

Capsaicin이 성숙흰쥐 근육층신경얼기의 칼슘채널 α_{1B} subunit 면역활성도에 미치는 영향

박승화, 김상현, 김경래¹, 박웅채¹
건국대학교 의학전문대학원 해부학교실, ¹외과학교실

간추림 : 성숙동물 근육층신경얼기에서 capsaicin 투여 후 시간경과에 따른 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도 변화를 살펴보기 위해 면역조직화학적, 형태계측학적 방법을 이용해 비교분석 하였다.

성숙흰쥐 (Sprague Dawley계, 200 gm 안팎)에 capsaicin을 50 mg/kg 피하주사하고 1일, 2일, 1주일, 4주일 후에 동물을 희생시킨 후 돌창자 근육층신경얼기의 전층표본을 제작하여 NADH-TR 반응염색과 α_{1B} subunit 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역활성도를 정량화하기 위해 신경세포의 형태를 분류하고 영상분석기를 이용하여 계수하고 통계처리 하였다.

정상군의 근육층신경얼기에서 α_{1B} subunit는 신경절과 신경절사이띠에 뚜렷한 면역반응을 나타내었으며 세포질이 α_{1B} subunit에 대해 반응을 나타낸 세포는 전체 신경세포의 56.0% (1형: 68.2%, 2형: 66.9%, 3형: 50.1%)를 차지하고 있었다. α_{1B} subunit에 대한 면역활성도는 capsaicin 투여 후 1일군부터 급격한 변화를 나타내어 면역반응 신경세포의 총수가 19.0% 감소하였으며, 감소현상은 1형 (20%↓)과 3형 (40.6%↓) 세포에서 두드러지게 나타났다. Capsaicin 투여 후 2일군에서는 1일군에 비해 활성도가 더 저하되어 면역반응 신경세포의 총수가 37.9% (1형: 23.7%↓, 3형: 52.2%↓) 감소하였다. Capsaicin 투여 후 1주일군에서는 가장 현저한 감소를 나타내어 정상군에 비해 64.9% (1형: 54.8%↓, 2형: 19.0%↓, 3형: 80%↓) 감소하였다. Capsaicin 투여 후 4주군에서 α_{1B} subunit의 면역활성도는 1주군에 비해 증가되는 추세를 보이고 있었으나 정상군에 비해 면역반응 신경세포의 총수는 43.9% (1형: 23.7%↓, 2형: 17.8%↓, 3형: 56.2%↓) 감소한 상태로 남아있었다.

이상의 결과로 capsaicin 투여에 의해 성숙흰쥐의 근육층신경얼기에서 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도는 투여 후 1주일까지 빠르게 저하되며 그 이후부터는 점차 정상으로 회복되거나 완전한 상태로의 회복에는 4주 이상의 시간경과가 필요함을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 성숙흰쥐, capsaicin, 근육층신경얼기, 칼슘채널 α_{1B} subunit, 면역조직화학

서 론

소화관은 자율신경의 지배를 받을 뿐만 아니라 자체 내에 존재하는 창자신경계통(enteric nervous system)에 의해 그 기능이 자동 조절되는 것은 널리 알려진 사실이다. 창자신경계통은 소화관의 두 근육

층 사이에 존재하는 근육층신경얼기(myenteric plexus)와 점막밑조직에 존재하는 점막밑신경얼기(submucous plexus) 및 소화관의 각 층에 분포되어 있는 카할간질세포(interstitial cells of Cajal)를 총칭하고 있다(Langley 1921). 창자신경계통에는 대단히 많은 수의 크기가 다양한 신경세포가 산재되어 있으며, 이들 중 작은 크기의 신경세포는 창자신경계통이 원래 가지고 있는 자체기원신경(intrinsic neuron)이고 크기가 큰 신경은 외부의 자율신경계에서 기원한 바깥기원신경(extrinsic neuron)이라고 한다

*이 논문은 2001년도 건국대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

교신저자: 박승화(건국대학교 의학전문대학원 해부학교실)
E-mail: seunghwa.park@kku.ac.kr

(Gunn 1951, Gunn 1959, Gabella 1967, Gabella 1971). 이렇게 형태적으로 다른 신경세포들은 여러 가지 신경전달물질의 분비를 통해 그 작용을 나타내며 또한 신경전달물질의 종류에 따라 작용이 달라 이에 대한 많은 연구보고가 있다 (Feher와 Leranth 1983, Moghimzadeh 등 1983, Melander 등 1985, Krantis와 Harding 1986, Ekblad 등 1988).

일반적으로 신경세포에서 신경전달물질의 분비는 신경세포에 존재하는 칼슘채널을 통해 이루어지고 있는 바 신경세포에서의 칼슘채널의 역할에 대한 많은 연구가 시행되어 왔다. 칼슘채널은 여러 종류의 세포에서 세포의 흥분, 유전자발현, 신경전달물질의 분비 등에 중요한 역할을 한다 (Miller 1987). 전압의존성 칼슘채널 (voltage-dependent Ca^{++} channel; VDCC)은 전기생리학적 및 약리학적 특성에 따라 L, T, N, P/Q, R형으로 분류하며, 이는 주로 포유류의 중추신경계통에서 그 연구가 이루어졌다 (Tsien 등 1991, Piedras-Renteria와 Tsien 1998). 창자신경계통에서도 신경전달물질의 분비를 통해 소화관의 운동, 분비, 혈류가 조절되며 이러한 기능은 전압의존성 칼슘채널을 통한 칼슘의 유입에 전적으로 의존하고 있다 (De Ponti 등 1993). 전기생리학적 연구에 의해 창자신경계통에는 N, L, P/Q형의 칼슘채널이 있음이 알려졌으며 (Hirning 등 1990, Zhou와 Galligan 1998) 그 중 N형 칼슘채널이 신경전달물질 분비에 가장 많이 관여하고 있음이 밝혀졌다 (Takahashi 등 1992).

