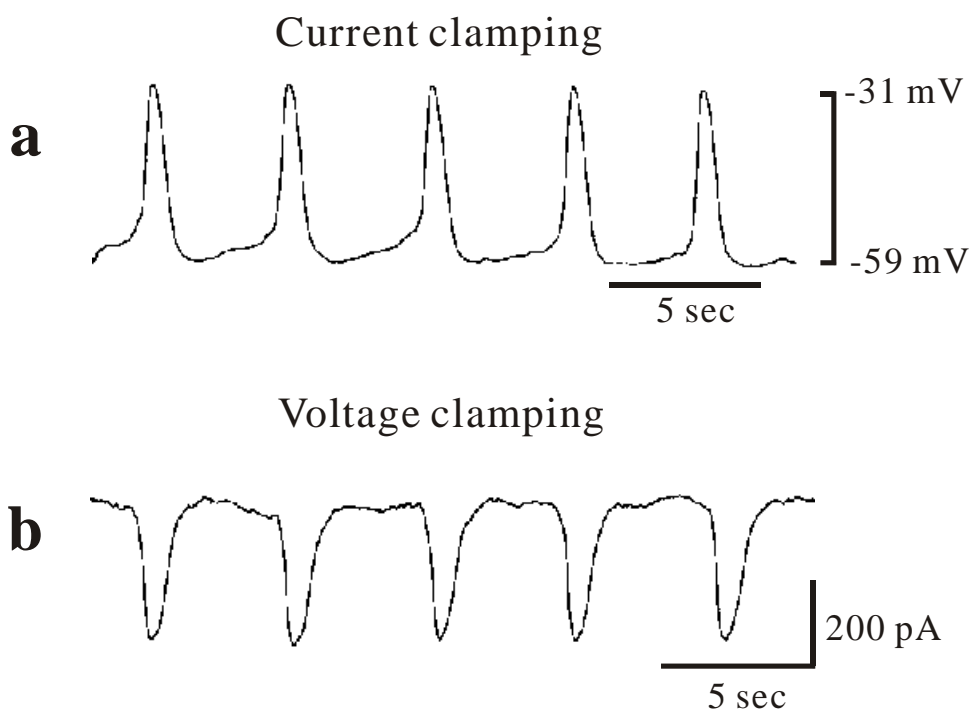


Figure 1. Typical trace of slow waves in current clamping mode (a) and spontaneous pacemaker currents in voltage clamping mode recorded at a holding potential of -70 mV (b) in cultured interstitial cells of Cajal from mouse small intestine.

