

저산소/재산소화와 Sodium Nitroprusside가 분리 위선세포의 산분비 및 세포내 Cyclic Nucleotide에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 약리학교실 및 소화기병연구소

김혜영 · 이송철 · 김경환

Effects of Hypoxia/Reoxygenation and Sodium Nitroprusside on Acid Secretion and Cyclic Nucleotide of Isolated Gastric Cells

Hyeyoung Kim, Ph.D., Song Zhe Lee, M.D. and Kyung Hwan Kim, M.D.

*Department of Pharmacology and Institute of Gastroenterology
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

= Abstract =

Background/Aims: Ischemia/reperfusion is associated with mucosal injury in trauma, major surgery, and nonsteroidal anti-inflammatory drug administration. Nitric oxide and cyclic nucleotides appear to play a cytoprotective role against gastric mucosal injury. Present study was aimed to investigate a cytoprotective mechanism of gastric cells against hypoxia/reoxygenation. **Methods:** Isolated gastric cells treated with or without sodium nitroprusside were exposed to hypoxia(30min)/reoxygenation(1h). Histamine(10^{-4} M) with 3-isobutyl-1-methylxanthine(10^{-4} M) was used to stimulate acid secretion. Acid secretory activity was measured by [14 C]-aminopyrine accumulation ratio. The intracellular cGMP and cAMP were determined by radioimmunoassay. The cell viability was assessed by lactic dehydrogenase release and trypan blue exclusion test. **Results:** Hypoxia/reoxygenation inhibited acid secretion, but increased intracellular levels of cGMP and cAMP. Sodium nitroprusside inhibited acid secretion stimulated by histamine and 3-isobutyl-1-methylxanthine. cGMP level, but not cAMP level, of gastric cells was increased by sodium nitroprusside. Cell viability was neither affected by hypoxia/reoxygenation nor sodium nitroprusside. **Conclusions:** Hypoxia/reoxygenation increases cGMP and inhibits acid secretion, possibly through nitric oxide induction, which acts as a mucosal defense mechanism. Increase of cellular cAMP during hypoxic exposure is thought of as cellular adaptation, and this is not related to acid secretion. (Korean J Gastroenterol 1997;29:164-174)

Key words : Hypoxia/reoxygenation, Sodium nitroprusside, Cyclic nucleotide, Acid secretion, Gastric cell

접수: 1996년 4월 6일, 승인: 1996년 8월 2일

연락처 : 김혜영, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 약리학교실

본 연구의 일부는 연세대학교 의과대학 약리학교실 1995년도 유한연구비의 보조로 이루어 졌음.

서 론

위점막은 허혈 또는 저산소시 급성 손상이 발생하며,^{1,4} 이 같은 위점막 손상은 위 전정부보다는 위 체부에서, 점액 분비 세포보다는 위산 분비 세포에서 더욱 민감하게 나타난다.¹ 허혈로 인한 위 점막 손상은 재관류 과정에서 더욱 심해진다.^{5,6} 이러한 허혈/재관류로 인한 점막 손상은 허혈 단독인 경우보다 주로 재관류시 악화되며, 주 손상 인자로는 다핵구 세포로부터 발생하는 산소 유리기(oxygen derived free radicals, $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2)가 중요한 손상인자로 알려져 있으며,^{6,7} 산소 유리기 이외에도 histamine,⁸ leukotriene,⁹ platelet-activating factor(PAF),¹⁰ endothelin^{11,12} 등과 같은 화학적 매개물질들도 관여한다. 이들 물질들은 콩팥 상피 세포에서 세포의 극성을 파괴시키거나,¹³ Ca^{++} 의 세포내 농도를 증가시켜¹⁴ 저산소증에 의한 손상을 악화시킨다고 추측하고 있다.

Cyclic nucleotide가 위점막 세포 보호기전으로 작용하리라는 가설은 indomethacin과 stress에 의한 위궤양 모델에서 항궤양제로 prostaglandin을 투여하면 cAMP 및 cGMP가 증가한 실험결과¹⁵로 증명되었다. 저산소 이후 세포내 cyclic nucleotides에 대한 보고들은 대부분 혈관을 이용한 실험결과로 쥐의 관상동맥 및 폐동맥에서 저산소 직후 cAMP 및 cGMP가 증가하며^{16,17} 이를 세포적응 현상의 하나로 설명하고 있다.

주효세포(effector cell)에서 nitric oxide(NO)는 guanylate cyclase를 활성화시켜¹⁸ cGMP를 생성하며^{19,21} cGMP는 cGMP의존성 protein kinase를 활성화하거나²¹ 이온 통로에 작용하기도 한다.²² 그러나 주머니 쥐(opossum)의 항문근을 이용한 실험²³에서 NO가 cAMP를 상승시킨다고 하였고, 기니픽 적출 위 평활근 실험²⁴에서도 유사한 결과를 얻어 NO의 작용에 cGMP 비의존성 경로가 제시된 바 있다. 최근에는 Ca^{++} 과 NADPH 의존성 NO synthase가 쥐의 위 점막에서 발견되었으며,²⁵ NO synthase의 활성이 억제될 경우 위 점막 혈류가 감소하고,²⁶ 위 점막이 손상된다고 하였다.²⁷ NO 억제제인 N^G -monomethyl-L-arginine과 guanylate cyclase 억제제인 methylene blue를 이용한 실험에서 NO가 점막세포 보호기능을 가지고 있다

고 하였다.^{28,29} 이와 같은 보고들은 NO가 위점막 손상에 대한 보호 작용이 있음을 간접적으로 시사하고 있다. 그러나 이의 기전에 관한 연구는 미미한 실정이며, 특히 저산소/재산소화에 의한 점막 손상에서 NO의 역할에 대한 연구는 많지 않다. Pohl과 Busse³⁰는 저산소에서 NO가 증가하나, 이후 재산소화 과정에서 NO의 반응력이 저하된다고 하였다. 이는 생성된 NO가 재산소화 과정에서 생성된 산소 유리기와 반응하여 소멸되거나,³¹ 또는 산소 유리기에 의해 직접 내피세포가 파괴되어 NO 생성이 감소되기 때문이라고 하였다. Senoo 등³²은 저산소/재산소화 과정의 점막 방어 기전에 위산 분비 능력의 감소가 관여한다고 주장하였다. 이외에도 NO가 다른 보호 작용 매개물인 PGE_2 등과 상호 작용으로 위점막 통합성에 관여하고 위 혈류량을 증가시키며²⁷ 위점막 혈류 조절은 NO의 점막 보호작용 기전에 중요한 역할을 할 것이라고 한다.