신경전달물질 분비에 있어 칼슘채널이 중요한 역할을 한다고 알려져 있지만 전압의존성 칼슘채널의 분포나 subunit의 구성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 대부분의 장기에서 전압의존성 칼슘채널은 α_1 , $\alpha_{2,8}$, β 등 3가지의 subunit로 구성된 common core로 구성되어 있다. 이 중 α_1 subunit는 전압의존성 칼슘채널을 결정하는 주된 요소이다. 뇌조직에 있는 α_1 subunit에는 cDNA의 구성이 서로 다른 α_{1A} - α_{1E} 의 5 종류의 subtype이 있음이 밝혀졌다 (Randall 1998, Walker와 De Waard 1998). 창자신경계통에서는 α_{1A} - α_{1D} 의 4 종류의 subtype이 확인되었으며 이들 중 α_{1B} subunit가 가장 널리 분포하여 창자신경계통에서 여러 종류의 신경전달물질 분비에 관여한다고 한다 (Kirchgessner와 Liu 1999).

한편 Capsaicin (8-methyl-N-Vanillyl-6-noneamide)은 고추에서 매운맛을 내는 성분으로서 정상이나 병적인 상태에서 감각신경의 기능을 연구하는데 있어 신경약리학적 도구로 널리 사용되고 있는 물질이다. Capsaicin에 관한 연구는 Jancso 등 (1977)에 의해 신생 흰쥐에 투여한 capsaicin이 척수신경절에서 신경독성물질 (neurotoxin)로 작용함이 알려진 이래 주로 말초신경계통에서의 형태적, 기능적 변화에 관한 연구가 주를 이루었다 (Szolcsanyi 등 1975, Jancso와 Kiraly 1981, Fitzgerald 1983, Buck와 Burks 1986). 그러나 이후 연구범위가 넓어지면서 중추신경계통이나 창자신경계통에서의 효과에 대해서도 활발한 연구가 진행되었다 (Henry 1976, Hayes와 Tyers 1980, Ritter와 Dinh 1988, Ritter와 Dinh 1990). 특히 창자신경계통에서 capsaicin은 별다른 효과를 나타내지 않는다는 의견이 지배적이었으며 (Gamse 등 1981, Furness 등 1982, Gibbins 등 1985) 일부 학자들만이 창자신경계통의 신경전달물질 분비에 영향을 미친다고 보고하였다 (Sternini 등 1987, Holzer 1991).

Capsaicin의 반응효과는 투여되는 양이나 동물의 발달정도에 따라 다르게 나타나 생후 1일에서 12일 사이에 capsaicin의 신경독성효과가 특히 민감하며 생후 14일 이후의 성숙동물에서는 형태적 변성효과가 나타나지 않는다고 한다 (Jancso와 Kirly 1981). 또한 성숙동물에 capsaicin을 투여하면 감각전달로 (sensory pathway)에 있어 초기에 substance P의 양이 감소하며 이후에는 수주일에서 수개월에 걸쳐 회복되는 양상을 보인다고 한다 (Szolcsanyi와 Jancso-Gabor 1976, Jancso 등 1977, Gamse 등 1981, Bitner와 LaHann 1985). 그러나 capsaicin 투여에 의한 성숙동물 창자신경계통에서의 변화에 대해서는 Kim (1993)의 연구 외에는 별 다른 보고가 없다.

이에 본 연구에서는 capsaicin이 성숙동물의 창자 운동을 관장하는 근육층신경절기에 미치는 영향을 알아보기 위해 성숙흰쥐에 capsaicin을 투여한 후 시간 경과에 따른 근육층신경절기에서의 칼슘채널 α_{1B} subunit의 분포변화를 면역조직화학적 및 형태계측학적 방법을 이용하여 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 200 gm 안팎의 성숙흰쥐 (Sprague Dawley 계) 30마리를 사용하였다.

2. 실험방법

1) Capsaicin 주사

성숙흰쥐에 capsaicin (Sigma chemical co., St. Louis, Mo, U.S.A)을 10% 에탄올, 10% Tween 80과 80% 생리식염수 혼합액에 10 mg/mL로 녹여 50 mg/kg를 1회 피하주사하였다. 대조군은 같은 방식으로 capsaicin을 제외한 나머지 혼합액을 같은 양 주사하였다. 주사 후 각각 1일, 2일, 1주일 4주일 후에 동물을 희생시켜 면역조직화학 염색을 시행하였다.

2) 전층표본 (whole mount preparation)제작

흰쥐를 에테르로 마취하고 4% paraformaldehyde 용액 150~200 mL로 관류고정 한 다음, 복강을 열어 돌막창자관막 (ileocecal valve)으로 부터 몸 쪽으로 7 cm의 돌창자 (ileum)를 잘라내었다. 잘라낸 돌창자는 생리식염수에 담가 창자간막 (mesentery) 부착부위를 따라 길이로 절개한 후 얇은 나무판 위에 편평하게 펼쳐 핀으로 고정하고 이것을 다시 고정액에 담가 4°C에서 18시간 고정하였다. 고정된 표본은 Furness와 Costa (1980)의 전층 (whole mount)표본을 이용한 면역조직화학방법에 따라 80% 에탄올로 씻은 후 95% 및 100% 에탄올과 xylene에서 각각 30분 동안 탈수하고 100%, 80%, 50% 에탄올의 순서로 함수한 후 phosphate 완충액 (pH 7.4)에 담가 입체현미경 하에서 돌창자의 근육충신경얼기를 세로근육층에 부착시켜 분리하였다.

