

Nitric Oxide와 Vasoactive Intestinal Peptide가 기니 꾹 위저부 평활근 이완에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병연구소, 생리학교실*

박효진 · 이영호* · 이혜영* · 정준표 · 이관식 · 전재윤 · 강복순* · 박인서

=Abstract=

The Effects of Nitric Oxide and Vasoactive Intestinal Peptide on the Smooth Muscle Relaxation of a Guinea Pig's Gastric Fundus

Hyo Jin Park, M.D., Young Ho Lee, Ph.D*, Hye Young Lee, MA*, Jun Pyo Chung, M.D.,
Kwan Sik Lee, M.D., Chae Yoon Chon, M.D., Bok Soon Kang, M.D.* and In Suh Park, M.D.

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

Background/Aims: The autonomic nervous system distributed throughout the stomach consists of adrenergic, cholinergic, and non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) nerves. Of these, NANC nerve fibers are known to be distributed all throughout the gastrointestinal tract and they provide the main inhibitory nerve supply to the gut smooth muscle. NANC nerve is known to release neurotransmitters such as nitric oxide (NO), adenosine 5'-triphosphate (ATP) and vasoactive intestinal peptide (VIP). However, the effect produced by each of the NANC neurotransmitter depends on an animal species and parts of gastrointestinal tract. Therefore, this experiment applied electrical field stimulation at the circular muscle of a guinea pig's gastric fundus to observe any relation of NANC nerve in muscular relaxation. **Methods:** The effect of ATP, VIP, and NO on muscle relaxation was determined through the electrical field stimulation, and each neurotransmitter's ability to regulate the muscle relaxation was compared. **Results:** Muscle strips were relaxed in response to electrical field stimulation that was applied. The relaxation was not inhibited by atropine or guanethidine, but was completely inhibited by tetrodotoxin. The muscle relaxation caused by NANC nerve stimulation was inhibited by L-NNA, VIP antagonist, and suramin. L-NNA was the most potent inhibitor among them. The muscle relaxation caused by electrical field stimulation was not further inhibited by VIP antagonist after the pretreatment of L-NNA, however, it was further inhibited by L-NNA following the treatment of VIP antagonist. The electrically stimulated induced muscle relaxation was almost completely abolished by coadministration of L-NNA with VIP antagonist and suramin. The exogenous VIP-induced muscle relaxation was not affected by presence or absence of L-NNA. Oxyhemoglobin or methylene blue treatment inhibited the muscle relaxation induced by electrical field stimulation. **Conclusions:** Non-adrenergic and non-cholinergic nerve has an inhibitory neurotransmission in a guinea pig's gastric fundus circular muscle and NO is the principal inhibitory neurotransmitter of NANC nerve. NO mediated muscle relaxation is thought to be associated with increase of cGMP in muscle cells. (**Korean J Gastroenterol 1997;29:289 - 300**)

Key Words : Non-adrenergic non-cholinergic nerve, Gastric fundus smooth muscle, Nitric oxide, Vasoactive intestinal peptide

접수: 1996년 2월 5일, 승인: 1996년 8월 2일

연락처 : 박효진, 서울특별시 강남구 도곡동 146-92, 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 내과학교실

서 론

위(stomach)는 해부학적으로 위저부(fundus), 위체(corpus) 및 유문동(antrum)으로 나누고 있으나, 위운동 측면에서 보면 근위부 및 원위부 두 부위로 나눌 수 있다. 즉, 분문에 가까운 근위 1/3은 음식물이 유입시 이완을 하여 저장고 역할을 하며, 원위 2/3 부위는 강력한 수축운동이 일어나 음식물과 위액을 혼합하고 분쇄하여 미즙(chyme) 형태로 만들어서 십이지장으로 배출하게 하는 기능을 갖고 있다. 위에 분포하는 자율 신경계는 아드레날린성 신경과 콜린성 신경 이외에 비아드레날린성, 비콜린성(non-adrenergic, non-cholinergic; NANC)신경으로 구성된다. 이중 NANC 신경섬유는 전 위장관계에 걸쳐 분포하며 장관 평활근에서 억제성 자율신경에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹ 즉, 음식물의 유입시에 하부식도 팔약근의 이완과 위내압 증가는 거의 없이 위 근위부를 이완시켜(receptive relaxation) 위용량을 크게 하며, 장관의 연동운동시 항문측 원위부의 이완등에 중요한 역할을 담당하고 있다.²⁻⁴

NANC 신경에서 유리되는 신경전달물질로는 nitric oxide(NO), adenosine 5'-triphosphate(ATP) 및 vasoactive intestinal peptide(VIP) 등이 알려져 있으나⁵ 이들 억제성 신경전달물질의 상대적 중요도는 동물 개체간, 장관 부위별에 따라 다른 것으로 알려지고 있다.^{6,7} 즉, ATP는 주로 기니 핀의 회장과 결장띠(taenia coli)에서 지배적인 역할을 하지만,^{6,7} 오포섬(opossum)의 식도 윤상근이나 기니 핀 위저부 윤상근에서 ATP의 억제성 신경전달 기능은 아직 이설이 있다.⁸ VIP와 NO는 기니 핀의 위저부와 대장 원위부 윤상근에서 주로 억제성 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려져 왔다.^{7,9} Grider 등¹⁰이 기니 핀 위저부의 이완이 VIP 항혈청 투여시 억제되며 NANC 신경을 자극하면 VIP가 유리된다고 보고한 이래 VIP는 하부식도팔약근, 유문팔약근, 항문팔약근등의 이완에 중요한 역할을 하며 위의 내인성 신경원에도 존재함이 밝혀졌다.¹¹ NO는 혈관 평활근에서 내피 세포성 이완 인자 (endothelium-derived relaxing factor)로 규명된 이후,¹² 많은 조직에서 이

완물질로 작용함이 알려졌고, 특히 NANC 신경전달물질의 하나로 인식되면서 신경원 말단에서 VIP와 함께 유리되어 팔약근 및 장관 평활근 이완에 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다.¹³ 즉, 적출한 흰쥐 혹은 기니 핀 위를 이용한 실험에서 전장자극에 의한 근육의 이완 반응은 입체적 특이성으로 인해 D-arginine에 의해서는 억제되지 않으나 NO synthase 억제제인 N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA)에 의해서는 농도가 증가함에 따라 억제되고, NO synthase의 기질인 L-arginine 첨가로 그 억제는 회복되어 NANC 신경전달물질의 하나로 작용한다고 알려지고 있다.^{3,14} 이들 신경전달물질들은 제 2전령(second messenger)으로서 VIP는 adenylate cyclase를 선택적으로 자극하여 cAMP를 증가시킬 뿐만 아니라 표적 근육세포에서 NO 생성을 자극하여서 작용을 나타내게 된다고 한다.¹⁵ NO는 위장관계에서는 장 신경원 혹은 근육세포에서 NO synthase에 의해 L-arginine으로부터 합성되는데, NO에 의한 근이완은 세포막 채널에 대한 NO의 직접 효과 및 NO에 의한 cGMP 합성의 증가로 인한 막과분극화 및 potassium 전도(conductance)의 증가에 의할 것이라 추측된다.^{16,17}