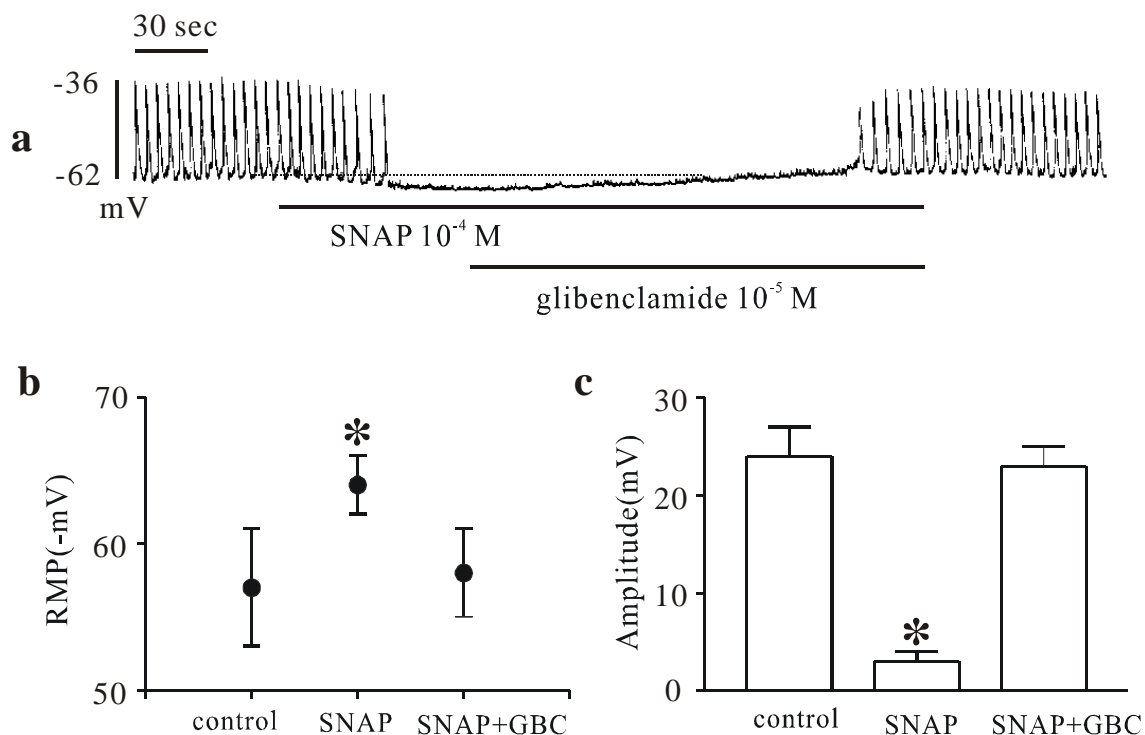


Figure 2. Effects of SNAP on slow waves in cultured ICC of mouse small intestine. (a) slow waves of ICC exposed to SNAP (10^{-4} M) in the current clamping mode ($I=0$). The SNAP produced membrane hyperpolarization and the decreased amplitude of slow waves were reversed by glibenclamide (10^{-5} M). Response to SNAP are summarized in (b) and (c). Bars represent mean values \pm s.e. *($P<0.05$), **($P<0.01$) Significantly different from the untreated control. GBC: glibenclamide.

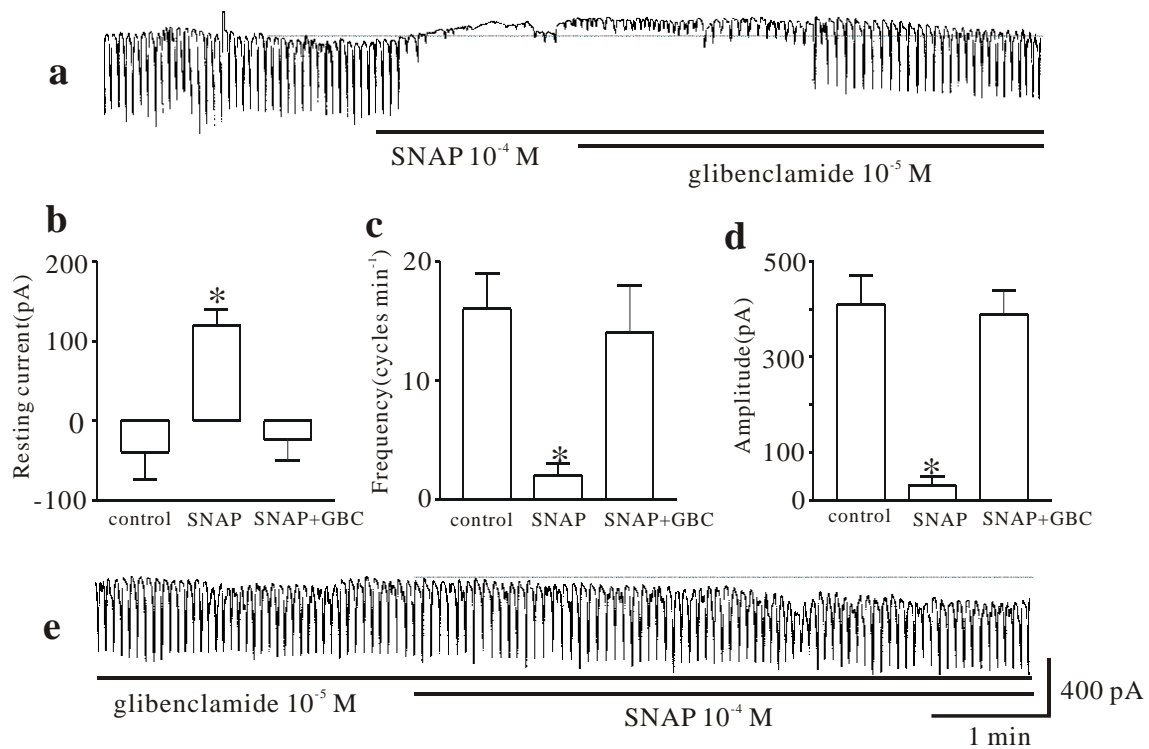


Figure 3. Effects of SNAP on spontaneous inward pacemaker currents in cultured ICC of mouse small intestine. (a) Pacemaker currents exposed to SNAP (10^{-5} M) at a holding potential of -70 mV. SNAP decreased the frequency and amplitude of the pacemaker currents, and increased the basal outward currents. These effects were reversed by adding glibenclamide (10^{-5} M). Response to SNAP are summarized in (b), (c), and (d). Bars represent mean values \pm s.e. *($P < 0.05$), **($P < 0.01$) Significantly different from the untreated control. (E) SNAP effects on pacemaker currents in the pretreatment of glibenclamide. The dot lines indicate the basal current levels. GBC: glibenclamide.