3) 면역조직화학적 방법

전층표본 제작에 의해 분리한 근육충신경얼기 조직을 0.1 M phosphate 완충용액 (pH 7.4)으로 여러 번 세척한 후, 남아 있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 1% sodium borohydride로 1시간 처리하였다. 세포 내로의 항체 투과율을 높이기 위해 다음의 모든

용액에 triton-X100을 혼합하여 최종 농도가 0.02% 되게 하였다. 조직을 0.1 M phosphate 완충용액으로 여러 번 세척한 후 10% normal goat serum (NGS, Gibco Lab., New York) 으로 실온에서 1시간 처리하여 비특이성 항원의 반응을 막았다. 이후 1:25로 희석한 antihuman rabbit α_{1B} 항체 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)에 실온에서 하룻밤 incubation하여 항원-항체 반응을 일으켰다. 그 다음 0.1 M phosphate 완충용액으로 세척하여 항원에 부착되지 않고 남아 있는 항체를 제거한 후, 이차 항체인 antirabbit-IgG (Chemicon International INC, Temecula, CA, U.S.A)로 실온에서 1시간 동안 incubation하였다. 조직을 다시 0.1 M phosphate 완충용액으로 여러 번 세척한 후 peroxidase-antiperiodase (PAP, Chemicon International INC., Temecula, CA, U.S.A)복 합체에 실온에서 2시간 동안 incubation하였다. 조직을 0.1 M phosphate 완충용액으로 세척한 후, 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)와 0.5% 과산화수소 (H_2O_2)를 함유한 0.05 M tris-HCl (pH 7.6)용액으로 발색시켜 증류수로 씻은 후 영구표본을 제작하였다. 모든 염색과정에서 항상 일차항체를 처리하지 않은 대조표본을 만들고 과정상 염색정도를 균일하게 하였다.

4) Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetrazolium Reductase (NADH-TR) 반응염색

정상 성숙흰쥐의 근육충신경얼기에서의 α_{1B} subunit 면역활성세포의 분포정도를 정량화하기 위해서 대조군으로 NADH-TR 반응염색을 한 근육충신경얼기를 Gabella (1969) 방법에 의하여 제작하였다.

5) 관찰 및 계측

NADH-TR 반응염색과 N형 칼슘채널 α_{1B} subunit에 대한 면역염색을 시행한 근육충신경얼기 표본에서 신경세포의 분포양상을 살펴보기 위하여 먼저 신경세포의 모양을 Song 등 (1984)의 분류방법에 의해 나누었다. 세포의 모양이 둥글고 크며 세포질이 핵에 비해 많은 세포를 1형, 세포의 모양이 방추형인 세포를 2형, 세포의 모양이 둥글고 작으며 세포질 양이 매우 적어 핵이 세포체의 대부분을 차지하는 세포를 3형으로 분류하여 계수하였다. 이 분류방

법에서 1형 세포는 바깥기원운동신경세포 (extrinsic motor neuron), 2형 세포는 바깥기원감각신경세포 (extrinsic sensory neuron), 3형 세포는 자체기원신경 세포 (intrinsic neuron)임을 의미한다.

한 마리의 흰쥐에서 근육층신경얼기 표본을 각각 5장씩 제작하였다. 슬라이드 한 장 당 20시야를 임의로 중복을 피하여 선택한 후, 영상분석기 (Image plus pro-5.0, Media Cybermedic, USA)를 이용하여 사진촬영하고 계수하였다. 모든 통계자료는 SPSS version 10.0 통계프로그램을 이용하여 분석 처리하였다.

결 과

1. 정상 성숙흰쥐 근육층신경얼기에서의 칼슘채널 α_{1B} subunit 면역반응 양상

정상 성숙흰쥐에서 근육층신경얼기는 칼슘채널 α_{1B} subunit 항체에 대해 뚜렷한 면역반응을 나타내었으며 전체적으로 격자모양을 이루며 돌림근육층과 세로근육층 사이에 고르게 분포하고 있었다 (Fig. 2A). 5~30의 신경세포로 이루어진 신경절 (ganglia)은 세로근육층에 직각방향으로 놓여있었고 이들 중 일부 신경세포들의 세포질은 α_{1B} subunit 항체에 대해 높은 면역활성을 나타내고 있었으며 다른 일부 신경세포는 반응을 하지 않아 세포질이 흰 공간으로 나타나기도 하였다. α_{1B} subunit 항체에 대한 면역반응은 축삭에서도 나타나 신경절을 이루는 신경세포 주변을 감싸 들고 있었으며 이들은 이웃하는 신경절과도 연결되어 신경절간띠 (internodal strand)를 이루기도 하였다. 신경 축삭에 나타나는 면역반응은 반점형태 (punctate)로 나타났으며 돌림근육층과 세로근육층에서 각각의 근섬유 방향과 평행으로 달리는 신경섬유들도 반응을 나타내어 제3신경얼기 (tertiary plexus)를 이루고 있었다 (Fig. 2C). 본 연구에서는 돌창자 근육층신경얼기에서 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도를 정량화하기 위해 세포질이 면역활성을 나타낸 신경세포를 Song 등 (1984)에 의한 분류기준에 의해 분류하고 그 수를 세었다. 정상 성

Table 1. Distribution of α_{1B} immunoreactive cells in myenteric plexus of control rats

Types of cells	Groups			Total
	1	2	3	
NADH-TR stain	19.8±4.5	11.8±2.9	63.9±15.3	95.5±19.9
α_{1B} immunostain	13.5±3.8	7.9±1.7	32.0±7.2	53.5±10.8
%	68.2	66.9	50.1	56.0

number: M±S.D. (per 1 mm²)

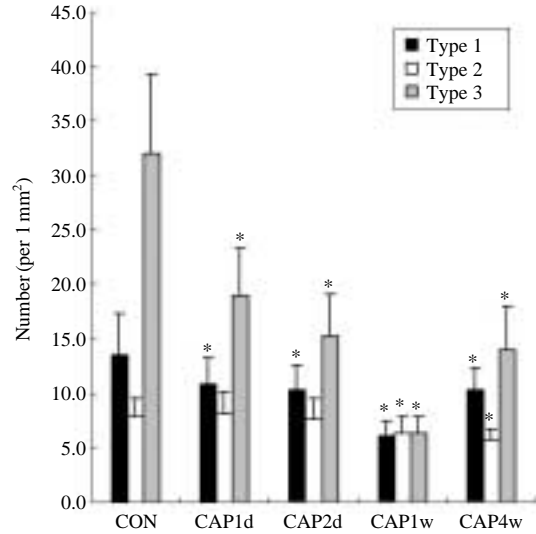


Fig. 1. Changes of numbers of α_{1B} immunoreactive cells in myenteric plexus (per 1 mm²) of capsaicin treated rats. number: M±S.D., *: p<0.01, CON: control group, CAP: capsaicin treated group, d: days, w: week.

