

세로토닌이 마우스 소장 카탈세포에
미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
서 정 인

세로토닌이 마우스 소장 카탈세포에
미치는 영향

지도 공 인 덕 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

서 정 인

서정인의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

지난 2년 반 동안은 학교를 떠나 새로운 길에서 쫓기고 있던 저에게 지금의 이 자리에 있게 만들어준 모교와의 끈을 이어주는 시간이었습니다. 또한 이 기간동안은 저의 일생동안을 통해 그 어느 때보다 많은 분들로부터 잊지 못할 도움과 배움을 받은 시간으로 기억될 것입니다.

먼저 바쁜 가운데서도 박사학위 지도교수를 흔쾌히 받아들여 주시고 실험을 계획하고 진행하는 과정과 논문이 완성될 때까지 지도와 조언을 아끼지 않으신 공인덕 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 실험에 대해서는 걸음마 상태인 저를 처음부터 끝까지 전심으로 도와주신 차승규 선생님께 또한 감사를 드립니다. 과정 과정마다 도움과 조언을 아끼지 않았던 친구이자 오랜 동창인 박규상 교수님께도 감사를 드립니다. 이런 영광스런 시간이 오기까지 처음부터 지도하여 주신 권상욱 교수님, 이동기 교수님, 백순구 교수님 그리고 김현수 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

먼 거리를 극복하고 모든 과정을 잘 마칠 수 있도록 여러 상황을 슬기롭게 도와주신 강서 송도 병원 박윤규 원장님, 김건욱 진료부장님, 김철석 외과과장님께 또한 깊은 감사를 드립니다.

지난 모든 시간들에는 어려울 때나 즐거운 때 아버지와 어머니의 기도가 항상 있었음을 잘 알고 있습니다. 또한 두 어린 자녀 주혜, 지혜와 항상 묵묵히 옆에서 자리를 지키며 기도와 정성을 다한 아내 강영미가 있었음을 잊을 수 없을 것입니다. 그리고 이 모든 것은 하나님의 계획아래 이루어진 것으로 하나님께 영광을 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문요약	v
제1장. 서론	1
제2장. 재료 및 방법	7
2.1. 세포분리 및 배양	7
2.2. 전기생리적 실험	7
2.3. 형광 현미경을 이용한 세포내 칼슘 이온농도($[Ca^{2+}]_i$) 측정	8
2.4. Small interfering RNA(siRNA) 제작	9
2.5. 실험 용액 및 약물	10
2.6. 자료분석	10
제3장. 결과	14
3.1. 카탈세포에서 서파 및 자발적 내향성 전류의 특성	14
3.2. 5-HT가 서파 및 자발적 내향성 전류에 미치는 영향	14
3.3. 카탈세포에서 자발적 칼슘 oscillation 및 5-HT에 의한 세포내 칼슘 변화	17
3.4. 5-HT ₃ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향	17
3.5. 5-HT ₄ 수용체가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향	22
3.6. 5-HT ₄ 수용체가 세포내 칼슘 변화에 미치는 영향	22
3.7. 5-HT ₄ 활성화에 따른 탈분극 및 칼슘 증가에 대한 protein kinase A 경로 억제 효과	26
3.8. SiRNA를 통한 5-HT ₄ 발현억제가 5-HT ₄ 수용체 활성화에 미치는 영향	26

제4장. 고찰	32
제5장. 결론	36
참고문헌	37
영문요약	43

그림 차례

그림 1. 분리된 단일 카할세포의 모습과 카할세포의 pacemaking이 평활근 으로 전달되는 모식도	2
그림 2. 현재까지 알려진 5-HT 수용체의 분류	3
그림 3. G-단백과 연결된 5-HT 수용체들의 신호전달 과정	6
그림 4. 분리된 소장 카할세포	11
그림 5. 세포내 칼슘 이온농도 측정을 위한 형광 측정 장치 모식도	12
그림 6. 막전압 고정법에 의한 이온전류 측정 장치의 모식도	13
그림 7. 카할세포에서 서파 및 자발적 내향성 전류	15
그림 8. 5-HT가 서파 및 자발적 내향성 전류에 미치는 영향	16
그림 9. 카할세포의 칼슘 oscillation 및 5-HT 효과	18
그림 10. 5-HT 농도에 따른 칼슘 이온 농도 변화	19
그림 11. 5-HT 농도에 따른 칼슘 이온 농도 변화의 요약	20
그림 12. 5-HT ₃ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향	21
그림 13. 5-HT ₄ 수용체가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향	23
그림 14. 5-HT ₄ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 세포내 칼슘증가에 미치는 영향	24
그림 15. 5-HT ₄ 수용체 효현제 및 차단제가 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향 ...	25
그림 16. PKA 억제제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향	28
그림 17. PKA 억제제가 5-HT 및 5-HT ₄ 수용체 효현제에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향	29
그림 18. 5-HT ₄ 수용체 효현제인 cisapride가 막전압에 미치는 효과	30
그림 19. SiRNA를 통한 5-HT ₄ 수용체 발현 억제가 cisapride에 의한 내향성 전류에 미치는 효과	31

표 차례

표 1. SiRNA 제작을 위한 oligonucleotide의 primer sequence	9
--	---

국 문 요 약

세로토닌이 마우스 소장 카할 세포에 미치는 영향

세로토닌(serotonin; 5-HT)은 뇌 뿐만 아니라 장에서 중요한 신경전달물질로 작용을 한다. 최근 5-HT₃ 수용체의 면역반응성이 쥐 위장관에서 소화관 운동의 pace maker로 알려진 카할 세포(interstitial cells of Cajal; ICC) 등에서 발견되었지만 카할 세포에서 5-HT의 기능적인 역할은 잘 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 배양된 카할 세포에서 5-HT 수용체 활성화가 카할 세포의 막전압 및 전류의 변화와 칼슘 변화에 미치는 영향 및 그 조절 기전을 규명하고자 하였다. 카할 세포는 7~10일 된 마우스의 소장으로부터 분리하였으며, 분리된 세포들은 stem cell factor(SCF, 5 ng/ml, Sigma)가 들어있는 배지에서 하루 혹은 이틀 간 배양 후 사용하였다. 세포막전압과 전류는 whole-cell patch clamp 방법을 사용하여 기록하였으며, 칼슘 변화는 칼슘 측정 염료인 Fura-2/AM을 사용하여 기록하였다. 카할 세포의 안정막 전압은 -56.4 ± 1.2 mV(n=33), 서파(slow wave)의 크기는 26.6 ± 2.3 mV(n=20)였으며, pacemaking 전류의 크기는 -581 ± 75.9 pA(n=22), 빈도는 분당 15.4 ± 0.7 회(n=45)였다. 5-HT는 내향전류(-546.8 ± 111.2 pA)와 막전압의 탈분극(-19.3 ± 1.9 mV)을 유발시켰다. 5-HT에 의한 탈분극은 RS 23579-190(10 μ M) 및 SDZ(20 μ M)와 같은 5-HT₄ 수용체 차단제에 의해 차단되었으며, ondansetron(5 μ M), Y25130(10 μ M) 및 MDL7222(1 μ M)와 같은 5-HT₃ 수용체 차단제에 의해서는 영향을 받지 않았다. 낮은 농도의 5-HT(0.1, 1, 10 μ M)는 카할 세포의 칼슘 oscillation의 빈도를 증가시켰으며, 높은 농도의 5-HT (100 μ M)에서는 칼슘 oscillation의 소실과 기저(basal) 칼슘을 증가가 관찰되었다. 이러한 칼슘 증가는 5-HT₄ 수용체 효현제들(5-methoxytryptamine 및 2-[1-(4-piperonyl)piperazinyl]benzothazole)에 의해 동일하게 재현되었으며, 5-HT₄ 수용체 차단제에 의해 차단되었다. 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제에 의한 탈분극 및 칼슘의 증가는 PKA 억제제(100 nM)에 의해 차

단되었다. 배양된 카할 세포에 5-HT₄ 수용체의 siRNA를 처치 하였을 경우, 5-HT₄ 수용체 효현제인 cisapride에 의한 세포막 전압의 탈분극과 내향 전류가 소실됨을 확인하였다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 카할 세포에서 5-HT 수용체는 막전압을 탈분극시켰으며 이러한 5-HT 수용체의 역할은 위장관 기능 조절에 중요할 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 카할 세포, 5-HT₄ 수용체, 세포내 칼슘([Ca²⁺]_i) 측정

세로토닌이 마우스 소장 카탈세포에 미치는 영향

<지도 공 인 덕 교수>

연세대학교 대학원 의학과

서 정 인

제1장 서론

위장관 평활근은 자발적 수축을 보이는데 이는 세포막 전압의 주기적 저분극 현상에 기인하며, 이때 기록되는 자발성 경과가 느린 탈분극 전위를 서파(slow wave)라 부른다(Bauer 등, 1985; Ward 등, 1994). 서파의 종류는 장기의 종류에 따라 다르며, 또한 같은 평활근에서도 동물의 종류, 부위, 또는 상태에 따라 차이를 나타낸다. 서파의 진폭은 수 mV로부터 40 mV 정도로 지속시간은 1-10 여초이며, 빈도는 분당 1-20 회 정도로 부위에 따라 차이를 나타낸다. 사람의 위장에서는 분당 3회, 십이지장에서는 분당 12회를 보인다. 이러한 서파는 위장관 여러 부위에서 평활근 수축과 잘 일치되고 있으며, 위장관의 위상성 수축의 발생 빈도와 평활근 수축 활동을 결정하고 있다. 즉 서파는 위장관 평활근의 수축 시기, 기간 및 빈도를 결정하는 매우 중요한 생리학적 의미를 지닌다. 따라서 서파의 이상은 여러 가지 위장관 운동성 질환을 초래할 수 있다(Hanani 및 Freund, 2000, Vanderwinden 및 Rumessen, 1999). 서파는 근원성(myogenic origin)이지만, 평활근의 종류에 따라서는 장관신경계(enteric nervous system)와 같은 신경성 조절을 받는다. 즉 장관신경계에서 분비되는 다양한 신경전달물질들과 호르몬 등이 서파의 조절에 중요하게 작용한다. 오랜 기간동안 서파에 대한 연구가 진행되어 왔지

만 근원과 발생 기전에 대해서는 확실하게 밝혀져 있지 않고 단지 신경계의 영향을 받지 않고 자발적으로 발생한다고 알려져 있다(Huizinga 등, 1995; Sanders, 1996; Ward 등, 1994). 이런 이유로 지금까지 위장관의 운동성이 평활근의 수축과 이완에 의해 이루어짐에 따라 위장관 운동성에 관한 연구가 주로 평활근에 집중되어 왔으며, 한편으로 장관신경계에 의해 평활근이 조절되는 것에 집중되어왔다. 그러나 1911년에 neuron-like 세포로 Cajal에 의해 알려진 카할 세포(interstitial cells of Cajal; ICC)가 자발적인 pacemaking 활동을 나타내는 세포로 밝혀짐에 따라, 카할 세포에서 발생된 pacemaking이 위장관 운동성 조절에 절대적인 역할을 담당하고 있음이 보고 되고 있다. 카할 세포는 방추모양(spindle shape) 혹은 여러 개의 가지를 가진 모양을 하고 있으며, 기능은 장에서 pacemaker로 작용하여 위장관 운동성의 기본적인 리듬을 유지한다. 또한 평활근과 장관신경계 사이에 존재하며, gap junction을 통해 장관신경계로부터 흥분성 혹은 억제성 신호를 평활근으로 매개하는 역할을 한다(Burns 등, 1996; Ward 및 Sanders, 2001). 이 세포의 특징은 세포막에 tyrosine receptor kinase에 작용하는 c-kit이 발현되어있는 것이다.

