

## 생쥐창자 근육층신경얼기에 분포하는 vanilloid receptor type-1 : 면역조직화학 및 전기생리학적 연구

전제열<sup>1</sup>, 양은석<sup>2</sup>, 김기훈, 장인엽

조선대학교 의과대학 해부학교실,<sup>1</sup>생리학교실,<sup>2</sup>소아과학교실

**간추림** : Capsaicin은 감각성 신경원에 작용하는 강력한 흥분성 물질로 vanilloid 수용체에 결합하여 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 뒤뿌리신경절, 삼차신경절, 결절신경절 등에서는 vanilloid receptor 제1형 (VR1)의 분포가 잘 알려져 있지만, 소화관에서는 VR1에 대한 분포가 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 실험에서는 생쥐의 작은창자와 큰창자에서 VR1의 분포를 알아내고, 창자운동의 향도잡이로 알려진 사이질세포(interstitial cells of Cajal)와 VR1과의 관계를 공초점주사레이저현미경과 전기생리학적 방법을 이용하여 알아보았다. VR1에 대한 면역조직화학염색을 실시한 결과 VR1면역양성신경세포들은 근육층신경얼기에서 주로 관찰되었다. VR1 면역양성 섬유들이 근육층신경절의 세포들을 둘러싸고 인접한 근육층신경얼기들과 연결띠를 형성하였다. 신경섬유와 달리 신경세포체에서는 매우 약한 반응만 관찰되었다. 돌림근육층과 세로근육층에서는 VR1 염색반응을 관찰할 수 없었다. 사이질세포와의 관계를 알아보기 위해 사이질세포와의 이중형광염색결과 사이질세포에서 VR1 염색반응을 관찰할 수 없었고, 사이질세포와 VR1 양성세포사이에는 상호연관성이 없었다. 이러한 사실은 전기생리학적으로 capsaicin의 투여가 사이질세포의 전기생리학적 성질에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 토대로 생쥐 VR1 양성신경세포들은 근육층신경얼기의 신경섬유에서 주로 관찰되었으며, 사이질세포와는 직접적 관련이 없음을 알 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : vanilloid receptor type-1 (VR1), c-kit, 근육층신경얼기, 사이질세포, 소화관운동

### 서론

Capsaicin은 capsicum 고추에서 발견된 친지질성 vanilloid 물질(lipophilic vanilloid substance)로, 열을 감지하게 한다. 즉 감각성 신경원에 작용하는 강력한 흥분성 물질로 vanilloid 수용체에 결합하여 작용하는 물질이다. 제1형 vanilloid 수용체와 비선택성 양이온 전도물질(non-selective cation conduction)이 결합함으로써 유발된 유해자극의 지각(nociception)과 국소적인 염증전구물질의 유리에 관여한다(Szallasi와 Blumberg 1996, 1999, Tominaga와 Julius

2000). 허혈이나, 염증상황에서 생성된 단백질은 VR1 활동성을 조절하는데 관여한다. Capsaicin을 사람 창자안에 투여하면 복통을 유발한다(Hammer 등 1998). VR1 유전자 결함을 가진 생쥐에서 유해자극의 지각이상과 통증과 관련된 행동장애 등을 보이고, 척수 뒤뿌리신경절에서 VR1 양성세포를 관찰할 수 없다고 알려지고 있다(Catherine 등 2000).

소화관의 capsaicin에 반응하는 미주신경감각신경들은 결절신경절(nodose ganglion)에서 기원하는 것으로 알려지고 있다(Such와 Jancso 1986, Marsh 등 1987, Holzer 1998, Bielefeldt 2000). 국소적으로 capsaicin을 투여하면 식도 및 샘창자를 지배하는 미주신경감각섬유의 일부가 흥분되는 것으로 알려지고 있다(Sekizawa 등 1999, Berthoud 등 2001). 미주신경에 capsaicin을 투여하면 미주신경감각섬유의 기

\*이 논문은 2002년도 조선대학교 연구보조비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자 : 장인엽 (조선대해부학교실)  
전자우편 : iyjang@mail.chosun.ac.kr

능을 차단시켜, 위산분비 저하(Sharkey 등 1991), 창자운동 저하(Raybould와 Holzer 1993, Lu와 Owyang 1999), 이자소화효소분비 저하(Li와 Owyang 1996), 음식섭취 억제(South와 Ritter 1988)등을 초래하는 것으로 알려지고 있다. VR1에 대한 관심이 결절신경절에서의 VR1의 분포 뿐만 아니라, 최근에는 창자신경에 존재하는 VR1의 분포에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Kulkarni-Narla와 Brown 2001, Nozawa 등 2001).

