대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthropol
17(4): 289 ~ 295, 2004

생쥐 작은창자 사이질세포에서 bradykinin의 효과 및 bradykinin 수용체 아형의 발현

고영엽[3], 전제열[2,5], 최 석[2], 임 용[4,5], 김준수[1], 문현식[1], 김명룡[1], 조경원[1], 조향훈[1], 장인엽[1,5]

[1]조선대학교 의과대학 해부학교실, [2]생리학교실, [3]내과학교실, [4]미생물학교실, [5]조선대학교 단백질소재 연구센타

간추림 : 소화관 염증 시 소화관 운동성 이상이 초래되며 여기에 내인성 매개물질들이 관여하는 것으로 알려져 있다. Bradykinin은 그 중 하나의 매개물질로서 신경전달물질이 아닌 펩티드성 국소 호르몬으로 염증이나 조직손상 시 혈장으로부터 생성되어 직접 민무늬근에 작용하여 소화관 운동성에 영향을 주고 있다. 소화관 운동성을 조절하는 창자사이질세포(interstitial cells of Cajal, ICC)는 소화관 운동의 향도잡이 역할과 더불어 창자신경계로부터 민무늬근으로 신호를 매개하는 기능을 담당하고 있다. 본 연구는 생쥐 작은창자에서 배양된 창자사이질세포와 작은창자근육층 전층표본을 대상으로 전기생리학적 및 면역조직화학적 방법을 통하여 bradykinin의 작용 및 분포를 알아보았다. Bradykinin-2는 창자사이질세포에서 세포막의 저분극을 유발하였으며, 소화관운동에 있어서 향도잡이 전류의 긴장성을 활성화 시켰다. 이중면역형광염색 결과, c-kit과 bradykinin-2 수용체가 창자사이질세포에서 함께 발현되었다. 따라서 본 실험의 결과 bradykinin이 간접적으로 창자사이질세포를 통하여 소화관 운동성을 조절할 수 있음을 시사하며 이 작용은 bradykinin-2 수용체를 통하여 매개되는 것으로 여겨진다.

찾아보기 낱말 : bradykinin, 창자사이질세포, 소화관운동, bradykinin수용체

서 론

창자사이질세포(interstitial cells of Cajal, ICC)는 소화관내 존재하는 특수세포로 식도에서부터 항문까지 근육층과 신경얼기에 분포되어 있다. 이 세포들은 간엽조직에서 발생되어 소화관 운동성에 중요한 역할을 담당하고 있다. 창자사이질세포는 교통반점을 통하여 서로 연결망을 이루고 있으며, 민무늬근과도 교통반점을 통하여 서로 연결되어 있다(Sanders 1999). 창자사이질세포는 c-kit에 의해 표지되며, 향도잡이세포로 창자운동인 서파(slow waves)를 발생시키며, 이러한 전기적 신호는 교통반점을 통하여 민무늬근에 직접 전달되어 창자 민무늬근의 자발적 수축을 유발한다(Huizinga 등 1995, Sanders 1999). 또한 창자사이질세포는 신경말단과 밀접하게 관계되어 있어, 억제성 및 흥분성 신경신호들을 민무늬근으로 매개하는 역할을 담당하고 있다(Publicova 등 1993, Sanders 1996, Ward 등 2000). 최근 창자사이질세포에서 아세틸콜린에 의한 무스카린성수용체(Epperson 등 2000), purinergic 수용체(Burnstock 2002), substance P에 의한 neurokinin-1 수용체(Portbury 등 1996) 및 somatostatin 수용체(Sternini 등 1997) 등이 밝혀지면서 여러 매개 물질들이 창자사이질세포를 통하여 소화관 운동성 조절에 관여하고 있음을 시사하고 있다. Bradykinin은 9개의 아미노산으로 구성된 펩티드물질로 염증이나 조직 손상 시 혈장에서 전구물질인 kininogen으로부터 생성되는데 소화관내에서는 특정 수용체를 통하여 여러

*이 논문은 2003년도 조선대학교 연구보조비 지원에 의하여 연구되었음.
교신저자 : 장인엽 (조선대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : iyjang@mail.chosun.ac.kr