세로토닌(5-hydroxytryptamin; 5-HT)과 그 수용체는 중추, 말초신경계 및 장과 심혈관계 그리고 혈액과 같은 비신경성 조직에 존재한다. 5-HT는 고전적인 신경 전달물질 중 하나로 위장관의 운동과 감정, 통증, 수면, 성적욕구 및 식욕과 같은

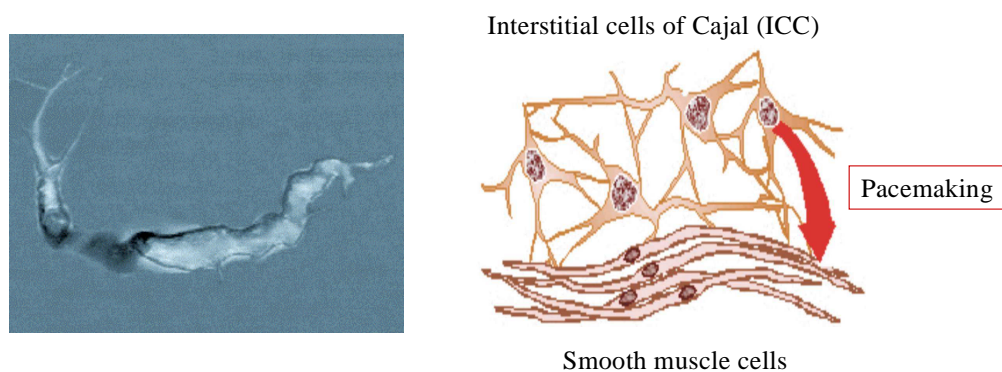


그림 1. 분리된 단일 ICC의 모습과 ICC의 pacemaking이 평활근으로 전달되는 모식도

여러 가지 정서에 관여하는 신경전달 물질이다. 5-HT 수용체에는 모두 7개 (5-HT₁₋₇)의 family가 존재하며, 이온통로인 5-HT₃ 수용체를 제외한 나머지 수용체들은 G-단백과 관련된 metabotropic 수용체이다(Barnes 및 Sharp, 1999; Raymond 등, 2001; 그림 2). 5-HT₁ 수용체는 모두 5 종류(1A, 1B, 1D, 1E 및 1F) 아형(subtype)이 알려져있으며, 이들 수용체는 공통적으로 G_{i/o} 단백을 활성화시킨다. G_{i/o} 단백질은 adenylate cyclase(AC)를 억제하여 세포내 2차 전령인 cAMP의 농도를 감소시켜 세포내 여러 가지 생리적 기능을 수행한다(그림 2). 5-HT₂ 수용체는 모두 세종류(5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C})의 아형이 알려져 있으며, 5-HT₂ 수용체는 공통적으로 G_{q/11}과 연결되어 phospholipase C (PLC)를 활성화시키고, PLC는 PIP₂로부터 IP₃와 DAG 생성을 촉진시킨다(Barnes 및 Sharp, 1999; Raymond 등, 2001). IP₃는 세포내 칼슘 저장고인 sarcoplasmic reticulum(SR)로부터 칼슘 유리를 촉진시키고, DAG은 protein kinase C(PKC)를 활성화 시킴으로서 다양한 생리적 기능을 나타낸다(그림 2). 한편 5-HT₄, 5-HT₆, 및 5-HT₇ 수용체는 5-HT₁ 수용체와는 달리 G_s 단백을 통해 AC를 활성화 시킴으로써 세포내 cAMP 농도를 증가시킨다(그림 2). 5-HT₃ 수용체는 GABA_A, glycine, 니코틴성 acetylcholine(ACh) 수용체들과 마찬가지로 5개의 서브유닛(subunit)으로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다.

Current Classification of Serotonin Receptors

Types	5-HT ₁	5-HT ₂	5-HT ₃	5-HT ₄	5-HT ₅	5-HT ₆	5-HT ₇
					┌───┐		
Effectors	AC ↓ (G _i /G _o)	↑PLC (G _{q/11})	Ion Channel (Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺)	AC ↑ (G _s)	AC ↑ (G _s)	?	AC ↑ (G _s)
Subtypes	5-HT _{1A} 5-HT _{1B} 5-HT _{1D} 5-HT _{1E} 5-HT _{1F}	5-HT _{2A} 5-HT _{2B} 5-HT _{2C}	5-HT _{3A} 5-HT _{3B}		5-HT _{5A}	5-HT _{5B}	

그림2. 현재까지 알려진 5-HT 수용체의 분류

인체내 5-HT의 95%가 위장관에 존재하며, 나머지 5% 정도는 뇌에 존재한다. 위장관의 총 5-HT의 양은 10 mg 정도이며, 이중 90%는 enterochromaffin 세포에 존재하며, 나머지 10 % 정도는 장신경계에 존재한다. 위장관에서 대부분의 5-HT는 혈액으로부터 유리된다(Bertaccini, 1960; Espramer 및 Testini, 1959). 한편 장신경(enteric nerve)에 5-HT가 존재하며, 장신경계에서 합성된다(Costa 등, 1982; Dreyfus 및 Bornstein, 1977). 장신경에서 세로토닌성 신경은 약 2% 정도로 알려져있으며(Furness 및 Costa, 1987) 장신경 자극시 장에서 분비된다(Gershon 및 Tamir, 1981). 또한 5-HT는 혈소판의 중요한 구성성분으로 혈소판의 응집과 혈액응고에 중요한 역할을 한다(Bertaccini, 1960; Espramer 및 Testini, 1959).

위장관에서 5-HT는 enterochromaffin 세포에서 분비되며(Verbeuren, 1989), 점막하(submucosal) 혹은 장신경에 존재하는 다양한 5-HT 수용체에 작용하여 위장관에서 감각 혹은 장운동에 다양하게 작용한다. 5-HT는 장관 신경에 작용하여 연동운동이나 구토와 같은 다양한 장 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Gershon, 1999). Gershon 등(1965)은 위장관에서 신경전달물질로서 5-HT를 처음 언급하였다. 장신경에서 5-HT는 느린(slow) 흥분성 시냅스후 전위(excitatory postsynaptic potential, EPSP) 혹은 빠른 EPSP를 일으킨다(Wood 및 Mayer, 1979; Wade 등, 1994; Zhou 및 Galliang, 1999). 위장관에서 5-HT는 장 수축 혹은 반사에 관련되어있다. 5-HT는 흥분성 및 억제성 신경 모두를 활성화시킬 수 있다. 즉 ACh을 유리시키는 콜린성 세포에 작용을 하면 그 결과로 평활근을 수축시키고, 억제성 nitergic 신경에 작용을 하면 nitric oxide(NO)를 분비케 하여 평활근을 이완시킨다(Gershon, 1999; Gershon 등, 1994; Kim 및 Camilleri, 2000) 또한 과민성 장증후군(irritable bowel syndrome)과 같은 장운동 장애에 5-HT 수용체의 효현제 및 길항제가 치료제로 사용된다. 이렇듯 뇌 및 장관신경계에서 5-HT 역할은 비교적 잘 알려져 있으나, 소화관 운동의 pacemaker로 알려진 카할 세포에서는 그 기능과 역할이 불분명하다. Glatzle 등(2002)은 5-HT₃ 수용체가 위장관에서 카할 세포를 위시한 장신경과 내분비세포에 발현되어있음을 보고하였다. 하지만 Glatzle 등의 연구 이후로 ICC에 발

현된 5-HT 수용체의 종류 및 그 기능에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 배양된 마우스 소장 카탈 세포에서 5-HT 수용체 활성화가 카탈 세포의 막전압 변화와 칼슘 변화에 미치는 영향과 조절기전을 규명하고 세로토닌성 조절에 관련된 5-HT 수용체를 알아보는데 그 목적이 있다.

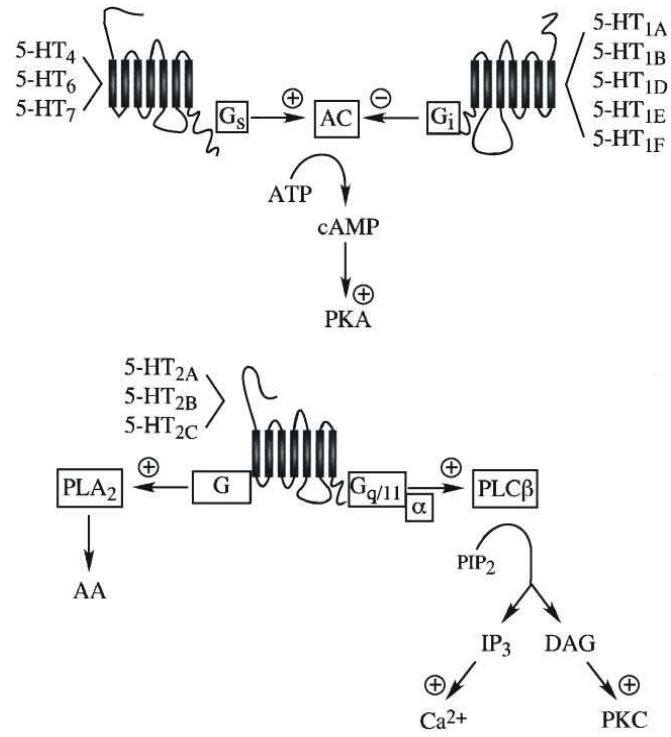


그림3. G-단백과 연결된 5-HT 수용체들의 신호전달 과정

제2장 재료 및 방법

2.1. 세포분리 및 배양

Balb/C (7-10 일) mice를 암수 구별 없이 실험동물로 사용하였다. Ether로 마취시킨 다음, 경추 부위를 탈구시켜 희생시킨 후 개복하여 pyloric ring에서부터 회장에 해당하는 소장부위를 적출하였다. 차가운 Ca^{2+} -free PSS(physiological salt solution) 용액으로 채워진 준비 용기 속에서 장간연(mesenteric border)을 따라 절개한 후 내용물을 제거하였다. 핀으로 조직을 고정한 후 해부 현미경하에서 미세 가위를 사용하여 점막층을 제거하고 근육층을 분리하였다. 분리된 소장근 조직을 1.3mg/ml collagenase(Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), 2mg/ml bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2 mg/ml trypsin inhibitor(Sigma)와 0.07 mg/ml ATP가 들어있는 Ca^{2+} -free 용액에서 20분간 배양(35°C, shaking water bath)하였다. 배양 후 strip을 튜브에서 fire blunted pipette을 이용하여 단일 세포로 분리하였다. 분리된 세포들을 stem cell factor(SCF, 5 ng/ml, Sigma)와 2% antibiotic/antimycotic(Sigma)가 들어있는 smooth muscle growth medium(SMGM; Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)에 재부유시킨 후, 세포들을 murine collagen으로 coating되어 있는 cover glass에 분주하였다. 분주된 세포는 37°C humidified incubator(95% air-5% CO_2)에서 배양하였으며, 배양된 다음날 전날 배양된 배지에서 2% antibiotic/antimycotic 만 제외시킨 배지로 바꾸어주었다. 실험은 배양 2일 후부터 시작하였다

2.2. 전기생리적 실험

Whole-cell patch clamp를 사용하여 배양된 카탈 세포에서 세포막 전류와 세포막 전압을 기록하였다. 세포막 전류 및 전압은 EPC9 혹은 EPC7(Instrutech Corp.,

NY, USA) patch clamp amplifier를 사용하여 기록하였다. 측정 전극은 borosilicate glass capillary(외경: 1.65 mm, 내경: 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)로 뽑아 제작하였다. 전극은 Sylgard 184(Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 카탈 세포 cluster가 붙어있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려 놓고, 세포의액은 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류되도록 하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50) software (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 혹은 pClamp(version, 6.0, Axon Instrument)를 통해 IBM 컴퓨터에 저장한 후 분석하였다. 모든 실험은 30~34°C에서 시행하였다.

