

2008年 2月

博士學位 論文

생쥐 소장에서 분리된
*Interstitial Cells of Cajal*에 대한
*Sphingosine Mono-Phosphate*의
작용 및 기전

장 운동성에 대한 *Sphingosine Mono-Phosphate*의
기능적 연구

조선대학교 대학원

의학과

한경택

생쥐 소장에서 분리된
*Interstitial Cells of Cajal*에 대한
*Sphingosine Mono-Phosphate*의
작용 및 기전

장 운동성에 대한 *Sphingosine Mono-Phosphate*의
기능적 연구

*Effects of Sphingosine Mono-Phosphate on Pacemaker
Activity in Interstitial Cells of Cajal from Murine
Small Intestine*

2008년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

한경택

생쥐 소장에서 분리된
*Interstitial Cells of Cajal*에 대한
*Sphingosine Mono-Phosphate*의
작용 및 기전

장 운동성에 대한 *Sphingosine Mono-Phosphate*의
기능적 연구

지도교수 김 만 우

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2007년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

한 경 택

한경택의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박찬국

위 원 조선대학교 교수 홍순표

위 원 조선대학교 교수 전제열

위 원 조선대학교 교수 최 석

위 원 조선대학교 교수 김만우

2007년 12월

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

<i>ABSTRACT</i> - - - - -	1
<i>I. 서 론</i> - - - - -	3
<i>II. 실험 방법</i> - - - - -	6
<i>III. 결 과</i> - - - - -	8
<i>IV. 고 찰</i> - - - - -	24
<i>V. 결 론</i> - - - - -	28
참고 문헌 - - - - -	29

ABSTRACT

Effects of Sphingosine Mono-Phosphate on Pacemaker Activity in Interstitial Cells of Cajal from Murine Small Intestine

Han Kyoung-Taek

Advisor : Prof. Kim Man-Woo Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Several reports demonstrated the diverse action of Sphingosine mono-phosphate (S1P) at the level of many tissues or single cell. Especially, actions on S1P receptors showed several effects in neuronal and non-neuronal systems.

The functional study was investigated to determine whether S1P modulates pacemaker currents generated in interstitial cells of Cajal (ICC) of murine small intestine by using a whole cell patch clamp techniques at 30 °C.

Externally applied S1P produced membrane depolarization in the current-clamp mode and increased tonic inward pacemaker currents in the voltage-clamp mode. Pretreatment of suramin did not block the S1P-induced effects on pacemaker currents. And externally applied SEW-2871 and FTY-720 did not have function on pacemaker currents. However, pretreatment of JTE-013 blocked the action of S1P on pacemaker currents. External Na^+ -free solution abolished the generation of pacemaker currents and inhibited the S1P-induced tonic inward currents.

Furthermore, the pretreatment with Ca^{2+} -free solution and thapsigargin abolished the generation of pacemaker currents and suppressed the S1P-induced action on ICC.

These results suggest that S1P modulates the pacemaker activities through S1P_2 receptor activation in ICC by external Ca^{2+} influx and internal Ca^{2+} release. Therefore, the ICC are target for S1P and their interaction can affect intestinal motility.

I. 서론

위장관의 운동은 잘 알려져 있듯이 수많은 요인들에 의해 결정된다. 예로서 교감신경, 부교감 신경 등으로 대변되는 extrinsic nervous system, 위장관 자체의 intrinsic nervous system, endocrine 및 paracrine system 등이 관여한다. 그리고 이 외에도 위장관 자체의 자율적인 요소, 즉, 위장관 평활근의 자발적 활동도와 마지막으로 카할 간질세포(Interstitial cells of Cajal, 이하 ICC로 기술)가 관여한다.

오래전부터 위장관의 평활근에서 자율적으로 발생하는 규칙적 수축운동(rhythmic contraction)은 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(depolarization) 과정이 low frequency, long duration으로 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 15여년 간 동물 모델(mouse, guinea pig, canine 등)을 중심으로 한 집중적인 연구를 통해 위, 소장, 그리고 대장에서 전형적인 phasic 활동을 나타내는 평활근에서의 pacemaker 역할은 ICC에서 기원한다는 사실이 밝혀졌다(Sanders, 1996). 이들 ICC는 non-neuronal, mesenchymal origin의 세포로서 3차원적인 network를 형성하고 있으며, species나 위장관의 위치에 상관없이 유사한 구조를 가지고 분포한다. 이들 ICC는 proto-oncogene인 c-kit 유전자를 발현하고 있는데(Ward 등, 1994), 잘 알려져 있듯이 이 유전자의 산물인 Kit receptor는 세포막에서 tyrosine kinase receptor로 작용한다. ICC가 c-kit를 발현하고 있기 때문에 조직내에서 ICC를 확인하는 데에는 c-kit에 대한 항체를 활용한 면역 조직학적 기법이 활용된다(Ward 등 1995). ICC의 역할은 심장의 동방결절세포와 유사한 향도잡이

(pacemaker) 역할로서 자발적 내향성 전류 (spontaneous inward currents; pacemaker currents)를 생성하여 서파를 발생시킨다(Koh 등, 1998a; Thomsen 등, 1998). ICC는 평활근층에 존재하여 gap junction을 통해 서로 연결망을 형성하고 있으며 평활근과도 연결되어 있다. 따라서 발생한 서파는 ICC 연결망을 통하여 연결되어 있으며 또한 평활근으로 전파된다(Sanders, 1996). ICC는 또한 장관 신경계와 시냅스처럼 밀접하게 연결되어 있어 신경으로부터 평활근으로의 흥분성 및 억제성 신호전달과정을 매개하고 있다(Burns 등, 1996; Wang 등, 2003; Ward 등, 2000; Ward와 Sanders, 2001). 이와 같은 연구결과들은 위장관 운동에 있어서 ICC의 중요성이 매우 크다는 것을 보여주고 있다.

Sphingosine 1-phosphate(이하 S1P로 기술)는 세포 성장, 분화, 생존 및 이동과 같은 다양한 생물학적 작용을 가지고 있다고 알려져 있다(Ammit 등, 2001; Cuvillier 등, 1996; Liu 등, 2000; Malek 등, 2001). S1P는 ceramide의 인체내 대사 과정을 통해 만들어 지는 sphingosine의 인산화 과정에 통해 만들어진다(Pyne, 2002; Spiegel과 Milstien, 2002). Sphingosine의 인산화는 다양한 species에서 Sphingosine kinase 1과 2 두가지 효소를 통해 유도되어 진다 (Kohama 등, 1998; Liu 등 2000). 더불어 세포내 S1P의 농도는 SPK뿐만 아니라 S1P-specific phosphatase와 lyase에 의해 조절되어 진다고 알려져 있다(Le 등, 2002; Olivera와 Spiegel, 2001). 실제로 S1P의 세포내 농도는 미비하지만, 성장인자 (예로 platelet-derived growth factor, nerve growth factor, epidermal growth factor), 사이토카인 그리고 G 단백질 연결 수용체 길항제와 같은 다양한 물질을 통하여 일순간에 증가를 야기 시킬 수 있다(Hobson 등, 2001; Meyer 등, 2001; Payne 등, 2002).