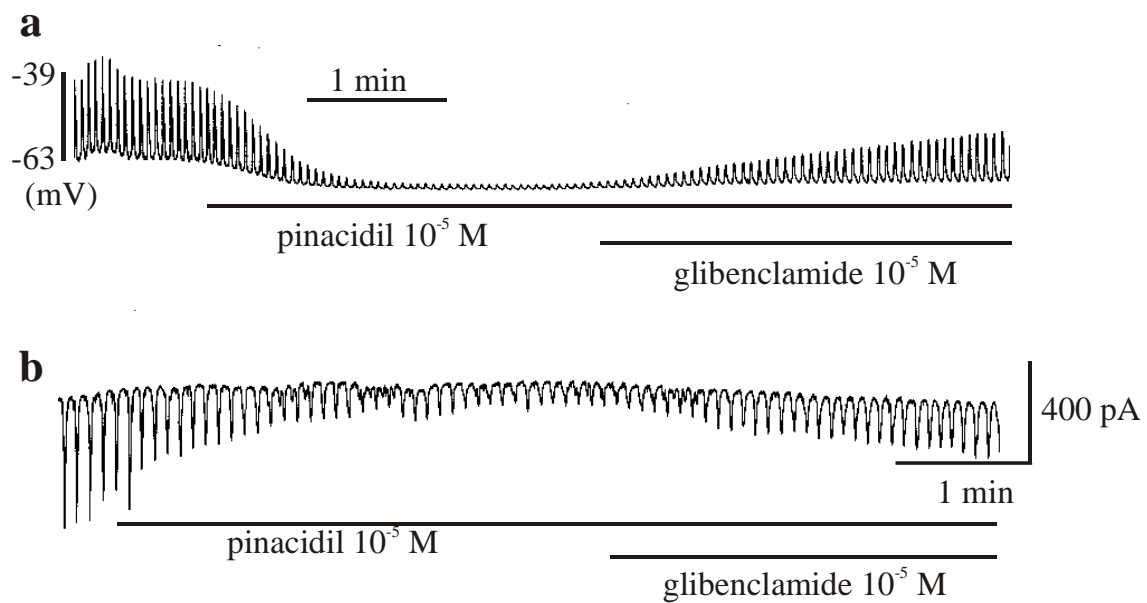


Figure 4. Effects of pinacidil on slow waves and spontaneous inward pacemaker currents. (a) slow waves of ICC exposed to pinacidil (10^{-5} M) in the current clamping mode ($I=0$). The pinacidil produced membrane hyperpolarization and the decreased amplitude of slow waves, which were reversed by glibenclamide (10^{-5} M). (b) Pacemaker currents exposed to pinacidil (10^{-5} M) at a holding potential of -70 mV. Pinacidil decreased the frequency and amplitude of the pacemaker currents, and increased the basal outward currents. These effects were reversed by adding glibenclamide (10^{-5} M).