이 실험에서는 생쥐 창자신경에서 VR1의 존재유무와 분포양상을 알아보고자 한다. 또한 capsaicin이 소화운동 저하를 초래한다는 보고들(Raybould와 Holzer 1993, Lu와 Owyang 1999)을 바탕으로 소화관운동에 있어서 항도잡이(pace-maker)작용을 하는 사이질세포(interstitial cells of Cajal, ICC)와의 기능적 및 구조적 연관성 여부에 대하여 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

6~8주된 스킷생쥐(Balb/C) 6마리를 사용하였으며, ether로 마취시킨 후 등창자와 잘록창자를 얻어 염색에 사용하였다.

### 2. 근육전층조직표본제작

(whole-mount preparation)

신선표본을 7~8 cm 정도 절단한 후, 주사기로 창자내부를 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 수 차례 세척한 후 양쪽 끝을 실로 묶어 -20 °C acetone 또는 4% paraformaldehyde를 주입하여 창자를 팽창시킨 다음, 동일 고정액으로 20분 동안 고정시켰다. Silga gel이 발라진 판을 사용하여 창자를 창자간막을 따라 절개한 후, 창자안쪽을 노출시켜 해부현미경을 사용하여 점막층을 제거하였다.

### 3. 면역조직화학염색

0.3% Triton X-100이 함유된 PBS를 실온에서 1

시간 반응시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA)가 함유된 PBS를 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 제1항체는 항 vanilloid 수용체 제1형 (VR1, Oncogene, USA)와 c-kit항체인 Ack2 (GIBCO)를 1% BSA가 함유된 PBS용액에 각각 1:200으로 희석하여 4°C에서 48시간 정도 반응시켰다. PBS로 수차례 세척한 후 2차항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate IgG (Vector)와 Texas red-conjugate IgG (Vector)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이중염색은 두 종류의 1차항체를 섞어서 동일하게 처리하고, 또 두 종류의 2차 항체를 반응시켜 관찰하였다. 대조군으로는 1차 항체들을 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다. 염색이 끝난 조직은 유리 슬라이드에 얹어서 습윤봉입제로 마무리하였다.

### 4. 공초점 주사현미경

모든 면역형광염색된 조직표본을 공초점주사현미경(FV300, Olympus, Japan)를 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로는 488 nm 파장을 FITC 용으로, 568nm 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 최종 3차원적 영상으로 재조립하였다.

### 5. 세포막전압 및 전류의 기록

#### 1) 세포분리

8~13일 된 Balb/C mice를 ether로 마취시킨 다음 목부위를 탈구시켜 희생시킨 후 배를 열어 날문조임근부터 작은창자끝부위를 적출하였다. 실온에서 Krebs-Ringer bicarbonate용액으로 채워진 준비용기 속에서 창자간막가장자리를 따라 절개하여 내용물을 제거하였다. 핀으로 조직을 고정한 후 수술현미경하에서 미세가위를 이용하여 점막층을 제거하고 돌림근층을 노출시켰다. 분리된 작은창자근육 조직을 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/mL이 들어 있

고,  $\text{Ca}^{2+}$ 이 들어있지 않는 Hank's 용액에 옮긴 다음  $37^\circ\text{C}$ 에서 20분간 항온 소화시켰다. 다시  $\text{Ca}^{2+}$ 이 들어있지 않는 Hank's 용액으로 교체하고 끝이 무딘 유리피펫을 사용하여 조심스럽게 진탕시켜 단일세포를 분리하였다.

분리된 세포들을 35 mm 배양 용기내 murine collagen (2.5 g/mL, Falcon/BD)으로 coating된, 멸균된 유리 coverglass위에 분주하였다. 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  $37^\circ\text{C}$  (95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ ) 배양기에서 배양시켰다. 배양된 다음날 전날 배양된 용액에서 2% antibiotic/antimycotic (Gibco)만 제외시켜 영양액을 바꾸어 주었다. 실험은 배양 2일째 후부터 시행하였다.