비록 특징적인 세포내 target은 아직 밝혀지진 않았지만, 현재까지 S1P는 세포내 신호전달물질로서의 역할을 담당하고 있다고 여겨지고 있다. 최근 endothelial differentiation gene (EDG) family중 G 단백질 연결 수용체와 S1P가 상호 작용 하

는 것으로 초점이 맞추어져 있다. 많은 EDG 수용체중 5가지의 수용체가 S1P에 의해 활성화 되는데, 이를 토대로 S1P는 5가지 수용체로 구분되어 진다.(S1P₁ ~ S1P₅). S1P₁, S1P₂, S1P₃ 수용체는 인체내에 다양하게 분포되어 있으며, S1P₄ 수용체는 lymphoid와 hematopoietic 세포에 그리고 S1P₅ 수용체는 glial 세포에 존재한다(Kluk과 Hla, 2002; Payne 등, 2002; Pyne, 2002).

아직까지 위장관에서 S1P 수용체의 존재 유무 및 S1P 수용체를 통한 신호전달 방법에 대해서 거의 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구는 생쥐 소장에서 배양된 ICC에서 S1P의 향도잡이 역할에 대한 효과와 그 작용 수용체, 그리고 작용기전을 밝히고자 한다.

II. 실험 방법

1. ICC 세포의 배양

3-7일 된 ICR 생쥐를 암수구별 없이 실험동물로 사용하였다. Ether로 마취시킨 후 희생시킨 다음 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장 부위를 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), 1.3 ml/ml; bovine serum albumin (Sigma), 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 °C에서 20분간 항온 소화시킨 후, 진탕시켜 단일 세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 유리 coverglass위에 분주하고, 10분 후에 stem cell factor (SCF, 5 ng/ml, Sigma)와 2 % antibiotic/antimycotic (Gibco)이 들어 있는 SmGm (smooth muscle growth medium; Clonetics Corp) 용액을 분주 한 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 단백에 대한 항체 (ACK2, Gibco-BRL)를 사용하였으며 면역형광염색된 세포표본을 공초점주사 현미경 (FV300, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

2. 세포막 전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 항온 조절계에 옮긴 후 분당 2-3 ml 속도로 세포외 용액을 관류

시켰다. 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

세포의 관류용액의 조성은(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 CaCl₂ 만을 제거하였다. 전극내 용액의 조성은(수치는 mM단위임) KCl 140, MgCl₂ 5, K₂ATP 2.7, Na₂GTP 0.1, creatinine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다.

실험에 사용된 약물은 Sphingosine 1-phosphate, suramin, SEW-2871, FTY-720, thapsigargin, flufenamic acid이며, 모든 약물은 Sigma로부터 구입하였다.

4. 실험결과의 통계적 처리

실험결과는 평균 ± 표준오차 (mean ± S.E)로 표기하였으며, 필요한 경우에는 ANOVA 또는 paired student's t-test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

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 향도잡이 전압을 발생시켰다(Fig. 1a). 안정막 전압은 -57 ± 8 mV ($n=6$), 서파의 크기는 32 ± 8 mV를 보였다 ($n=6$). Voltage-clamping mode에서 유지전압 -70 mV로 막전압을 고정하면 자발적인 내향성 전류인 향도잡이 전류가 기록된다(Fig. 1b). 기록된 향도잡이 전류의 발생빈도는 분당 15.4 ± 1.5 회, 전류의 크기는 -482 ± 48 pA, 안정 전류는 -27 ± 19 pA ($n=5$)를 나타냈다.

2. ICC에서 기록되는 향도잡이 전압 및 전류에 대한 S1P의 효과

배양된 ICC에 투여한 S1P ($1 \mu\text{M}$)는 세포막 전압의 탈분극 (depolarization)과 함께 향도잡이 전압의 크기를 감소시켰다(Fig. 2a). 이 실험에서 안정막 전압은 대조군의 -52 ± 2 mV에서 S1P 투여시 -24 ± 3.9 mV로 변화하였다. 또한 향도잡이 전압의 크기는 대조군의 29.8 ± 6.2 mV에서 S1P 투여시 9.2 ± 1.8 mV로 변화하였다($n=8$; fig. 2b and c). 또한 향도잡이 전류에 대해서 긴장성 내향성 전류를 활성화 시켰고 향도잡이 전류의 발생빈도 및 크기는 감소시켰다(Fig. 3a). 유지전압 -70 mV에서 S1P ($1 \mu\text{M}$)에 의해 활성화된 안정 전류는 -340.6 ± 12.6 pA이고 감소된 전류의 발생빈도와 크기는 6.8 ± 1.8 회, -68.5 ± 26.6 pA였다(Fig. 3b and c).

3. ICC에서 기록되는 향도잡이 전류에 대한 S1P의 농도 의존적 효과

앞선 실험에서 S1P는 향도잡이 전류에 대해서 긴장성 내향성 전류를 활성화 시켰고 향도잡이 전류의 발생빈도 및 크기를 감소시켰다. S1P의 향도잡이 전류에 대한 효과가 농도 의존성을 가지는지 실험하고자 다양한 농도 (0.1, 0.5, 1 μ M)의 S1P를 ICC에 투여하였다. 0.1 및 0.5 μ M의 S1P를 투여시 ICC에서 발생하는 향도잡이 전류에 대해 역시 긴장성 내향성 전류를 활성화 시켰지만, 1 μ M의 효과만큼 크게 나타나지 않고 약하게 그 효과가 발생하였다. 특히 긴장성 내향성 전류는 발생하지만, 향도잡이 전류에 대한 발생빈도 및 크기의 감소는 거의 미약한 수준을 보여주었다(Fig. 4a and b). 하지만, 1 μ M 농도 이상의 S1P의 투여시 강한 내향성 전류를 활성화 시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 4c). 본 실험에 대한 결과는 Fig. 5a, b and c와 같이 요약되었다(n=5). 이와 같은 결과는 ICC에서 발생하는 향도잡이 전류에 대한 S1P의 효과가 농도 의존적으로 작용하는 것을 알 수 있었다.