숙흰쥐의 근육층신경얼기에서의 칼슘채널 α_{1B} subunit 항체에 반응을 나타낸 세포의 분포정도를 살펴 보기 위해 대조군으로 NADH-TR 염색을 시행한 표본을 제작하여 1 mm² 단위면적 당 신경세포의 총수를 계산하였다 (Fig. 2B). 그 결과 1형이 68.2%, 2형이 66.9%, 3형이 50.1%로 전체 신경세포의 56.0%가 반응을 나타내었다 (Table 1).

2. Capsaicin 투여 후 시간경과에 따른 칼슘채널 α_{1B} subunit 면역반응 변화

성숙흰쥐 근육층신경얼기에서 capsaicin 투여로

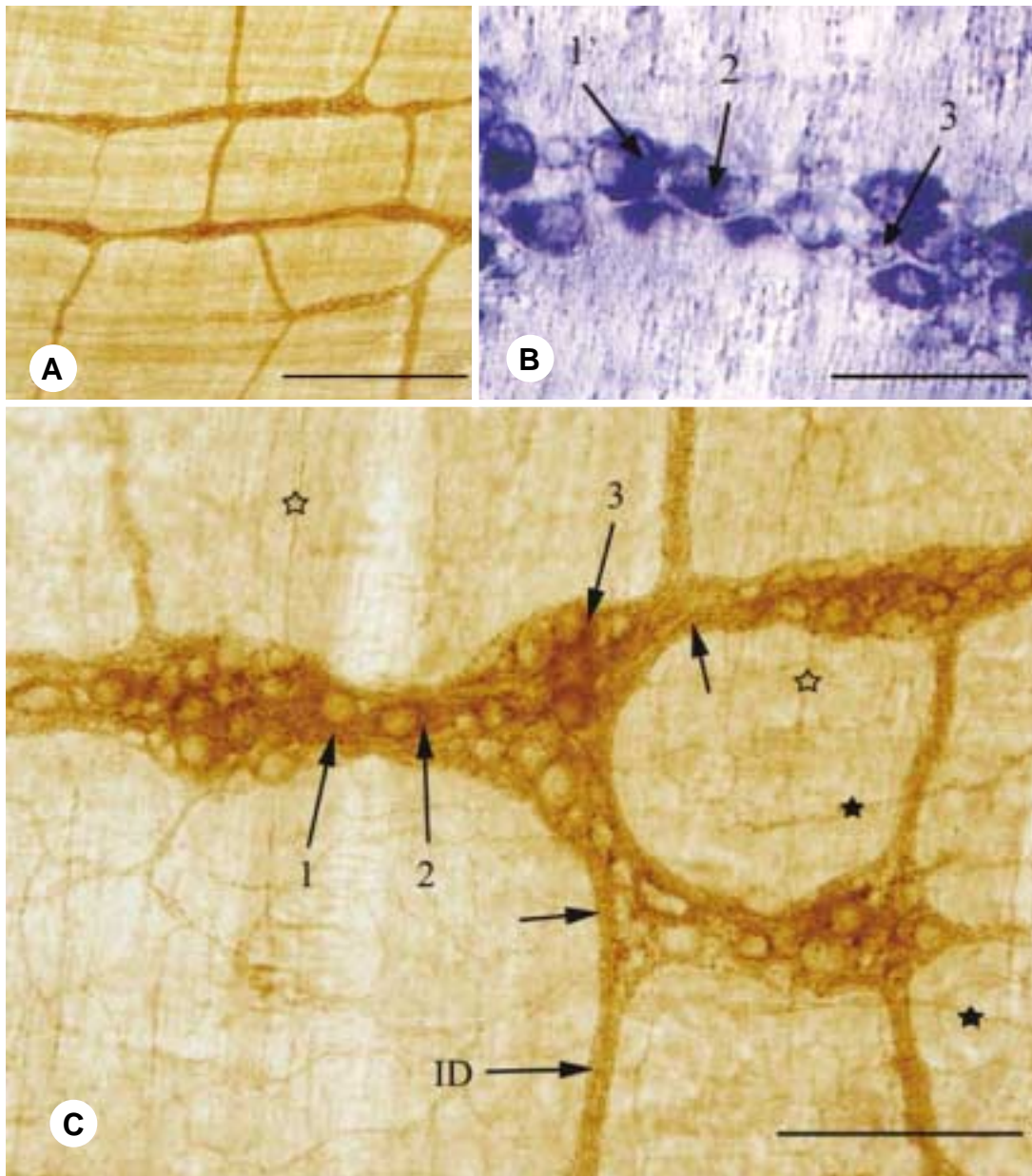


Fig. 2. Myenteric plexus in control group. A: Myenteric plexus arranged in rectangular appearance between circular and longitudinal muscle layer. α_{1B} subunit immunostain. Scale bars, 500 μm . B: Types of myenteric neurons. 1: Type 1 cell, large and round cell with rich cytoplasm. 2: Type 2 cell, ovoid cell with rich cytoplasm. 3: Type 3 cell, small cell with scanty cytoplasm. NADH-TR stain. Scale bars, 200 μm . C: Myenteric ganglia and internodal strand were immunoreacted with α_{1B} subunit. Several neurons have dense cytoplasm immunoreacted with α_{1B} subunit. Immunoreacted axons have punctate appearance (\uparrow) surround each nerve cell body and traced into internodal strand (ID) that connect with each ganglion. immunoreacted axons were also seen in the longitudinal (\star) and circular muscle layer (\blackstar). 1: Type 1 cell, 2: Type 2 cell, 3: Type 3 cell. α_{1B} subunit immunostain. Scale bars, 200 μm .