2.3. 형광 현미경을 이용한 세포내 칼슘이온농도([Ca²⁺]_i) 측정

5-HT 수용체의 활성화에 의한 세포내 칼슘농도 변화를 측정하기 위해서 칼슘 농도를 반영하는 형광염료들을 세포내에 부하(loading)시켜 놓은 뒤, 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)과 연결된 형광측정장치(Ratio Fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하여 관찰하였다. 세포내 Ca²⁺ 농도 측정을 위하여 칼슘 농도측정 염료인 Fura-2를 5 μ M 되도록 가하여 실온에서 빛이 차단된 상태로 30~60분간 부하시켰다. 부하후, 세포가 붙어있는 cover glass를 현미경위의 perfusion chamber에 장착하고, complete perfusion system(Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA)과 연결된 도관을 micromanipulator(Narishige scientific instrument, Tokyo, Japan)로 세포 인접부위에 위치시킨 뒤, 여러 종류의 약물들이 포함된 세포외 관류액으로 관류시키면서 나타나는 형광 세기의 변화를 기록하였다. 여기서 340 nm와 380 nm의 빛으로 번갈아 가며 여기(excitation)시켰을 때 510 nm로 방출(emission)되는 형광 강도의 비율(F₃₄₀/F₃₈₀)이 세포내 이온농도를 반영하게 된다(Park 등, 2002).

2.4. Small interfering RNA (siRNA) 제작

마우스 5-HT₄ 수용체(NM_008313)의 두 곳(1, 475-493; 2, 1182-1200)을 small(혹은 short) interfering RNA(siRNA) 제작의 목표서열로 정하였으며, 대조군으로 마우스 유전자에 존재하지 않음이 확인된 19 nucleotide의 무작위 서열(scrambled sequence)을 결정하였다. 먼저 각각에 대한 oligonucleotide template를 합성하였다 (Bioneer Co., Daejun, Korea, 표1). 표1의 template들을 100 μM 농도가 되도록 nuclease-free water에 녹인 다음, Silencer™ siRNA construction kit(Ambion Inc., Austin, USA)를 이용하여 이중 결합의 siRNA를 합성(in vitro transcription)하였다. 합성된 siRNA는 1:25로 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8, and 1 mM EDTA)에 희석한 뒤, 정량분석을 위해 260 nm에서의 흡광도(A₂₆₀)를 spectrophotometer로 측정하였다. 배양된 카할 세포에 siRNA의 처리는 분리된 카할 세포가 직경 35 mm 배양접시 바닥에 부착됨을 확인한 뒤 실시하였다. 합성된 siRNA(100 pM), serum 및 항생제가 첨가되지 않은 DMEM, 그리고 oligofectamine(Invitrogen Co., Carlsbad, USA)을 조심스럽게 혼합하여 실온에서 20분간 둔 뒤, 이어 배양접시 내 배지를 제거하고 위 혼합액을 가하여 37°C 5% CO₂에서 4시간 배양하였다. 이 후 serum 농도가 2배인 동량의 배지를 첨가하여 24시간 이상 배양한 다음 실험에 사용하였다.

표1. SiRNA 제작을 위한 oligonucleotide의 primer sequence

Target	Sequence	
5-HT4(1)	Antisense	5'-AATGCAAGGCTGGAACAACATCCTGTCTC-3'
	Sense	5'-AAATGTTGTTCCAGCCTTGCACCTGTCTC-3'
5-HT4(1)	Antisense	5'-AATGACCTAGAAGACAGCTGTCCTGTCTC-3'
	Sense	5'-AAACAGCTGTCTTCTAGGTCACCTGTCTC-3'
Scrambled	Antisense	5'-AACCACTACCTGAGCACCCAGCCTGTCTC-3'
	Sense	5'-AACTGGGTGCTCAGGTAGTGGCCTGTCTC-3'

2.5. 실험용액 및 약물

전기생리적 실험 및 칼슘 측정을 위한 세포외 관류액(external solution; PSS)의 조성(mM)은 135 NaCl, 5KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. 세포막 전류 및 전압 측정을 위한 전극내 용액은 120 K-aspartate, 20 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 5 Mg-ATP, 0.3 Na₂GTP 및 0.1 creatine phosphate이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다.

세포 배양에는 사용된 smooth muscle basal medium(SMBM)과 smooth muscle growth medium(SMGM)은 Clonetics(Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)로부터, Fura-2/AM은 Molecular probes(Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였다. 5-HT, stem cell factor, 2-methoxytryptamin 및 SDZ는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, MDL7222, GR113808, RS23579-190, Y25130, myristoylated PKA inhibitor 등은 Tocris(Ellisville, MO, USA)로부터 구입하였다.

2.6. 자료분석

결과는 평균(Mean)과 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의의는 paired 혹은 unpaired t-검정과 분산분석(one-way ANOVA)으로 검증하여, p값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

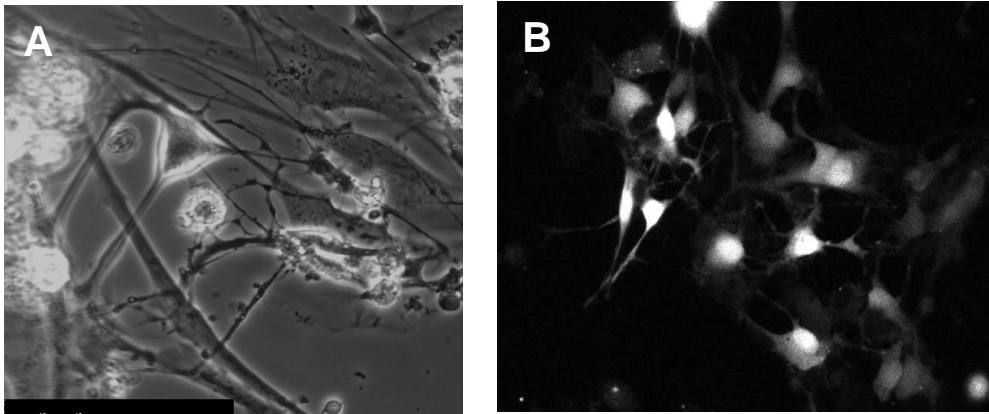


그림4. 분리된 소장 카탈 세포. A: phase contrast, B: Fura-2/AM을 부하한 모습

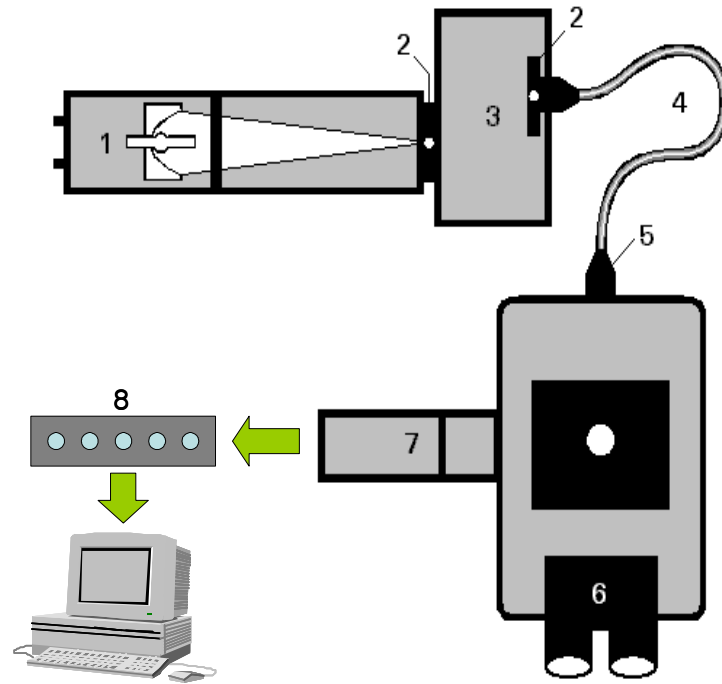


그림5. 세포내 칼슘이온농도 측정을 위한 형광 측정장치 모식도 1. Arc lamp housing, 2. Adjustable slits, 3. Excitation monochromator, 4. Liquid light guide, 5. Liquid light guide adapter, 6. Microscope, 7. Photomultiplier tube, 8. AD converter (connected to IBM computer)

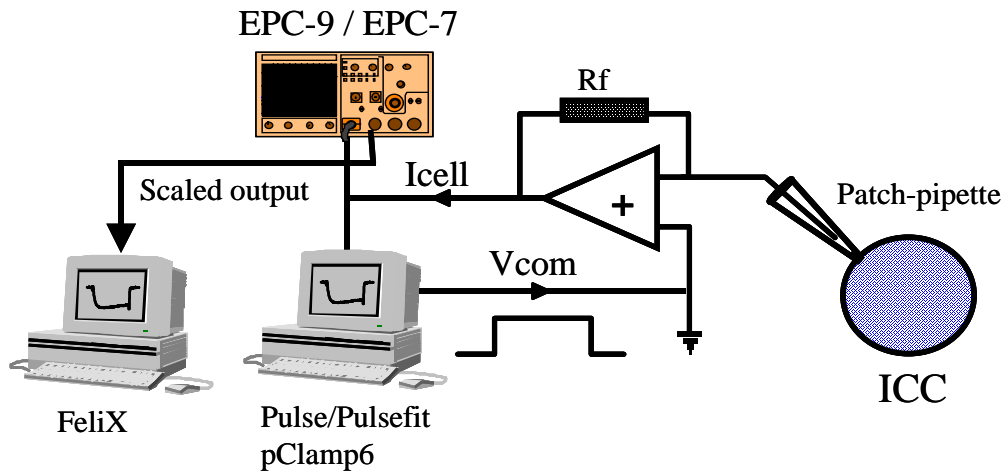


그림 6. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 모식도. 패치 클램프 전용소프트웨어(Pulse/Pulsefit 혹은 pClamp6)를 이용하여 만든 전압 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(V_{com})을 A/D converter(EPC-9 혹은 digidata 1200)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 전극(patch pipette)을 통하여 전달하고 세포막에 존재하는 이온통로의 활성정도에 따라 변화하는 전압을 고정하기 위해 증폭기(EPC-9 혹은 EPC-7)를 통하여 흘려주는 전류(I_{cell})을 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터에 저장한다. 이때 세포내 칼슘과 동시 측정하거나 혹은 단독으로 전류를 지속적으로 기록하기 위해서 증폭기에서 전류를 다른 컴퓨터로 연결하여(scaled output), FeliX 소프트웨어 상에서 구현하였다.

제3장 결과

3.1. 카할 세포에서 서파 및 자발적 내향성 전류의 특성

전류 고정법하(current-clamping mode, $I=0$)에서 기록된 안정막 전압은 -56.4 ± 1.2 mV($n=33$)을 보였으며, 서파(slow wave)의 크기는 28.6 ± 2.3 mV($n=20$)를 나타내었다(그림 7). 막전압을 -80 mV로 고정한 voltage-clamp mode 상태에서 카할 세포는 자발적 내향성 전류를 발생시켰다. 발생된 내향성 전류의 크기는 -585.1 ± 75.9 pA($n=22$)였으며, 자발적인 서파와 내향성 전류의 빈도는 분당 15.4 ± 0.7 회($n=45$)였다.

3.2. 5-HT가 서파 및 자발적 내향성 전류에 미치는 영향

전류 고정법하에서 5-HT ($10 \mu\text{M}$)를 가하였을 경우 서파의 안정막 전압이 탈분극 되었다(그림 8A). 5-HT를 가하기 전·후의 안정막 전압은 각각 -55.4 ± 3.2 mV와 -36.1 ± 2.9 mV로 5-HT에 의한 탈분극의 크기는 19.3 ± 1.9 mV였다. 막전압을 -80 mV에 고정한 상태에서 5-HT ($10 \mu\text{M}$)는 뚜렷한 내향성(inward) 기저전류(basal current)를 유발시켰다. 5-HT에 의해 유발된 내향성 전류의 크기는 -546.8 ± 111.2 pA였다(그림 8B).