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

가지 생리학적 반응 또는 염증반응에 관여하고 있다(Regoli 등 1980). 지금까지 알려진 바로는 창자에서 bradykinin은 신경전달물질이 아닌 국소 호르몬으로서 직접 민무늬근에 작용하여 소화관 운동성을 조절하고 있는 것으로 알려져 있다(Hasler 등 1995). 그러나 창자사이질세포에 대한 bradykinin의 효과에 대해서는 전혀 보고된 바 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 생쥐 작은창자에서 배양된 창자사이질세포 및 근육층전층표본에서 bradykinin 수용체의 존재유무와 그 아형을 창자사이질세포 표지자(c-kit)와 함께 이중면역조직화학적 방법으로 규명하고, 배양된 창자사이질세포에서 발생되는 전기적 현상에 대한 생리학적 효과를 분석하여 bradykinin의 소화관 운동성 조절이 창자사이질세포를 통하여 이루어질 수 있는가에 대해서 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 창자사이질세포의 배양

8～13일 된 Balb/C mice를 희생시킨 후, 배를 열어 날문조임근부터 작은창자끝부위를 적출하였다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate용액으로 채워진 준비용기 속에서 창자간막 가장자리를 따라 절개하여 점막층을 제거하고 근육층을 분리시켰다. 분리된 근육조직을 collagenase (Worthington type II), 1.3 mg/mL; bovine serum albumin (Sigma), 2 mg/mL; trypsin inhibitor (Sigma), 2 mg /mL; ATP, 0.27 mg/mL 등이 들어 있고, Ca^{2+}이 들어있지 않는 Hank's 용액에 옮긴 다음, 37°C에서 20분간 항온 소화시켜 단일세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 cover glass위에 분주하고, 10분 후에 stem cell factor (SCF, 5 ng/mL, Sigma)와 2% antibiotic/antimycotic (Gibco)이 들어있는 SmGm (smooth muscle growth medium; Clonetics Corp)용액을 분주한 후 37°C (95% O_2-5% CO_2) 배양기에서 배양시켰다. 실험은 배양 2일째부터 시행하였다.

2. 세포막 전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 항온 조절계에 옮긴 후 분당 2～3 mL 속도로 세포외용액을 관류시켰다. Whole-cell patch clamp를 사용하여 배양된 창자사이질세포에서 세포막 전압과 세포막 전류를 기록하였다. Patch clamp 증폭기 (Axopatch 1-D, Axon Instruments)를 통하여 나오는 신호는 디지털 오실로스코프, 생리적 기록기를 통해서 관찰하였고, 고정전압과 자극전압의 조정 및 전류의 기록은 pClamp (version, 6.0, Axon Instruments)를 사용하였다. 세포막 전류는 -70 mv의 유지전압에 고정하여 기록하였다. 막전압고정실험에서 얻어진 결과는 Pclamp와 GraphPad Prizm (version 2.01, San Diego, CA, USA)을 이용하여 분석 처리하였다. 모든 실험은 30°C에서 시행하였다.

3. 면역세포화학염색

본 실험에서 배양 세포 및 근육층전층표본에 나타나는 창자사이질세포를 증명하기 위해, 창자사이질세포 표지자로 잘 알려진 c-kit과 bradykinin-1 및 2 receptor에 대한 항체를 이용하여 이중염색을 실시하였다. 고정은 4% paraformaldehyde로 실시하였으며, 근육층전층표본의 제작 등 자세한 사항은 기존의 보고한 방법에 의해서 시행하였다(윤 등 2004). 배양 세포 및 근육층전층표본을 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS를 실온에서 30분-1시간 동안 반응시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA)가 함유된 PBS를 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 염소에서 얻은 anti-bradykinin-1 receptor (Santa Cruz), anti-bradykinin-2 receptor (Santa Cruz)와 흰쥐에서 얻은 anti-c-kit (GIBCO)를 각각 1 : 200으로 희석하여 4°C에서 48시간 정도 반응시켰다. 이중형광염색은 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate IgG (Vector)와 Texas red-conjugate IgG (Vector)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이중염색은 두 종류의 1차 항체를 섞어서 동일하게 처리하고, 또 두 종류의 2차 항체를 반응시켜 관찰하였다. 대조군으로는 1차 항체들을 생략하고 2차 항체만 반응시킨 세포들을 사용하였다. 염색이 끝난 세포들은 유리슬라이드에 얹어서 습윤 봉입제로 마무리하였다.

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

4. 공초점주사현미경

모든 면역형광염색된 세포표본을 공초점주사현미경(FV300. Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로는 488 nm 파장을 FITC용으로, 568 nm 파장을 Texas-red용으로 사용하였다. Whole-mount 조직표본에서는 1 μm 간격으로 주사영상을 얻었는데 10~30 μm 두께까지 주사하였다. Flow View Softwave program (Olympus, Japan)을 사용하여 영상을 구성하였다.