한편 NANC 신경전달물질중 VIP와 NO는 몇몇 조직에서 상호작용이 있음이 보고되었으며^{18,19} 장신경계에서 NO synthase는 주로 VIP에 면역반응을 보이는 신경원에 존재하는 것으로 밝혀졌다.⁷ 또한, 장근신경총으로부터 분리한 신경절에서 니코틴성 수용체 길항제인 1,1,dimethyl-4-phenylpiperazineium iodide(DMPP)는 VIP 유리 및 NO 생성을 자극하고, VIP와 NO의 합성은 L-NNA에 의해 억제되는 것으로 보아 VIP 유리는 NO 생성에 영향을 받는다고 보고되었다.¹⁹ NO는 신경 말단부에서 VIP 유리를 자극하고 근육세포내의 guanylated cyclase를 자극하여 VIP에 의한 이완효과를 상승시키며 L-NNA를 처리하면 NO의 생성은 차단되나 VIP 유리는 일부만 차단되므로 남은 VIP의 직접적인 효과에 의한 이완작용이 이루어지게 된다고 하였다.²⁰ 그러나, 기니 핀 위저부의 이완에 작용하는 신경전달물질들간의 상대적인 우세한 영향과 상호작용은 아직 이설이 많은 실정이다.

이에 본 연구에서는 기니 꾀 위저부 윤상근에 전장자극을 하여 근육 이완에 NANC 신경이 관여하는지 알아보며, ATP, VIP 및 NO가 위저부 근육의 이완에 미치는 영향 및 근육 이완에 대한 이들 신경 전달물질들간의 상호 우세한 작용을 평가해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

가. 실험동물

실험동물로는 체중 300g 내외의 기니 꾀을 암 수구별없이 사용하였다.

나. 약 물

본 실험에 사용된 약물로는 acetylcholine, atropine sulfate, guanethidine, indomethacin, tetrodotoxin, L-NNA, VIP-antagonist, VIP, suramin, methylene blue, oxyhemoglobin 등이며 Sigma 회사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 방법

가. 위저부 윤상근의 제조

기니 꾀의 후두부를 강타하여 실신시키고 경동맥을 절단하여 즉사시킨 후 개복하여 위를 적출하였다. 적출한 위는 실온에서 혼합기체(95% O₂ + 5% CO₂)로 포화된 Krebs-Henseleit 용액(KH 용액 ; D-Glucose, 11 mM; KCl, 4.7 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; MgSO₄, 1.2 mM; NaCl, 119 mM; NaHCO₃, 25 mM; CaCl₂, 2.5 mM)이 채워진 용기내에서 위저부를 분리 절제하고 소만부위를 따라 절개하여 위점막을 노출시켰다. 이후 현미경하에서 미세용 수술기구를 이용하여 점막층을 박리하고 윤상근이 표면에 노출되게 깨끗이 분리하여 윤상근의 주행방향으로 길이 10mm, 너비 3mm되는 근육절편을 만들었다.

나. 장력의 측정

상기의 방법으로 분리한 근육절편은 50ml의 chamber에 담그어 절편의 한쪽 끝은 chamber 하단의 metal rod에 연결하고, 다른 한쪽 끝은 strain

gauge transducer에 연결하여 등척성 장력을 physiograph(Grass, Quincy, MA, USA)에 기록하였다. 근육 절편은 혼합기체가 충분히 공급되고, 온도가 37°C로 유지되는 KH 용액의 chamber에 고정시킨 후, 1g의 기초장력을 하여 최소 90분간 온도 및 흥분성이 일정해질 때 까지 평형을 유지시켰다. 90분이상의 평형기간이 끝난 후, 20-25mM의 고농도 K⁺(정상 KH용액의 조성중 K⁺농도를 20-25mM 되게 Na⁺ 농도를 감소시킨 용액) 용액으로 수축을 유도한 후 세척시키는 과정을 2 내지 3회 반복하여 수축고가 일정해 졌을때 본실험을 시행하였다.

한편, 본연구에서는 NANC 자극에 의한 근육의 이완을 측정하기 위해 근육에 전기 자극을 하였는데, 이때 전기자극은 자극기(Grass, Quincy, MA, USA)를 이용하여 전장 자극(electrical field stimulation)법으로 자극하였다. 사용된 전기자극은 신경단에서 신경전달물질이 분비될 수 있도록 rectangular waves(자극강도; 80 V, 자극기간; 1 msec, 자극빈도; 4Hz)로 자극하였다. 전처치 약물실험을 위하여는 전장자극을 하기 10-20분전에 약물로 전처치하였고 각 실험은 60분간격을 두고 실시하였다. 또한 본 실험에서는 prostaglandin 대사물질의 관여를 배제하기 위해 전 실험에 indomethacin (5×10^{-7} M)을 쳐치하였고 콜린성 및 아드레날린성 신경전달을 차단하기 위해 atropine(5×10^{-5} M)과 guanethidine (5×10^{-5} M)을 첨가한 후 실험을 실행하였다.

(1) 전장 자극에 의한 근이완 평가

본 연구에서 전장자극에 의한 근이완이 NANC 신경자극에 의한 것인지를 확인하기 위해 먼저 고농도 K⁺용액으로 수축시킨 근육 절편에 전장자극을 하여 근이완을 관찰한 후, atropine (5×10^{-5} M)과 guanethidine (5×10^{-5} M)을 전처치한 후 전장자극을 하여 근이완의 변화를 관찰하였다. 또한 이완반응이 신경성 전달물질의 매개에 의한 것인지를 확인하기 위하여 tetrodotoxin (1×10^{-6} M)을 투여하여 근이완 소실여부를 관찰하였다.

(2) 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질에 의한 근이완 평가

20-25mM의 고농도 K⁺ 용액으로 수축을 유발한 상태에서 전장자극에 의한 이완정도를 기록한 후, 이 이완에 NO의 관련 여부를 확인하고자 NO synthase 억제제인 L-NNA(1×10^{-4} M)을 첨가하고 장력이 안정화되면 전장 자극을 시행하여 근육절편의 이완반응의 정도를 대조군과 비교평가하였다. 다음으로 VIP의 작용을 평가해보기 위해 VIP 길항제(3.6×10^{-8} M)를 첨가한 후 장력이 안정화되면 전장 자극을 시행하여 근이완 정도를 대조군과 비교하였다. 마찬가지로 ATP에 의한 이완작용을 알아보고자 ATP 차단제인 suramin(3×10^{-5} M)을 첨가하여 전장 자극시 근이완에 미치는 ATP의 역할을 평가하였다.