4. ICC에 분포하는 S1P 수용체에 대한 연구

현재까지 알려진 S1P 수용체는 크게 5가지로 구분되어 진다(S1P₁ - S1P₅ receptors). ICC에서 발생하는 향도잡이 전류에 대한 S1P의 효과가 어떤 수용체를 통하여 이루어지는 밝혀내기 위해 다양한 S1P 수용체의 작동제 및 길항제를 사용하였다. ICC에서 발생하는 정상상태의 향도잡이 전류에 S1P₃ 수용체 길항제인 suramin (1 μ M)을 전처리 한 후, S1P를 투여한 결과 향도잡이 전류에 대한 S1P의 긴장성 내향성 전류는 여전히 보여주었다(Fig. 6a). 또한 S1P₁ 수용체에 대한 특징적으로 작용하는 작동제인 SEW-2871 (1 μ M) 역시 ICC에서 발생하는 향도잡이 전류에 큰 영향을 주지 못하였다(Fig. 6b). 한 수용체에 특징적이지는 않지만 S1P₁, S1P₃, S1P₄, 그리고 S1P₅에 강력한 작동제로 작용하는 FTY-720 (1 μ M)은 ICC에

서 발생하는 향도잡이 전류에 효과를 발휘하지 못하였다(Fig. 6c). 이와 같은 결과는 ICC에 S1P₂ 수용체가 존재할 가능성을 제시하여 S1P₂ 수용체 길항제인 JTE-013 (10 그리고 20 μM)을 전처리 한 후, S1P를 투여한 결과 S1P에 의하여 발생하는 긴장성 내향성 전류가 사라지는 것을 알 수 있었다(Fig. 7a and b).

5. S1P에 의해 발생하는 긴장성 내향성 전류에 대한 G 단백질의 기능

ICC에서 발생하는 향도잡이 전류에 대한 S1P의 효과가 G 단백질과의 연관성을 보이는지 확인하고자 GTP binding 단백질을 불활성화 시키는 a nonhydrolyzable guanosine 5'-diphosphate analogue인 GDPβS를 이용해 검증해 보았다. Patch-clamp용 유리피펫에 GDPβS (10 mM)을 투여한 결과, S1P는 여전히 긴장성 내향성 전류를 발생시켰다(Fig. 8a). GDPβS가 피펫에 있는 상태에서 안정막 전류는 -23 ± 8 pA였고, 이후 S1P를 투여한 결과 안정막 전류는 대조군과 비슷한 결과인 -498.7 ± 47 pA를 보여주었다. 또한 정상 대조군에서 보여주었던 S1P의 향도잡이 빈도 및 크기도 GDPβS가 존재하는 상태에서도 거의 차이를 보이지 않았다(Fig. 8b, c, and d; n=4).

6. Na⁺-free 용액 및 flufenamic acid의 S1P 효과에 대한 역할

S1P에 의해 발생하는 긴장성 내향성 전류에 대한 특징을 확인해 보고자 비선택적 양이온 통로 길항제인 flufenamic acid와 Na⁺-free 용액을 사용해 보았다. Na⁺-free 용액을 ICC에 투여한 결과 자발성 향도잡이 전류가 사라지는 것을 알 수 있었고, 또한 이 상태에서 S1P를 투여 하였을 경우, S1P에 의해 나타나는 긴장성 내향성 전류가 나타나지 않은 것을 알 수 있었다(Fig. 9a). Na⁺-free 용액이 있는 상태에서 S1P에 의해 유도되는 안정막 전류는 -24 ± 7 pA를 보여주었고, 이 수치

는 대조군 상태에서의 것과 비교 하였을 때 유의성 있는 차이를 보여주었다(Fig. 9b; n=4). 또한 flufenamic acid (10 μ M)를 ICC에 처리하였을 경우, 역시 자발성 향도잡이 전류가 사라지는 것을 알 수 있었고 이 상태에 투여된 S1P 역시 그 효과를 발휘하지 못하였다(Fig. 10a). Flufenamic acid의 존재하에 S1P의 효과에 의한 안정막 전류는 -21 ± 8 pA로서, 이 수치 역시 대조군 상태에서의 것과 비교하였을 때 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 10b; n=4).

7. S1P의 효과에 대한 세포외 Ca^{2+} -free 용액과 endoplasmic reticulum의 Ca^{2+} -ATPase 억제제의 역할

세포내와 세포외 Ca^{2+} 의 역할을 확인해보고자 endoplasmic reticulum의 Ca^{2+} -ATPase 억제제인 thapsigargin과 Ca^{2+} -free 용액하에 S1P의 효과를 확인해보았다. 유지전압 -70 mV에서 ICC로부터 발생되는 향도잡이 전류는 Ca^{2+} -free 용액에 의해 사라지는 것을 확인할 수 있었고, 이 상태에서 처리된 S1P는 그 효과가 사라지는 것을 알 수 있었다(Fig. 11a). 요약된 수치에서도 S1P효과는 정상 농도 Ca^{2+} 용액의 안정막 전류와 비교 하였을 때 유의성 있게 차단하는 것을 보여 주었다(Fig. 11b; n=4). 더불어, thapsigargin의 경우 역시 S1P의 효과를 차단하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 12a and b; n=4).

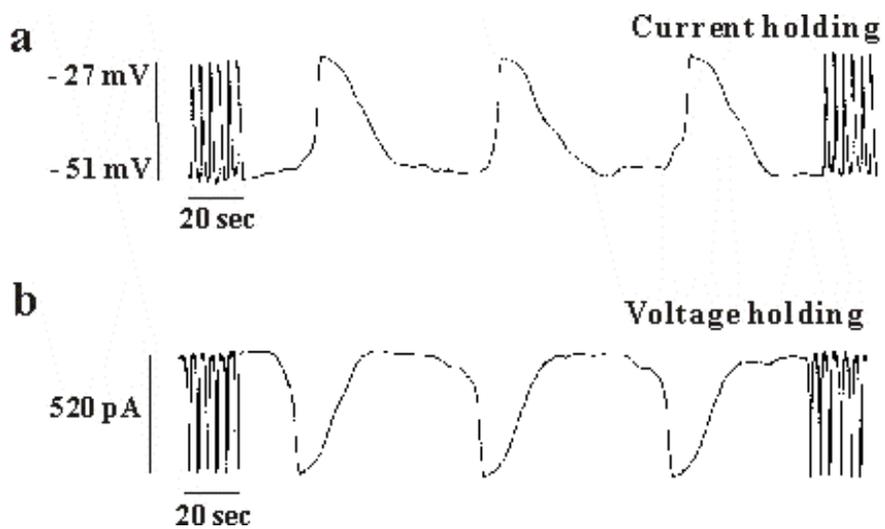


Figure 1. Typical trace of pacemaker potentials in current clamping mode (a) and spontaneous pacemaker currents in voltage clamping mode recorded at a holding potential of -70 mV (b) in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine.