### 2) 세포막 전압 및 전류의 기록

배양된 용기를 현미경위에 설치되어 있는 항온 조절계에 옮긴 후 분당 2~3 mL 속도로 세포외용액을 관류시켰다. Whole-cell patch clamp를 사용하여 배양된 ICC에서 세포막전류(voltage clamp)와 세포막전압(current clamp)을 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)와 IBM-compatible computer를 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  $30^\circ\text{C}$ 에서 시행하였다.

### 3) 실험용액

세포외 관류용액의 조성은 다음과 같다(각 수치는 mM단위임). Ca-PSS 용액: KCl 5, NaCl, 135,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  1.2, glucose 10, HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]) 10이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.4가 되도록 적정하였다.  $\text{Ca}^{2+}$ -free 용액은 위 조성에서  $\text{CaCl}_2$ 만을 제거하였다. 전극내용액의 조성은 다음과 같다(각 수치는

mM단위임). KCl 140,  $\text{MgCl}_2$  5,  $\text{K}_2\text{ATP}$  2.7,  $\text{Na}_2\text{GTP}$  0.1, creatine phosphate disodium 2.5, HEPES 5, EGTA 0.1이며 Tris를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다.

## 결 과

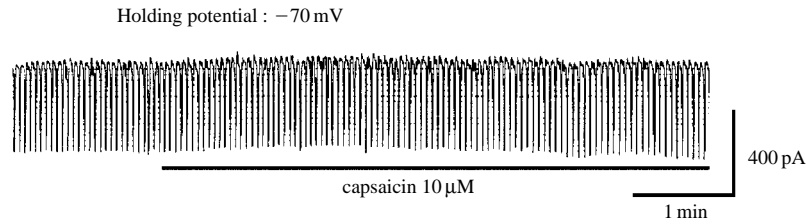
Vanilloid receptor 제1형 (VR1)에 대한 항체를 이용하여 생쥐 작은창자와 큰창자에서 면역조직화학적 염색과 전기생리학적 방법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. VR1의 면역조직화학적 소견

VR1 양성 신경섬유들이 작은창자와 큰창자의 근육층신경절기(myenteric plexus)의 전반에 걸쳐 분포하였는데 큰창자와 작은창자사이의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 이들 신경절기들의 형태와 크기는 다양하였으며, 신경섬유들은 근육층신경절기들 사이에서 두꺼운 연결띠를 형성하였는데, 창자의 장축에 평행으로 주행하거나, 직각으로 주행하였다. 뿐만 아니라 연결띠와 연결띠사이를 연결하는 얇은 신경섬유들이 관찰되었는데 이들의 주행방향은 대부분 장축에 직각이었다. 근육층신경절기신경섬유들은 다른 근육층신경절의 세포들을 둘러싸는 양상이었다(Fig. 1). VR1 양성 신경섬유들은 보통 규칙적이지 않고, 염주모양의 팽창을 보이는 주행경로를 가지고 있었다. 근육층신경절기의 VR1 양성 세포체는 VR1 양성 신경섬유에 비해 약하게 염색되었다. 세로 근육층과 돌림근육층에서는 VR1 면역양성반응을 관찰할 수 없었다. 소화관운동을 조절하는 사이질세포와 VR1 면역양성세포 사이의 관계를 알아보기 위해 이중형광염색을 실시하였는데, 사이질세포에서 VR1 면역반응을 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 또한 사이질세포의 돌기들과 VR1 반응 신경섬유사이에 특이한 연관성은 없었다.

### 2. Capsaicin 처치에 따른 사이질세포의 세포막 전압 및 전류의 기록

유지전압  $-70$  mV로 막전압을 고정하면 자발적



**Fig. 3.** Effects of capsaicin on the inward pacemaker currents recorded at a  $-70$  mV of holding potential in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine. Capsaicin ( $10\ \mu\text{M}$ ) had no effect on the generation of pacemaker currents.