(3) VIP와 NO의 상호작용 및 근이완 기전평가

NANC 신경전달물질중 NO와 VIP 및 ATP 이외의 다른 물질의 관련 여부를 확인하고자 20-25mM의 고농도 K⁺ 용액으로 수축을 유발한 상태에서 전장자극에 의한 이완정도를 관찰한 후, 각각의 차단제인 L-NNA(1×10^{-4} M), VIP 길항제(3.6×10^{-8} M) 및 suramin(3×10^{-5} M)을 동시에 투여하여 전장자극을 시행한 후, 이완정도를 대조군과 비교하였다.

VIP와 NO간의 상호 우세한 작용을 알아보기 위해서 먼저 L-NNA(1×10^{-4} M)를 첨가한 후 전장자극을 시행하여 근이완 정도를 평가한 후, VIP 길항제를 첨가하여 전장자극을 재시행하여 대조군과 비교하였다. 역으로 VIP 길항제(3.6×10^{-8} M)를 먼저 첨가한 후 전장자극을 시행하였으며 여기에 L-NNA(1×10^{-4} M)를 첨가한 후 전장자극을 재시행하여 대조군과 비교하였다. 전장자극에 의해 유리된 VIP가 근이완을 시킬때, 유리된 VIP와 NO와의 상관성을 확인해보고자 L-NNA가 존재하는, 또는 존재하지 않는 실험조건하에서 VIP에 의한 근육이완을 측정하였다. 세포외 NO의 작용을 평가해보기 위해 세포외 배지의 NO를 제거하는 작용이 있는 oxyhemoglobin(2×10^{-5} M)을 투여하여 근이완 반응의 변화를 대조군과 비교하였다. NO에 의한 근이완 기전을 규명하기 위해 soluble guanylate cyclase의 선택적 억제제인 methylene blue(5×10^{-5} M)를 투여한 후 근이

완 반응의 변화를 대조군과 비교하였다.

3. 통계학적 분석

전장 자극에 의한 근이완은 20-25mM K⁺ 용액에 의한 수축고의 백분율(%)로 표시하였으며 모든 값은 Mean±SE로 표기하였다. 전장자극과 약물 투여군간의 통계학적인 분석에는 paired t-test를 시행하였고 검정시 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 비아드레날린성 비콜린성 신경 자극이 근이완에 미치는 영향

본 연구에서 전기자극에 의한 근이완이 NANC 신경전달물질중 NO와 VIP 및 ATP 이외의 다른 물질의 관련 여부를 규명하기 위해 실험한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 먼저 20-25mM 고

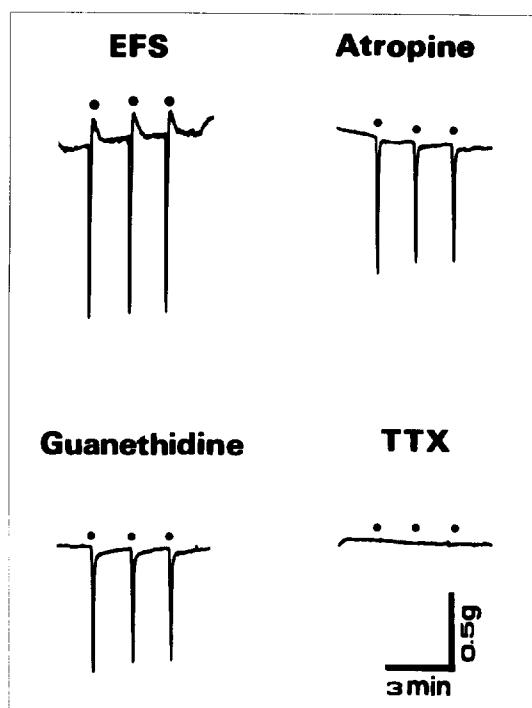


Fig. 1. Effects of tetrodotoxin(TTX, 1×10^{-6} M), atropine (5×10^{-5} M) or guanethidine 5×10^{-5} M) on NANC relaxations of gastric fundus strips to electrical field stimulation; EFS). Addition of TTX completely abolished the relaxations induced after EFS.

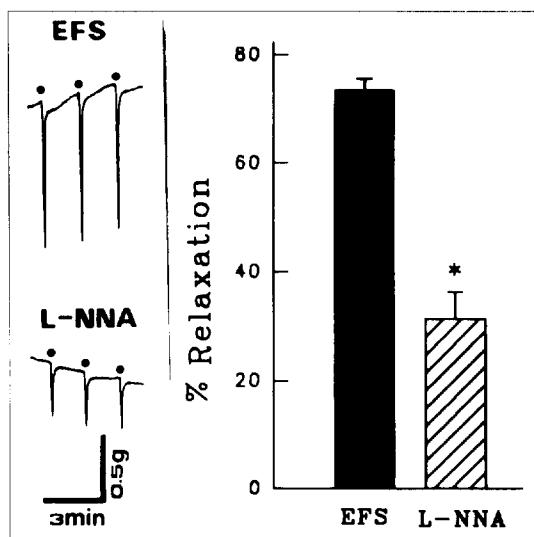


Fig. 2. Effects of L-NNA(1×10^{-4} M) on muscle relaxation.

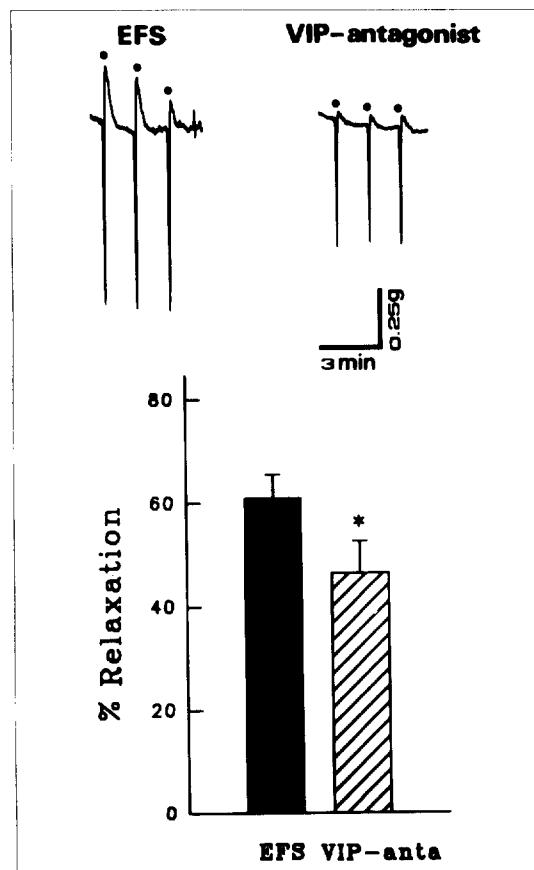


Fig. 3. Effects of VIP antagonist(3.6×10^{-8} M) on muscle relaxation.