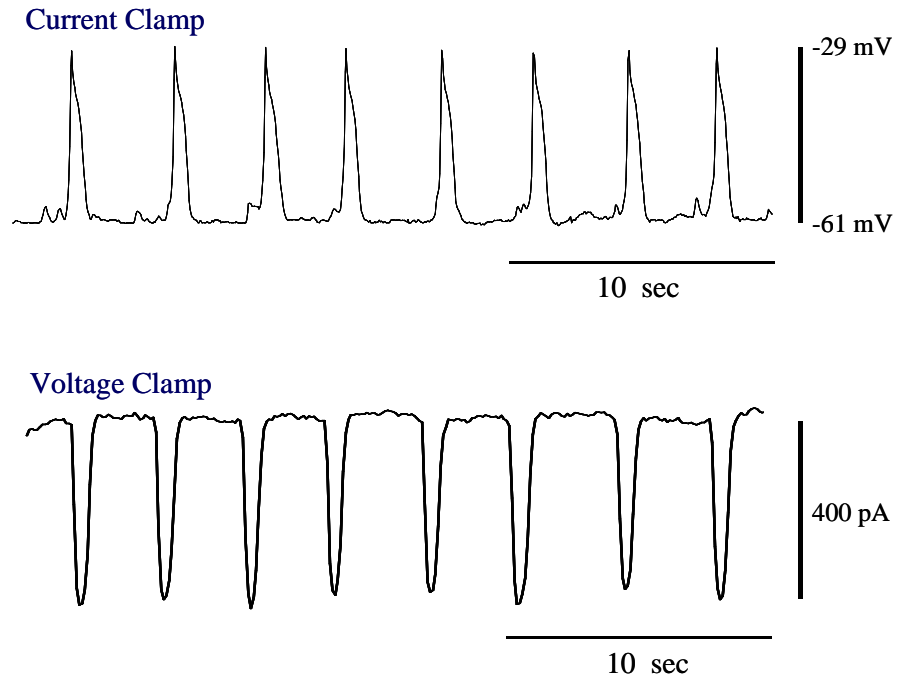


그림 7. 카탈 세포에서 서파 및 자발적 내향성 전류. 위의 그림은 전류 고정법 (current clamp) 하에서 세포막 전압의 변화를 기록하였으며, 아래 그림은 전압 고정법 (voltage clamp) 방법으로 막전류를 기록하였다. 전류 고정법하에서는 전류를 0($I=0$)으로 고정하였으며, 전압 고정법에서는 막전압을 -80 mV에 고정하여 기록하였다.

그림 8. 5-HT가 서파 및 자발적 내향성 전류에 미치는 영향. 그림A는 전류 고정법 하에서 기록된 서파이다. 5-HT를 가하였을 경우 막전압의 탈분극을 보여주며, 그림C는 이를 요약한 그래프이다. 그림B는 전압 고정법하에서 기록된 내향성 전류이다. 막전압은 -80 mV에 고정하였다. ** p<.001

3.3. 카할 세포에서 자발적 칼슘 oscillation 및 5-HT에 의한 세포내 칼슘 변화

세포내 칼슘 농도 변화를 관찰하기 위하여 Fura-2/AM를 카할 세포에 부하한 뒤 세포내 칼슘 농도를 기록하였다. 그림 9A는 카할 세포의 자발적인 칼슘 oscillation을 보여준다. 카할 세포의 자발적인 칼슘 oscillation의 빈도는 분당 11.5 ± 0.7 회($n=11$)였으며, 5-HT($10 \mu\text{M}$)를 관류시 칼슘 oscillation 빈도 및 basal 칼슘이 증가하였다(그림 9). 5-HT 농도에 따른 칼슘 변동을 확인하기 위해 농도를 변화시켜 가며 세포내 칼슘을 확인하였다. 낮은 농도의 5-HT는 칼슘 oscillation의 빈도와 basal 칼슘을 동시에 증가시켰으며, $100 \mu\text{M}$ 이상의 높은 농도에서는 칼슘 oscillation은 감소시키는 반면 basal 칼슘을 크게 증가시켰다(그림 10). 5-HT의 농도가 $1 \mu\text{M}$ 및 $10 \mu\text{M}$ 로 증가됨에 따라 칼슘 oscillation의 빈도는 분당 11.5 ± 0.7 회에서 각각 15.4 ± 1.4 회 및 22.0 ± 2.1 회로 증가하였으며(그림 11A), 그 이상의 농도에서는 oscillation의 소실 및 basal 칼슘 증가를 보였다. 5-HT에 의한 basal 칼슘 역시 농도 증가에 따라 증가하였다(그림 11B).

3.4. 5-HT₃ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향

Glatzle 등(2002)은 카할 세포를 위시한 장신경 등에 5-HT₃ 수용체가 발현되어 있음을 면역화학 염색을 통하여 보고하였다. 따라서 본 연구에서 5-HT₃ 수용체가 카할 세포의 서파에 영향을 미치는가를 확인하고자 하였다. 5-HT에 의한 탈분극은 선택적 5-HT₃ 수용체 차단제인 ondansetron($5 \mu\text{M}$), Y25139($10 \mu\text{M}$) 및 MDL7222($5 \mu\text{M}$)를 전처치 한 후에도 여전히 일어남을 확인하였다(그림 12). 따라서 5-HT₃ 수용체가 카할 세포에서 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 효과는 미미함을 시사한다.

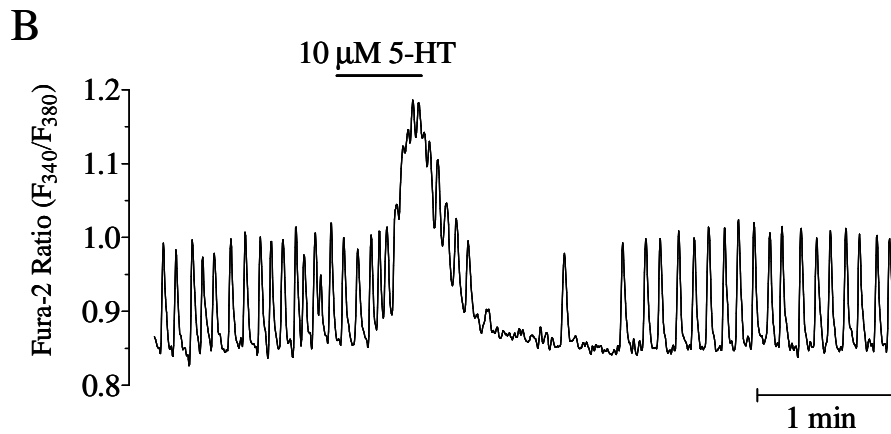
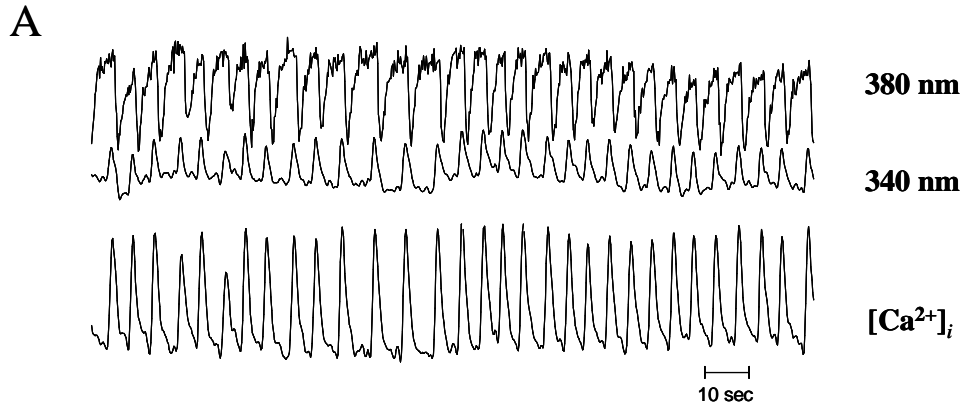


그림 9. 카탈 세포의 자발적 칼슘 oscillation 및 5-HT 효과. 그림 A 및 B는 카탈 세포에서 세포내 칼슘 농도를 측정한 것이다. 세포 내 칼슘이온농도 측정은 fura-2/AM을 부하시켜 형광측정장치로 기록하였다. 그림 A는 340 nm 및 380 nm로 빛을 여기 시켰을 때 510 nm에서 측정된 빛의 강도와 칼슘 농도를 반영하는 그것의 ratio를 보여 준다. 카탈 세포는 자발적으로 칼슘 oscillation을 보여주고 있다. 그림B는 10 μ M의 5-HT를 관류하였을 때의 칼슘 농도변화를 보여준다.

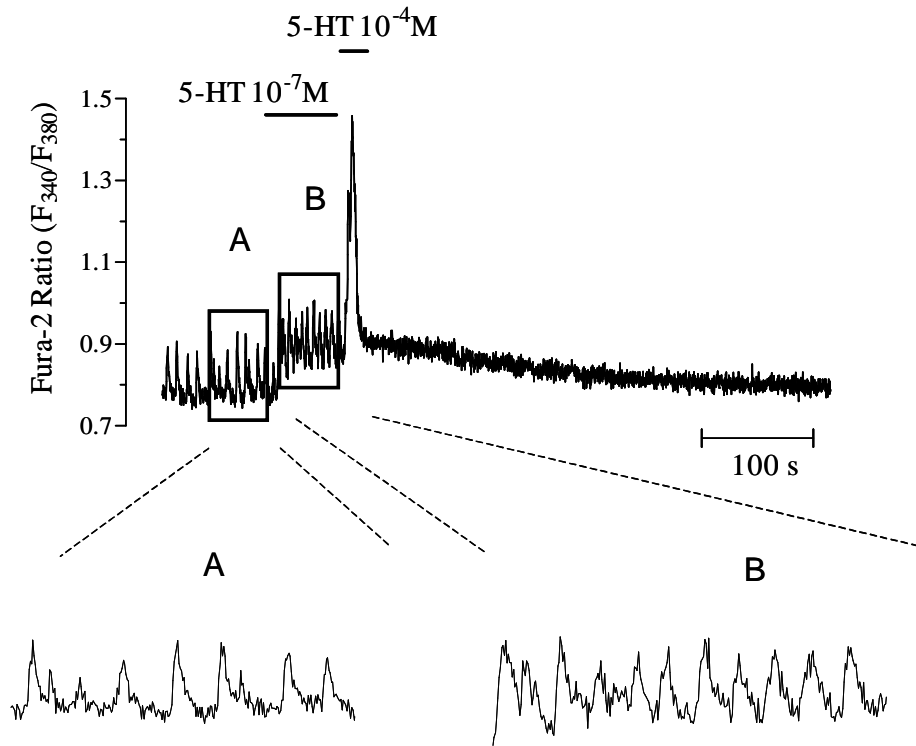


그림 10. 5-HT 농도에 따른 칼슘 이온 농도 변화. 자발적인 칼슘 oscillation이 관찰되는 카탈 세포에서 $0.1 \mu\text{M}$ (10^{-7} M)과 $100 \mu\text{M}$ (10^{-4} M)의 5-HT를 관류했을 때의 세포내 칼슘 변화이다. A는 5-HT를 가하기 전의 칼슘 oscillation을 보여주고, B는 $0.1 \mu\text{M}$ 의 5-HT를 가하였을 때의 변화를 보여준다. 아래 그림은 상자로 나타낸 A와 B의 확대된 그림이다.