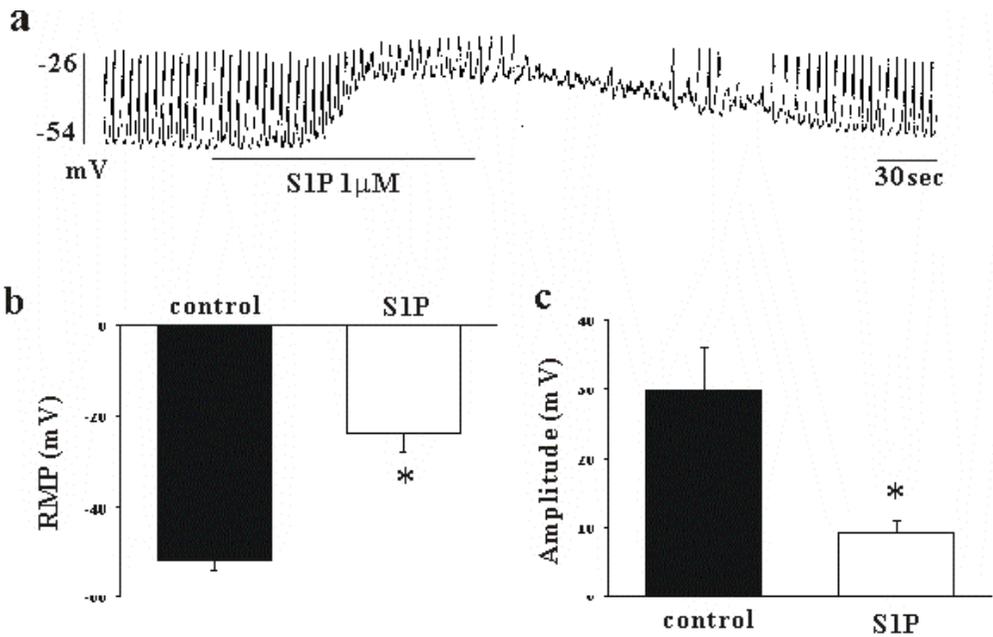


Figure 2. Effects of S1P on pacemaker potentials in culture ICC of murine small intestine. (a) Pacemaker potentials of ICC exposed to S1P (1 μ M) in the current clamping mode ($I=0$). Response to S1P are summarized in (b) and (c). Bars represent mean values \pm S.E. *($P<0.01$) Significantly different from the untreated control.

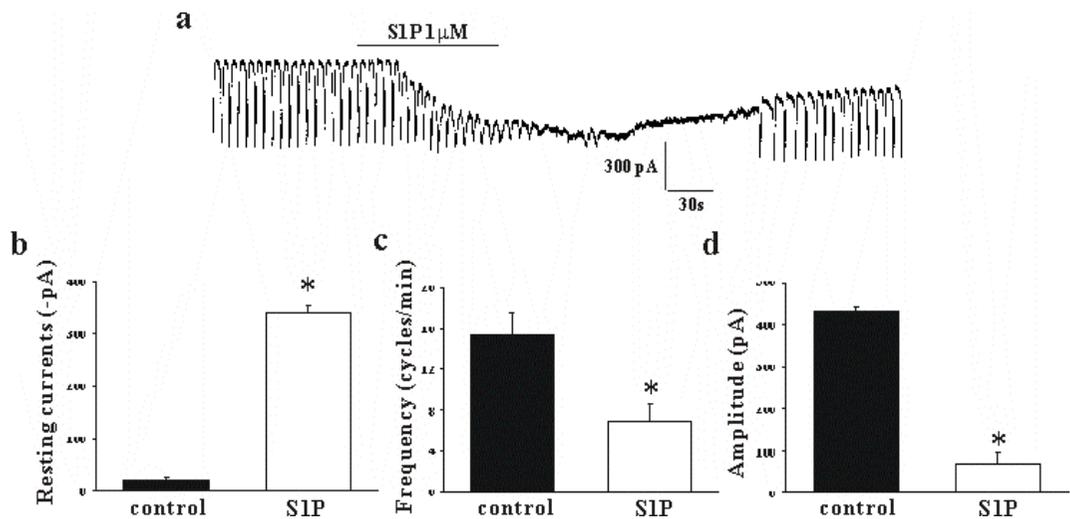


Figure 3. Effects of S1P on pacemaker currents in culture ICC of murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μ M) at a holding potential of -70 mV. Response to S1P are summarized in (b) and (c). Bars represent mean values \pm S.E. *($P < 0.01$) Significantly different from the untreated control.

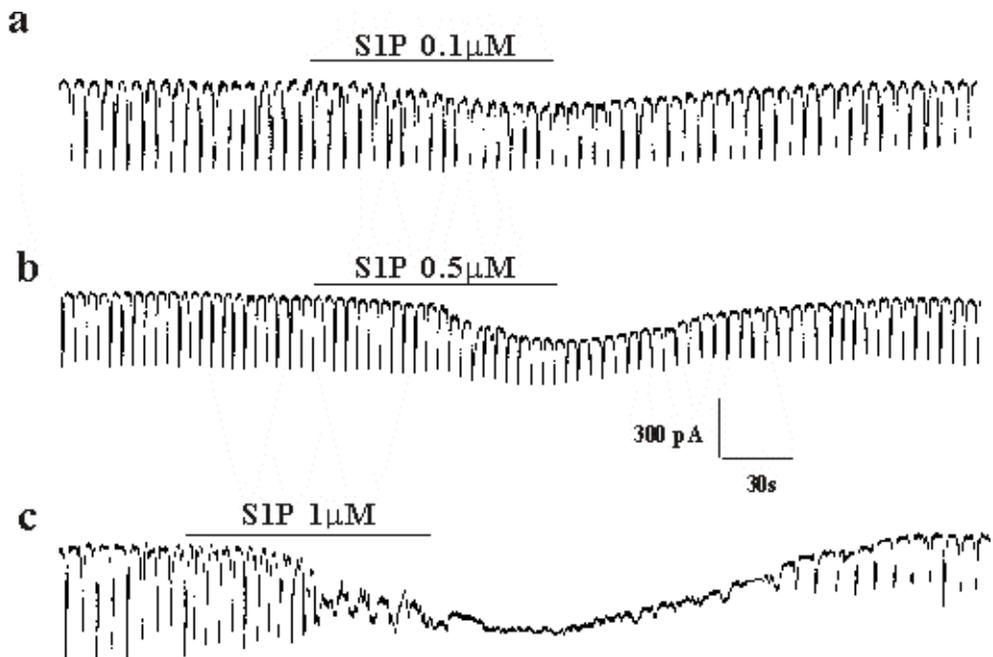


Figure 4. Various concentrations of SIP actions on pacemaker currents in culture ICC of murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to SIP (0.1 ~ 1 μM) at a holding potential of -70 mV. SIP caused a concentration-dependent increase in tonic inward currents.