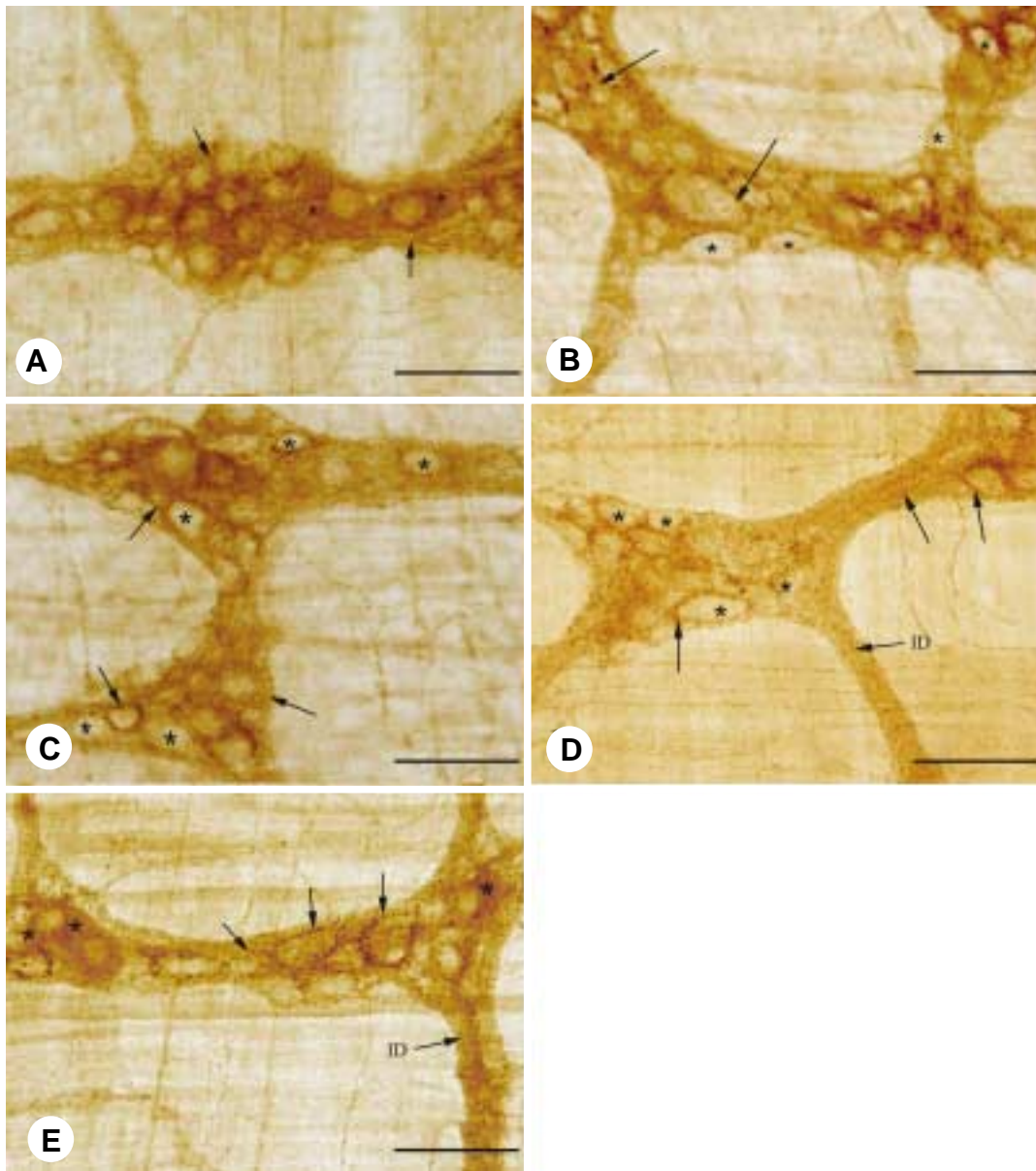


Fig. 3. Changes of immunoreactivities of α_{1B} subunit in capsaicin treated group. Scale bars, 100 μ m. A: Control group. Many neurons have dense cytoplasm immunoreacted with α_{1B} subunit (*) were seen. Punctate axon (\uparrow) surround each nerve cell body. B: 1 day after capsaicin treated group. Cytoplasmic immunoreactivities of nerve cell body were decreased and several nerve cells (*) have vacant cytoplasm that dose not react with α_{1B} subunit. Punctate axon (\uparrow) surround each nerve cell body. C: 2 days after capsaicin treated group. Nerve cells with vacant cytoplasm (*) were increased. Immunoreactivities of axons were increased (\uparrow). D: 1 week after capsaicin treated group. Most of nerve cell have vacant cytoplasm (*) that dose not react with α_{1B} subunit. Punctate axon (\uparrow) surround each nerve cell body and trace into internodal strand. E: 4 weeks after capsaicin treated group. Immunoreactivities of α_{1B} subunit were increased within ganglion and internodal strand (ID). Several nerve cell body have dense cytoplasm immunoreacted with α_{1B} subunit (*) were seen. Highly immunoreacted axons (\uparrow) surround each nerve cell body.

인한 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도는 capsaicin 투여 후 1일군부터 급격한 변화를 나타내어 세포질이 α_{1B} subunit에 대해 면역활성을 나타내는 신경세포들의 전체 수가 19.0% 감소하였다. 이러한 면역활성 세포의 감소현상은 1형과 3형 세포에서 두드러지게 나타났다(Table 2, Fig. 1). 이와 같은 현상은 면역조직 표본에서도 확인되는 바 신경절을 이루는 신경세포들의 α_{1B} subunit에 대한 면역활성도가 저하되어 정상군의 세포들(Fig. 3A)에 비해 세포질이 열게 염색되었으며 면역반응을 나타내지 않아 세포질이 흰 공간으로 나타난 신경세포들이 다수 관찰되었다. 또한 면역활성이 저하되어 세포질이 열게 염색된 신경세포들의 주변은 높은 면역활성도를 나타내어 축삭에서의 면역활성도는 변화하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3B).

Capsaicin 투여 후 2일군에서는 1일군에 비해 α_{1B} subunit에 대한 면역활성도가 더 저하되어 면역활성 신경세포의 전체 수가 감소하였으며 역시 1형과 3형 세포에서 감소현상이 두드러졌다(Table 2, Fig. 1). 면역조직표본에서의 형태적 변화는 capsaicin 투여 1일군에 비해 면역활성도가 다소 떨어져 보였으며 전체적인 형태변화는 1일군에서와 유사하였다(Fig. 3C).