내향성 전류인 향도잡이 전류가 기록된다. 기록된 향도잡이 전류의 빈도는 17.7 (0.4 cycle/min회,  $n = 13$ )를 보였으며 전류의 크기는  $-482$  (22 pA,  $n=19$ )를 나타냈다. 배양된 ICC에 투여된 capsaicin ( $10\ \mu\text{M}$ )은 향도잡이 전류의 발생빈도나 전류의 크기에 아무런 영향을 나타내지 않았다(Fig. 3).

## 고찰

기니픽과 흰쥐에서 vanilloid receptor 수용체를 함유하는 근육층신경절기세포와 섬유들은 작은창자와 큰창자에 널리 분포한다고 알려져 왔는데, 생쥐를 대상으로 한 이 실험결과와 일치하였다(Maggi 1995, Anavi-Goffer 등 2002). 근육층신경절기의 세포체와 신경섬유에 VR1이 존재한다는 것은 돼지를 대상으로 한 결과와 일치하였다(Poonyachoti 등 2002). 이렇게 여러 동물의 창자에서 VR1이 잘 표지되는 것은 여러 동물의 창자 VR1의 아미노산 배열이 유사하다는 결과로 확인되었다(Savidg 등 2002).

근육층신경절기세포의 분류는 신경화학적, 형태학적, 전기생리생리학적 특성에 의해 이루어져 왔는데, 모든 VR1 양성세포는 콜린성, 흥분성으로 작용하는 것으로 알려지고 있다(Costa 등 1996, Lomax와 Furness 2000, Coutts 등 2002). 이러한 주장은 VR1을 통한 capsaicin의 작용은 최종적으로는 아세틸콜린에 의한 신경전도를 통해서 이루어지는 것으로 뒷받침되고 있다(Bartho 등 1999, Mang 등 2001). 흥분성 운동신경세포에 분포한다고 알려진 substance-P 또는 calcitonin과 VR1이 동일세포내에 존

재한다는 것은 VR1이 흥분성 신경전도와 관련된 것을 뒷받침하고 있다(Costa 등 1996, Lomax와 Furness 2000, Anavi-Goffer와 Coutts 2003).

미주신경의 감각섬유종말구조의 특징적인 소견은 근육층속 배열(intramuscular array, IMA)와 신경절속층판종말(intraganglionic laminar cordings; IGLE) 형태를 갖는다고 알려져 있다(Berthoud와 Powley 1992). IGLE는 근육층신경절기의 창자신경을 둘러싸고 긴장수용체 역할을 수행하며(Zagorodnyuk 등 2001), IMA는 주로 위에 존재하며 신장수용체(stretch receptor)로 작용하는 것으로 최근 밝혀졌다(Phillips와 Powley 2000). 하지만 이들 소견은 위바닥과 날문방에서 확인된 것으로 작은창자의 돌림근육층과 세포근육층에서 VR1양성으로 염색되는 IMA와, 근육층신경절에서 VR1양성으로 염색되는 IGLE 모두 관찰할 수 없었던 이 실험소견은 흰쥐를 대상으로 한 결과(Patterson 등 2003)와 일치하였다. 최근 신경추적자를 주입하고, VR1과의 이중염색을 이용한 실험에서, 근육층신경절기신경세포들을 둘러싸는 VR1양성경섬유들은 미주신경기원이 아니라, 척수신경에서 기원하는 것으로 밝혀졌다(Ward 등 2003). 따라서 본 실험결과 염색된 VR1양성신경섬유들은 IGLE에 해당하는 구조물들을 가지고 있지 않는 것으로 미루어 미주신경에서 기원하지 않는 것으로 생각된다.

VR는 통증을 전달하는 수용체로 알려져 왔다. 소화관에서는 척수를 통한 교감신경과, 미주신경을 통해 부교감신경이 모두 관여하는 것으로 추측되지만 이에 대한 정확한 구분은 아직 이루어지지 않은 사실이다. 그러나 지금까지 밝혀진 사실은 통증을 수반