Sodium nitroprusside는 NO 공여물로서 sodium nitrite, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, 3-morpholin-osydanimine 등과 함께 혈관확장 약물로 임상적으로도 이용되고 있다. NO 공여물들은 체내에서 NO를 유리시킴으로써 여러 생리작용을 나타내며, 소화기계에서는 점액³³과 HCO_3^- ³⁴ 분비, 위점막의 통합성유지³⁵ 등의 연구에 사용되고 있다. 최근의 sodium nitroprusside를 이용한 소화기계 연구로는 위장 평활근과 팔약근의 이완유도³⁶ 및 위장관의 안정기 긴장도(resting tone)의 감소와 자발성 수축의 완화등이 있다.³⁷

본 연구는 저산소/재산소화 과정시 NO의 위선세포 방어작용 및 기전을 규명하기 위하여 첫째, 분리 위선세포를 세포 생존에 영향을 주지 않는 정도로 저산소/재산소화에 노출시킨 후 위산분비 및 세포내 cGMP 및 cAMP의 변동을 관찰함으로써 세포 방어기전으로서 cyclic nucleotide의 역할을 확인하고자 하였으며 둘째, 위선세포내 cyclic nucleotide, 위산분비 및 NO와의 관계규명을 위하여 NO 공여물인 sodium nitroprusside 투여후 위산분비 변동과 세포내 cGMP 및 cAMP를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 위 관류 및 적출

수컷 New Zealand 흰토끼(1.5-2.5kg)에 secobarbital (30mg/kg)을 정맥주사하여 마취한 다음 복부를 절개하여 복부 동맥에 혈류와 역행하는 방향으로 도관을 삽입하였다. 도관을 통하여 5ml의 heparin(250U/ml)을 힘을 주어 주사하고 1분후 도관을 통하여 출혈시킨 다음 장관막 혈관을 결찰하였다. 가슴을 절개하여 흉부 대동맥을 검자로 차단하고 37℃의 산소포화 인산완충용액(PBS; NaCl 149.6mM, K₂HPO₄, 3mM, NaH₂PO₄ 0.64mM; pH 7.3)을 도관을 통하여 동맥으로 강제 주입함과 동시에 문맥을 열어 관류액이 나오도록 하였다. 이 방법에 의하면 대부분의 PBS 용액은 위혈관을 통과하게 되며, 관류 속도는 45ml/min되도록 flow inducer (Watson-Marlow Ltd., Cornwall, U.K.)로 조정하였다. 위에서 혈액이 완전히 제거되기까지 대략 500ml의 PBS를 관류하였으며, 그후 위를 적출하여 소만을 따라 절개한후 위 내용물을 비웠다.

2. 위선세포 분리

적출한 위의 분문부와 전정부를 제거하고 체부만을 PBS로 여러번 세척한 후 여과지로 물기를 제거하여 잔여 위 내용물과 표면 상피 세포들을 제거하였다. 위점막을 근층으로부터 분리한 후 잘게 썰어 산소포화 인산완충용액(37℃)으로 두번 세척하고 50ml의 collagenase 효소 용액(NaCl 130mM, NaHCO₃ 12mM, NaH₂PO₄ 3mM, Na₂HPO₄ 3mM, K₂HPO₄ 3mM, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 1mM, phenol red 10mg/L; 사용 직전에 Type I collagenase(Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 1mg/ml, rabbit albumin 1mg/ml, glucose 2mg/ml 첨가)이 담긴 200ml 플라스크에 잘게 썬 위 점막을 옮기고 100% 산소로 포화시킨 후 봉하여 37℃ 수조에서 가볍게 흔들며 반응시켰다. 위를 적출하여 반응 시작할 때까지의 전 과정을 5분 이내에 행하였으며 90분후 위선세포가 분리되면 반응을 정지시키고 이후 실험은 실온에서 행하였다. 위선세포의 뿌연 분산액을 nylon mesh로 여과하여 15ml 시험관에 옮겼으며 이때 시험관에서 위선세포는 가볍게 가라앉아 원심 분리될

하지 않고도 세포 손상을 최소화하면서 쉽게 재분산시킬 수 있었다. 실온에서 working buffer(NaH₂PO₄ 0.5mM, Na₂HPO₄ 1mM, NaHCO₃ 20mM, NaCl 70mM, KCl 5mM, glucose 11mM, HEPES 50mM(pH 7.4), CaCl₂ 1.5mM, MgCl₂ 1.5mM, bovine serum albumin(BSA) 1mg/ml)로 3회 세척하여 위선세포로부터 collagenase를 제거하였다³⁸ 분리한 위선세포는 trypan blue exclusion법으로 세포 생존율이 90% 이상임을 확인한 후 실험에 사용하였다.

3. 저산소/재산소화 실험

분리된 위선세포를 working buffer에 분산시킨 후 10⁻⁵M-10⁻³M sodium nitroprusside(Sigma Co., St. Louis, MO) 투여군과 대조군으로 구분하여 100% 산소(대조군) 또는 100% 질소(저산소증) 조건하에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난후 대조군과 저산소군 모두 100% 산소상태로 전환하였다. 이를 다시 histamine (10⁻⁴M)과 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx; 10⁻⁴M) 투여군과 투여하지 않은 군으로 구분하여 모두 37℃에서 60분간 반응시켰다. 저산소/재산소화 전 과정후 위산분비의 척도로 세포내외의 [¹⁴C]-aminopyrine 축적 비율을 측정하였으며, 위선세포내 cAMP와 cGMP 및 세포생존율을 평가하였다.