Capsaicin 투여에 의한 근육층신경얼기의 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도는 투여 후 1주일군에서 가장 현저한 변화를 나타내어 면역활성 신경세포의 전체 수가 정상군에 비해 64.9% 감소하였으며 이 중 1형세포가 54.8%, 2형세포가 19.0%, 그리고 3형세포가 80%씩 감소하였다. Capsaicin 투여 후 1일군과 2일군에 비교해 볼 때 그동안 변화를 나타내지 않던 2형세포도 통계적으로 의미있는 감소를 나타내어 capsaicin 투여에 의해 가장 늦게 반응함을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 1). 이와 같은 정량적인 변화는 면역조직표본에서도 확인할 수 있는 바 표본의 전체적인 면역활성도가 떨어져 다른 군들에 비해 열은 염색정도를 나타내었으며 신경절을 이루는 대부분의 신경세포의 세포질이 면역반응 나타내지 않아 흰 공간으로 나타났다. 이러한 신경세포의 주변에서는 α_{1B} subunit에 대해 면역활성을 나타낸 축삭들이 신경세포를 감아 둘러싸 이웃하는 신경절

Table 2. Changes of numbers of α_{1B} immunoreactive cells in myenteric plexus (per 1 mm²) of capsaicin treated rats

Types of cells		Groups			Total
		1	2	3	
CON	number	13.5±3.8	7.9±1.7	32.0±7.2	53.5±10.8
	%	100	100	100	100
CAP 1d	number	10.8±2.4	8.2±2.0	19.0±4.3	38.0±6.4
	%	80.0*	103.8	59.4*	81.0*
CAP 2d	number	10.3±2.3	7.7±1.8	15.3±3.8	33.2±7.8
	%	76.3*	97.5	47.8*	62.1*
CAP 1w	number	6.1±1.4	6.4±1.5	6.4±1.5	18.8±4.3
	%	45.2*	81.0*	20.0*	35.1*
CAP 4w	number	10.3±2.1	5.7±1.1	14.0±4.0	30.0±6.8
	%	76.3*	72.2*	43.8*	56.1*

number: M±S.D., *: p<0.01, CON: control group, CAP: capsaicin treated group, d: days, w: week

로 이어지는 신경절사이띠를 이루고 있었다(Fig. 3D).

Capsaicin 투여 후 4주군에서 근육층신경얼기의 α_{1B} subunit의 면역활성도는 다시 증가되는 추세를 보이고 있었다. 이를 capsaicin 투여 후 1주일군과 비교해 보면 전체 면역활성 신경세포의 수가 증가하였으며 이는 특히 1형과 3형 신경세포의 면역활성도가 증가한 결과 때문이었다. 그러나 정상군과 비교해 보면 면역활성 신경세포의 총수는 43.9% 감소되어 있었으며 이 중 1형이 23.7%, 2형이 17.8%, 3형이 56.2%씩 감소한 상태로 남아 있어 정상군의 회복에는 더 많은 시간경과가 필요함을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 1). 면역조직표본 관찰의 결과 근육층신경얼기에서의 전체적인 α_{1B} subunit 면역활성도가 증가하여 비교적 짙은 염색반응을 나타내었으며 신경절 내에서는 면역활성을 나타낸 1형과 3형 신경세포가 흔하게 관찰되었으며 면역반응을 나타내지 않아 세포질이 흰 공간으로 남아 있는 2형 신경세포도 다수 관찰되었다. 또한 강한 면역반응을 나타낸 축삭들이 신경세포 주변을 감싸 돌고 있어 각각의 신경세포의 경계가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3E).

이상의 결과를 종합해 보면 capsaicin 투여에 의해 성숙원쥐의 근육층신경얼기에서의 칼슘채널 α_{1B} subunit의 면역활성도는 투여 후 1주일까지 빠르게 저하되며 그 이후부터는 점차 정상으로 회복되나

완전한 상태로의 회복에는 4주 이상의 시간경과가 필요함을 알 수 있다.

고 찰

근육충신경얼기에는 다양한 형태의 신경세포가 존재하며 이들은 substance P를 비롯한 여러 신경전달물질을 분비하여 그 기능을 수행하고 있다(Llewellyn-Smith 등 1988, Li와 Furness 1998, Lee와 Nam 2006). 신경세포에서 신경전달물질 분비는 전압의존성 칼슘채널을 통한 칼슘의 유입에 전적으로 의존하고 있다(De Ponti 등 1993). 창자신경계통에는 α_{1A} - α_{1D} 의 4종류의 subtype이 존재하며 이들 중 칼슘채널 α_{1B} subtype이 가장 널리 분포하여 근육충신경얼기를 이루는 신경절세포나 축삭에서 강한 면역반응을 일으키며 돌림근육층과 세포근육층을 지배하는 신경섬유에도 분포하고 있어 콜린성신경과 밀접한 관계를 갖고 있고(Kirchgeßner와 Liu 1999) 일차내재성구심신경(primary intrinsic afferent neuron)의 기능 조절에 중요한 역할을 할 것으로 추정하고 있다(Gruner와 Silva 1994). 이와 같은 사실은 본 연구결과에서도 확인되었던 바 정상군의 근육충신경얼기에서 α_{1B} subunit 항체에 대해 높은 면역활성을 나타낸 신경절세포들을 다수 관찰 할 수 있었으며 축삭에도 반응을 나타내어 신경절을 이루는 신경세포 주변을 감싸 돌고 있었으며 이들은 이웃하는 신경절과도 연결되어 신경절간띠(internodal strand)를 이루고 있었다. 또한 본 연구에서는 α_{1B} subunit에 대해 면역활성을 나타낸 신경세포를 Schofield(1962)의 기능에 따른 형태 분류방법과 기원에 따른 분류방법(Gunn 1951)을 같이 적용한 Song 등(1984)의 분류기준에 따라 구분하여 그 분포정도를 살펴 본 바 바깥기원운동신경에 해당하는 1형 신경세포가 68.2%, 바깥기원감각신경에 해당하는 2형이 66.9%, 자체기원신경에 해당하는 3형이 50.1%로 전체 근육충신경얼기를 이루는 신경세포의 56.0%가 α_{1B} subunit에 대해 면역반응을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 사실은 아직 보고된 바가 없는 새로운 사실로 근육충신경얼기에서의 칼슘채널 α_{1B} subunit