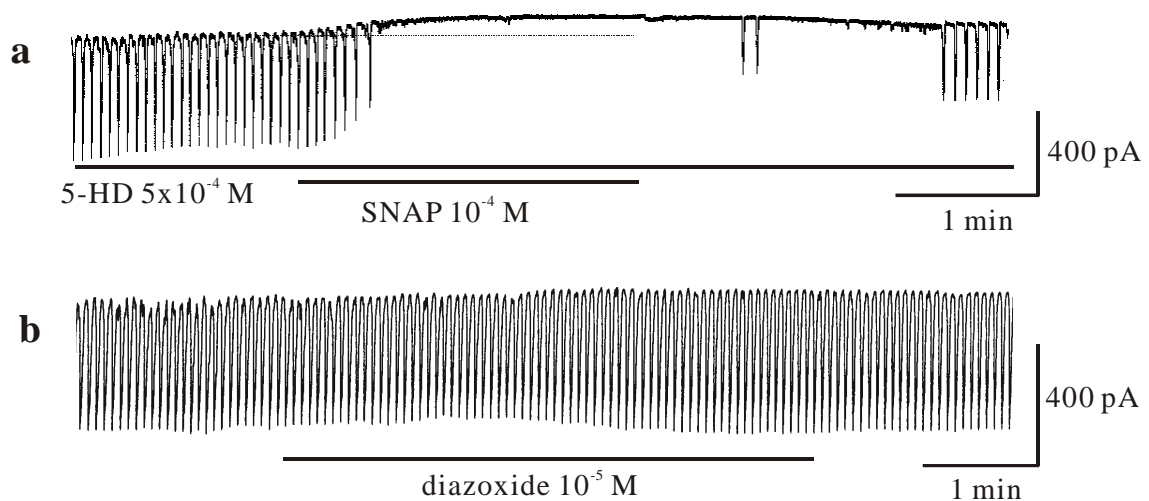


Figure 5. Effects of 5-HD, a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels blocker, in SNAP-induced responses and effects of diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels opener, on pacemaker currents in cultured ICC from mouse small intestine. (a) The SNAP produced basal outward currents and decreased amplitude or frequency of pacemaker currents, which were not reversed by 5-HD (5×10^{-4} M). (b) Diazoxide (10^{-5} M) had no effects on pacemaker currents.

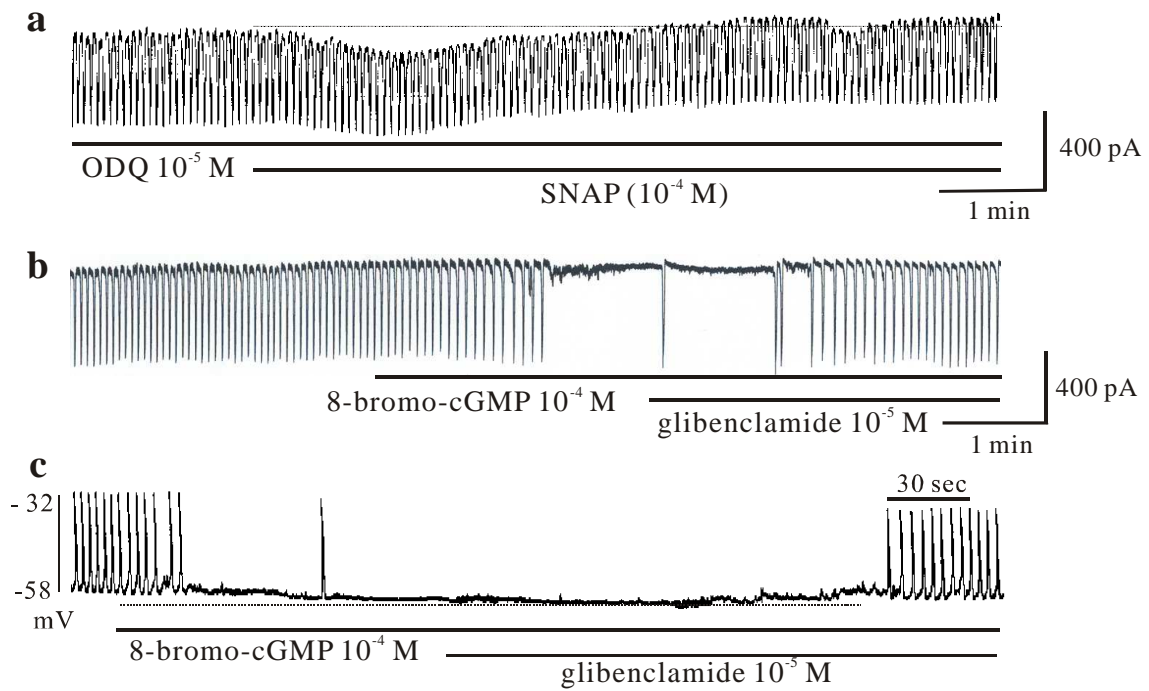


Figure 6. Effects of ODQ in SNAP-induced responses and effects of cell permeable 8-bromo-cGMP on pacemaker currents in cultured ICC from mouse small intestine. (a) ODQ (10^{-5} M) blocked the effect of SNAP (10^{-4} M) (b) 8-bromo-cGMP (10^{-4} M) decreased the frequency and amplitude of the pacemaker currents, and increased the basal outward currents. These effects were reversed by adding glibenclamide (10^{-5} M). (c) 8-bromo-cGMP (10^{-4} M) induced membrane hyperpolarization and the decreased amplitude of pacemaker potentials were reversed by glibenclamide (10^{-5} M). The dot lines indicate the basal current levels.