농도 K^+ 용액으로 근수축을 유발하여 수축고가 일정해진 후 전장자극을 가했을 때 근육은 이완되었다. 이 후 atropine(5×10^{-5} M)과 guanethidine(5×10^{-5} M)을 각각 투여하였을 때, 전장자극에 의한 근이완은 거의 소실되지 않았으나, tetrodotoxin (1×10^{-6} M)에 의해서는 근이완이 완전히 소실되었다.

2. 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질이 근이완에 미치는 영향

전장자극시 NANC 신경자극으로 인한 근이완에 신경전달물질의 관여 여부를 규명하기 위해 실험한 결과는 Fig. 2, 3, 4에 나타낸 바와 같다. 먼저 고농도 K^+ 용액으로 수축을 유발한 후에 전장자극을 가해 근이완을 기록한 다음 L-NNA(1×10^{-4} M)를 첨가하

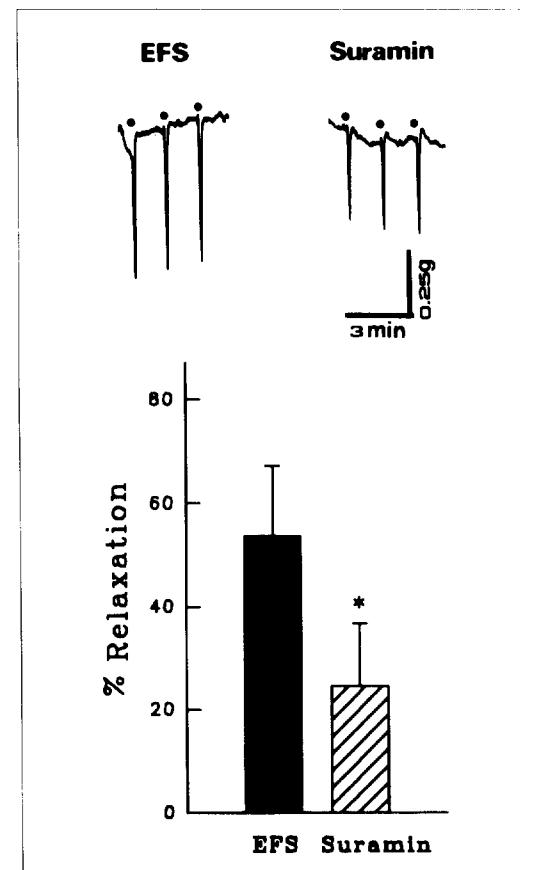


Fig. 4. Effects of suramin(3×10^{-5} M) on muscle relaxation.

여 전장 자극을 시행해 본 바, 근육절편의 이완은 억제되었는데, 그 정도는 L-NNA 투여전 $73.5 \pm 2.1\%$, L-NNA($1 \times 10^{-4}M$) 투여후 $31.2 \pm 5.0\%$ 으로 이완반응이 유의하게($p < 0.05$) 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

동일한 실험조건에서 L-NNA대신 VIP 길항제의 효과를 관찰해 본 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 VIP 길항제 투여에 의한 근이완 반응은 억제되었는데, 그 정도는 약물 투여전 $61.0 \pm 4.5\%$ 에서, VIP 길항제($3.6 \times 10^{-8}M$)를 첨가한 후 $46.5 \pm 6.2\%$ 으로서 이완 반응이 유의하게($p < 0.05$) 억제되었으나, L-NNA의 경우보다는 그 억제 정도가 적었다(Fig. 3).

Fig. 4에서 보는 바와 같이 suramin($3 \times 10^{-5}M$)을 첨가한 후 전장자극시 근이완은 투여전 $53.8 \pm 13.3\%$ 에서, 투여후 $24.4 \pm 12.3\%$ 으로 유의하게($p < 0.05$) 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

3. VIP와 NO가 근이완에 미치는 상호작용 및 근이완 기전

먼저 본실험에서는 전장자극에 의한 근이완에 관여하는 NANC 신경전달물질로 NO, VIP 및 ATP이

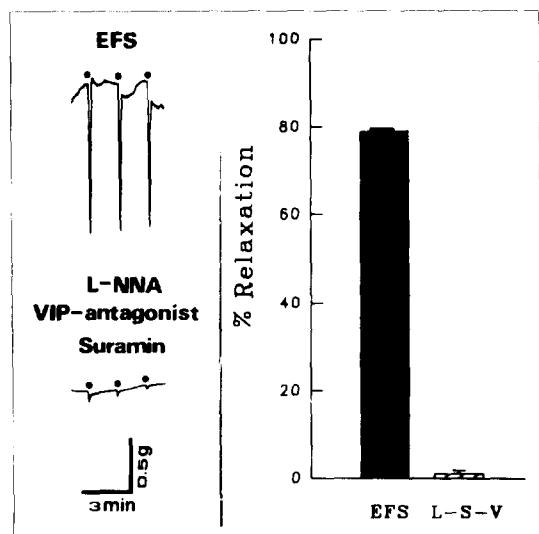


Fig. 5. Effects of L-NNA($1 \times 10^{-4}M$), VIP antagonist($3.6 \times 10^{-8}M$) 및 suramin($3 \times 10^{-5}M$). The electrically stimulation induced muscle relaxation was almost completely abolished.

외에 다른 물질의 관여 여부를 확인하고자 하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 전장자극에 의한 근이완(79.0%)은 L-NNA ($1 \times 10^{-4}M$), VIP 길항제 ($3.6 \times 10^{-8}M$) 및 suramin ($3 \times 10^{-5}M$)의 동시 투여에 의해 $1.0 \pm 0.8\%$ 으로 이완반응이 거의 소실됨을 알 수 있었다.