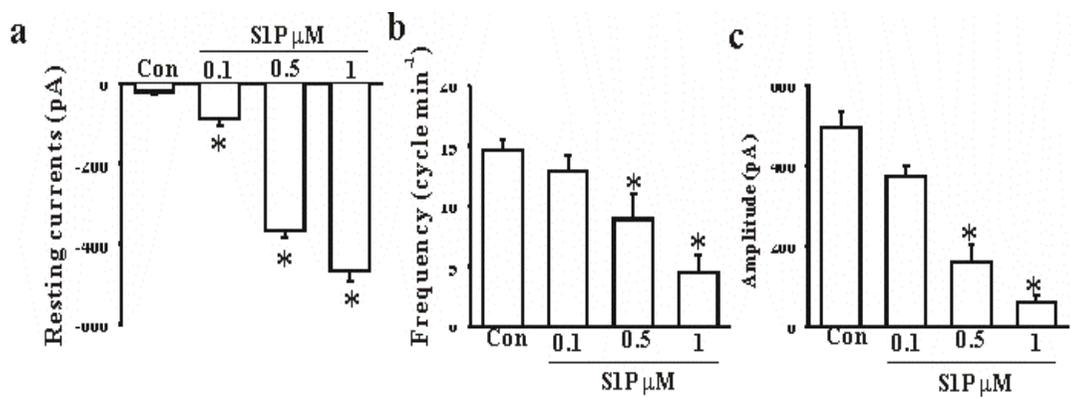


Figure 5. Summarized data of S1P actions on pacemaker currents in culture ICC of murine small intestine. Response to S1P are summarized in (a), (b) and (c). Bars represent mean values \pm S.E. *($P < 0.01$) Significantly different from the untreated control.

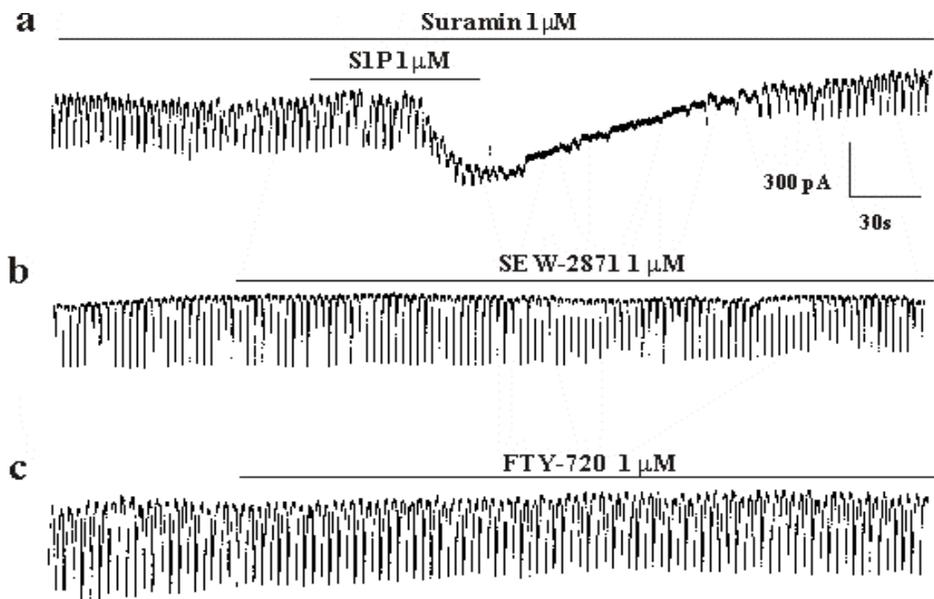


Figure 6. Effects of S1P subtype receptor antagonist and agonist on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μ M) in the presence of suramin, S1P₃ receptor antagonist (1 μ M). (b) Pacemaker currents of ICC exposed to SEW-2871, S1P₁ receptor agonist (1 μ M). (c) Pacemaker currents of ICC exposed to FTY-720, S1P₁, S1P₃, S1P₄ and S1P₅ receptor agonist (1 μ M).

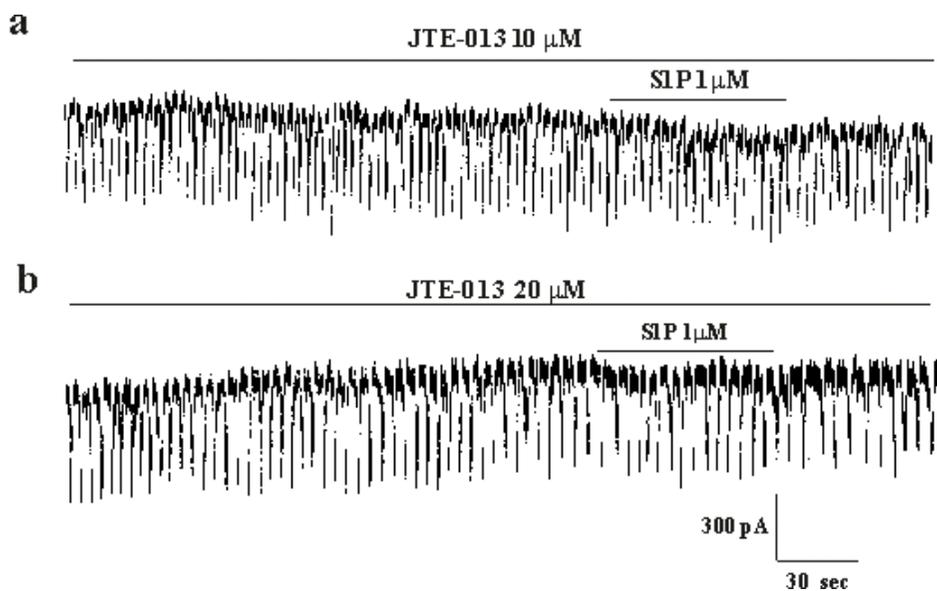


Figure 7. Effects of S1P₂ subtype receptor antagonist on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μM) in the presence of JTE-013, S1P₂ receptor antagonist (10 μM). (b) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μM) in the presence of JTE-013, S1P₂ receptor antagonist (20 μM).

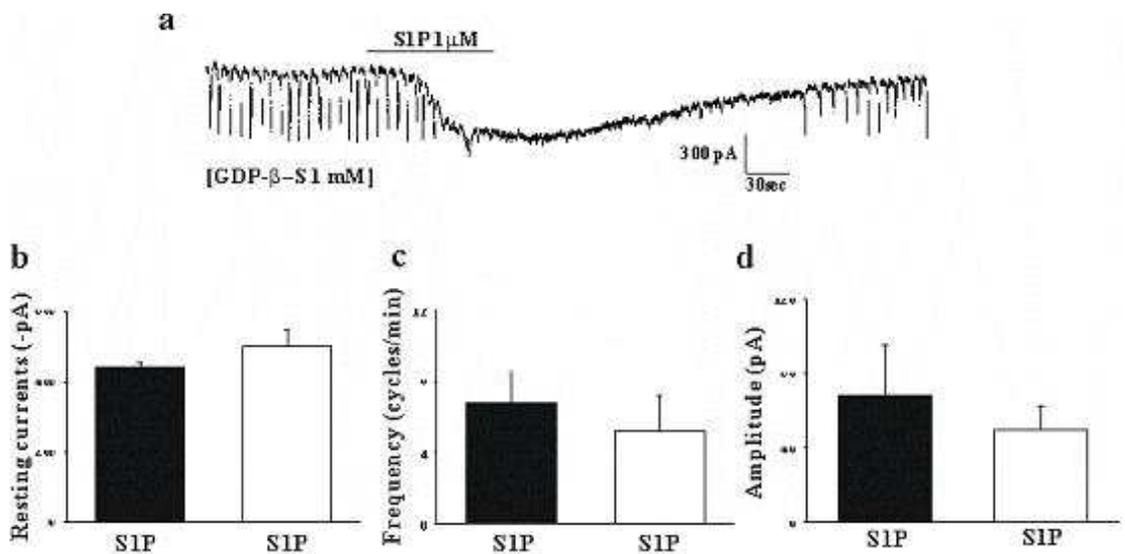


Figure 8. Effects of GDP β S on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μM) in presence of GDP β S (1 mM) in the pipette. The effects of S1P in the presence of GDP β S are summarized in (b), (c) and (d). Bars represent mean values \pm S.E. *($P < 0.01$) Significantly indifferent from the untreated control. Black bar: GDP β S(-) control, White bar: GDP β S(+).