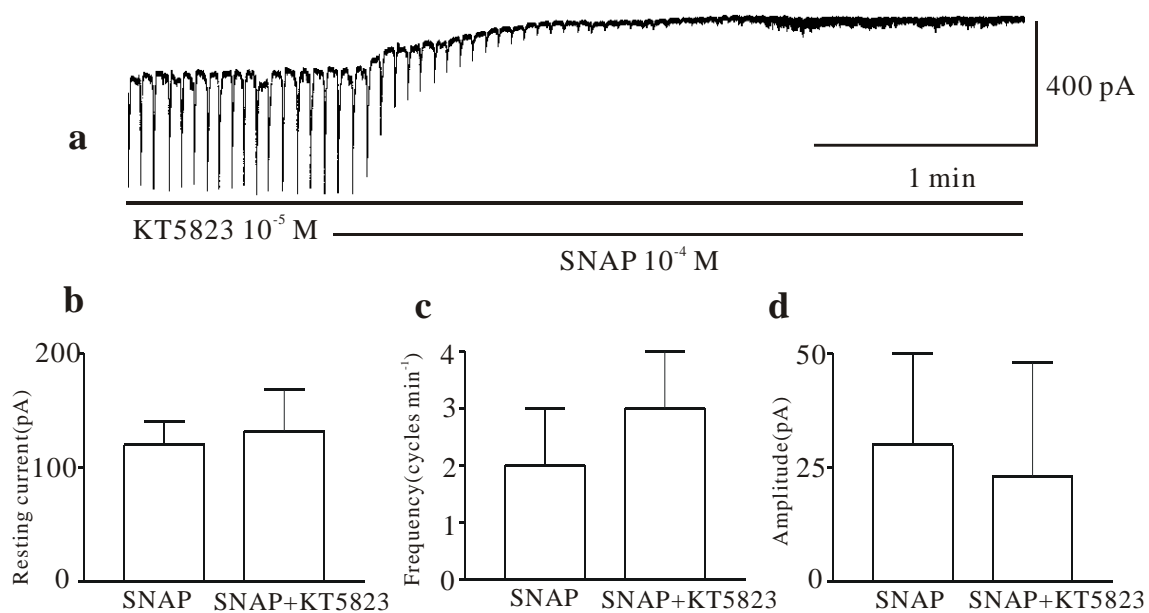


Figure 7. Effects of KT-5823, a protein kinase G inhibitor, in SNAP-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC from murine small intestine. (a) The SNAP produced basal outward currents and decreased amplitude or frequency of pacemaker currents in the pretreatment of KT-5823 (10^{-5} M). Response to SNAP in the pretreatment of KT-5823 are summarized in (b), (c), and (d). Bars represent mean values \pm s.e.

IV. 고찰

산화질소 (NO)는 위장관내 매우 중요한 억제성 신경전달물질이다. NO는 위장관 평활근의 안정막 전압의 과분극을 유발하고 서파의 빈도와 크기를 감소시켜 결과적으로 평활근의 이완을 초래한다 (Frank et al. 1997; Keef et al. 1997; Thornbury et al. 1991; Ward et al. 1992). 세포면역학적 방법에 의하면 NO를 포함하고 있는 신경말단이 ICC와 밀접하게 연결되어 있으며 (Wang et al. 2003; Ward and Sanders 2001) 또한 기능적으로 외부에서 투여한 NO는 조직에서 ICC 막전압의 과분극을 유발한다 (Kito and Suzuki 2003). 본 연구에서 NO를 발생시키는 SNAP를 배양된 소장 ICC 세포에 투여한 경우 안정막 전압의 과분극이 유발되었다. 세포막의 과분극은 세포막에 존재하는 K^+ 통로의 활성화와 밀접한 연관 관계가 있다. NO는 여러 평활근 세포에서 ATP-민감성 K^+ 통로를 포함하여 여러 K^+ 통로들을 활성화 시킨다 (Deka et al. 2004; Koh et al. 1995; Murphy and Brayden 1995). ATP-민감성 K^+ 통로는 안정막 전압을 유지시키며 생쥐 대장 평활근에서 기초적으로 활성화 되어 있다 (Koh et al. 1998). ATP-민감성 K^+ 통로의 억제는 막전압의 저분극을 유발시켜 세포의 흥분성을 증가시키는 반면 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화는 막전압의 과분극을 유발시켜 세포의 흥분성을 감소시킨다. 소장 ICC세포에 ATP-민감성 K^+ 통로 개방제를 투여한 경우 막전압의 과분극이 초래되고 향도잡이 전류의 발생 빈도와 전류의 크기가 감소되며 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 억제된다. 따라서 이러한 효과들은 ICC에도 ATP-민감성 K^+ 통로가 존재함을 시사한다 (Jun et al. 2004). 프로스타글랜딘 (PGE_2)는 ICC에서 EP_2 수용체를 통하여 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화 시키며 ATP-민감성 K^+ 통로의 분자구