4. [¹⁴C]-Aminopyrine 축적비율

Aminopyrine은 약염기로서 산성인 위벽 세포안으로 확산된다. 그러므로 위선세포 내외의 [¹⁴C]-aminopyrine 축적 비율은 위산 분비 능력의 지표로 사용된다⁴⁰⁻⁴² [¹⁴C]-aminopyrine의 축적실험은 Berglinth 등의 방법⁴⁰을 수정하여 사용하였다. 요약하면 위선세포 분산액(25mg 습중량/ml)을 sodium nitroprusside 투여군과 대조군으로 나누어 37℃에서 100% 질소 또는 산소 공급하에 30분동안 반응시켰다. 30분후 위산분비 촉진 상태를 위해 histamine(10⁻⁴M)과 IBMx(10⁻⁴M)를 투여하고 동시에 0.2μCi/ml [¹⁴C]-aminopyrine(109mCi/mmol; Amersham International plc., Amersham, U.K.)을 위선세포 분산액에 첨가하여 37℃에서 60분간 100% 산소 공급하에서 흔들며 반응시켰다. 기초 산분비를 유지하는 대조군엔 vehicle만 첨가후 동일조건으로 반응시켰다. 반응액을 원심분리하여(20,000×g,

2분 침전한 세포 (pellet)는 1N NaOH 0.5ml를 가하여 용해시켰으며, 상층액(1ml)은 그대로 10ml의 Instagel[®] (Packard Instrument, Downers Grove, IL, U.S.A.)을 가한후 방사능을 Beckman LS 5000 TA Counter (Fullerton, CA, U.S.A.)로 측정하였다. 위선세포 용해액의 방사능(radioactivity of pellet, cpm_p)과 위선세포 외 반응액의 방사능(radioactivity of supernatant, cpm_m)과의 비율로 위선세포의 산 분비를 평가하였다.

$$[^{14}\text{C}]\text{-Aminopyrine 측정 비율} = \text{cpm}_p / \text{cpm}_m$$

5. 위선세포내 cAMP 측정

반응이 끝난후 원심분리하여 얻은 위선세포(75mg 습중량/ml 반응액)를 200 μ l의 Tris/EDTA buffer (50mM/4mM, pH 7.5)를 가하고 초음파 분쇄하였다. 분쇄한 위선세포는 100 $^{\circ}$ C 수조에 3분간 담귀 phosphodiesterase 활성을 억제시키고 단백질을 응고시킨 다음 20,000 \times g로 2분간 원심분리하였다. 위선세포내 cAMP는 방사면역 측정시약(Amersham International plc., Amersham, U.K.)을 사용하여 원심분리후 얻은 상층액에서 측정하였다. 요약하면, 상층액 50 μ l를 취하여 시험관에 [³H]-cAMP 50 μ l와 결합단백 100 μ l를 첨가하여 얼음에 채운 상태로 냉장고 (2-8 $^{\circ}$ C)에 2시간 보관하였다. 활성화된 charcoal 100 μ l를 첨가하여 5분간 얼음위에 방치한 다음 12,000 \times g로 2분간 원심분리후 항원-항체 반응이 일어난 cAMP 함유 상층액 200 μ l에 Instagel[®] 5ml를 넣고 4분간 방사능을 측정하였다. 위선세포내 함유된 cAMP 함량은 2-10 pmole 범위로 작성한 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

6. 위선세포내 cGMP 측정

cAMP 측정시와 마찬가지로 초음파 분쇄한 위선세포 분산액을 100 $^{\circ}$ C 수조에 3분간 담귀 phosphodiesterase 활성을 억제시키고 단백질을 응고시킨 다음 20,000g로 2분간 원심분리한 후, 방사면역 측정시약 (Amersham International plc., Amersham, U.K.)으로 측정하였다. 요약하면, 상층액 100 μ l를 취하여 [³H]-cGMP 50 μ l와 항 혈청 50 μ l를 첨가하여 얼음에 채운 상태로 냉장고(2-8 $^{\circ}$ C)에 90분간 보관하였다. (NH₄)₂SO₄ 용액 1ml를 첨가하고 얼음물에 5분간 방치한 뒤 12,000 \times g로 2분간 원심분리하여 면역반응이 일어나지

않은 cGMP를 함유한 상층액은 버리고 시험관을 뒤집어 용액이 흐르게 한 뒤 면봉을 이용하여 남은 용액을 완전히 제거하였다. 증류수 1.1ml를 취하여 Instagel[®] 5 ml를 넣고 4분간 방사능을 측정하였다. cGMP 농도는 2-10 pmole 범위로 작성한 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

7. 세포 생존율

정상 산소 상태 및 저산소/재산소화 과정과 sodium nitroprusside 처리이후 세포 생존정도는 반응액으로 유리되는 lactic dehydrogenase(LDH) 활성 측정 및 trypan blue exclusion법으로 확인하였다. LDH 활성은 Babson 및 Phillips의 방법⁴³으로 측정하였다.

8. 통계처리

모든 결과는 "평균값 \pm 표준오차"로 표현하였으며 실험군간의 변화 양상을 검토하기 위하여 analysis of variance를 이용하였다. Post-hoc test로는 Newman-Keul test⁴⁴로 유의성을 검정하며 P값이 0.05이하일 경우 유의적 차이가 있는 것으로 평가하였다.