한 창자의 팽창이나, 염산에 의해 유발된 자극 등은 고립로핵(nucleus tractus solitarius)을 비롯한 대뇌에 c-Fos를 유발하는 것으로 알려지고 있다(Traub 등 1996, Michl 등 2001). 이 경우에 척수에서는 거의 c-Fos 활성화가 이루어지지 않는다는 보고로 미루어, 창자신경을 통하지 않고 미주신경을 이용하여 중추신경계통으로 전달되는 독자적인 통증통로가 존재하는 것을 추측케한다. 이러한 미주신경과 VR의 연관성이 유해자극의 전도에 관여할 뿐만 아니라, capsaicin을 이용하여 부교감성 분비작용, 포만감의 전도 등에도 관여하는 것으로 밝혀지고 있다(South와 Ritter 1988, Li와 Owyang 1996, Liu와 Owyang 1999). Capsaicin을 투여하면 미주신경의 감각신경이 흥분되는데 이는 VR1을 통하지 않고 다른 형태의 VR을 통해서 흥분이 전달되는 것으로 추측되고 있다(Holzer 1998). 지금까지 소화관통증을 전달하는 경로는 VR1을 통해서 이루어진다고 알려지고 있지만, 이런 VR1양성신경섬유들은 미주신경보다는 척수신경가지들이라는 이론이 대두되고 있다(Grundy 2002, Ward 등 2003). 이는 통증유발 인자의 종류 및 형태에 따라 미주신경과 척수신경의 통증전달 역할이 구분되어 있을 가능성을 의미하는 것으로 향후 이를 입증하기 위한 활발한 연구가 필요하다고 사료된다.

ICC가 창자신경으로부터 오는 신경전도를 조절하여 소화관운동의 항도잡이역할을 수행하고, 신경으로부터 전달된 전기신호를 주위의 민무늬근세포들에 널리 전파시키는 역할을 수행하는 것으로 알려지고 있다(Huizinga 등 1995). Capsaicin을 투여하면 미주신경감각섬유의 기능을 차단시켜 소화관운동의 감소를 초래한다는 보고들(Raybould와 Holzer 1993, Lu와 Owyang 1999)을 바탕으로, 본 실험에서 이중형광염색을 실시하여 VR1양성세포와 c-kit양성세포를 관찰한 결과, ICC에서 VR1에 의해 염색되지 않았고, 또 전기생리학적으로 capsaicin의 투여가 배양 ICC의 전기생리학적 활성도에 별다른 영향을 주지 못하였다. 따라서 생쥐의 작은창자와 큰창자에서는 capsaicin에 의한 소화관운동능력의 감소를 초래하는 것은 VR1와 ICC의 직접적인 관련이 없고, 다른 경로를 통하여 간접적 영향을 받는 것으로 생각

된다. 이러한 소견은 capsaicin의 투여가 창자신경 calcitonin gene-related peptide (CGRP)의 유리를 촉진시키고 유리된 CGRP가 ICC에 작용하여 창자 민무늬근의 이완을 유발하는 것으로 추측되고 있다(Bartho 등 1991). 많은 CGRP양성창자신경들에서 VR1양성을 보인다는 보고(Sternini와 Anderson 1992)는 이를 더욱 뒷받침 해주는 것이라 여겨진다. 이 연구자들도 최근 CGRP가 민무늬근육세포 뿐만 아니라 ICC에 미치는 영향을 전기생리학적 및 형태학적으로 밝혀내었다(미발표자료).

정상적인 감각전도에 있어서는 VR가 관여하는지는 여전히 완전히 알려져 있지 않지만, 소화관의 케양성질환, 염증성질환, 역류성질환등에서는 VR이 조절작용에 관여하는 것으로 추측되고 있다(Lemann 등 1991, Anton 등 2001).

손이나 발의 염증시 체성감각경로에서 VR1의 발현이 증가한 것(Carlton과 Coggeshall 2001)처럼, 창자신경에서도 어떤 조건이 주어지면 VR1의 발현이 증가되는지 알아보는 것이 매우 중요한 작업으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