의 작용기전을 연구하는데 있어 유용한 기초자료가 될 수 있으리라 생각된다. 그러나 본 연구의 결과만으로 근육충신경얼기의 신경절세포에서 α_{1B} subunit가 합성되는지에 대한 여부를 확인할 수 없으므로 전자현미경관찰을 통한 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 성숙동물에 capsaicin을 투여한 후 근육충신경얼기에서의 α_{1B} subunit 면역활성 변화를 시간 경과에 따라 관찰하였다. α_{1B} subunit 면역활성도는 capsaicin 투여 후 1일 부터 면역활성신경세포의 현저한 감소현상이 나타나 투여 후 1주일째에 최고에 이르렀다. 그 변화는 1형 신경세포와 3형 신경세포에서 빠르게 나타나 투여 후 1일군에서 1형 세포가 20%, 3형 세포가 40.1% 씩 감소하였으며 2일군에서는 감소현상이 더 증가하여 1형 세포가 23.7%, 3형 세포가 52.2% 씩 감소하였다. 또한 면역활성도가 최하로 저하된 capsaicin 투여 후 1주일군에서는 그동안 변화를 나타내지 않았던 2형 세포에서의 면역활성도가 저하되어 1형 세포가 54.8%, 2형 세포가 19.0%, 3형 세포가 80.0% 씩 감소하였다. 이상의 결과를 종합해 보면 성숙동물에 투여한 capsaicin의 효과는 근육충신경얼기에서 바깥기원운동신경과 자체기원신경에서 신경전달물질의 분비를 빠르게 유도하며 그 이후 바깥기원감각신경세포에서의 신경전달물질이 분비되는 것으로 해석할 수 있다. Kim(1993)은 성숙흰쥐에 capsaicin을 투여한 후 근육충신경얼기에서 substance P와 CGRP의 면역활성 변화를 살펴본 바 투여 후 이른 시기에 해당하는 1일군과 2일군에서는 이들의 면역활성에 별다른 변화를 나타내지 않으나 capsaicin 투여 후 1주일군에서는 두 물질 모두 면역활성도가 급격히 저하하여 거의 반응을 나타내지 않는다고 하였다. 통각전달에 관여하는 일차구심성섬유의 신경전달물질로 잘 알려진 substance P와 CGRP는 창자신경계통에서 소화관의 운동 및 샘분비를 조절하며(Llewellyn-Smith 등 1988, Li와 Furness 1998, Lee와 Nam 2006) vanilloid 수용체를 가진 세포와 공존하고 있고(Ward 등 2003, Horie 등 2005) 또한 칼슘채널 α_{1B} subunit를 통해 분비가 이루어짐이 증명되었다(Kirchgeßner와 Liu 1999). 이러한 보고들은 본 연

구결과에 나타난 α_{1B} subunit 면역활성도 저하가 이러한 신경전달물질분비와 관련이 있음을 간접적으로 증명해 주고 있다.

Capsaicin은 화학적 통증을 수반하는 자극물질로 반응효과는 투여되는 양이나 동물의 발달정도에 따라 다르게 나타나 생후 1일에서 12일 사이에는 capsaicin의 신경독성효과가 특히 민감하며 생후 14일 이후의 성숙동물에서는 형태적 변성효과가 나타나지 않는다고 한다(Jancso와 Kirly 1981). 또한 성숙동물에 capsaicin을 투여하면 감각전달경로(sensory pathway)에 있어 초기에 substance P의 양이 감소하며 이후에는 수주일에서 수개월에 걸쳐 회복되는 양상을 보인다고 한다(Szolcsanyi와 Jancso-Gabor 1976, Jancso 등 1977, Gamse 등 1981, Bittner와 LaHann 1985). 창자신경계통에서의 이러한 변화는 Kim(1993)의 실험에서 살펴볼 수 있는 바 capsaicin 투여 후 1달군에서 근육층신경얼기 내의 substance P와 CGRP 면역활성이 거의 정상으로 회복된다고 하였다.

본 연구의 capsaicin 투여 후 4주군에서 근육층신경얼기에서의 α_{1B} subunit 면역활성도를 살펴보면 capsaicin 투여 후 1주일군과 비교해 전체 면역활성 신경세포의 수가 60.0% 증가하였으며 특히 1형(63.5% ↑)과 3형(118.8% ↑) 신경세포의 면역활성도가 증가하였다. 이는 위의 연구자들의 보고에 비추어볼 때 capsaicin에 의해 분비된 신경전달물질이 다시 재합성되면서 이와 동반되어 α_{1B} subunit의 합성이 증가한 결과로 생각할 수 있으나 본 연구 결과만으로는 확신할 수 없으므로 이에 대한 세포질 내에서의 미세구조적 변화에 대한 연구가 필요하다.

본 연구 결과를 정리해 보면 성숙동물의 근육층신경얼기에서 칼슘채널 α_{1B} subunit는 capsaicin에 반응하는 일부 신경세포들의 신경전달물질 분비에 관여하며 capsaicin 투여에 의해 그 활성도가 저하되고 일정기간 후 정상으로 회복될 것이라 생각된다.

Capsaicin에 의한 성숙동물의 근육층신경얼기에서 칼슘채널 α_{1B} subunit의 변화를 살펴본 본 논문은 여러 형태의 신경세포가 복잡한 회로를 이루면서 창자의 운동을 조절하는 창자신경계통의 작용기전

을 연구함에 유용한 기초자료가 될 수 있으리라 기대한다.