조는 Kir 6.2 + SUR 2B로 구성되어 있음이 밝혀져 있다 (Choi et al. 2006). 본 연구에서 SNAP는 ATP-민감성 K^+ 통로 개방제와 같은 작용으로 막전압의 과분극을 유발하였고 향도잡이 전류의 발생빈도와 전류의 크기 감소와 더불어 외향성 전류의 발생이 초래되었으며 이러한 효과는 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 억제되었다. 이는 NO가 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화를 통하여 ICC의 향도잡이 활동도를 억제함을 나타낸다. 방광 평활근 (deka and Brading 2004), 혈관 및 심장근 (Kubo et al. 1994; Han et al. 2002)에서도 NO는 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화 시킨다고 보고되어 있어 본 실험 결과와 일치함을 보여주고 있다.

ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화는 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입의 억제 또는 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터의 Ca^{2+} 분비 억제를 통하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시킨다(Brayden 2002; Small et al. 1992). ICC의 향도잡이 전류의 발생은 세포내 Ca^{2+} 의 주기적인 변화에 의해서 이루어진다. 즉 ICC의 향도잡이 전류 발생이 내형질세망으로부터 inositol triphosphate (IP_3)를 통한 Ca^{2+} 분비가 이루어지고 이어서 미토콘드리아에 Ca^{2+} 이 유입되면서 이루어진다(Ward et al. 2000). PGE_2 는 소장 ICC에서 Ca^{2+} 의 농도를 감소시켰으며 이는 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화와 연결되어 있다 (Choi et al. 2006). 그러나 막전압 의존성 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine은 향도잡이 전류의 발생에는 아무런 효과를 나타내지 않는다(Jun et al. 2004b). 따라서 NO에 의한 향도잡이 전류 발생 억제는 Ca^{2+} 의 유입보다는 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 Ca^{2+} 의 분비를 억제하여 이루어지는 것으로 생각된다. Willams등 (2004)이 corpus cavernosum smooth muscle에서 NO가 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 Ca^{2+} 의 분비를 억제한다고 보고하였다.

NO의 세포내 주 신호 전달 기전은 guanylate cyclase를 활성화 시킨 다음

cGMP 생성을 증가시켜 매개된다. 생성된 cGMP는 이어서 protein kinase G (PKG)를 활성화 시킨다 (Lincoln et al. 1993). 그러나 일부 세포에서는 cGMP와는 무관하게 세포에 효과를 나타낸다고도 알려져 있다. NO는 혈관 평활근에서 직접 K^+ 통로를 활성화 시키고 (Bolotina et al. 1994) 위 또는 십이지장 평활근을 cGMP와는 무관하게 이완 시킨다 (Kitamura et al. 1992; Martins et al. 1995). 또한 신경에서는 NO가 cGMP 보다는 MAP kinase-의 의존성 기전을 통하여 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화시킨다 (Lin et al. 2004). 토끼의 요도 ICC에서는 NO가 cGMP/PKG 의존성으로 전기적 활동도를 억제하고 있다 (Sergeant et al. 2006). 본 연구에서 NO의 향도잡이 전류에 대한 효과가 guanylate cyclase 차단제인 ODQ에 의해서 억제되고 또한 세포막을 투과는 8-bromo-cGMP가 SNAP가 동일한 작용을 보였다. 따라서 소장 ICC에서의 NO의 작용이 cGMP를 통하여 이루어지고 있음을 알 수 있다. 대장 ICC에서 NO에 의해 cGMP가 증가된다고 보고되어있고 (Shuttleworth et al. 1993) 또한 cGMP 생성증가가 혈관 평활근에서 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화 시킨다고 보고되어 (Murphy and Brayden 1995) 있어 본 연구 결과와 일치됨을 보여주고 있다. 그러나 본 연구에서 PKG 억제인 KT-5823은 NO의 작용을 차단하지 못하여 PKG와는 무관하게 이루어 향도잡이 전류의 억제가 이루어짐을 시사하고 있다. 토끼 뇨도와 본 연구의 생쥐 소장 ICC에서의 PKG 차이는 정확히 알 수 없지만 요도와 소장의 전기적 활동도가 다르기 때문에 아마도 사용한 동물의 종이나 조직의 차이로 인해서 차이가 있는 것으로 생각된다.

결론적으로 NO는 ICC의 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화를 통하여 향도잡이 전류를 조절을 통해 소장의 운동을 조절하며 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화는 cGMP를 생성하여 이루어진다.