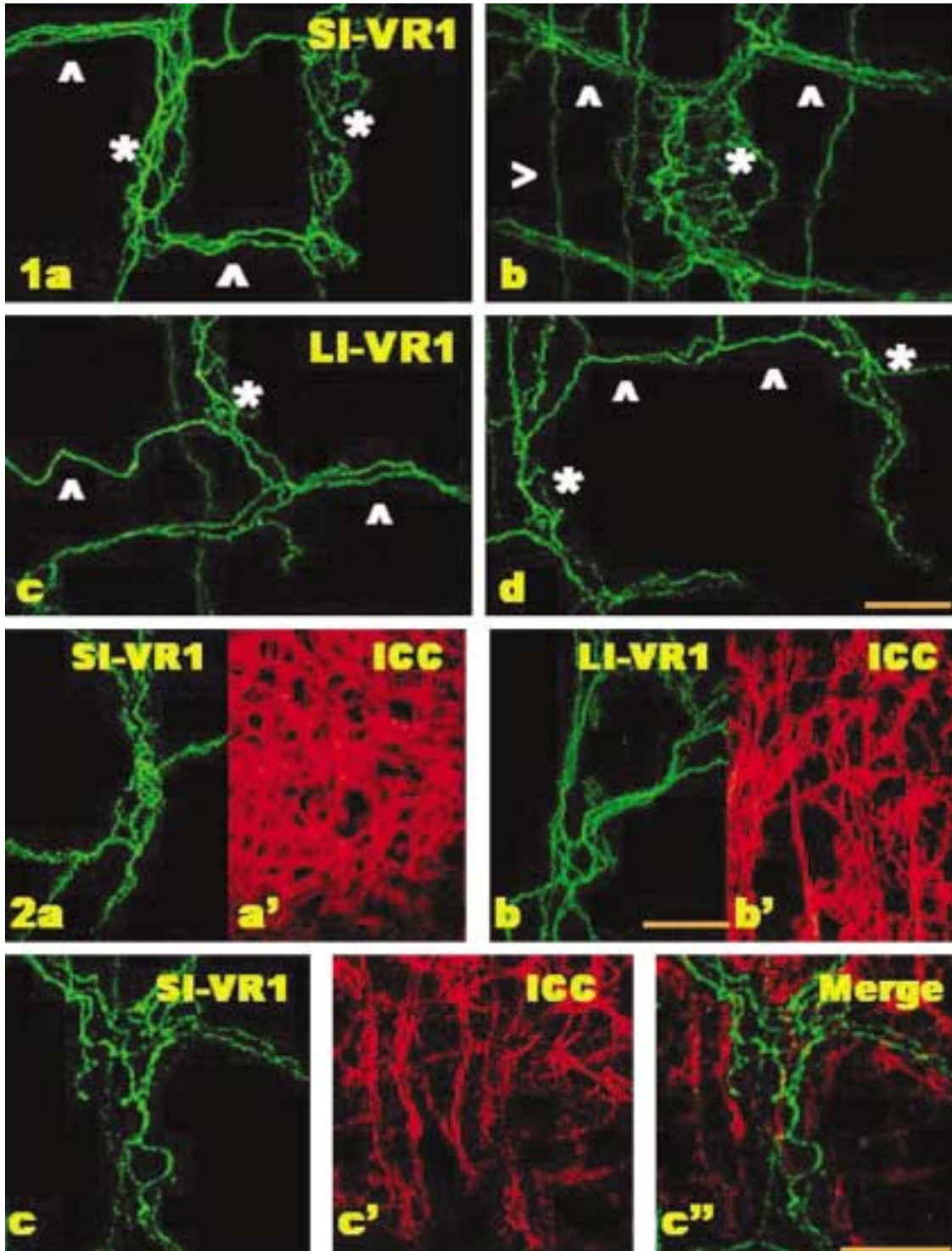
- Anavi-Goffer S, McKay NG, Ashford ML, Coutts AA : Vanilloid receptor type 1-immunoreactivity is expressed by intrinsic afferent neurones in the guinea-pig myenteric plexus. *Neurosci Lett* 319 : 53-57, 2002.
- Anavi-Goffer S, Coutts AA : Cellular distribution of vanilloid VR1 receptor immunoreactivity in the guinea-pig myenteric plexus. *Eur J Pharmacol* 1; 458 : 61-71, 2003.
- Anton PM, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L : Chronic low-level administration of diquat increases the nociceptive response to gastric distension in rats: role of mast cells and tachykinin receptor activation. *Pain* 92 : 219-227, 2001.
- Bartho L, Koczan G, Holzer P, Maggi CA, Szolcsanyi J : Antagonism of the effects of calcitonin gene-related peptide and of capsaicin on the guinea-pig isolated ileum by human alpha-calcitonin gene-related peptide. *Neurosci Lett* 129 : 156-159, 1991.
- Bartho L, Lenard L, Patacchini R, Halmi V, Wilhelm M,