결 과

1. BK 처지에 따른 창자사이질세포의 향도잡이 전압 및 전류에 대한 효과

창자사이질세포에 전류고정법(current clamp)을 시행 시 세포막 전압의 자발적인 탈분극 현상인 향도잡이전압(pacemaker potentials)이 기록되는데, 안정막 전압은 −59±5 mV였으며, 크기는 28±2 mV를 보였다(n=13; Fig. 1A). 유지전압 −70 mV로 세포막 전압을 고정하면(voltage clamp) 자발적인 내향성 전류인 향도잡이전류(pacemaker currents)가 기록되는데, 이 전류의 발생빈도는 분당 17±2회, 전류의 크기는 −413±61 pA를 나타냈다(n=33; Fig. 1B).

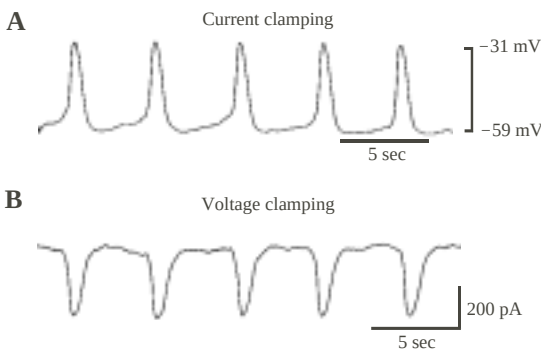

Fig. 1. Typical trace of pacemaker potentials in current clamping mode (A) and spontaneous pacemaker currents in voltage clamping mode recorded at a holding potential of −70 mV (B) in cultured ICC from mouse small intestine.

배양된 창자사이질세포에 투여한 bradykinin (10−8 M)는 세포막 전압의 저분극(hypopolarization)과 함께 향도잡이 전류의 크기를 감소시켰다. 이 실험에서 안정막 전압은 대조군의 −59±2.3 mV에서 bradykinin 투여시 −36±5.4 mV로 변화하였다. 또한 향도잡이 전류의 크기는 대조군의 26.7±2.6 mV에서 bradykinin 투여시 5.4±2.6 mV로 변화하였다(n=5; Fig. 2A and B). 또한 향도잡이 전류에 대해서 긴장성 내향성 전류의 활성화를 초래하였다. 유지전압 −70 mV에서 bradykinin (10−8 M)에 의해 활성화된 긴장성 전류의 크기는 −420±34 pA를 나타냈다 (n=6; Fig. 3). 이러한 결과는 bradykinin이 사이질 세포의 흥분성을 증가시켜 장운동을 촉진시킬 수 있음을

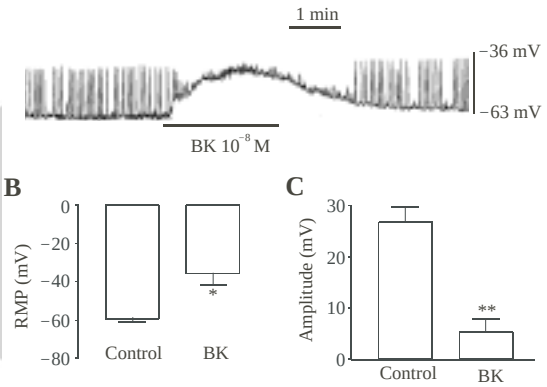

Fig. 2. Effects of bradykinin on pacemaker potentials in cultured ICC of mouse small intestine. 'A' shows the pacemaker potentials of ICC exposed bradykinin (10−8 M) in the current clamping mode (I=0). The bradykinin induced membrane depolarization and decrease amplitude of pacemaker potentials. Responses to bradykinin are summarized in B. Bars represent mean values ±SE. *($P<0.05$), **($P<0.01$) Significantly different from the untreated control.

Fig. 3. Effects of bradykinin on pacemaker currents in cultured ICC of mouse small intestine. Bradykinin (10−8 M) increased tonic inward currents and decreased in the frequency and amplitude of pacemaker currents.