근이완에 NANC 신경전달물질의 상호 우세한 작용을 평가하기 위해 실험한 결과는 Fig. 6, 7, 8와 같다. 먼저 Fig. 6에서 보는 바와 같이 전장자극에 의한 근이완은 $71.7 \pm 11.9\%$ 이었고, 이는 L-NNA($1 \times 10^{-4}M$) 투여후 $22.7 \pm 7.8\%$ 으로 이완이 억제되었으나($p < 0.05$), L-NNA가 존재하는 상태에서 VIP 길항제($3.6 \times 10^{-8}M$)를 첨가하였을 때 이완정도가 $20.0 \pm 7.5\%$ 로서 L-NNA 처치시 나타나는 근이완보다 더

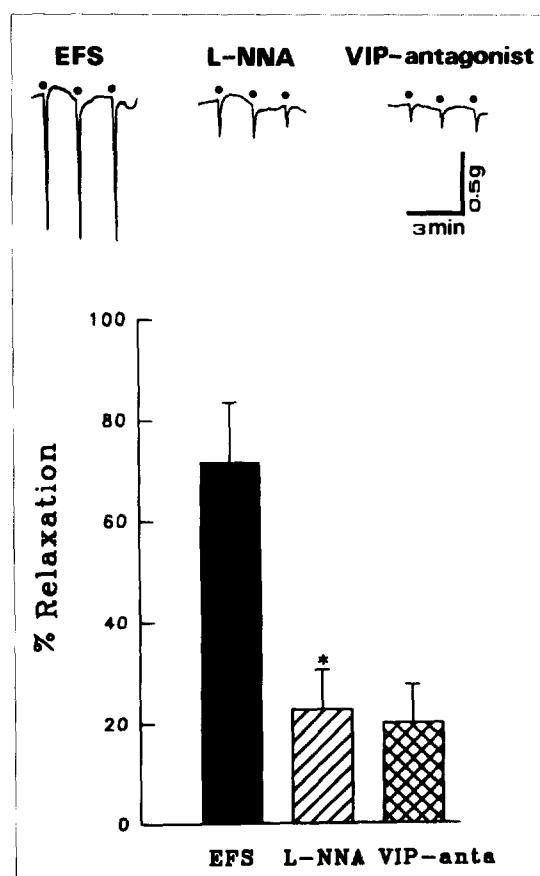


Fig. 6. Effects of VIP antagonist on muscle relaxation after the pretreatment of L-NNA.

이상의 억제반응이 관찰되지 않았다(Fig. 6). 그러나 상기의 방법과 달리, 먼저 VIP 길항제를 투여하였을 때 근이완은 대조군 $58.6 \pm 4.7\%$ 에 비해 투여후 $45.0 \pm 7.3\%$ 으로 이완이 억제되었고($p < 0.05$) 동일한 실험조건에서 L-NNA($1 \times 10^{-4}M$)를 첨가하였을 경우, 근이완은 $20.0 \pm 8.1\%$ 으로 VIP 길항제 투여시의 근이완을 더욱 더 억제시킬 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 7).

전장자극에 의해 유리된 VIP가 근을 이완시킬 때, 유리된 VIP와 NO와의 상관성을 확인해보고자 실험한 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. VIP를 농도의존적으로 투여하여 나타난 근이완은 L-NNA를 처치한 상태에서 동일한 실험을 시행해본 바, 거의 차이가 없었다.

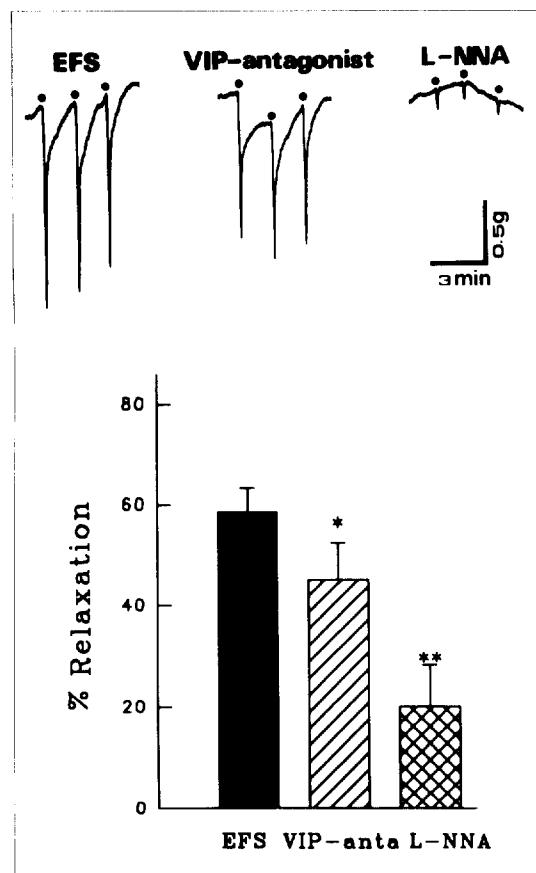


Fig. 7. Effects of L-NNA on muscle relaxation after the pretreatment of VIP antagonist.

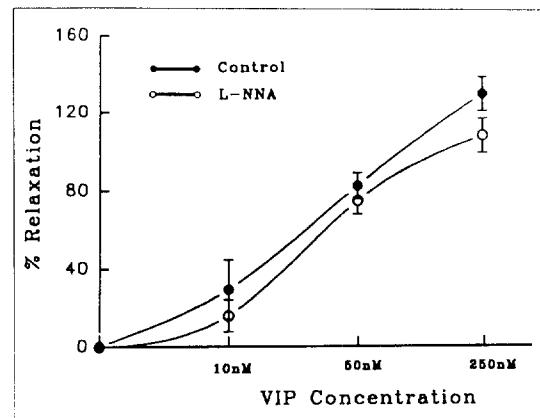


Fig. 8. Relaxation induced by exogenous VIP which was measured in the presence(open circle) or without L-NNA. The exogenous VIP-induced muscle relaxation was not affected by presence or absence of L-NNA.

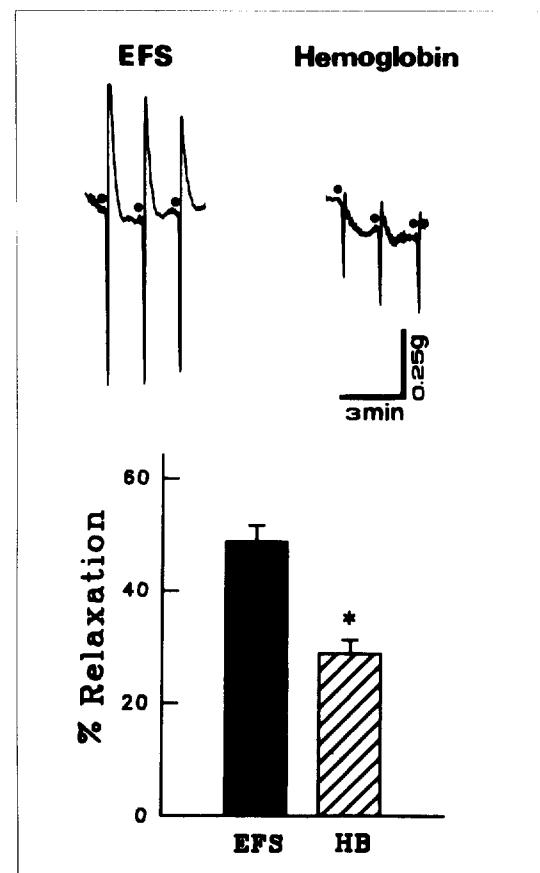


Fig. 9. Effects of oxyhemoglobin(HB, $2 \times 10^{-5}M$) on muscle relaxation.