- Holzer P, Maggi CA : Tachykinin receptors are involved in the “local efferent” motor response to capsaicin in the guinea-pig small intestine and esophagus. *Neuroscience* 90 : 221–228, 1999.
- Berthoud HR, Lynn PA, Blackshaw LA : Vagal and spinal mechanosensors in the rat stomach and colon have multiple receptive fields. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1371–R1381, 2001.
- Berthoud HR, Powley TL : Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J Comp Neurol* 319 : 261–276, 1992.
- Bielefeldt K : Differential effects of capsaicin on rat visceral sensory neurons. *Neuroscience* 101 : 727–736, 2000.
- Carlton SM, Coggeshall RE : Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett* 310 : 53–56, 2001.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D : Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288 : 306–313, 2000.
- Costa M, Brookes SJH, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ : Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75 : 949–967, 1996.
- Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S : Localisation of cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol* 448 : 410–422, 2002.
- Grundy D : Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 51(Suppl 1) : 2–5, 2002.
- Holzer P : Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am J Physiol* 275 : G8–G13, 1998.
- Hammer J, Hammer HF, Eherer AJ, Petritsch W, Holzer P, Krejs GJ : Intraluminal capsaicin does not affect fluid and electrolyte absorption in the human jejunum but does cause pain. *Gut* 43 : 252–255, 1998.
- Holzer P : Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am J Physiol* 275 : G8–G13, 1998.
- 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.
- Kulkarni-Narla A, Brown DR : Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci Lett* 308 : 153–156, 2001.
- Lemann M, Dederding JP, Flourie B, Franchisseur C, Rambaud JC, Jian R : Abnormal perception of visceral pain in response to gastric distension in chronic idiopathic dyspepsia. The irritable stomach syndrome. *Dig Dis Sci* 36 : 1249–1254, 1991.
- Li Y, Owyang C : Pancreatic secretion evoked by cholecystokinin and non-cholecystokinin-dependent duodenal stimuli via vagal afferent fibres in the rat. *J Physiol* 494 : 773–782, 1996.
- Liu YX, Owyang C : Duodenal acid-induced gastric relaxation is mediated by multiple pathways. *Am J Physiol* 276 : G1501–G1506, 1999.
- Lomax AE, Furness JB : Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 302 : 59–72, 2000.
- Maggi CA : Maggi Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (Cgrp) as cotransmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 45 : 1–98, 1995.
- Mang CF, Erbelding D, Kilbinger H : Differential effects of anandamide on acetylcholine release in the guinea-pig ileum mediated via vanilloid and non-CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 134 : 161–167, 2001.
- Marsh SJ, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D : The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience* 23 : 275–289, 1987.
- Michl T, Jovic M, Heinemann A, Schuligoi R, Holzer P : Vagal afferent signaling of a gastric mucosal acid insult to medullary, pontine, thalamic, hypothalamic and limbic, but not cortical, nuclei of the rat brain. *Pain* 92 : 19–27, 2001.
- Nozawa Y, Nishihara K, Yamamoto A, Nakano M, Ajioka H, Matsuura N : Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. *Neurosci Lett* 309 : 33–36, 2001.
- Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR : Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 31 : 277–287, 2003.