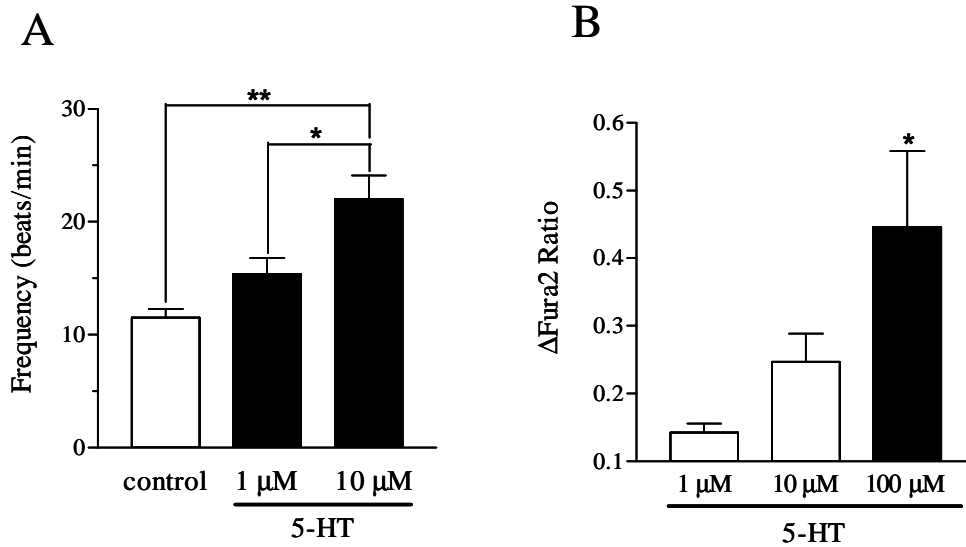


그림 11. 5-HT 농도에 따른 칼슘 이온 농도 변화의 요약. 그림A는 1 μM 및 10 μM 5-HT에 의한 칼슘 oscillation의 빈도(frequency)를 5-HT를 가하기 전(control)과 비교한 그래프이다. 빈도는 분당 일어나는 칼슘 oscillation의 수를 나타낸다. 100 μM 5-HT일 때의 빈도는 높은 5-HT 농도에서 칼슘 oscillation이 나타나지 않기 때문에 표시하지 않았다. 그림B는 농도에 따른 fura-2 ratio 변화($\Delta\text{Fura2 Ratio}$)를 나타낸 것이다. Y축의 $\Delta\text{Fura2 Ratio}$ 는 약물을 가하기 전후 ratio 값의 차이를 나타낸다. 모든 값들은 평균±표준오차로 나타내었다. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

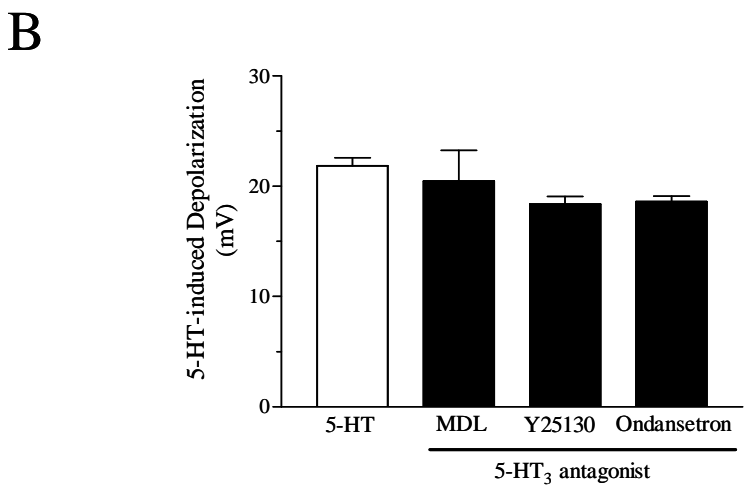
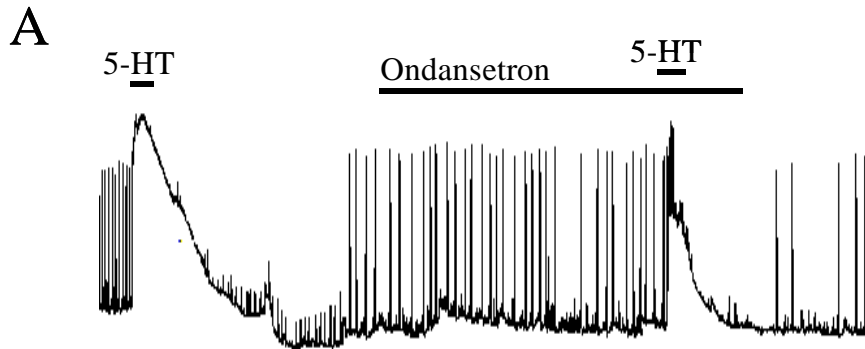


그림 12. 5-HT₃ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향. 그림A는 10 μM 5-HT에 의한 서파의 탈분극과 5-HT₃ 수용체 차단제 중 하나인 ondansetron의 효과이다. 그림B는 여러 가지 5-HT₃ 수용체 차단제들의 전처치가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 효과들의 요약이다. MDL(MDL7222)은 1 μM, Y25130은 10 μM, 그리고 ondansetron은 5 μM로 가하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 나타내었다.

3.5. 5-HT₄ 수용체가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향

5-HT₄ 수용체가 5-HT에 의한 탈분극에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전류고정법 하에서 5-HT₄ 수용체 효현제 및 차단제를 사용하여 확인하였다. 5-HT (10 μ M)를 가하였을 경우 서파의 안정막 전압이 탈분극 되었으며(23.5 ± 4.3 mV, n=4), 이러한 5-HT에 의한 탈분극은 5-HT₄ 수용체 차단제인 RS23579-190(10 μ M)을 전처치 한 경우 현저히 억제되었다(1.5 ± 0.5 mV, n=4; 그림 13A, B). 또한 5-HT₄ 수용체 효현제인 2-[1-(Piperonyl)Piperaziny] benzothiazole(VB20B7)을 10 μ M 농도로 관류하였을때 5-HT와 동일하게 세포막 전압을 탈분극시켰다(20.1 ± 1.0 mV, n=4; 그림 13C). 한편 5-HT₄ 수용체 활성화가 내향성 전류를 유발시키는지 확인하기 위하여 세포막 전압을 -80 mV에 고정한 후 VB20B7을 가하였다. VB20B7은 내향성 전류를 유발시켰으며(그림 13D), 이는 5-HT₄ 수용체에 의한 탈분극이 5-HT₄ 수용체 활성화에 따른 내향성 전류로 인함을 알 수 있다. 따라서 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 활성화가 5-HT에 의한 탈분극을 매개함을 시사한다.

3.6. 5-HT₄ 수용체가 세포내 칼슘 변화에 미치는 영향

5-HT₄ 수용체가 세포내에 미치는 영향을 관찰하기 위해 5-HT₄ 수용체 효현제 및 차단제를 사용하여 확인하였다. 세포내 칼슘 농도는 Fura-2/AM을 카할 세포에 부하한 뒤 기록하였다. 자발적인 칼슘 oscillation을 보이는 카할 세포에 5-HT(10 μ M)를 관류시 세포내 칼슘이 증가하였다(그림 14). 5-HT₄ 수용체 차단제인 GR113808(10 μ M) 및 SDZ(20 μ M)를 전처치 한 경우 5-HT에 의한 칼슘 증가는 현저히 억제되었다. 또 다른 5-HT₄ 수용체 효현제인 5-methoxytryptamin(5-MT, 10 μ M)도 세포내 칼슘을 증가시켰으며 5-MT에 의한 칼슘 증가 역시 5-HT₄ 수용체 차단제인 SDZ에 의해 차단되었다(그림 15). 이상의 결과는 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가 역시 5-HT₄ 수용체를 매개함을 알 수 있다.

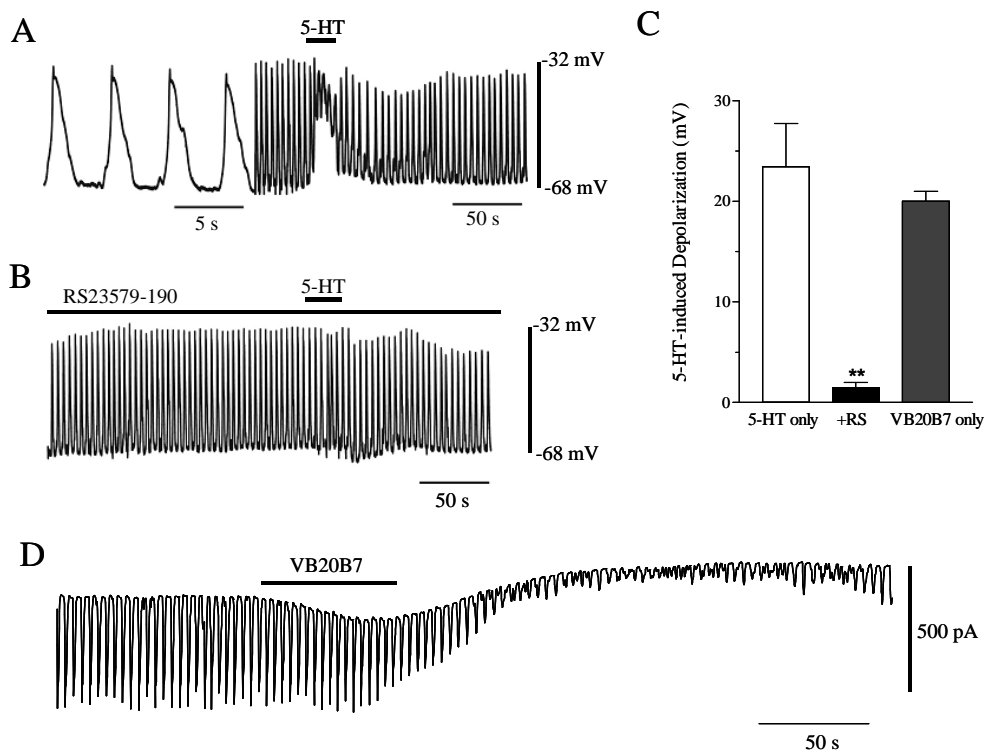


그림 13. 5-HT₄ 수용체가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향. 그림 A와 B는 10 μ M 5-HT에 의한 서파의 탈분극(A)과 5-HT₄ 수용체 차단제인 RS23579-190 (10 μ M) 전 처치 한 후의 5-HT 효과(B)를 나타낸 것이다. 그림C는 5-HT₄ 수용체 차단제인 RS23579-190 전 처치 전(5-HT only)과 후(+RS)의 10 μ M 5-HT에 의한 탈분극 크기를 나타낸 것이다. 나머지는 5-HT₄ 수용체 효현제인 VB20B7(2-[1-Piperonyl]Piperaziny] benzothiazole)을 5-HT와 동일 농도로 가하였을 경우 일어나 탈분극의 크기를 나타낸 것이다. 그림 D는 5-HT₄ 수용체 효현제인 VB20B7에 의해 내향성 전류가 유발됨을 보여주는 그림이다. 전압고정법으로 측정하였으며, 막전압은 -80 mV에 고정하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 나타내었다. ** p<0.01

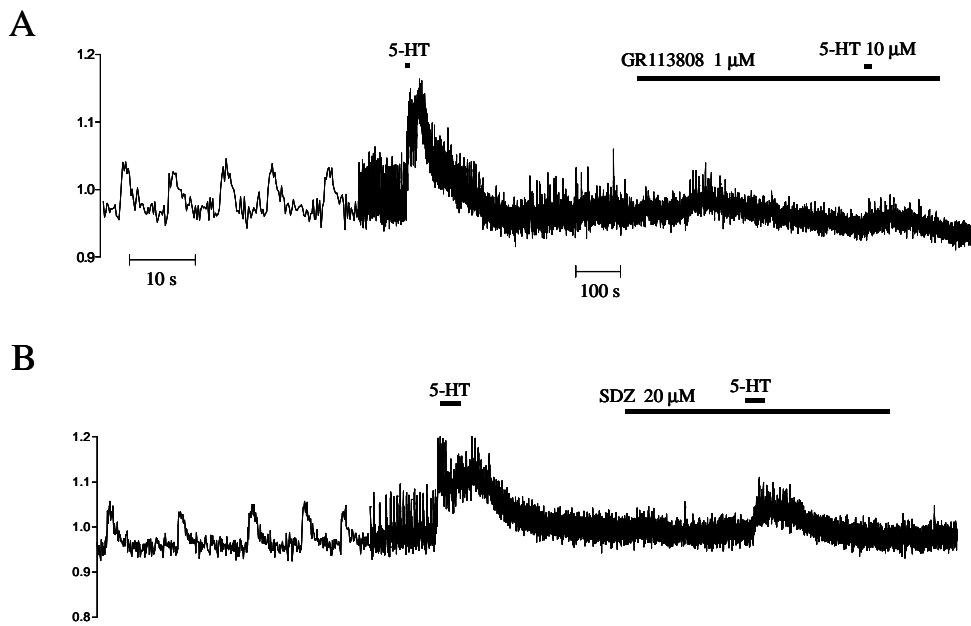


그림 14. 5-HT₄ 수용체 차단제가 5-HT에 의한 세포내 칼슘증가에 미치는 영향.
 자발적인 칼슘 oscillation이 관찰되는 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 차단제인 1 μM GR113808 (A)과 20 μM SDZ(B)의 전처치가 10 μM 5-HT에 의한 칼슘증가에 미치는 영향을 나타내었다. 각 그림에서 앞쪽은 칼슘 변동을 확대해서 나타낸 것이다.