결 과

1. 기초 및 촉진 위산분비에 대한 저산소/재산소화의 영향

정상산소 공급하에서 [¹⁴C]-aminopyrine의 세포내 축적비율은 기초상태가 2.5 \pm 0.1% 이었고, histamine +IBMX 자극에 의한 촉진상태에서는 8.3 \pm 0.3%(기초상태의 332%)이었다. 위선세포를 저산소/재산소화에 노출시킨후의 기초 위산분비는 1.6 \pm 0.1%로 정상산소상태의 60%로 감소되었고, 촉진상태에서는 5.4 \pm 0.2%로 정상산소시 반응의 65%이었다(Fig. 1A)

2. 저산소/재산소화에 의한 세포내 cGMP 및 cAMP 변동

정상산소하의 기초상태에서 세포내 cGMP는 0.40 \pm 0.07 pmol/mg이었고, histamine +IBMX 자극에 의해 1.84 \pm 0.11 pmole/mg로 증가하여 기초상태의 450%이었다. 위선세포를 저산소/재산소화에 노출시켰을 때 세포내 cGMP의 기초상태(1.12 \pm 0.19 pmole /mg)는

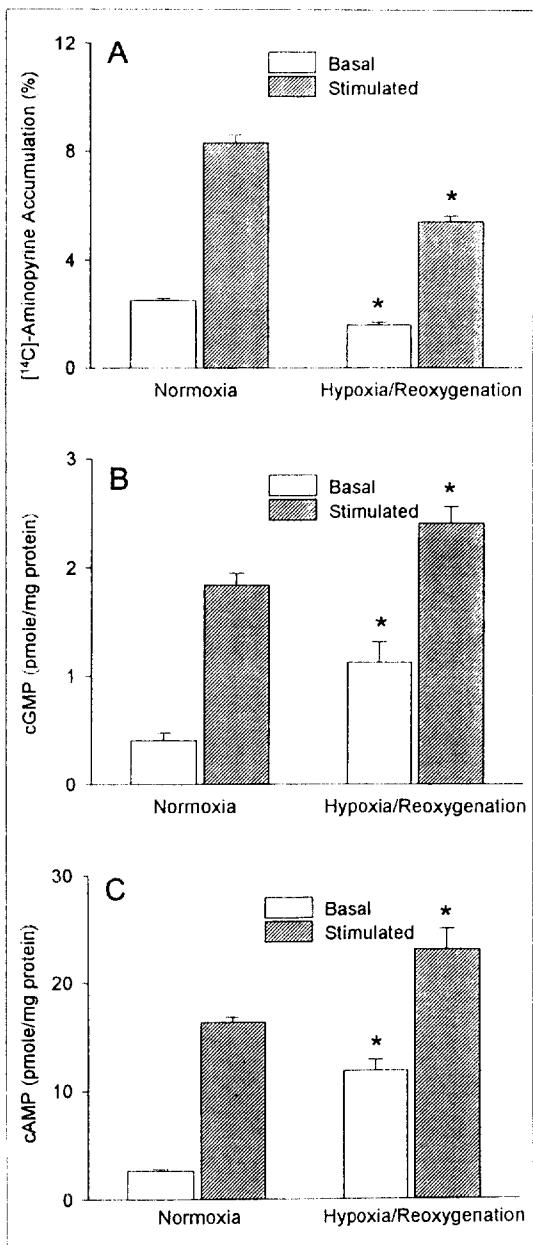


Fig. 1. Effect of hypoxia/reoxygenation on acid secretion(A), cGMP level(B) and cAMP level(C) of gastric cells with or without treatment of secretagogues. After 30min incubation under 100% N₂(hypoxia) or 100% O₂(normoxia), further 1 hour incubation with or without treatment of histamine(10⁻⁴M) plus IBMX(10⁻⁴M) was performed and 100% O₂. Each bar represents mean ± SE. *P<0.05 difference from corresponding normoxia.

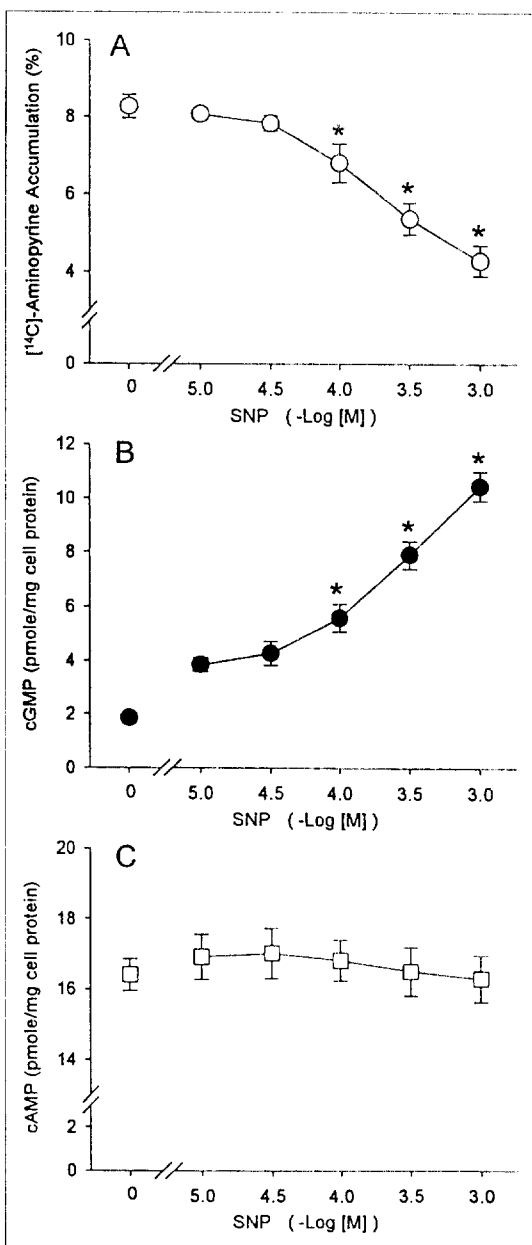


Fig. 2. Dose response of sodium nitroprusside for acid secretion(A), cGMP(B) and cAMP(C) of gastric cells stimulated by secretagogues. After 30min incubation with treatment of sodium nitroprusside (10⁻⁵ ~ 10⁻³M) during normoxia(100% O₂), further 1 hour incubation with treatment of histamine(10⁻⁴M) plus IBMX(10⁻⁴M) was performed under 100% O₂. Each bar represents mean ± SE. *P<0.05 difference from gastric cells without treatment of sodium nitroprusside. SNP, sodium nitroprusside.