NANC 신경으로부터 유리된 NO의 작용과 근육 내에서 생성된 NO의 상대적인 중요도를 규명하기 위해 실험한 결과는 다음과 같다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 전장자극에 의한 근이완($49.0 \pm 2.7\%$)은 oxyhemoglobin($2 \times 10^{-5} M$) 투여 후 $29.0 \pm 2.4\%$ 으로 근이완이 유의하게($p < 0.05$) 억제됨을 알 수 있었다.

NO에 의한 근이완의 기전을 규명하기 위해 실험한 결과는 Fig. 10에 나타낸 바와 같다. 그림에서 보

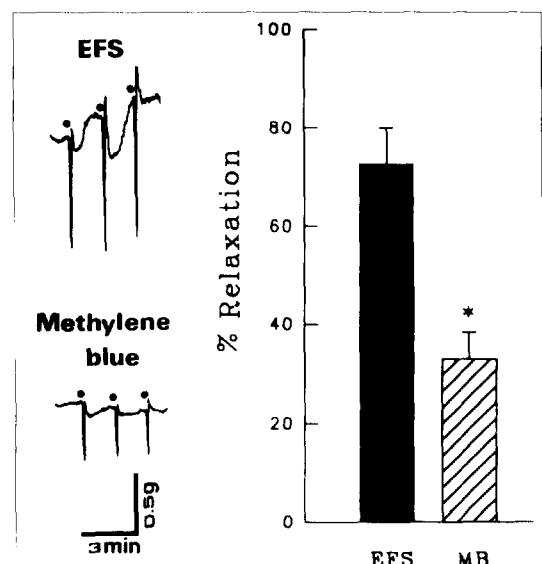


Fig. 10. Effects of methylene blue(MB, $5 \times 10^{-5} M$) on muscle relaxation.

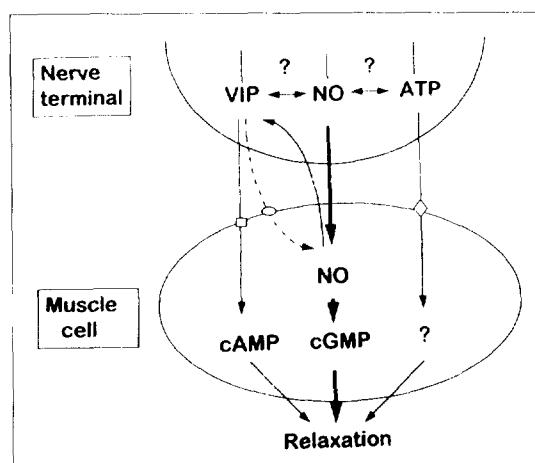


Fig. 11. Model illustrating interplay of NANC neurotransmitters during neurally induced relaxation.

는 바와 같이 전장자극에 의한 근이완은 $72.2 \pm 4.6\%$ 에서 methylene blue($5 \times 10^{-5} M$)를 투여한 후 $34.6 \pm 6.4\%$ 으로 이완반응이 유의하게($p < 0.05$) 억제됨을 관찰하였다.

고 졸

음식물을 삼킬 때 위 근위부는 약 20초간 이완을 하여 음식물의 저장에 중요한 역할을 담당하는데, 이러한 현상을 수용성 이완(receptive relaxation)이라고 하며², 일단 음식물이 위내에 들어오면 복부 내압이 일시 상승하게 되고 vago-vagal reflex를 통해 위 근위부 평활근은 이완을 하게 되는 즉, 적응성 이완(adaptive relaxation)의 과정을 거친다.²¹ 이러한 위의 수용성 및 적응성 이완에는 NANC 신경이 관여하며 NANC 신경에서 유리되는 억제성 신경전달물질로는 ATP, VIP 그리고 NO 등이 존재하는 것으로 알려져 왔으나,⁵ 이들 신경전달물질의 존재 여부, 신경전달물질간의 상대적인 우세한 영향 및 상호작용은 개체별, 장관 부위별에 따라 다르며 아직 정립이 안된 실정이다.^{6,7} 위저부 윤상근 절편을 이용한 본 연구에서도 전장자극에 의한 근이완이 유발되었는데 이러한 근이완은 atropine과 guanethidine를 투여한 후 거의 억제되지 않아 위저부 윤상근에서 NANC 신경을 통한 근이완 작용이 존재함을 관찰할 수 있었다. 또한 이 이완반응은 tetrodotoxin을 투여한 후 완전히 소실되어 본 연구에서 실시한 전장자극에 의한 근이완은 신경원성에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 indomethacin, atropine 및 guanethidine이 존재하는 실험조건에서 NANC 신경 자극에 의한 효과로 보고 신경전달물질간의 상대적인 우세 및 상호작용을 규명하고자 하였다.

NANC 신경전달물질 중 ATP는 일찌기 Burnstock 등²²에 의해 억제성 신경전달물질로 증명되었고 이와 관련된 신경을 퓨린성 신경(purinergic nerve)이라고 명명하였다. 쥐의 위저부 근육절편에 전장자극을 가하였을 때 ATP가 유리되고²³ 선택적인 Ca^{+} -activated K^{+} 통로 억제제인 apamin은 ATP에 의한 이완 효과를 차단하지만, 전장자극을 가하였을 때는 근이완 반응에 아무런 영향을 초래치 않았다는 보고

가 있다.²⁴ 이와 달리 기니 꽈 위저부 종주근을 재료로 한 실험에서, theophylline이 ATP, ADP, adenosine 및 전장자극에 의한 이완반응을 길항하여 ATP는 NANC 신경의 억제성 신경전달물질로서 기능을 한다고 주장하였으나²⁵ 다른 연구자들은 ATP에 의한 근이완에 theophylline의 억제 효과가 없었다는 상반된 보고를 하였다.^{26,27} 본 연구에서는 ATP 차단제인 suramin(3×10^{-5} M)을 첨가한 후 전장 자극시 근이완이 유의하게 억제됨을 관찰하여 ATP가 기니 꽈 위저부의 근이완에 일정 부분 역할을 할 수 있었다.

VIP는 28개의 아미노산으로 구성되어 있으며 쥐, 기니 꽈, 고양이, 사람 등의 위 장근신경총, 윤상근 및 종주근내 신경섬유에서 VIP에 면역반응을 보이며 VIP에 면역반응을 보이는 신경원은 장근신경총 내 신경원의 약 45%를 차지한다고 알려져 있다.^{28,31} 한편, 기니 꽈 위저부 근육절편을 이용한 실험에서 VIP 항혈청 투여시 근이완은 억제되고¹⁰ 전장자극에 의한 근이완 실험에서 전기자극의 주파수를 증가시켰을 때 VIP유사 면역반응(VIP-like immunoreactivity)은 주파수에 의존적으로 증가하고 동시에 근이완정도와 비례적 연관이 있다는 것이 규명되었다.³² 본 연구에서는 VIP 길항제 투여하 근이완 반응은 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있어 기니 꽈 위저부 평활근 이완에 관여하는 억제성 신경전달물질로서의 VIP의 역할을 확인할 수 있었다. 그러나 VIP 길항제 투여에 의한 근 이완 억제 정도는 L-NNA 및 suramin의 경우보다 미약하였다.