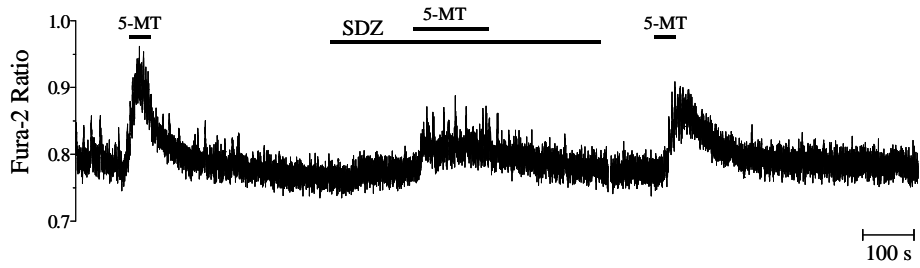


그림 15. 5-HT₄ 수용체 효현제 및 차단제가 세포내 칼슘증가에 미치는 영향. 칼슘 oscillation이 나타나는 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 효현제인 5-mthoxytryptamin (5-MT, 10 μ M)에 의한 칼슘 증가와 이것이 5-HT₄ 수용체 차단제인 SDZ(20 μ M) 전처치에 의해 억제됨을 보여준다.

3.7. 5-HT₄ 활성화에 따른 탈분극 및 칼슘 증가에 대한 protein kinase A 경로 억제 효과

5-HT 수용체 중 5-HT_{4/6/7} 수용체는 heterotrimeric G-단백에 연결되어있다. 5-HT₄ 수용체는 G-단백 중 Gs와 연결되어있으며, Gs 단백질은 adenylyl cyclase(AC)를 활성화시키고, AC에 의해 증가된 cAMP를 통해 protein kinase A(PKA)를 활성화시켜 다양한 생리적 기능을 나타낸다. 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 활성화에 의한 탈분극 및 칼슘 증가가 PKA 경로를 통해 일어나는지를 세포막 투과가 가능한 PKA 억제제(myristoylated PKA inhibitor, PKAI)를 이용하여 확인하였다. 전류 고정법하에서 5-HT를 가하였을 경우 서파의 안정막 전압이 23.5 ± 4.3 mV 탈분극되었으며, 100 nM의 PKAI를 전처치 한 후엔 5-HT에 의한 탈분극이 현저히 감소하였다(6.3 ± 1.9 mV, n=5, 그림 16). 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제인 VB20B7에 의한 칼슘 증가 역시 PKAI 전처치에 의해 현저히 감소하였다(그림 17). 이상의 결과는 5-HT₄ 수용체 활성화에 의한 막전압의 탈분극과 칼슘증가가 PKA 의존적인 경로를 통해서 일어남을 나타낸다.

3.8. SiRNA를 통한 5-HT₄ 수용체 발현 억제가 5-HT₄ 수용체 활성화에 미치는 영향

카할 세포에서 5-HT₄ 수용체의 역할을 확인하기 위하여 5-HT₄ 수용체에 대한 siRNA를 제작하였다. 카할 세포 배양시 siRNA를 24시간 이상 처리하여 5-HT₄ 수용체 발현을 억제한 다음 5-HT₄ 수용체에 의한 막전류의 변화를 관찰하였다. 먼저 장관의 5-HT₄ 수용체에 효현제로 알려진 cisapride가 카할 세포의 서파에 미치는 효과를 확인하였다. Cisapride는 5-HT와 같이 막전압을 탈분극 시켰으며, cisapride에 의한 탈분극은 5-HT₄ 수용체 차단제인 RS23579-190에 의해 억제되었다(그림 18). Cisapride에 의한 탈분극은 5-HT₄ 수용체에 의한 내향성 전류가 발생

하기 때문이다. 이러한 cisapride에 의한 내향성 전류는 5-HT₄ 수용체 siRNA를 통해 5-HT₄ 수용체 발현을 억제한 경우에는 소실됨을 보였다(그림 19). SiRNA 자체가 5-HT₄ 수용체 기능에 영향을 주는지 확인하기 위해 대조군으로 마우스 유전자에 존재하지 않음이 확인된 19 nucleotide의 무작위 서열(scrambled sequence)의 siRNA를 처치한 경우에는 여전히 cisapride에 의한 내향성 전류가 관찰되었다. 따라서 카탈 세포의 pacemaking 전류가 5-HT₄ 수용체에 의해 조절되고 있음을 알 수 있다.

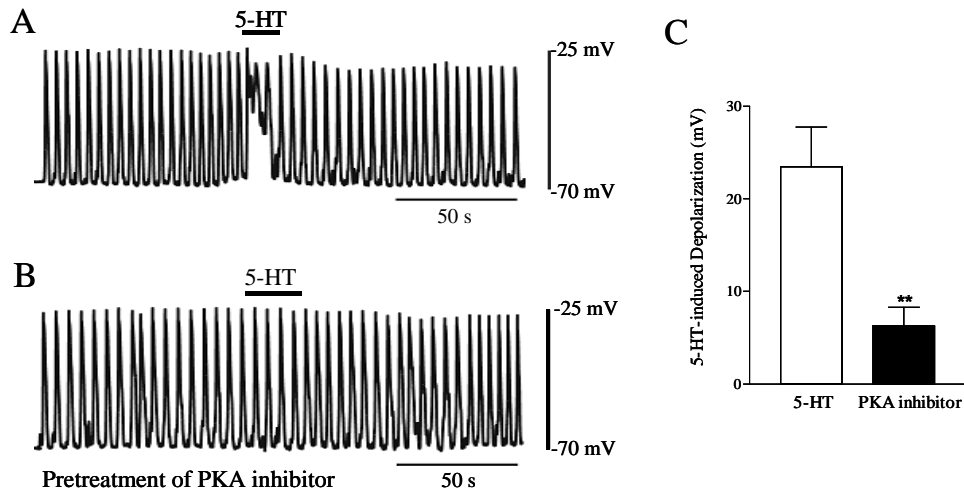


그림 16. PKA 억제제가 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 영향. 그림 A와 B는 10 μ M 5-HT에 의한 서파의 탈분극(A)과 세포막 투과가 가능한 protein kinase A(PKA) 차단제인 myristoylated PKA inhibitor(100 nM)를 5-10분간 전처리 한 후의 5-HT 효과를 나타낸 것이다. 그림C에서는 5-HT에 의한 탈분극의 크기와 PKA 차단제 후의 탈분극 크기를 비교하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 나타내었다. ** p<0.01

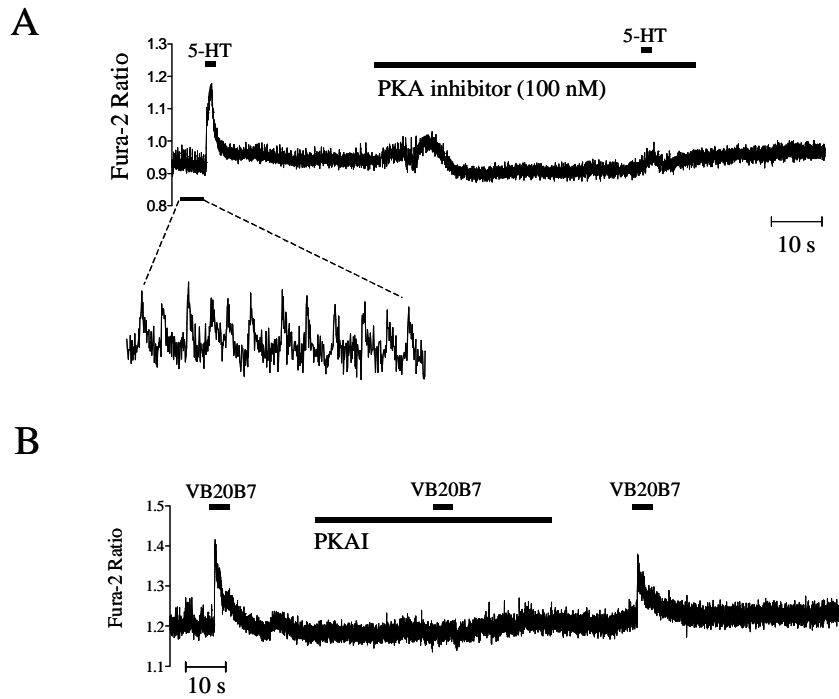


그림 17. PKA 억제제가 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향. 칼슘 oscillation이 관찰되는 카탈 세포에서 100 nM의 PKA 억제제(PKA inhibitor, PKAI) 전처치가 10 μ M 5-HT(A)와 10 μ M VB20B7(B)에 의한 칼슘 증가에 미치는 영향을 나타내었다. 그림 A의 아래 그림은 약물 처리전 칼슘 oscillation을 확대한 것이다.

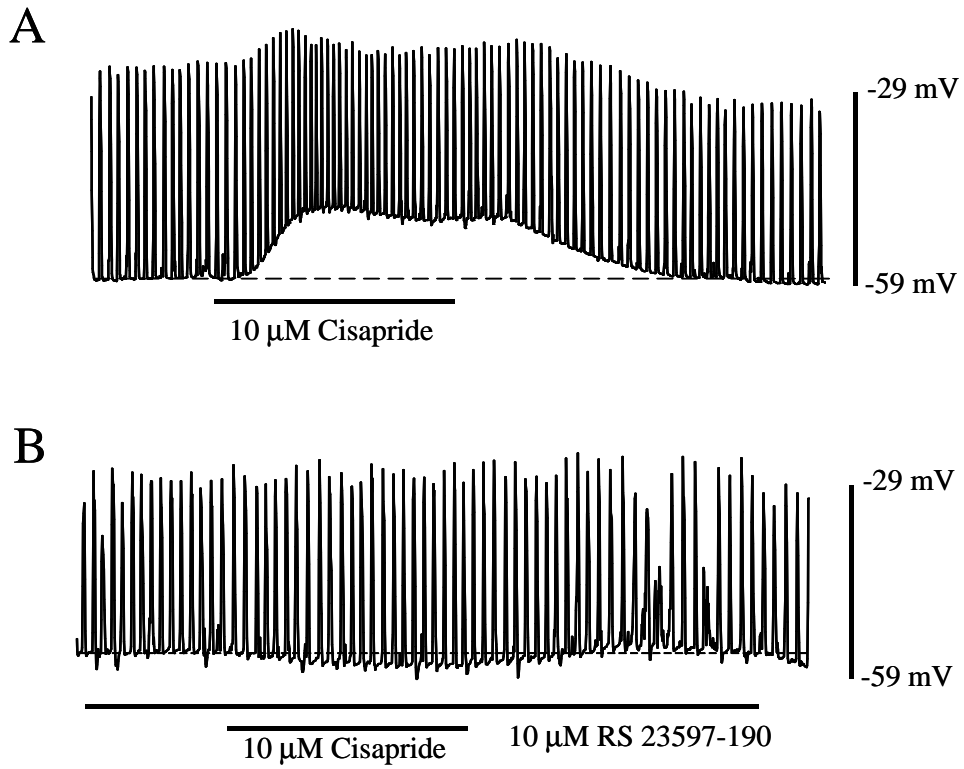


그림 18. 5-HT₄ 수용체 효현제인 cisapride가 막전압에 미치는 효과. 그림 A는 위장관 5-HT₄ 수용체 효현제인 cisapride(10 μM)에 한 서파의 탈분극이다. 그림B는 5-HT₄ 수용체 차단제인 RS23579-190(10 μM) 전처치가 cisapride에 의한 막전압 탈분극에 미치는 영향이다. 전압은 -80 mV에 고정하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 나타내었다.