정상산소를 공급했을 때보다 유의있게 높았고, histamine+IBMX에 의한 촉진상태에서는 2.40 ± 0.14 pmole/mg으로 증가하였다(Fig. 1B). 이같은 저산소/재산소화 노출에 의한 cGMP의 증가는 정상산소하의 cGMP치와 비교하여 볼때 기초 및 촉진상태에서 각각 280%와 130%이었다.

정상산소 공급하에서 세포내 cAMP는 기초상태에서는 2.63 ± 0.20 pmole/mg 이었고, histamine+IBMX 자극에 의해 16.40 ± 0.45 pmole/mg로 증가하였다. 저산소/재산소화에 노출시킨 세포의 기초상태 cAMP는 11.87 ± 1.00 pmole/mg이었고, 촉진상태에서는 23.01 ± 1.90 pmole/mg로 증가하여 각각 정상산소 상태의 450%와 140%로 저산소증/재산소화시 세포내 cAMP가 현저히 높았다(Fig. 1C).

3. 저산소/재산소화와 sodium nitroprusside가 세포생존율에 미치는 영향

정상산소 및 저산소/재산소화 노출후 LDH 유리는 기초상태의 위선세포에서 각각 45.1 ± 93.0 WU/ml와, 46.5 ± 2.5 WU/ml이었으며, histamine+IBMX에 의한 분비 촉진상태의 위선세포에서 역시 48.0 ± 3.0 WU/ml, 45.1 ± 4.0 WU/ml로 별차이가 없었다(Table 1). Trypan blue exclusion 법에 의한 위선세포 생존율 측정에서도 정상산소 및 저산소/재산소화 노출후 기초 및 위산분비 촉진 위선세포의 생존율엔 유의적 차이를 나타내지 않았다. Sodium nitroprusside(10^{-3} M) 투여는 LDH유리 및 trypan blue exclusion에 영향을 주지

않았다.

4. Sodium nitroprusside가 위산분비에 미치는 영향

Histamine+IBMX에 의해 위산분비는 기초상태의 $2.5 \pm 0.1\%$ 에서 $8.3 \pm 0.3\%$ 로 항진되었다(Fig 1A). Histamine+IBMX 자극에 의한 위산분비 항진은 sodium nitroprusside 10^{-5} M~ 10^{-3} M 첨가로 농도의존적으로 억제되었다(Fig 2A). Sodium nitroprusside 10^{-5} M 및 5×10^{-4} M 투여시 위산분비는 별 변동이 없었으나, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M과 10^{-3} M 투여시 각각 $6.8 \pm 0.5\%$, $5.3 \pm 0.4\%$, $4.2 \pm 0.4\%$ 로 [14 C]-aminopyrine 축적율이 감소되었다.

5. Sodium nitroprusside가 위선세포내 cGMP 및 cAMP에 미치는 영향

Sodium nitroprusside 10^{-3} M은 기초 및 촉진상태, 정상산소 및 저산소/재산소화 상태 모두에서 위선세포의 cGMP를 증가시켰으며, 특히 저산소/재산소화 상태에서 histamine+IBMX로 촉진시킨 위선세포에서 더욱 현저하였다(Table 1). 즉 기초상태에서 저산소/재산소화에 노출된 위선세포의 cGMP는 1.12 ± 0.19 pmole/mg 이었으나 sodium nitroprusside 투여시 5.64 ± 0.99 pmole/mg로 증가하였고, histamine+IBMX로 자극한 위선세포내 cGMP는 2.40 ± 0.15 pmole/mg 에서 10.20 ± 0.91 pmole/mg으로 증가되었다.

정상산소 상태에서 sodium nitroprusside 10^{-3} M을

Table 1. Effects of Sodium Nitroprusside and Hypoxia/reoxygenation on Cell Viability

	LDH release		Trypan blue exclusion	
	Basal	Stimulated	Basal	Stimulated
Normoxia	45.1 ± 3.0	48.0 ± 3.9	92.0 ± 1.0	92.6 ± 1.0
SNP, 10^{-3} M	45.5 ± 2.8	45.9 ± 2.9	94.4 ± 1.0	93.4 ± 1.2
H/R	46.5 ± 2.5	45.1 ± 4.0	93.1 ± 1.1	92.5 ± 1.3

Values are mean \pm SE in WU/ml (LDH release) and % (trypan blue exclusion test). After 30min incubation with or without treatment of SNP(10^{-3} M) under 100% N₂ (hypoxia) or 100% O₂(normoxia), further 1 hour incubation was performed under 100% O₂. Gastric cells were stimulated by histamine (10^{-4} M) with IBMX (10^{-4} M) at 1 hour incubation period.

SNP, sodium nitroprusside; H/R, hypoxia/reoxygenation

Table 2. Effect of Sodium Nitroprusside on cGMP and cAMP of Gastric Cells Exposed to Hypoxia/reoxygenation

	cGMP		cAMP	
	Normoxia	H/R	Normoxia	H/R
Basal				
None	0.40 ± 0.07	1.12 ± 0.19	2.63 ± 0.20	11.87 ± 1.00
SNP, 10 ⁻³ M	2.73 ± 0.18*	5.64 ± 0.99*	2.66 ± 0.30	11.00 ± 2.05
Stimulated				
None	1.84 ± 0.11	2.40 ± 0.15	16.40 ± 0.45	23.01 ± 1.90
SNP, 10 ⁻³ M	10.46 ± 0.54*	10.23 ± 0.91*	16.30 ± 0.66	22.13 ± 2.89

Values are means ± SE in pmole/mg protein. After 30min incubation with or without treatment of SNP(10⁻³M) under 100% N₂ (hypoxia) or 100% O₂ (normoxia), further 1 hour incubation was performed under 100% O₂. Gastric cells were stimulated by histamine (10⁻⁴M) with IBMX (10⁻⁴M) at 1 hour incubation period.