Boeckxstaens 등³은 쥐 위저부 종주근을 이용한 실험에서 N^G -monomethyl-L-arginine 혹은 L-NNA 처치하에 전장 자극시 기초 장력이 증가하며, 이러한 증가된 장력은 L-arginine에 의해 회복되는 소견을 관찰하였고 NO의 생물학적 활성도는 superoxide dismutase에 의해 증가되며 hemoglobin에 의해 제거됨을 관찰하여 NO가 쥐 위저부의 이완에 관여하는 억제성 신경전달물질임을 보고한 바 있다. Meulemans 등¹⁴은 기니 꽈 위를 이용한 실험에서 전장자극에 의한 근이완 반응은 L-NNA에 농도-의존적으로 억제되었고 NO synthase의 가질인 L-arginine 투여후 회복되었다고 보고하였다. 이어 NO 공여물질

인 nitroglycerin을 외부 투여해 본 바, 농도-의존적으로 전장자극후에 관찰되는 것과 같은 근이완을 관찰할 수 있었고, soluble guanylate cyclase의 억제제인 methylene blue를 처치한 후 근이완 반응이 억제됨을 관찰하여 NO가 NANC의 신경전달물질로 작용할 것이라 하였다. 본 연구에서도 NO synthase 억제제인 L-NNA를 첨가한 후 전장 자극을 시행해 본 바, 근육절편의 이완은 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다. 한편, 전장 자극에 의한 근 이완은 L-NNA, VIP 길항제 및 suramin의 동시 투여에 의해 거의 억제되어 전장 자극에 의한 근이완에 관여하는 NANC 신경전달물질로 NO, VIP 및 ATP이외에 다른 물질은 거의 관여 하지 않음을 확인할 수 있었다.

NANC 신경전달물질 중 VIP와 NO는 몇몇 조직에서 상호작용이 있음이 보고되었다.^{18,20} 장신경계에서 NO synthase는 주로 VIP에 면역반응을 보이는 신경 원에 함께 존재하는 것으로 밝혀졌고,⁷ 장근신경총으로부터 분리한 신경절에서 니코틴성 수용체 길항제인 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazine iodide는 VIP 유리 및 NO 생성을 자극하며, VIP와 NO의 합성은 NO synthase의 억제제인 L-NNA에 의해 억제됨으로써 VIP 유리는 NO 생성에 영향을 받는다고 보고되었다.¹⁹ NO는 신경 말단부에서 VIP 유리를 자극하고 근육세포내의 guanylate cyclase를 자극하여 VIP에 의한 이완효과를 상승시키며 L-NNA를 처리하여 NO의 생성을 차단하더라도 VIP 유리는 얼마간만 차단되므로 남은 VIP의 직접적인 효과에 의한 이완작용이 유발됨을 보고하였다.²⁰ 그러나, 이들 신경전달물질간의 상대적인 우세한 영향은 개체별, 장관 부위별로 다르고 상호 우세한 영향들은 아직 이설이 있어서,^{6,7} 본 연구에서도 NANC 신경전달물질의 상호 우세한 작용을 평가하기 위해 실험한 결과, 전장자극에 의한 근이완이 L-NNA 투여후 억제되었으나 L-NNA가 존재하는 조건에서 VIP 길항제의 첨가에 의해서는 L-NNA 처치시 나타나는 근이완보다 더이상의 억제반응이 관찰되지 않았다. 그러나, 먼저 VIP 길항제를 투여하였을 때 근 이완이 억제되었고 동일한 실험조건에서 L-NNA를 첨가하였을 경우 근이완은 더욱 더 억제되었다. 또한 전장자극에 의해 유리된 VIP가 근이완을 시킬 때, 유리된

VIP가 근육내에서 NO를 생성하는지 그 상관성을 확인해보고자 VIP를 투여하여 농도-의존적으로 나타난 근이완을 관찰한 후, L-NNA를 처리한 상태에서 동일한 실험을 시행해본 바, 거의 차이가 없어 전장자극시 근이완은 신경말단부에서 유리된 VIP가 근육세포내 NO 생성에는 영향이 없음을 알 수 있었다.

한편, NO에 의한 근 이완 기전으로서는 Meulemans 등¹⁴의 보고에 따라 근육내 cGMP 증가에 기인할 것이라는 것이 잘 알려져 있다. 본 실험에서도 hemoglobin과 methylene blue의 처리시 전장 자극에 의한 근이완이 억제되어 이를 뒷받침하는 실험적 증거로 생각된다.

Grider 등³³은 기니 꿩 위저부 근육절편을 이용한 실험에서 VIP가 일차적인 신경전달물질이고 이것이 표적 근육세포로부터의 NO 생성을 초래케하며 이 과정이 VIP에 의한 근이완의 작용기전으로 일부 작용한다는 것으로, 실제 VIP에 의해 초래된 근이완은 L-NNA에 의해 억제되었다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 이를 확인하고자 외부에서 투여한 VIP에 의한 근 이완이 L-NNA 처리에 의해 영향을 받지 않아 이러한 기전은 아닐 것으로 추측되고 근육내 cAMP 증가에 의할 것이라 추측된다. 실제 Boeckxstaens 등³은 쥐 위저부 근육에서 VIP를 중재한 근 이완이 NO 합성 억제제에 의해 억제되지 않는다고 보고한 바 있다. 한편, ATP에 의한 근 이완 기전은 현재까지 불분명하나 ATP에 의한 근 이완이 apamin에 의해 억제되므로 Ca^{+} -activated K^{+} channel의 활성화에 의한 막전압 과분극에 의할 것이라 추측된다.³² 그러나 이들 NANC 신경전달물질에 의한 근 이완 기전 및 ATP와 VIP (또는 NO)간의 상호작용에 대해서는 추후 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 그림 11에서 보는 바와 같이 기니 꿩 위저부 윤상근을 이용하여 시행한 전장자극상 근육 이완에는 NANC 신경이 관여하며, ATP, VIP, 그리고 NO가 억제성 신경전달물질로서 작용함을 알 수 있었고, 그 중 NO의 효과가 가장 큰 것으로 생각된다. NO에 의한 근 이완 기전은 신경 말단으로부터 유리된 NO가 근육 세포내로 이동하여 cGMP 증가

를 통해 일어날 것으로 추측된다.