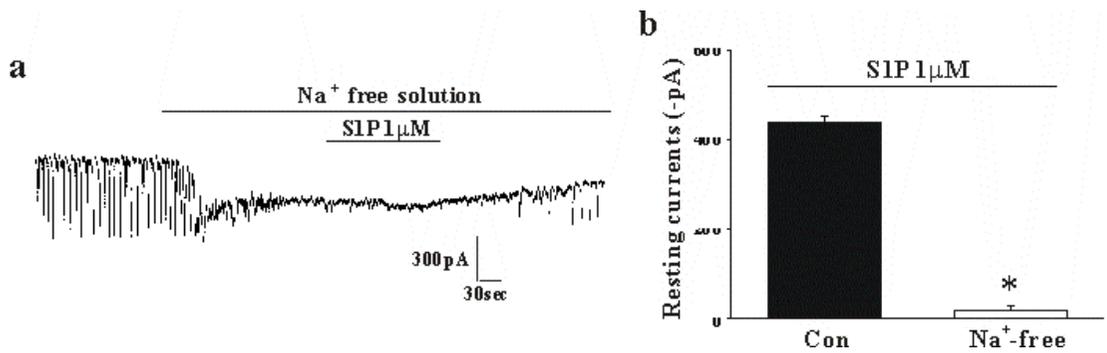


Figure 9. Effects of Na⁺-free solution on SIP-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to SIP (1 μM) in presence of Na⁺-free solution. The effects of SIP in the presence of Na⁺-free solution are summarized in (b). Bars represent mean values ± S.E. *(P<0.01) Significantly different from the untreated control. Con: Control.

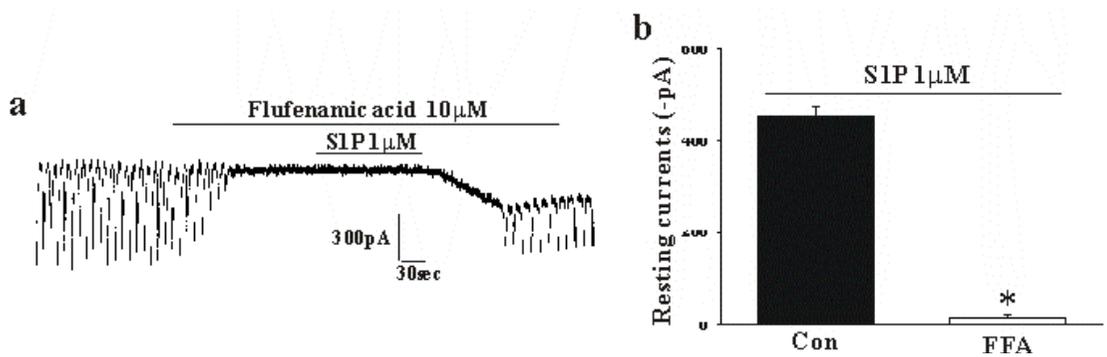


Figure 10. Effects of flufenamic acid on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μ M) in presence of flufenamic acid (10 μ M). The effects of S1P in the presence of flufenamic acid are summarized in (b). Bars represent mean values \pm S.E. *($P < 0.01$) Significantly different from the untreated control. Con: Control, FFA: Flufenamic acid.

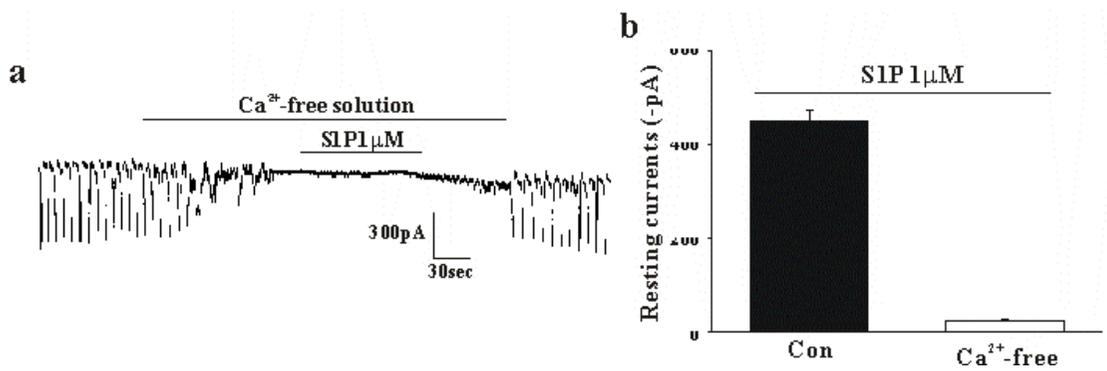


Figure 11. Effects of Ca²⁺-free solution on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μM) in presence of Ca²⁺-free solution. The effects of S1P in the presence of Ca²⁺-free solution are summarized in (b). Bars represent mean values ± S.E. *(P<0.01) Significantly different from the untreated control. Con: Control.

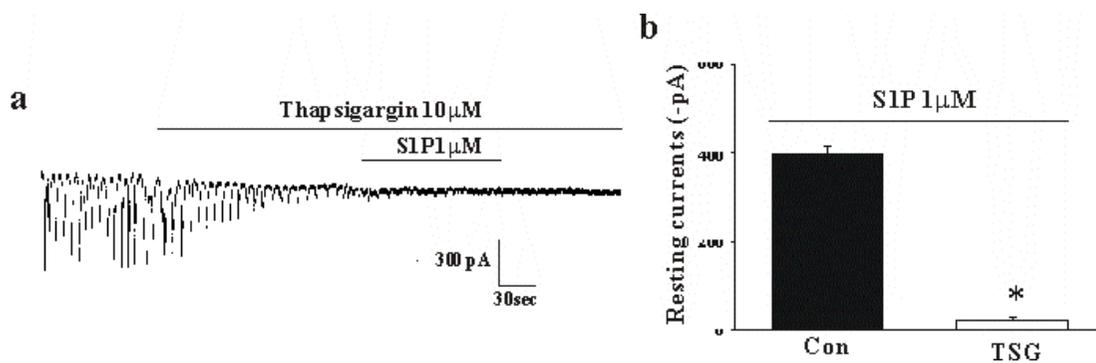


Figure 12. Effects of thapsigargin on S1P-induced responses on pacemaker currents in cultured ICC of the murine small intestine. (a) Pacemaker currents of ICC exposed to S1P (1 μ M) in presence of thapsigargin (10 μ M). The effects of S1P in the presence of thapsigargin are summarized in (b). Bars represent mean values \pm S.E. *($P < 0.01$) Significantly different from the untreated control. Con: Control, TSG: Thapsigargin.