- Phillips RJ, Powley TL : Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res Rev* 34 : 1–26, 2000.
- Poonyachoti S, Kulkarni-Narla A, Brown DR : Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell Tissue Res* 307 : 23–33, 2002.
- Raybould HE, Holzer HH : Duodenal acid-induced inhibition of gastric motility and emptying in rats. *Am J Physiol* 265 : G540–G546, 1993.
- Savidge C, Davis K, Shah S, Colley E, Phillips S, Sanasinghe J, Winter P, Kotsonis H, Rang PM : Cloning and functional characterization of the guinea-pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology* 43 : 450–456, 2002.
- Sekizawa S, Ishikawa T, Sant’Ambrogio FB, Sant’Ambrogio G : Vagal esophageal receptors in anesthetized dogs: mechanical and chemical responsiveness. *J Appl Physiol* 86 : 1231–1235, 1999.
- Sharkey KA, Sobrino JA, Cervero F, Varro A, Dockray GJ : Visceral and somatic afferent origin of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lower thoracic spinal cord of the rat. *Neuroscience* 32 : 169–179, 1989.
- Sharkey KA, Oland LD, Kirk DR, Davison JS : Capsaicin-sensitive vagal stimulation-induced gastric acid secretion in the rat: evidence for cholinergic vagal afferents. *Br J Pharmacol* 103 : 1997–2003, 1991.
- South EH, Ritter RC : Capsaicin application to central or peripheral vagal fibers attenuates CCK satiety. *Peptides* 9 : 601–612, 1988.
- Sternini C, Anderson K : Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. *Somatosens Mot Res* 9 : 45–59, 1992.
- Such G, Jancso G : Axonal effects of capsaicin: an electrophysiological study. *Acta Physiol Hung* 67 : 53–63, 1986.
- Szallasi A, Blumberg PM : Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain* 68 : 195–208, 1996.
- Szallasi A, Nilsson S, Farkas-Szallasi T, Blumberg PM, Hokfelt T, Lundberg JM : Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res* 703 : 175–183, 1995.
- Tominaga M, Julius D : Capsaicin receptor in the pain pathway. *Jpn J Pharmacol* 83 : 20–24, 2000.
- Traub RJ, Sengupta JN, Gebhart GF : Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience* 74 : 873–884, 1996.
- Zagorodnyuk VP, Chen BN, Brookes SJ : Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J Physiol* 534 : 255–268, 2001.

## Legends for Figures

- Fig. 1.** Distribution of VR1-immunoreactive (VR1-IR) nerve fibers in the whole-mount preparations of murine small intestine (SI) and large intestine (LI): (a, b) The VR1-IR nerve fibers taken at the level of the myenteric plexus of SI. VR1-like immunoreactivity was observed within myenteric ganglia (\*) and in interganglionic fiber tracts (^). Very occasional fibers are also observed within the circular muscle layer. (c, d) The VR1-IR nerve fibers taken at the level of the myenteric plexus of LI. Similarly to small intestine, VR1-IR was observed within myenteric ganglia and in interganglionic fiber tracts. Scale bars = 50  $\mu$ m.
- Fig. 2.** Double labeling of VR1-immunoreactivity (a–c; green) and ICC (a’–c’; red) within the myenteric plexus of murine intestines. Merge with double labeling of VR1 and ICC shows that VR1-LI nerve fibers and ICC are not apposed to each other and neither colocalized (c’'). Scale bars = 50  $\mu$ m.



**Abstract**

**Vanilloid Receptor Type-1 Immunoreactivities in the Mouse Myenteric Plexus: Immunohistochemical and Electrophysiological Study**

Jae-Yeoul Jun<sup>1</sup>, En-Seok Yang<sup>2</sup>, Kee-Hune Kim, In-Youb Chang

*Department of Anatomy, College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Physiology, College of Medicine,  
<sup>2</sup>Department of Pediatrics, College of Medicine, Chosun University*

The vanilloid receptor type-1 (VR1) is a nonselective cation channel activated by capsaicin and can be act as mediator of chemical and physical stimuli that elicit pain. The presence of VR1 in the dorsal root, trigeminal and nodose ganglia has been firmly established, but it unclear in the mouse intestinal wall. The distribution of VR1 receptors in mouse afferent neurons innervating the intestinal tract was investigated by immunohistochemistry. Also small and large intestines were dual-labelled with antibody for VR1 and marker for interstitial cells of Cajal (c-kit). VR1-immunopositive cells were localized on fine fibers in myenteric plexus and expressed weakly myenteric ganglia. The majority of VR1-immunopositive fibers are not colocalized with or apposed to c-kit positive interstitial cells of Cajal. Also electrophysiologically capsaicin had no effect on cultured interstitial cells of Cajal. It is concluded that VR1-immunoreactive intestinal nerves are mainly distributed in myenteric plexus of murine intestinal wall, and vanilloid may be not directly related to interstitial cells of Cajal in regulation of intestinal motility.

**Key words** : Vanilloid receptor type1 (VR1), c-kit, Myenteric plexus, Interstitial cells of Cajal (ICC), Intestinal motility