V. 결 론

본 연구는 소화관내 특수세포인 ICC에서 기록된 서파와 향도잡이 전류에 대한 NO의 효과와 작용기전을 규명하고자 생쥐 작은창자에서 배양된 ICC에서 세포막 전압 고정법을 시행하였다. ICC는 서파와 자발적인 내향성 전류인 향도잡이 전류를 발생하였다. NO 생성물질인 SNAP는 막전압의 과분극을 유발하였으며 서파의 크기를 감소시켰다. 또한 향도잡이 전류의 크기 및 발생빈도를 억제하였으며 동시에 외향성 전류를 발생시켰다. NO에 대한 효과는 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 억제된 반면 미토콘드리아 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 5-HD에 의해서는 억제되지 않았다. Guanylate cyclase 차단제인 ODQ는 NO의 작용을 억제하였으며 세포막을 투과할 수 있는 8-bromo-cGMP는 서파와 향도잡이 전류에 대해 SNAP과 동일한 작용을 보였으며 glibenclamide에 의해서 차단되었다. 그러나 protein kinase G 차단제인 KT-5823은 서파와 향도잡이 전류에 대해 NO의 작용을 억제하지 못 하였다. 이상의 실험결과들로부터 NO는 ICC에 작용하여 간접적으로 위장관 운동성을 조절하고 있으며 그 작용은 cGMP를 생성한 후 ICC의 세포막에 존재하는 ATP-민감성 K^+ 통로의 활성화를 통하여 향도잡이 전류를 조절함으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853.
- Brayden JE (2002) Clinical roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 312-316.
- 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.
- Burnstock G, Lavin S (2002) Interstitial cells of Cajal and purinergic signaling. *Autonomic Neuroscience* 97: 68-72.
- Choi S, Park DY, Yeum CH, Chang IY, You HJ, Park CK, Kim MY, Kong ID, So I, Kim KW, Jun JY (2006) Bradykinin modulates pacemaker currents through bradykinin B2 receptors in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Br J Pharmacol* 148: 918-926.
- Deka DK, Brading AF (2004) Nitric oxide activates glibenclamide-sensitive K^+ channels in urinary bladder myocytes through a c-GMP-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 492: 13-19.
- Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B (2000) Molecular components expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C529-C539.

- Frank H, Sweeney KM, Sanders KM, Shuttleworth CWR (1992) Effects of a novel guanylate cyclase inhibitor on nitric oxide-dependent inhibitory neurotransmission in canine proximal colon. *Br J Pharmacol* 122: 1223-1229.
- Han J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE (2002) ATP-sensitive K⁺ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 283: H1545-H1554.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995) W/k⁺ gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373: 347-349.
- Jain D, Khalid M, Manishi T, Joan CM, Deborah DP (2003) Role of Interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol* 98: 618-624.
- Jun JY, Choi S, Yeum CH, Chang IY, Park CK, Kim MY, Kong ID, So I, Kim KW, You HJ (2004a). Noradrenaline inhibits pacemaker currents through stimulation of beta 1-receptors in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine. *Br J Pharmacol* 141: 670-7.
- Jun JY, Choi S, Yeum CH, Chang IY, You HJ, Park CK, Kim MY, Kong ID, Kim MJ, Lee KP, So I, Kim KW (2004) Substance P induces inward current and regulates pacemaker currents through tachykinin NK1 receptor in cultured interstitial cells of Cajal of murine small intestine. *Eur J Pharmacol* 495: 35-42.
- Jun JY, Choi S, Chang IY, Yoon CK, Jeong HG, Kong ID, So I, Kim KW, You HJ (2005) Deoxycholic acid inhibits pacemaker currents by activating ATP-dependent K⁺ channels through prostaglandin E₂ in

- interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Br J Pharmacol* 144: 242-251.
- Keef KD, Murray DC, Sanders KM, Smith TK (1997) Basal release of nitric oxide induces an oscillatory motor pattern in canine colon. *J Physiol* 499: 773-86.
- Kitamura K, Lian Q, Carl A, Kuriyama H (1993) S-nitrocytein, but not sodium nitroprusside, produces apamin-sensitive hyperpolarization in rat gastric fundus. *Br J Pharmacol* 109: 415-423.
- Kito Y, Suzuki H (2003) Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J Physiol* 553: 803-818.
- Koh SD, Bradley KK, Rae 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, Campbell JD, Carl A, Sanders KM (1995) Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol* 489: 735-747.
- Koh SD, Kim TW, Jun JY, Glasgow NJ, Ward SM, Sanders KM (2000). Regulation of pacemaker currents in interstitial cells of Cajal from murine small intestine by cyclic nucleotides. *J Physiol* 527: 149-162.
- 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.
- Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, Saito K, Kuroda Y (1994) Atrial natriuretic or and isosorbide dinitrate modulate the gating of