P<0.05 difference from corresponding gastric cells without treatment of SNP.

SNP, sodium nitroprusside; H/R, hypoxia/reoxygenation

처리한 경우 기초상태 위선세포의 cGMP는 580% 증가하였고(Table 2), histamine+IBMX로 촉진시킨 위선세포는 sodium nitroprusside 10⁻⁵M~10⁻³M 첨가시 농도 의존적으로 cGMP가 증가되었다. Sodium nitroprusside 비처리군의 cGMP 수준은 1.84±0.11 pmole/mg 이었으며, sodium nitroprusside 10⁻⁵M, 5×10⁻⁴M, 10⁻⁴M, 5×10⁻³M, 10⁻³M 처리시 각각 3.86±0.27, 4.29±0.45, 5.60±0.51, 7.89±0.50, 10.46±0.54 pmole/mg로 증가되었다(Table 2, Fig. 2B). 그러나 cAMP는 sodium nitroprusside투여에 의하여 변동되지 않았다(Fig. 2C).

고 찰

NO는 반 필수 아미노산인 L-arginine으로 부터 NO synthase에 의해 생성되어 여러 종류의 세포에서 생리 및 병리 작용을 매개한다고 알려져 있다.⁴⁵ 최근에는 쥐의 위 점막에서 Ca⁺⁺와 NADPH 의존성 NO synthase가 발견되어²⁵ NO가 위산분비와^{26,46} 위점막 보호에 관여하리라는 가능성이 제시되었다.¹¹ NO는 위점막의 통합성 유지에 관여하며²⁷, 이러한 통합성 유지에는 NO에 의한 위 혈류량 증가가 큰 요인으로 작용한다고 한다.⁴⁷ 이는 NO synthase 활성도가 저하되면 NO 생성이 감소하여, 결국 혈류량 감소에 의한 산소 공급 저하로

세포손상이 악화될 가능성을 생각할 수 있다. 또한 NO가 점액 분비,³³ HCO₃ 분비,³⁴ prostaglandin E₂와 상호관련이 있으므로²⁷ NO synthase 활성도 감소로 이들 물질의 생성이 감소할 것으로 추정된다. 한편 소량의 NO는 위점막 보호기능이 있으나 다량의 NO는 오히려 위점막 손상을 악화시킨다는 보고⁴⁸와 위점막내에서 NO의 주 생성원은 내피세포 및 다핵구이며 점막 세포의 NO생성이 상대적으로 적다는 보고⁴⁹를 고려할 때 위점막 NO synthase 활성도 변동과 다양한 통합성 유지 요소들간에 상호 관련성이 있을 것으로 추측할 수 있다.

저산소/재산소화 과정에서 손상받은 위점막에 대한 NO의 보호작용 기전으로는 NO synthase 활성화⁶, 점막을 손상시키는 산소 유리기⁵⁰의 생성원인 다핵구 침착의 감소,¹⁴ 혈소판 응집의 감소,⁵¹ 산소 유리기와 NO의 결합으로 인한 산소유리기의 제거³¹등이 보고되었다. Senoo 등³²에 따르면 저산소이후 점막 손상은 외부에서 투여한 산이 존재할 때에만 발생하며 따라서 저산소 이후 위산분비 감소가 하나의 위점막 보호요인으로 작용할 것이라고 하였다. 위점막 NO synthase 활성도 유지가 위점막 통합성 유지에 중요할 것이라는 보고¹⁴와 본 실험이 보여준 NO의 위산분비 억제기능과 종합하여 보면 위점막 보호기능에 위산분비 억제가 관여할 가능성이 한층 높다. 아울러 위점막 보호기능은 혈

관 내피세포에서 유래된 NO 매개에 의한 혈관 확장이 중요한 요인으로 알려져 왔으나, 본 실험에서는 내피세포 이외에 위선세포에 존재하는 NO synthase에 의한 가능성을 제시하였다는 점에서 중요한 결과라 할 수 있다. 저산소 상태가 지속되는 경우에도 세포의 괴사가 발생하지 않는 한 NO는 저산소 이후에도 점막 보호기능을 유지한다.²⁷ 실제로 본 연구에서도 저산소하의 기초 산 분비에서 NO 공여물질을 투여한 경우 세포내 cGMP가 정상산소 상태에서와 유사하게 현저히 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 저산소/재산소화 이후 생성된 NO의 점막 보호기능은 유지될 수 있다는 설명이 가능하다. 본 실험에서 저산소/재산소화 이후 감소되는 위산분비는 세포생존율이나 cAMP의 감소가 없으므로 비특이적인 세포기능의 파괴에 의한 것이 아님이 증명되었다.