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

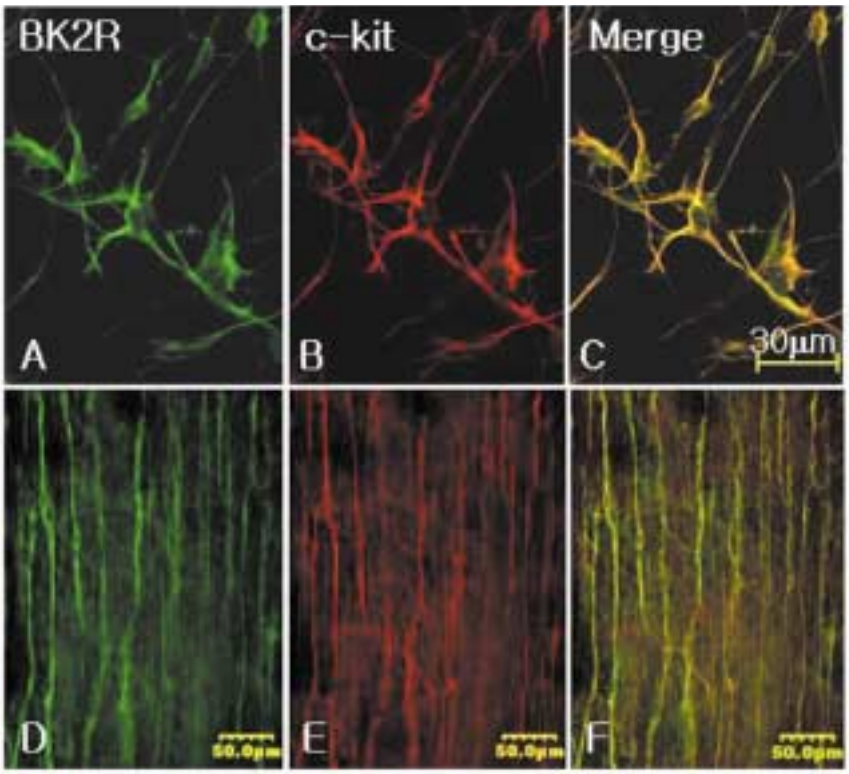

Fig. 4. Confocal microscopic images of Bradykinin-2 receptor- and c-kit- immunoreactive murine small intestine. Cultured cells (A-C): Bradykinin-2 receptor-immunoreactive cells (A) also showed c-kit-immunoreactivity (B). Colocalization was confirmed by merging (C). Note that immunoreactivity is localized in the cytoplasm of interstitial cells of Cajal (ICC), not nucleus. Whole-mount preparation (D-F): Cytoplasmic immunoreactivity of both bradykinin-2 receptor and c-kit was observed in the circular muscle layer of the murine small intestine. ICCs run parallel to the long axis of the circular muscle fibers.

시사한다.

2. Bradykinin-2 수용체에 대한 면역조직화학적 소견

면역조직학적 방법에 의해 bradykinin-1과 bradykinin-2 수용체의 염색을 실시한 결과, 배양된 창자사이질세포(Fig. 4A-C) 및 근육층전층표본의 창자사이질세포(Fig. 4D-F) 모두에서 bradykinin-2 수용체는 발현 되었지만, bradykinin-1 수용체는 발현 되지 않았다. Bradykinin-2 수용체의 면역반응 양상은 세포질 가장자리에서 잘 관찰되었고 핵에서는 관찰되지 않았다. 근육층전층표본에서의 결과를 보면 창자이질세포 표지자인 c-kit과 bradykinin-2 수용체에 대한 항체에 모두 염색되는 창자사이질세포들은 근육층신경얼기(myenteric plexus)보다는 돌림근육층 (circular muscle layer)에서 가장 뚜렷하게 나타났는데, 이들은 돌림근육섬유의 장축에 평행하게 주행하였다(Fig. 4D-F).

고 찰

소화관 운동성의 이상은 신경성 조절계의 변화나 또는 민무늬근 조절계의 변화에 의해서 발생되며 소화관 내용물의 이동이 감소 또는 증가되는 결과를

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

초래한다. 민무늬근조절에 가장 중요한 요소는 창자에서 자발적으로 발생되는 전기적 활동도, 즉 서파이다. 서파는 소화관 여러 부위에서 민무늬근의 자발적 수축과 매우 일치되고 있으며 소화관 부위 및 동물의 종에 따라 발생빈도 및 모양이 다르게 기록된다. 사람에서는 위에서 분당 3회, 십이지장에서는 분당 12회를 보이고 있다. 따라서 주기적인 서파의 발생은 소화관 민무늬근의 위상성 수축의 발생빈도와 수축시기를 결정하는 매우 중요한 역할을 담당하고 있어 서파의 이상은 곧 바로 여러 가지 소화관 운동성 질환을 야기 시킬 수 있다(Szurszewski 1987). 이러한 서파를 발생시키는 세포가 소화관내 창자사이질세포이다.