- ATP-sensitive K⁺channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res* 74: 471-476.
- Lin YF, Raab-Graham K, Jan YN, Jan LY (2004) NO stimulation of ATP-sensitive potassium channels: Involvement of Ras/mitogen-activated protein kinase pathway and contribution to neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci* 101: 7799-7804.
- Lincoln TM, Cornwell TL (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB* 7: 328-338.
- Martins SL, De Oliveira RB, Ballejo G (1995) Rat duodenum nitrenergic-induced relaxations are cGMP-independent and apamin-sensitive. *Eur J Pharmacol* 284: 265-270.
- Murphy ME, Brayden JE (1995). Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* 486:47-58.
- Nakamura E, Lee KP, So I, Kim KW, Suzuki H (2004) Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on electrical responses of circular smooth muscle isolated from the guinea-pig stomach antrum. *J Smooth Muscle Res* 40: 183-98.
- Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol* 128: 481-503.
- Publicova NG, Hammond EM, Sanders KM (1993) Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proc Natl Acad Sci* 90: 2087-2091.
- Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, Huber A, Russwurm M, Allescher HD (2001). Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric

- oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence. *Cell Tissue Res* 305: 331-340.
- Sanders KM (1996) A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111:492-515.
- Sanders KM, Ward SM (1992) Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262: G379-G392.
- Sergeant GP, Johnston L, McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA (2006) Activation of the cGMP/PKG pathway inhibits electrical activity in rabbit urethral interstitial cells of Cajal by reducing the spatial spread of Ca^{2+} waves. *J Physiol* 574: 167-81.
- Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM, de Vent J, Sanders KM (1993) Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: response to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56: 513-522.
- Small RC, Berry JL, Foster RW (1992). Potassium channel opening drugs and the airways. *Braz J Med Biol Res* 25:983-998.
- Sternini C, Wong H, Wu SV, De Giorgio R, Yang M, Reeve J Jr, Brecha NC, Walsh JH (1997) Somatostatin_{2A} receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 386: 393-408.
- Suzuki H, Ward SM, Bayguinov YR, Edwards FR, Hirst GDS (2003) Involvement of intramuscular interstitial cells in nitrenergic inhibition in

- the mouse gastric antrum. *J Physiol* 546:751–763.
- Szurszewski JH (1987) Electrical basis for gastrointestinal motility. In: Johnson LR (2nd eds) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp 383–422.
- Takeuchi T, Fujinami K, Fuzita A, Okishio Y, Takewaki T, Hata F (2004) Essential role of the interstitial cells of Cajal in nitric oxide-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse ileum. *J Pharmacol Sci* 95: 71–80.
- 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: 848–51.
- Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM (1991) Nitric oxide and nitrosocystein mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 261: G553–G557.
- Ueno T, Duenes JA, Zarroug AE, Sarr MG (2004) Nitrenergic mechanisms mediating inhibitory control of longitudinal smooth muscle contraction in mouse small intestine. *J Gastrointest Surg* 8: 831–41.
- Uenoyama S, Kobayashi T, Takeuchi Y, Yamashita K, Koide Y, Kazui T (2004) Improvement of intestinal motility using S-methylisothiourrea in postoperative ileus. *Am J Sur* 187: 93–97.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ (1999) Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Micros Res Tech* 47: 344–360.
- Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, Faussone-Pellegrini MS (2002) Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon

- express several nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett.* 326: 191-195.
- Vannucchi MG, De Giorgio R, Faussone-Pellegrini MS (1997) NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachykinins distribution in rat ileum during development. *J Comp Neurol* 383: 153-162.
- 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: 531-43.
- 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: 1393-403.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM (1994) Mutation of proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 480: 91-97.
- Ward SM, Dalziel HH, Bradley ME, Buxton, IL, Keef K, Westfall DP, Sanders KM (1992) Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br J Pharmacol* 107: 1075-1082.
- Ward SM, Ordog T, Koh SD, Baker A, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM (2000) Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 525: 355-361.
- Ward SM, Sanders KM (2001) Interstitial cells of Cajal: primary Targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 262:125-135.

Williams BA, Liu C, De Young L, Brock GB, Sims SM (2005) Regulation of intracellular Ca^{2+} release in corpus cavernosum smooth muscle: synergism between nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C650–C658.

Xue C, Pollock J, Schmidt HHHW, Ward SM, Sanders KM (1994) Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 49: 1–14.