위산분비의 주경로는 histamine과 H₂ 수용체와의 결합에 의해 G단백 매개 adenylate cyclase 활성을 증가 시킴으로 이루어진다. Adenylate cyclase는 cAMP를 축적시켜, cAMP 의존성 protein kinase A(PKA)를 활성화시키고 PKA는 H⁺, K⁺ ATPase에 대한 양자 이동의 증가로 위산분비를 촉진시킨다.⁵² 그러므로 위산분비의 감소는 세포내 매개물인 cAMP의 감소가 예상되나 본 실험결과에서는 증가하는 결과를 보였다. 이는 두가지 의미를 가질 수 있다. 하나는 저산소/재산소화 이후 위산분비 억제부위가 세포내 신호 전달체계 가운데 cAMP 이후 단계에 관여할 가능성이 있고 또 하나는 cGMP 매개 위산분비 억제 가능성이다. 후자의 경우 본 실험결과 정상 산소 상태에서는 NO에 의하여 위산분비가 억제되고 동시에 cGMP는 증가하였으나 cAMP는 변동이 없었던 결과를 볼때 세포내 cGMP 매개에 의한 위산분비 억제 가능성이 한층 높아진다. 쥐 항문근을 이용한 실험²³에서 NO가 세포내 cAMP 및 cGMP 모두를 상승시킨다고 하였고 적출 위 평활근 실험²⁴에서 유사한 결과를 얻어 NO의 작용에 cGMP 의존성 경로 이외에 cGMP 비의존성 경로가 관여할 가능성이 제시되고 있다. 그러나 비록 다른 장기이기는 하나 본 실험 결과는 이들 실험 결과와는 달리 NO 투여후 정상산소 상태 및 저산소/재산소화 이후 모두에서 cGMP의 증가를 보였으나 cAMP의 변동은 없었다. 이와 같은 결과로 추정하여 보면, NO는 위선세포의 분비와 관련

하여 적어도 cAMP 경로와는 다른 경로로 작용하거나 혹은 위산분비 관련 세포내 신호 전달 체계 중 cAMP 이후 단계에 관여할 것으로 추측된다.

본 실험결과에서도 저산소/재산소화에 노출시킨 세포에서 측정된 cAMP 및 cGMP는 모두 증가하여 위점막내에서도 다른 장기에서와 유사한 결과를 보였다. 이는 위산분비 감소 이외에도 세포 손상을 극복하여 항상성을 유지하기 위한 세포의 적응현상으로 생각된다. 또한 저산소/재산소화 이후 억제된 위산분비는 cGMP 상승으로 유추해 볼때, NO 생성 증가에 기인할 가능성이 있으며, cAMP 증가는 NO 매개 경로가 아닌 다른 세포내 신호변환 기전과 관련이 있을 것으로 생각된다. 한편 토끼 혈소판⁵³ 및 주머니 쥐(opossum)의 항문 내 팔약근²³에 NO 공여물로 sodium nitroprusside 또는 3-morpholinopyridine을 투여하였을 때 cGMP 및 cAMP가 상승하며 이때 cAMP의 상승은 NO에 의해 증가된 cGMP가 cAMP의 분해를 억제시켜 나타난다는 보고를 볼 때, 본 실험결과에도 이와 같은 이론을 적용시켜 설명할 수 있으리라 생각된다.

요 약

목적: 허혈/재관류는 위상, 대수술, 비스테로이드계 항염증 약물투여 등에 의한 점막손상의 원인으로 알려져 있다. Nitric oxide와 cyclic nucleotides는 위점막 손상에 대한 보호기전에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 저산소/재산소화에 대한 위선세포의 세포 보호기전을 규명하고자 하였다. **대상 및 방법:** 분리 위선세포에 sodium nitroprusside를 투여한 후 저산소(30분)/재산소화(1시간)에 노출시켰다. 위산분비 측진을 위하여 위선세포에 histamine(10⁻⁴M)과 3-isobutyl-1-methylxanthine(10⁻⁴M)을 처리하였다. 위산분비능은 [¹⁴C]-aminopyrine 축적물로 측정하였고, 세포내 cGMP와 cAMP는 방사면역법으로 측정하였다. 세포생존율은 lactic dehydrogenase 유리 및 trypan blue exclusion법으로 결정하였다. **결과:** 저산소/재산소화는 위산분비를 억제하였고 세포내 cGMP 및 cAMP를 증가시켰다. Sodium nitroprusside는 histamine과 3-isobutyl-1-methylxanthine으로 촉진시킨 위산분비를 억제시켰다. Sodium nitroprusside 투여는 위선세포내 cGMP를 증

가시켰으나 cAMP는 변동되지 않았다. 세포생존율은 저산소/재산소화 및 sodium nitroprusside 투여의 영향을 받지 않았다. 결론: 저산소/재산소화 같은 위점막의 병적상태는 nitric oxide를 유도하여 cGMP를 상승시킴으로써 산분비를 억제시키며 이는 점막 보호기전으로 작용할 것으로 생각되며, 저산소/재산소화시 증가되는 cAMP는 위산분비와 무관하게 세포 적응현상으로서 세포 보호기전으로 작용하리라 생각된다.

색인용어 : 저산소/재산소화, Sodium nitroprusside, Cyclic nucleotide, 산분비, 위선세포

참 고 문 헌

1. Kivilaakso E, Barxilai A, Schiessel R, Fromm D, Silen W. Experimental ulceration of rabbit gastric mucosa. *Gastroenterology* 1981;80:77-83.
2. Starlinger M, Jakesz R, Mathews JB, Yoon C, Schiessel R. The relative importance of HCO₃ and blood flow in the protection of rat gastric mucosa during shock. *Gastroenterology* 1981;81:732-735.
3. Takeuchi K, Ohno Y, Okabe S. Variation of gastric transmucosal potential difference and lesion formation during hemorrhagic shock in the rat. *Gastroenterology* 1986;91:1113-1122.
4. Hojgaard L, Buow JB, Madsen J. Gastric mucosal electrical potential difference, pH, blood flow and morphology during hypoxia and selective gastric ischemia with and without allopurinol pretreatment in anesthetized dogs. *Acta Physiol Scand* 1990;139:185-192.
5. Perry MA, Wadhwa S. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988;254:G366-G372.
6. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'Brien PE. Protection against ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994;39:366-373.
7. Latych RE, Chuknyiska RS, Bulkeley GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 1987;102:122-131.
8. Rangachari PK. Histamine release by gastric stimulants. *Nature* 1975;23:53-55.
9. Wallace JL, McKnight GW, Keenan CM, Byles NI, MacNaughton EK. Effects of leukotrienes on susceptibility of the rat stomach to damage and investigation of the mechanism of action. *Gastroenterology* 1990;98:1178-1186.
10. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Natl Acad Sci* 1991;88:4651-4655.
11. Lopez-Belmonte J, Whittle BJR. The involvement of endothelial dysfunction, nitric oxide and prostanoids in the rat gastric microcirculatory responses to endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1994;112:267-271.
12. Michida T, Kawano S, Masuda et al. Role of endothelin 1 in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 1994;106:988-993.
13. Molitoris BA, Nelson WJ. Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *J Clin Invest* 1990;85:3-9.
14. Tepperman BL, Vozzolo BL, Soper BD. Effect of neutropenia on gastric mucosal integrity and mucosal nitric oxide synthase in the rat. *Dig Dis Sci* 1993;38:2056-2061.
15. Balint GA. The effect of prostacyclin treatment on the changes of cyclic nucleotide levels of rat antral and fundic gastric mucosa in different experimental models. *Japan J Exp Med* 1989;59:135-137.
16. Graser T, Vonhouette PM. Hypoxic contraction of canine coronary arteries: role of endothelium and cGMP. *Am J Physiol* 1991;261:H1769-1777.
17. Park KH, Levi R. Hypoxic coronary vasodilatation and cGMP overproduction are blocked by a nitric oxide synthase inhibitor, but not by guanylyl cyclase ANF receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1994;256:99-102.
18. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983;52:352-357.

19. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1709-1715.
20. Collier J, Vallance P. Physiological importance of nitric oxide: an endogenous nitrovasodilator. *Br Med J* 1991;302:1289-1290.
21. Sanders KM, Ward SM: Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992;262:G379-392.
22. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 1985;313:310-314.
23. Chakder C, Rattan S. Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation. *Am J Physiol* 1993;264:G702-G707
24. Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Activation of distinct cAMP and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264:G470-G477
25. Whittle BJR, Berry S, Lopez-Belmonte J, Boughton-Smith NK, Moncada S: Detection of the synthase enzyme that forms the endogenous vasodilator, nitric oxide in the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991;100:A184
26. Pique JM, Whittle BJR, Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 1989;174: 293-296.
27. Whittle BJR, Lopez-Belonte J, Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide. Interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 99:607-611.
28. Stroff T, Respondek M, Muller KM, Peskar BM. Role of endogenous nitric oxide in the protective effect of neurokinin A4-10 in the rat stomach. *Gastroenterology* 1994;106:A186.
29. Kitagawa H, Ikejiri T, Nishiwaki H, Kohei H. Endothelium dependent adaptive gastric protection. *Jpn J Pharmacol* 1992;58(suppl 1):131.
30. Pohl U, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium derived relaxant factor. *Am J Physiol* 1989;256:H1595-H1600.
31. Gryglewski RJ, Palmer MJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320: 454-456.
32. Senoo K, Itoh M, Joh T, et al. Role of acid secretion in the injury induced by local ischemia/reperfusion to the stomach. *Gastroenterolgy* 1994;106:A176.
33. Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1993;265(3 pt 1):G418-422.
34. Flemstrom G. Gastric and duodenal mucosal bicarbonate secretion. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, vol II, New York: Raven, 1987:1011-1029.
35. Boughton-Smith NK, Hutcheson I, Deakin AM, Whittle BJR, Moncada S. Protective effect of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990;191:485-488.
36. Dent J, Dodds WJ, Hogan WJ, Wood JD, Arndorfer RC. Depressant effect of sodium nitroprusside on the lower esophageal sphincter of the opossum. *Gastroenterology* 1979;76:784-789.
37. Martinez-Cuesta MA, Whittle BJR, Moncada S. Endogenous nitric oxide regulates the motility of the rat isolated duodenum. *Br J Pharmacol* 1992;107: 400P.
38. Berglindh T, Obrink KJ. A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa. *Acta Physiol Scand* 1976;96:150-159.
39. Ostrowski J, Bomsztyk K. Interaction of signal transduction pathways in mediating acid secretion by rat parietal cells. *Am J Physiol* 1989;256(Cell Physiol 25):C873-C879.
40. Berglindh T, Helander H, Obrink KJ. Effects of secretagogues on oxygen consumption, aminopyrine accumulation and morphology in isolated gastric

- gland. *Acta Physiol Scand* 1976;97:401-414.
41. Sack J, Spenney JG. Aminopyrine accumulation by mammalian gastric glands: an analysis of the technique. *Am J Physiol* 1982;243:G313-G319.
 42. Soll AH. Potentiating interactions of gastric stimulations on ¹⁴C-aminopyrine by isolated canine parietal cells. *Gastroenterology* 1982;83:216-223.
 43. Babson AL, Phillips GE. A rapid colorimetric assay for serum LDH. *Clin Chem Acta* 1965;12:210-215.
 44. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2nd Ed. NJ: Prentice-Hall, Englewood Cliffs: 1984.
 45. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
 46. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992; 102:168-174.
 47. Lippe IT, Holzer P. Participation of endothelium derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 1992;105:708-714.
 48. Ferraz JP, Tiegley A, Wallace JL. Paradoxical effects of L-arginine on gastric mucosal integrity. *Eur J Pharmacol* 1994;260:107-111.
 49. Brown JF, Tepperman BL, Hanson PJ, Whittle BJR, Moncada S. Differential distribution of nitric oxide synthase between cell fractions isolated from the rat gastric mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:680-685.
 50. Smith GS, Barreto JC, Schmidt KL, Tornwall MS, Miller TA. Protective effect of dimethylthiourea against mucosal injury in rat stomach: Implications for hydroxyl radical mechanism. *Dig Dis Sci* 1992; 37:1345-1355.
 51. Caplan MS, Hedlund E, Hill N, Mackendrick W. The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injury in rats. *Gastroenterology* 1994;106:346-352.
 52. Chew CS. Intracellular mechanism on control of acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 1992;7:856-862.
 53. Maurice DH, Haslam R. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitro-vasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol* 1990;37:671-681.