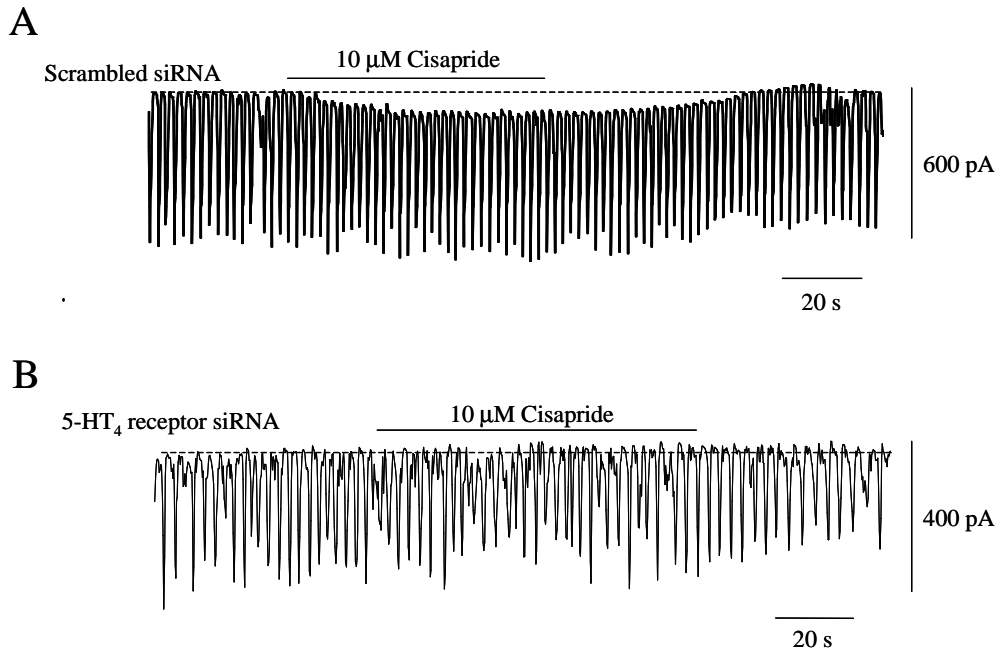


그림 19. siRNA를 통한 5-HT₄ 수용체 발현억제가 cisapride에 의한 내향성 전류 발생에 미치는 효과. 그림 A는 마우스 유전자에 존재하지 않는 19 nucleotide의 무작위 서열(scrambled sequence)로 제작한 siRNA를 처치한 카할 세포에서 기록된 pacemaking 전류와 이 전류에 미치는 cisapride의 효과이다. 그림B는 5-HT₄ 수용체의 siRNA를 처치한 카할 세포에서 기록된 pacemaking 전류와 cisapride의 효과이다.

제4장 고찰

위장관의 카할 세포가 전기적인 서파를 발생시킴으로 장 평활근의 활성도를 조절하는 것으로 밝혀진 이후 이 세포에 대한 많은 연구가 되어져 왔다. 하지만 이들 대부분의 연구들은 세포면역학적 방법에 의한 형태학적 결과들 중심으로 이루어져 왔으며 전기생리학적 실험에 대한 결과는 상대적으로 미미한 상황이다. 또한 이 세포에 어떤 종류의 이온통로들이 존재하는지 혹은 생리적 기능에 대한 연구들이 부족하며, 자발적인 서파의 기전 역시 밝혀지지 않았다. 나아가 장신경절로부터 유리되는 여러 신경전달 물질들에 대한 수용체가 카할 세포에 존재하는지에 관한 연구 역시 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 뇌 뿐만 아니라 장에서 중요한 신경전달물질로 작용을 하는 5-HT가 소화관운동의 pacemaker로 알려진 카할 세포에서는 어떠한 기능과 역할을 나타내는지 규명하고자 하였다.

먼저 전기생리적 실험에서 배양된 마우스 소장 카할 세포는 선행 연구와 마찬가지로 자발적인 서파와 pacemaking 전류를 보였다. 또한 카할 세포에서 자발적인 서파 및 pacemaking 전류뿐만 아니라 자발적인 칼슘 oscillation도 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 위장관에서 카할 세포는 pacemaker로서의 기능을 수행할 수 있음을 시사한다. 5-HT는 카할 세포의 탈분극과 내향성 전류를 유발시켰으며, 세포내 칼슘 농도 및 oscillation 빈도를 증가시켰다. 선행 연구들에 의하면 장신경에서 분비된 신경전달물질들은 직접 평활근에 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 그러나 최근 Ward 등(2004)은 장신경의 varicose부분과 카할 세포 사이에 신경의 연결부위와 비슷한 구조가 존재하며, 장신경에서 분비되는 신경전달물질들이 카할 세포를 활성화 시키고, 이러한 카할 세포의 활성화를 통해 평활근의 활동도를 조절한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 5-HT에 의한 카할 세포의 탈분극, 내향성 전류의 유발 및 칼슘 증가는 장신경에서 분비된 5-HT가 카할 세포에 직접 작용함을 시사한다. 5-HT에 의한 카할 세포의 탈분극 및 칼슘 증가는 카할 세포의 pacemaking 활성을 변화시키고 결국 위장관 평활근의 기능을 조절할 것으로 사료된다.

장에서 5-HT₃ 수용체는 장신경과 점막하 신경(submucosal neuron)등에 존재하며, 아주 빠른 탈분극을 일으킨다(Galligan 등, 1996; Mawe 등, 1986). Glatzle 등(2002)은 5-HT₃ 수용체가 흰쥐 위장관의 카할 세포를 비롯한 장신경 및 내분비 세포에 발현되어있음을 보고하였다. 이들의 연구는 5-HT₃ 수용체가 위장관에서 반사와 장운동 등에 흥분성 및 억제성 기능을 하며, 장 평활근의 pacemaking 기능에도 영향을 미침을 강력히 시사하였다. 이 결과들은 5-HT₃ 수용체의 생리적 기능에 대한 연구가 아닌 세포면역학적 방법에 의한 형태학적 결과였다. 따라서 본 실험에서는 카할 세포에서 5-HT₃ 수용체가 기능적으로 작용하는지 확인하였다. 5-HT₃ 수용체 차단제들인 ondansetron, Y25130 및 MDL7222 등이 5-HT에 의한 탈분극에 미치는 효과가 적음을 보였다. 이는 Glatzle 등이 보고한 대로 5-HT₃ 수용체가 카할 세포에 발현되어 있지만 기능적으로 그 역할이 미미할 가능성도 있고, 혹은 종(species)에 따른 차이 때문일 수도 있다.

반면 5-HT에 의한 막전압의 탈분극은 5-HT₄ 수용체 차단제에 의해 현저히 억제되었으며, 5-HT₄ 수용체 효현제인 VB20B7이 세포막 전압에 미치는 효과가 5-HT에 의한 것과 유사함을 보였다. 이는 카할 세포에서 5-HT에 의한 세포막의 탈분극은 5-HT₄ 수용체를 매개로 함을 시사한다. 카할 세포에서 5-HT는 낮은 농도에서는 칼슘의 oscillation을 증가시키고, 높은 농도에서는 basal 칼슘 농도를 증가시켰다. 5-HT에 의한 세포내 칼슘 증가 역시 5-HT₄ 수용체 차단제들에 의해 억제되었으며, 5-HT₄ 수용체 효현제인 5-MT에 의해 칼슘이 증가하고, 이는 5-HT₄ 수용체 차단제에 의해 억제되는 것으로 보아 5-HT에 의한 카할 세포의 칼슘 증가 역시 5-HT₄ 수용체를 매개로 함을 알 수 있다.

5-HT₄ 수용체는 G-단백 중 Gs 단백질과 연결되어 있다. Gs 단백질은 adenylate cyclase(AC)를 활성화시켜 세포내 cAMP 농도를 증가시키고, 증가된 cAMP는 PKA를 활성화 시켜 다양한 생리적 기능을 나타낸다(Barnes 및 Sharp, 1999; Raymond 등, 2001). 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 활성화에 의한 효과가 이들 경로와 연결되어 있는지를 확인하였다. 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제에 의한 막전압의 탈분극과 칼슘 증가는 PKA 억제제에 의해 소실되었다. 이는 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 활성화에 의한 세포막 전압의 탈분극과 칼슘 증가가 cAMP-PKA 경

로를 통해서 일어남을 시사한다.

5-HT₄ 수용체는 adrenocortical 세포(Cotesse 등, 1996)와 심방근(Ouadid 등, 1992) 등에서 세포내 칼슘 유입(influx)을 증가시킨다. 이러한 칼슘의 유입은 5-HT₄ 수용체 활성화로 인한 cAMP 증가가 L-형 칼슘 통로의 활성을 증가시켜서 일어난 결과이다. 한편 사람의 5-HT₄ 수용체에는 두 종류의 splice variant들이 서로 다르게 조절되기도 한다(Pindon 등, 2002). 즉 5-HT_{4b}는 G_{α₁₀} 및 G_{α_s} 연결 되어있으며, 또 다른 splice variant인 5-HT_{4a}는 G_{α_s}와만 연결이 되어 G_{α_s}를 활성화를 통한 세포내 칼슘 농도 증가를 유발시킨다. 카할 세포에서 5-HT에 의한 칼슘 증가는 5-HT₄ 수용체를 매개로 하며, PKA 의존적 경로를 통해서 칼슘 유입을 증가시킨다. Adrenocortical 세포나 심방근에서의 칼슘 증가는 L-칼슘 통로의 활성 증가로 인한 것인데, 카할 세포에는 L-형 칼슘 통로가 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 카할 세포에서 5-HT₄ 수용체 활성화를 통한 칼슘의 증가는 L-형 칼슘 통로가 아닌 다른 경로를 통해서 유입됨을 시사한다. 마우스 대자의 감각신경세포에서 5-HT₄ 및 5-HT₂ 수용체는 TRPV 통로를 활성화하여 내향성 전류를 유발하였다(Sugiura 등, 2004). 이는 5-HT 수용체가 비선택적 양이온통로(NSCC)를 활성화시킬 수 있음을 의미한다. 따라서 추후 카할세포에서 5-HT에 의한 NSCC 활성화에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

카할 세포에서 5-HT의 효과가 5-HT₄ 수용체를 매개로 하여 일어남을 약리적 방법을 통하여 먼저 확인하였다. 5-HT 작용이 5-HT₄ 수용체를 매개하는 것을 확인하기 위하여 5-HT₄ 수용체 발현을 siRNA를 통해서 억제하여 확인하였다. 먼저 위장관에 존재하는 5-HT₄ 수용체 효현제로 잘 알려진 cisapride가 카할 세포에 미치는 영향을 확인하였다. Cisapride 역시 세포막 전압의 탈분극과 내향성 전류를 유발시켰으며, 5-HT₄ 수용체 차단제에 의해 그 효과가 억제되는 것을 확인하여, 배양된 카할 세포에서 cisapride가 5-HT₄ 수용체 효현제로 작용함을 확인하였다. SiRNA를 통해 5-HT₄ 수용체 발현을 억제하였을 때 cisapride에 의한 효과가 소실되는 것으로 보아 카할 세포에서 5-HT에 의한 탈분극과 칼슘 증가에 5-HT₄ 수용체가 중요함을 확인할 수 있었다. SiRNA 자체가 5-HT₄ 수용체에 직접 영향을 미치는지는 마우스 유전자에 존재하지 않음이 확인된 무작위 서열(scrambled

sequence)로 siRNA를 제작하여 확인하였다.