염증성 소화관 질환시 소화관 운동성 이상이 보편적으로 나타나며 임상적으로 복통과 설사가 유발된다. 이러한 운동성 이상에 대한 기전은 확실치 않지만 소화관 염증시 창자관내 염증성 세포들의 침윤이 증가되고 여러 화학적 매개물질들이 분비되어 염증을 악화시키는 결과로 추론되며 대표적인 물질의 하나로 bradykinin이 알려져 있다. Bradykinin는 일반적으로 민무늬근을 수축시키는 물질로 알려져 있으나 일부에서는 이완을 유발시키는 것으로도 보고되어 있다. 즉 Bradykinin는 토끼 큰창자(Hyman 등 1992), 기니피그 큰창자(Hasler 등 1995) 및 돌창자민무늬근(Calixto와 Medeiros 1991)들의 수축을 유발시키는 반면, 쥐 샘창자에서는 농도-의존적으로 이완 반응을 일으킨다(Boschcov 등 1984). 그러나 지금까지 bradykinin의 소화관 운동성에 대한 효과는 민무늬근에 직접 작용한 결과에 국한되어 있지만 창자사이질세포를 통하여 간접적으로도 이루어질 수 있다는 가설은 최근 창자사이질세포에서 여러 신경전달물질들의 수용체들이 존재한다는 사실들에 의해 뒷받침되고 있다(Portbury 등 1996, Sternini 등 1997, Epperson 등 2000, Burnstock 2002). 본 연구에서 창자사이질세포에 대해 bradykinin는 향도잡이전류의 긴장성 성분의 활성화를 통하여 세포막 전압의 저분극을 초래하였다. 이러한 결과는 세포막 전압이 교통반점을 통하여 민무늬근에 전달되어 동시에 민무늬근의 저분극을 유발시켜 수축을 야기 시킬 수 있음을 강력히 시사한다. 따라서 bradykinin이 창자사이질세포를 매개로 소화관 민무늬근의 활동도를 조절할 수 있음을 나타낸다. 일반적으로 bradykinin의 작용은 G-단백질과 연관된 세포막 특정수용체를 통하여 이루어진다(Regoli, 1980). 창자 민무늬근에서는 2종류의 bradykinin 수용체 아형이(bradykinin-1과 bradykinin-2) 발현된다. Bradykinin은 우선적으로 bradykinin-2 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있으며 이 수용체의 활성화가 bradykinin-2 수용체의 활성화가 소화관 민무늬근의 수축을 매개하는것으로 알려져 있다(Regoli 1980, Feres 등 1992, Hasler 등 1995, Hu 등 2003). 본 연구결과, 배양된 창자사이질세포들 및 근육층전층표본의 창자사이질세포들에서 bradykinin-2 수용체가 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 창자사이질세포에 대한 bradykinin의 효과도, 소화관민무늬근에서의 효과와 비슷하게, bradykinin-1 수용체보다는 bradykinin-2 수용체를 통하여 이루어진다고 추측된다. 또한 창자사이질세포의 bradykinin-2 수용체 면역반응이 돌림근육층의 창자사이질세포들에서 잘 관찰되는 것으로 보아 bradykinin-2는 서파를 확산시키는 작용(propagation of slow waves)에 관여하는 것으로 사료된다. 하지만 창자사이질세포에 대한 bradykinin의 효과나 그 수용체에 대한 다른 보고가 없어, 이에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 생쥐 작은창자 창자사이질세포에는 bradykinin-2 수용체가 존재하고, bradykinin은 이를 통하여 창자사이질세포의 전기적 활동도를 변화시킴으로서 간접적으로 소화관 민무늬근의 활동도를 조절할 수 있다고 추측된다.

참 고 문 헌

윤상필, 전제열, 임 용, 김인정, 김주영, 김장만, 장인엽 : 생쥐 작은창자 근육층의 calcitonin gene-related peptide 양성 섬유의 분포 및 창자사이질세포에 대한 작용. 대한체질인류학회지 17 : 207-214, 2004.

Boschcov P, Paiva ACM, Paiva TB, Shimuta SI : Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for the diphasic effect in the rat duodenum smooth muscle. Br J Pharmacol 83 : 591-600, 1984.

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

Burnstock G, Lavin S : Interstitial cells of cajal and purinergic signalling. Auton Neurosci 97 : 68−72, 2002.

Calixto JB, Medeiros YS : Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin−insensitive biphasic response in circular muscle of the guinea−pig ileum. J Pharmacol Exp Ther 259 : 659−665, 1991.

Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B : Molecular markers expressed in cultured and freshely isolated interstitial cells of Cajal. Am J Physiol 279 : C529−C539, 2000.

Feres T, Paiva ACM, Paiva TB : BK1 and BK2 bradykinin receptors in the rat duodenum smooth muscle. Br J Pharmacol 107 : 991−995, 1992.

Hasler WL, Kurosawa S, Takahashi T, Feng H, Gaginella TS, Owyang C : Bradykinin acting on B2 receptors contracts colon circular muscle cells by IP3 generation and adenylate cyclase inhibition. J Pharmacol Exp Ther 273 : 344−350, 1995.

Hu HZ, Liu S, Gao N, Xia Y, Mostafa R, Ren J, Zafirov DH, Wood JD : Actions of bradykinin on electrical and synaptic behavior of neurons in the myenteric plexus of guinea−pig small intestine. Br J Pharmacol 138: 1221−1232, 2003.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A : W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature 373 : 347−349, 1995.

Hyman PE, Diego A, Ridout D, Yuan QX, Ennes H, Cominelli F, Snape WJ, Tomomassa T : Effect of cell culture on rabbit colonic smooth muscle bradykinin receptors. Gastroenterol 102 : 1597−1604, 1992.

Portbury AL, Furness JB, Young HM, Southwell, BR, Vigana SR : Localization of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea−pig gastrointestinal tract. J Comp Neurol 367 : 342−351, 1996.

Publicova NG, Hammond EM, Sanders KM : Amplication of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. Proc Natl Acad Sci 90 : 2087−2091, 1993.

Regoli D, Barabe J : Pharmacology of bradykinin and related kinins. Pharmacol Rev 32 : 1−46, 1980.

Sanders KM : A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. Gastroenterol 111 : 492−515, 1996.

Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM : Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. Neurogastroenterol Motil 11 : 311−338, 1999.

Sternini C, Wong H, Wu SV, De Giorgio R, Yang M, Reeve Jr J, Brecha NC, Walsh JH : Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of cajal and enterochromaffin−like cells of the gastrointestinal tract. J Comp Neuol 386 : 396−408, 1997.

Szurszewski JH : Electrical basis for gastrointestinal motility. In: Johnson, L.R.(Ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd edn. Raven Press, New York, pp. 383−422, 1987.

Ward SM, Beckertt EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM : Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. J Neurosci 20 : 1393−1403, 2000.

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.

Korean J Phys Anthropol
17(4): 289 ~ 295, 2004

Abstract

Expression of Bradykinin Receptors and Effects of Bradykinin in the Interstitial Cells of Cajal from Mouse Small Intestine

Young-Youp Koh[3], Jae-Yeoul Jun[2,5], Seok-Choi[2], Yong Lim[4,5], Jun-Soo Kim[1], Hyun-Sik Moon[1], Myung-Young Kim[1], Kyung-Won Cho[1], Hyang-Hoon Cho[1], In-Youb Chang[1,5]

[1]*Department of Anatomy,* [2]*Physiology,* [3]*Internal Medicine and* [4]*Microbiology, College of Medicine, Chosun University.*
[5]*Research Center for Proteineous Materials, Chosun University.*

Interstitial Cells of Cajal (ICC) are pacemaker cells that generates slow waves and drive spontaneous mechanical contractions of gastrointestinal smooth muscle. Slow waves are generated the periodic activation of spontaneous inward currents (pacemaker currents). We studied the modulation of pacemaker activities by bradykinin (10−8 M) in cultured ICC with the whole cell patch-clamp technique, and the localization of bradykinin-2 receptor-immunoreactivity using double labelling immunohistochemistry in the murine small intestine. Externally applied bradykinin produced membrane depolarization in current-clamping mode. At a −70 mV of holding potential bradykinin increased tonic inward pacemaker currents. Double labelling with bradykinin-2 receptor and and c-kit was shown that ICC expressed the bradykinin-2 receptor-immunoreactivity. These results suggest that bradykinin modulates electrical activities of ICC via bradykinin-2 receptor, which may regulate gastrointestinal motility.

Key words : Bradykinin, Interstitial cells of Cajal, Bradykinin receptor, Gastrointestinal motility

Correspondence to : In-Youb Chang (Department of Anatomy and Institute for Medical Science, School of Medicine, Chosun University)
E-mail : iyjang@mail.chosun.ac.kr

Copyright (C) 2005 NuriMedia Co., Ltd.