IV. 고찰

Sphingosine 1-phosphate (S1P)는 극성을 가진 sphingolipid metabolite로서 세포 내 이차 신호전달자 및 세포의 매개자로서의 작용을 가진 것으로 알려져 있다. 세포외를 통한 기능은 G 단백질을 경유하는 family를 통해 매개 되지만, 아직까지 특징적인 세포내 기능 부위는 밝혀지지 않았다. 그동안 S1P에 대한 많은 연구들을 통해 세포 성장, 분화, 이동, 사멸 등 많은 생리학적인 기능을 담당하는 것으로 알려져 있고, 또한 병리학적인 상태에서도 중요한 역할을 차지할 것으로 보고되어 왔다. 하지만, 다양한 기능에 대한 많은 보고에도 불구하고 위장관 특히 위장관 운동성에 대한 기능은 아직 미비한 실정이다. 최근 소화관 평활근에 대한 S1P 수용체의 존재는 밝혀졌지만, 소화관 운동에 가장 큰 역할을 담당하는 Interstitial cells of Cajal (ICC)에 대한 역할은 아직 연구되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 소장 내 향도잡이 세포의 역할을 담당하는 ICC의 전기적 활동도에 대한 S1P의 기능 그리고 ICC에 존재하는 S1P의 수용체 type, 마지막으로 ICC에 대한 S1P의 역할에 대한 특징을 주었다.

소화관 운동성의 조절은 신경성 조절계의 변화나 또는 평활근 조절계의 변화에 의해서 발생되며 소화관 내용물의 이동이 감소 또는 증가되는 결과를 초래한다. 평활근 조절에 가장 중요한 요소는 위장관에서 자발적으로 발생하는 전기적 활동도, 즉 서파(slow wave)가 가장 중요한 축을 담당한다. 서파는 소화관 여러 부위에서 평활근의 자발적 수축과 매우 일치되고 있으며 주기적인 서파의 발생은 소화관 평활근의 위상성 수축의 발생 빈도와 수축시기를 결정하는 매우 중요한 역할을 담당하고 있어 서파의 이상은 곧 바로 여러 가지 소화관 운동성 질환을 야기 시킬 수 있다 (Szurszewski 1987). 이러한 서파를 발생시키는 세포가 소화관내 ICC이다. 분리된 ICC에서 세포막 전압 및 전류 고정법 (patch-clamp recording)을 시행하면 자발적으로 발생하는 내향성 향도잡이 전류 및 전압이 기록된다. 본 실험에서 실시

된 분리된 ICC를 이용한 세포막 고정법에서 자발적인 향도잡이 전류 및 전압이 기록되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 실험에 사용된 ICC가 소화관내 향도잡이 세포로서의 기능을 수행하고 있다는 것을 보여준다.

최근 위장관 평활근에서 S1P 수용체가 밝혀지고 그 기능이 보고되었다 (Zhou and Murthy, 2004). 이 보고에 따르면, 위장관 평활근에는 S1P 수용체가 발견되어 있고, S1P의 처치는 평활근의 수축을 야기 시킨다는 것이다. 즉 S1P의 위장관내의 작용은 주로 수축성을 증가시키는 방향으로 작용한다는 내용이 주장되었다. 하지만, 이러한 S1P의 소화관 운동성에 대한 효과는 평활근에 직접 작용한 결과에 국한되어 있지만, ICC를 통하여 간접적으로 이루어질 수 있다는 가설은 최근 ICC에서 여러 신경전달 물질 및 내인성 물질의 수용체가 존재한다는 사실들에 의해 뒷받침되고 있다 (Portbuty et al., 1996; Sternini et al., 1997; Epperson et al., 2000; Burnstock 2002). 본 연구에서 ICC 세포에 대해 S1P는 향도잡이 전류의 긴장성 성분의 활성화를 통하여 탈분극을 초래하였다. 이러한 결과는 세포막 전압이 교통신호를 통하여 평활근에 전달되어 동시에 평활근의 탈분극을 유발시켜 수축을 야기시킬 수 있음을 강력히 시사한다. 따라서 ICC세포를 매개로 소화관 평활근의 활동도를 조절 할 수 있음을 나타낸다.

이전까지 S1P의 생리학적 효능은 세포내 이차전달자로의 작용을 통해 이루어진다고 생각되어졌다. 하지만 최근 세포막에 S1P 수용체가 발견되면서 많은 작용이 세포막을 통해 이루어진다는 것이 밝혀지고 있다. 일반적으로 S1P 수용체는 S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄, S1P₅로 구분되어 지는데, 이러한 수용체는 G 단백질과 연결되어 있다고 알려져 있다 (Hla 등, 2001). 많은 조직에서 S1P 수용체의 존재가 밝혀지고 있지만, ICC에서는 그렇지 못한 실정이다. 하지만, ICC의 향도잡이 전기적 현상에 대한 S1P의 효과는 ICC에 S1P 수용체가 존재한다는 것을 시사해 주고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 S1P 수용체의 길항제 및 작동제를 사용하여 S1P₂ 수용체가 ICC에 발견되어 있다는 것을 발견하였다. 즉, S1P의 ICC에 대한 효과는 S1P₂

수용체를 통하여 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 앞에서 언급하였듯이 S1P 수용체는 G 단백질의 연관성이 있다는 많은 보고가 있었다. Sf9세포를 이용한 실험에서 S1P₁ 수용체는 Gi 단백질과 결합되어 있고, S1P₂와 S1P₃ 수용체는 Gq 그리고 G13 단백질과 결합되어 있다고 보고되었다(Brocklyn 등, 2000; Yamazaki 등, 2000). 또한 S1P₅ 수용체는 Gi와 G12 수용체가 *Xenopus oocytes*에 발현되어 있다고 알려져 있다 (Im 등, 2000). 본 연구에서 S1P₂ 수용체가 ICC에 발현되어 있다면 예전의 보고와 비교하였을 때, 분명 ICC에 발현되어 있는 S1P₂ 수용체는 G 단백질과 연결이 되어 있어 그 기능을 발휘할 것으로 유추되지만, 실험을 통한 결과 G 단백질은 ICC에 분포하는 S1P 수용체와 연관이 없는 것이 밝혀졌다. 이것은 S1P의 기능이 다른 많은 조직에서 G 단백질과 결합되어 그 기능을 발휘하지만, ICC에서는 G 단백질이 연관되지 않은 또 다른 신호전달체계가 있다는 것을 시사한다.