선택적 5-HT₄ 수용체 리간드(ligand)들은 심부정맥(Kaummann 및 Sanders, 1994), 신경퇴행성 질환(Raynolds 등, 1995), 그리고 요실금(Hegde 및 Eglen, 1996)과 같은 장애에 효과적인 치료제로 사용되어왔으며, 특히 5-HT₄ 수용체의 발현과 그 기능은 5-HT₃ 수용체와 함께 지난 십수년간 위장관 약리에서 중요한 초점이 되어왔다(Hoyer, 2002; Kim 및 Camilleri, 2001). Cisapride, renzapride, zacopride 등과 같은 benzamide계 약물은 5-HT₄ 수용체에 효현제로 작용을 하였다(Buchheit 및 Buhl, 1991; Linnik 등, 1991; Taniyama 등, 1991). 5-HT₄ 수용체 효현제인 cisapride는 여러 실험 동물 모델에서 식도, 위, 소장 및 대장의 수축을 항진 시킬 뿐만아니라, 임상적으로 위식도 반사(gastroesophageal reflex) 장애 혹은 위장관 마비나 운동장애 치료제로 사용되어왔다(Camilleri 및 von der Ohe, 1994). 기니픽(guinea pig)에서 5-HT₄ 수용체 활성화는 기니픽 소장을 수축시켰으며, 장신경계에서는 콜린성 신경전달의 촉진과 연동운동을 활성화시켰다(Craig 및 Clarke, 1991; Craig 및 Clarke, 1990; Rizzi 등, 1992). 위에서 보듯 위장관에서 5-HT₄ 수용체의 작용은 주로 장신경계 혹은 평활근과 장점막에 초점이 맞춰져 왔으며, pacemaking에 중요한 카할 세포에는 연구된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서의 결과들은 위장관에서 5-HT₄ 수용체의 prokinetic 효과들이 장신경과 평활근 뿐만 아니라 카할 세포를 통해서도 일어남을 제시한다. 이와같은 연구결과는 장운동의 pacemaker인 카할 세포가 장신경 및 평활근과 함께 위장관 운동장애에 대한 5-HT의 새로운 치료 목표가 될 수 있음을 시사한다.

제5장 결론

배양된 카할 세포에서 5-HT 수용체 활성화가 카할 세포의 막전압과 전류 변화 및 세포내 칼슘 농도 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 5-HT는 카할 세포에서 막전압을 탈분극 시켰으며, 막전압 고정법 하에서는 내향성 전류를 유발시켰다.
2. 낮은 농도의 5-HT는 카할 세포의 칼슘 oscillation의 빈도를 증가시키며, 높은 농도에서는 basal 칼슘 농도를 증가시켰다.
3. 5-HT₃ 수용체 차단제는 5-HT에 의해 유발되는 탈분극에 영향을 미치지 못하였다.
4. 5-HT₄ 수용체 효현제는 세포막의 탈분극 및 내향성 전류를 유발 시켰으며, 세포내 칼슘 농도를 증가시켰다.
5. 5-HT₄ 수용체 차단제는 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제에 의한 막전압의 탈분극과 세포내 칼슘 증가를 억제하였다.
6. Myristoylated PKA 억제제는 5-HT 및 5-HT₄ 수용체 효현제의 작용을 차단하였다.
7. siRNA를 통해 5-HT₄ 수용체 발현을 억제하였을 때 5-HT₄ 효현제 작용이 억제됨을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 마우스 소장 카할 세포에는 5-HT₄ 수용체가 발현되어 있으며, 5-HT₄ 수용체는 카할 세포의 pacemaking 활동도를 조절하여, 위장관의 세로토닌성 조절에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

참고문헌

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999;38(8):1083-1152.

Bauer AJ, Publicova NG, Sanders KM. Origin and spread of slow waves in canine gastric antral circular muscle. *Am J Physiol* 1985;249:G800-G860

Bertaccini G. Tissue 5-hydroxytryptamine and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid after partial or total removal of the gastrointestinal tract in the rat. *J Physiol (Lond)* 1960;153:239-249

Buchheit KH, Buhl T. Prokinetic benzamides stimulate peristaltic activity in the isolated guinea pig ileum by activation of 5-HT₄ receptors. *Eur J Pharmacol* 1991;205(2):203-208.

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

Camilleri M, von der Ohe MR. Drugs affecting serotonin receptors. In: Hawkey CJ, ed. *Bailliere's clinical gastroenterology: International practice and research*, vol 8, no 2. London: Bailliere Tindall, 1994:301-319.

Contesse V, Hamel C, Lefebvre H, Dumuis A, Vaudry H, Delarue C. Activation of 5-hydroxytryptamine₄ receptors causes calcium influx in adrenocortical cells: involvement of calcium in 5-hydroxytryptamine-induced

- steroid secretion. *Mol Pharmacol* 1996;49:481-493.
- Graig DA, Clarke DE. Peristalsis evoked by 5-HT and renzapride: evidence for putative 5-HT₄ receptor activation. *Br J Pharmacol* 1991;102(3):563-564.
- Graig DA, Clarke DE. Pharmacological characterization of a neuronal receptor for 5-hydroxytryptamine in guinea pig ileum with properties similar to the 5-hydroxytryptamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;252(3):1378-1386.
- Dreyfus DF, Bornstein MB. Uptake of serotonin by intrinsic neurons of the myenteric plexus grown in organotypic tissue culture. *Brain Res.* 1977;128(1):109-123.
- Espramer V, Testini A. Observations on the release and turnover rate of 5-hydroxytryptamine in the gastrointestinal tract. *J Pharm Pharmacol* 1959;11:618-623
- Furness JB, Costa M. Transmitter neurochemistry of enteric neurons. In: the enteric nervous system. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987:55-89
- Galliagn JJ. Electrophysiological studies of 5-hydroxytryptamine receptors on enteric neurons. *Behav Brain Res* 1996;73:199-201
- Gershon MD, Drakontides AB, Ross LL. Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science* 1965;149:197-199
- Gershon MD, Tamir H. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine from resting and stimulated enteric neurons. *Neuroscience.* 1981;6(11):2277-2286

- Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13Suppl2:15-30
- Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters - roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20 Supp7:3-14
- Glatzle J, Sternini C, Robin C, Zittel TT, Wong H, Reeve JR Jr, Raybould HE. Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2002;123:217-226
- Hanani M, Freund HR. Interstitial cells of Cajal their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand.* 2000;170(3):177-90.
- Hegde SS, Eglen RM. Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J* 1996;10:1398-1408.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71(4):533-554.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 327:347-349.
- Kaumann AJ, Sanders L. 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;349(4):331-337.

- Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterology* 2000;95:2698-2709.
- Linnik MD, Butler BT, Gaddis RR, Ahmed NK. Analysis of serotonergic mechanisms underlying benzamide-induced gastroprokinesis. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259(2):501-507.
- Mawe GM, Branchek TA, Gershon MD. Peripheral neural serotonin receptors: identification and characterization with specific antagonists and agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9799-9803
- Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol* 1992;41:346-351.
- Pindon A, van Hecke G, van Gompel P, Lesage AS, Leysen JE, Jurzak M. Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with G_{α-} and G_{α_{i/o}} proteins. *Mol Pharmacol*. 2002;61(1):85-96.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther*. 2001;92:179-212.
- Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Keczer S, Parnes H, Eglen RM, Wong EH. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative

- diseases. *Br J Pharmacol* 1995;114(5):993-998.
- Rizzi CA, Coccini T, Onori L, Manzo L, Tonini M. Benzimidazolone derivatives: a new class of 5-hydroxytryptamine₄ receptor agonists with prokinetic and acetylcholine releasing properties in the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261(2):412-419.
- Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1996;11(2):492-515.
- Sugiura T, Bilefeldt K, Gebhart GF. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci* 2004;24(43):9252-9530.
- Taniyama K, Nakayama S, Takeda K, Matsuyama S, Shirakawa J, Sano I, Tanaka C. Cisapride stimulates motility of the intestine via the 5-hydroxytryptamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;258(3):1098-1104.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech*. 1999;47(5):344-60.
- Verbeuren TJ. Interaction of 5-HT with autonomic and sensory neurons. In: fozard JR, ed. The peripheral actions of the 5-hydroxytryptamine in peripheral tissues. Oxford: Oxford University Press, 1989:1-25.
- Wade PR, Tamir H, Kirchgessner AL, Gershon MD. Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotopic antibodies to 5-HT

- receptors. *Am J Physiol*. 1994;266:G403-416.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the protooncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in mice intestine. *J Physiol* 1994; 480:91-97
- Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 2001;262:125-132
- Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16:112-7
- Wood JD, Mayer CJ. Serotonergic activation of tonic-type enteric neurons in guinea pig small bowel. *J Neurophysiol* 1979;42:582-593
- Zhou X, Galligan JJ. Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(2):803-810.

ABSTRACT

Effects of Serotonin on Cajal Cells of Murine Small Intestine

Seo, Jung In

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor In Deok Kong)

Serotonin (5-hydroxytryptamine 5-HT) plays an important role in the brain as well as in the gastrointestinal (GI) tract as neuroenteric modulator. Recently, the 5-HT₃ receptor immunoreactivities were found in the rat GI tract including the interstitial cells of Cajal (ICC), which is known as the pacemaker cell of the peristaltic movement. To date, however, functional roles of 5-HT receptors in the ICC had not been elucidated. Therefore, this study was performed to clarify the influences of 5-HT receptor activation on the membrane potential, membrane current and intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) together with their regulatory mechanisms in the ICC. We isolated the ICC from the small intestine of the 7-10 day-old Balb/C mouse and cultured for 1 or 2 days before using. After confirmation of pacemaking activity in the cultured ICC, we measured the membrane potential and membrane currents by using the whole-cell patch clamp technique. Changes in [Ca²⁺]_i was measured with Fura-2/AM using fluorescence measurement system. In the ICC with pacemaking activity, resting membrane potential was 56.4±1.2 mV (n=33) and intensity of the slow wave was 26.6±2.3 mV (n=20). The amplitude of pacemaking current was

581±75.9 pA (n=22) and its frequency was 15.4±0.7 (n=45). 5-HT induced a depolarization (-19.3±1.9 mV) in the membrane potential during current clamp-mode and a prominent inward current (-546.8±111.2 pA) during voltage clamp-mode with holding at -80 mV. The 5-HT-induced depolarization was partially or completely blocked by RS23579-190 and SDZ, which are known as selective 5-HT₄ receptor antagonists but not by the 5-HT₃ receptor antagonists, such as ondansetron (5 μM), Y25130 (10 μM) and MDL7222 (1 μM). In Fura-2 loaded ICC, low concentrations of 5-HT (0.1 μM, 1 μM and 10 μM) increased frequency of the [Ca²⁺]_i oscillation and its basal level in a concentration-dependent manner. At 100 μM of 5-HT, however, oscillation was disappeared and basal [Ca²⁺]_i level only was continuously increased. This increase in [Ca²⁺]_i was mimicked by 5-HT₄ agonists (5-methoxytryptamine and 2-[1-(4-piperonyl)piperazinyl]benzothiazole) and blocked by 5-HT₄ blockers. Myristoylated PKA inhibitor (100 nM) markedly attenuated the depolarization and [Ca²⁺]_i changes caused by 5-HT and 5-HT₄ agonists. After application of siRNA targeted against 5-HT₄ receptor in the ICC, the depolarization of the membrane current and the inward current induced by 5-HT₄ receptor agonist (cisapride) were disappeared. From all these results, it is concluded that 5-HT receptor induces membrane depolarization and [Ca²⁺]_i increase in the ICC, which is responsible for the serotonergic modulation of the gastrointestinal function.

Key words: Interstitial cells of Cajal, 5-HT₄ receptor, intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) measurement