요 약

목적: 기니 꿩 위저부 윤상근에서 전장자극을 가하여 근육 이완에 NANC 신경이 관여하는지 알아보며, ATP, VIP 및 NO가 위저부 근육의 이완에 미치는 영향 및 근육 이완에 대한 이들 신경전달물질들 간의 상호 우세한 작용을 평가해 보고자 실험하였다. **대상 및 방법:** 기니 꿩 윤상근으로 근육절편을 제조한 후 전장 자극법으로 자극하여 나타나는 근이완의 변화를 측정하였다. **결과:** 위 저부 근육 절편에 전장자극을 가하였을 때 근이완이 관찰되었는데, 이 근이완은 atropine과 guanethidine에 의해서는 억제되지 않았으나, tetrodotoxin 처리에 의해서는 완전히 억제되었다. NANC 신경자극에 의한 근이완은 NO 합성 억제제인 $\text{N}^{\text{o}}\text{-nitro-L-arginine}$ (L-NNA), VIP 길항제 및 ATP 차단제인 suramin에 의해 각각 억제되었으며, 이중 L-NNA에 의한 억제가 가장 현저하였다. 전장자극에 의한 근이완은 L-NNA 전처리에 의해 억제된 후 VIP 길항제 처리에 의해서는 더 이상 억제되지 않았으나, 역으로 VIP 길항제 전처리에 의해 억제된 근이완은 L-NNA 처리에 의해 더욱 억제되었다. 전장자극에 의한 근이완은 L-NNA, VIP 길항제 및 suramin의 동시 처리에 의해 완전히 소실되었다. VIP 투여에 의한 근이완은 L-NNA 처리에 의해 영향을 받지 않았다. Oxyhemoglobin 및 methylene blue 처리는 전장자극에 의한 근이완을 각각 억제시켰다. **결론:** 전장자극에 의한 기니 꿩 위저부 윤상근 이완에는 ATP, VIP, 그리고 NO가 NANC 신경의 억제성 신경전달물질로서 작용함을 알 수 있었고, 그 중 NO의 효과가 가장 큰 것으로 생각된다. NO에 의한 근 이완 기전은 신경 말단으로부터 유리된 NO가 근육 세포내로 이동하여 cGMP 증가를 통해 일어날 것으로 추측된다.

색인단어: 비아드레날린성 비콜린성 신경, 위저부 평활근, Nitric oxide, Vasoactive intestinal peptide

첨 고 문 헌

1. Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature* 1963;200:581-582.
2. Abrahamsson H. Studies on the inhibitory nervous control of gastric motility. *Acta Physiol Scand* 1973; 390:1-38.
3. Boeckxstaens GE, Pelekmans PA, Bogers JJ, et al. Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:441-447.
4. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accomodate food or fluid. *Nature* 1991;351:477-479.
5. Hoyle CHV, Burnstock G. Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In: *Handbook of physiology. The Gastrointestinal system. Motility and circulation*, Bethesda, MD. Am Physiol Soc 1989;vol I pp 435-464.
6. Costa M, Furness JB, Humphreys CM. Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea pig gastrointestinal tract. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986;332: 79-88.
7. Furness JB, Bornstein JC, Murphy R, Pompolo S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. *Trends Neurosci* 1992;15:66-71.
8. Daniel EE, Helmy-Elkholy A, Jager LP, Kannan MS. Neither a purine nor VIP is the mediator of inhibitory nerves of opossum esophageal smooth muscle. *J Physiol.* 1983;260:243-260.
9. Frew R, Lundy PM. Evidence against ATP being the nonadrenergic, noncholinergic inhibitory transmitter in guinea pig stomach. *Eur J Pharmacol* 1982;81: 333-336.
10. Grider JR, Cable MB, Said SI, Makhlouf GM. Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *Am J Physiol* 1985;248:G73-G78.
11. Larsson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky D, et al. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3197-3200.
12. Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
13. Costa M, Furness JB, Brookes SJH, Bredt DS, Snyder SH. Presence and chemical coding of neurons with nitric oxide synthase immunoreactivity in the guinea pig small intestine (Abstract). *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc* 1991;22:97.
14. Meulemans AL, Helsen LF, Schuurkes JAJ. Role of NO in vagally-mediated relaxations of guinea-pig stomach. *Arch Pharmacol* 1993;348:225-230.
15. Chakder S, Rattan S. Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP, and NO. *Am J Physiol* 1993;264:G702-G707.
16. Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM. Nitric oxide mimics non-adrenergic, non-cholinergic hyperpolarization in gastrointestinal muscles. *Am J Physiol* 1991;262: G553-G557.
17. O'Kelly T, Brading A, Mortensen N. Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* 1993;34: 689-693.
18. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1990; 191:303-309.
19. Grider JR, Jin JG. VIP release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus:evidence for regulation of VIP release by nitric oxide. *Neuroscience* 1993;54:521-526.
20. Grider JR. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol* 1993;264:G334-G340.
21. Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. *Arch Int Pharmacodyn* 1986;280 (Suppl): 50-61.
22. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A.

- Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 1970;40:668-688.
23. Belai A, Lefebvre RA, Burnstock G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1991; 194:225-234.
 24. Lefebvre RA, De Beurme FA, Sas S. Effect of apamin on the responses to VIP, ATP and NANC neuron stimulation in the rat and cat gastric fundus. *J Auton Pharmacol* 1991;11:73-83.
 25. Okuwuasaba FK, Hamilton JT, Cook MA. Relaxations of guinea-pig fundic strip by adenosine, adenine nucleotides and electrical stimulation: antagonism by theophylline and desensitization to adenosine and its derivatives. *Eur J Pharmacol* 1977;46: 181-189.
 26. Small RC, Weston AH. Theophylline antagonizes some effects of purines in the intestine but not those of intramural inhibitory nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1979;67:301-308.
 27. Huizinga JD, Den Hertog A. Inhibition of fundic strips from guinea pig stomach: the effect of theophylline on responses to adenosine, ATP and intramural nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 1980; 63:259-265.
 28. Kuwahara A, Ishikawa T, Mikami S, Yanaihara N. Distribution of neurons containing immunoreactivity for gastrin-releasing peptide (GRP), substance P, and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat gastric wall. *Biomed Res* 1983;4:473-478.
 29. Ekblad E, Ekelund M, Graffner H, Hakanson R, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in the stomach wall of rat and mouse. *Gastroenterology* 1985;89:73-85.
 30. Llewellyn-Smith IJ, Furness JB, Gibbins IL, Costa M. Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin, substance P, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol* 1988;272:139-148.
 31. Wattchow DA, Furness JB, Costa M. Distribution and coexistence of peptides in nerve fibers of the external muscle of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1988;95:32-41.
 32. Grider JR, Makhlouf GM. Prejunctional inhibition of vasoactive intestinal peptide release. *Am J Physiol* 1987;253:G7-G12.
 33. Grider JR, Murthy KS, Jin JG, Makhlouf GM. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am J Physiol* 1992;262:G774-G778.