ICC는 자발적인 향도잡이 전기적 현상을 발생시키고 이것은 gap junction을 통해 평활근으로 전달되어 진다. 최근 ICC에서 발생하는 향도잡이 전류가 전압 비의존성-비선택적 양이온 통로를 통해 이루어진다고 보고되었다 (Koh 등, 1998b; Thomsen 등, 1998). 본 연구에서 S1P는 향도잡이 전류에 긴장성 내향성 전류를 발생시키는 결과를 토대로 S1P의 기능이 전압 비의존성-비선택적 양이온 통로를 통해 이루어지는지를 확인하고자 비선택적 양이온통로 억제제인 flufenamic acid를 사용한 결과 S1P의 기능은 본 이온통로를 통한다는 것을 보여주었다. 즉, ICC에서 발생하는 향도잡이 전류는 전압 비의존성-비선택적 양이온 통로를 통해 발생되어 지고 ICC에 대한 S1P의 작용 역시 본 통로를 통해 긴장성 내향성 전류를 발생한다는 주장을 입증해 주고 있다.

많은 세포에서, S1P의 기능은 세포내 칼슘의 농도의 증가를 유도시킨다고 알려져 있다. 특히 S1P₂와 S1P₃ 수용체의 경우 세포내 칼슘의 증가를 야기 시킨다는 많은 결과가 보고되었다. 그러나 이와 더불어 S1P₁의 수용체의 경우는 세포내 칼슘

과 연관성이 없다는 보고는 많은 혼돈을 일으키고 있다. 본 연구에서는 세포외 칼슘 그리고 세포내 칼슘 모두 S1P의 작용에 영향을 준다는 결과를 보여주었다.

결론적으로 생쥐 소장 ICC세포에는 S1P₂ 수용체가 존재하고, S1P는 이를 통하여 ICC 세포의 전기적 활동도를 변화시킴으로서 간접적으로 소화관 평활근의 활동도를 조절할 수 있다고 추측된다.

V. 결 론

본 연구는 소화관내 특수세포인 ICC에서 기록된 서파와 향도잡이 전류에 대한 SIP의 효과와 작용기전을 규명하고자 생쥐 소장에서 배양된 ICC에서 세포막 전압 고정법을 시행하였다. ICC는 서파와 자발적인 내향성 전류인 향도잡이 전류를 발생시켰고, SIP는 막전압의 접극을 유발하였으며 서파의 크기를 감소시켰다. 또한 ICC에서 발생한 향도잡이 전류에 대해 긴장성 내향성 전류를 발생시켰다. ICC에 대한 SIP의 기능은 SIP_2 수용체를 통하여 이루어지며 긴장성 내향성 전류는 비선택적 양이온 통로를 통한다는 결과를 도출해 내었다. 더불어 ICC에 대한 SIP의 기능은 세포내 그리고 세포외 칼슘과 밀접한 연관을 가진다는 결과를 알게 되었다.

이상의 실험결과들로부터 SIP는 ICC에 작용하여 간접적으로 위장관 운동성을 조절하고 있으며, 그 작용은 SIP_2 수용체를 통해 비선택적 양이온 통로의 활성화를 통하여 향도잡이 전류를 조절함으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

참고 문헌

Ammit AJ, Hastic AT, Edsall LC, Hoffman RK, Amrani Y, Krymskaya VP, Kane SA, Peters SP, Penn RB, Spiegel S, Panettier RA (2001) Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J* 15: 1212-1214.

Brocklyn JRV, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S (2000) Sphingosine 1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood* 95: 2624-2629.

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.

Cuvillier O, Pieianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosin 1-phosphate. *Nature* 381: 800-803.

Farrugia G (1999) Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu Rev Physiol* 45: 217-223.

Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ (2001) Lysophospholipids-receptor revelations. *Science* 294:1875-1878.

Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivara A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S (2001) Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291: 1800-1803.

Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynce KR (2000) Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* 275: 14281-14286.

Kluk MJ, Hla T (2002) Signaling of sphingosine 1-phosphate via the S1P/EDG-family of G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582:72-80.

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

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

Kohama T, Olivara A, Edsall L, Nagiee MM, Dickson R, Spiegel S (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273: 23722-23728.

Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S (2002) Sphingosine 1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1582: 8-17.

Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275: 19513-19520.

Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL (2000) Edg-1, the G protein coupled receptor for sphingosine 1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106: 951-961.

Malek RL, Toman RF, Edsall LC, Wong S, Chiu J, Letterle CA, Van Brocklyn JR, Milstien S, Spiegel S, Lee NH (2001) Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family G protein coupled sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 276:5692-5699.

Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, Jakobs KH (2001) Stimulation of intracellular sphingosine 1-phosphate production by G-protein coupled sphingosine 1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol* 414: 145-154.

Olivera A, Spiegel S (2002) Sphingosine kinase: a mediator a vital cellular

functions. *Prostaglandins* 64: 123-134.

Payne SG, Milstien S, Spiegel S (2002) Sphingosine 1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett* 531: 54-57.

Pyne S (2002) Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochem Biophys Acta* 1582: 121-131.

Sanders KM (1996) A case for interstitial cells of Cajal as pacemaker and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111: 492-515.

Spiegel S, Milstien S (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signalling molecule. *J Biol Chem* 277: 25851-25854.

Szurszewski JH (1987) Electrical basis for gastrointestinal motility. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd edn, ed. Johnson LR, pp.383-422, Raven Press, New York.

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.

Tomita T (1981) Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In *Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge*, ed.

Brading AF, Jones AW and Tomita T, pp. 127–156, Edward Arnold, London.

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: 91–99.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Harney SC, Sanders KM (1995) Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol* 269: 1577–1615.

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.

Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, Sato M, Yoneya T, Okazaki H, Okajima F, Ohta H (2000) Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca^{2+} signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 583–589.

Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, Satoh K, Kume S, Tigyi G, Igarashi Y, Ozaki Y (2000) Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 96: 3431-3438.

저작물 이용 허락서

학 과	의 학 과	학 번	20067367	과 정	박 사
성 명	한글 : 한경택	한문 : 韓景宅	영문 : Han Kyoung Taek		
주 소	광주광역시 남구 주월1동 금영푸르미 APT 2006호				
연락처	E-mail : hkt125@naver.com				
논문제목	한글 : 생쥐 소장에서 분리된 Interstitial Cells of Cajal에 대한 Sphingosine Mono-Phosphate의 작용 및 기전				
	영문 : Effects of Sphingosine Mono-Phosphate on Pacemaker Activity in Interstitial Cells of Cajal from Murine Small Intestine				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락 하였던 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2008년 2월 일

저작자: 한경택 (인)

조선대학교 총장 귀하