참 고 문 헌

- BittnerMA, LaHann TR : Biphasic time-course of capsaicin-induced substance P depletion: failure to correlate with thermal analgesia in the rat. *Brain Res* 322: 305-309, 1985.
- Buck SH, Burks TF : The neuropharmacology of capsaicin: Review of some recent observations. *Pharmacol Rev* 38: 179-226, 1986.
- De Ponti F, Giaroni C, Costentino M, Lecchini S, Frigo G : Calcium channel blockers and gastrointestinal motility: basic and clinical aspects. *Pharmac Ther* 60: 121-148, 1993.
- Ekblad E, Ekman R, Hakanson R, Sundler F : rectum of nerve fibers containing gastrin-releasing peptide in rat small intestine after local removal of myenteric ganglia. *Neuroscience* 24: 309-319, 1988.
- Feher E, Leranth C : Light and electron microscopic immunocytochemical localization of VIP-like activity in the rat small intestine. *Neuroscience* 10: 97-106, 1983.
- Fitzerald M : Capsaicin and sensory neurons. A Review. *Pain* 15: 109-130, 1983.
- Furness JB, Costa M : Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5: 1-20, 1980.
- Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL : Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience* 7: 447-459, 1982.
- Gabella G : neuron numbers in the myenteric plexus in newborn and adult rats. *Experimentia* 23: 52-54, 1967.
- Gabella G : Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat* 109: 81-95, 1971.
- Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F : Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of the rat. *Arch Pharmacol* 317: 140-148, 1981.
- Gibbins IL, Furness JB, Costa M, Macintyre I, Hilyard CJ, Girgis S : Co-localization of calcitonin gene related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57: 125-130, 1985.
- Gruner W, Silva LR : ω -conotoxin sensitivity and presynaptic

- inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci* 14: 2800-2808, 1994.
- Gunn M : A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Q J Microsc Sci* 92: 55-77, 1951.
- Gunn M : Cell types in the myenteric plexus of the cat. *J Comp Neurol* 111: 83-100, 1959.
- Hayes AC, Tyers MB : Effects of capsaicin on nociceptive heat, pressure and chemical thresholds and substance P levels in the rat. *Brain Res* 189: 561-564, 1980.
- Henry JL : Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 114: 439-451, 1976.
- Hirning LD, Fox AP, Miller RJ : Inhibition of calcium currents in cultured myenteric neurons by neuropeptide Y: evidence for direct receptor/channel coupling. *Brain Res* 532: 120-130, 1990.
- Holzer P : Capsaicin: Cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43: 143-201, 1991.
- Horie S, Michael GJ, Priestley JV : Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach. *Inflammopharmacology* 13: 127-37, 2005.
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A : Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature(Lond)* 270: 741-743, 1977.
- Jancso G, Kiraly E : Sensory neurotoxins: Chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Res* 210: 83-89, 1981.
- Kim BY : Effects of capsaicin on the nervous tissue in adult rats. *Yonsei Med Degr J* 36: 85-105, 1993. (in korean)
- Krantis A, Harding RK : The distribution of GABA-transaminase dehydrogenase activity in the myenteric plexus fo rat small intestine: a histochemical analysis. *Neurosci Lett* 64: 85-90, 1986.
- Kirchgessner AL, Liu MT : Differential localization of Ca²⁺ channel α_1 subunits in the enteric nervous system: Presence of α_{1B} channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. *J Copm Neurol* 409: 85-104, 1999.
- Langley JN : The autonomic nervous system. Pt 1, Cambridge Heffer, 1921.
- Lee HS, Nam YS : Immunohistochemical localization of calcium binding proteins and some neurotransmitters in myenteric plexus of goat stomach. *J Vet Sci* 7: 315-319, 2006.
- Li ZS, Furness JB : Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 294: 35-43, 1998.
- 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* 272: 139-148, 1988.
- Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A, Fahrenkrug J, Takemoto K, Mutt v : Distribution of galanin-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract of several mammalian species. *Cell Tissue Res* 239: 253-270, 1985.
- Miller RJ : Mutiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235: 46-52, 1987.
- Moghimzadeh E, Ekman R, Hakanson R, Sundler F : Neuronal gastrin-releasing peptide in the mammalian gut and pancreas. *Neuroscience* 10: 553-563, 1983.
- Piedras-Renteria ES, Tsien RW : Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7760-7765, 1998.
- Randall AD : The milecular basis fo volrage-gated Ca²⁺ channel diversity: is it time for T? *J Membrane Biol* 161: 207-213, 1998.
- Ritter S, Dinh TT : Capsaicin-induced neuronal degeneration: silver impregnation of cell bodies, axons, and terminals in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 271: 79-90, 1988.
- Ritter S, Dinh TT : Capsaicin induced neuronal degeneration in the brain and retina of the rats. *J Comp Neurol* 296: 447-454, 1990.
- Schofield GC : Experimental studies on the myenteric plexus in mammals. *J Comp Neurol* 119: 159-185, 1962.
- Song YS, Her KB, Chung IH, Shin TS : Morphometric study of the myenteric plexus of gastrointestinal tract after vagotomy. *Yonsei Med Degr J* 17: 415-425, 1984. (in korean)
- Sternini C, Reeve JR, Brecha N : Distribution and characterization gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. *Gastroenterology* 93: 852-862, 1987.
- Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A, Joo F : Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Arch Pharmacol* 287: 157-169, 1975.
- Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A : Sensory effects of capsaicin congeners. II. Importance of chemical structure and pun-

- gency in desensitizing activity capsaicin-type compounds. Drug Res 26: 33-37, 1976.
- Takahashi T, Tsunoda Y, Lu Y, Wiley J, Owyang C : Nicotinic receptor-evoked release of acetylcholine and somatostatin in the myenteric plexus is coupled to calcium influx via N-type calcium channels. J Pharmacol Exp Ther 263: 1-5, 1992.
- Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA : Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. Trends Pharmacol Sci 12: 218-214, 1991.
- Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR : Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. J Comp Neurol 465: 121-135, 2003.
- Zhou X, Galligan JJ : Inhibition of calcium currents in cultured myenteric neurons by 5-hydroxytryptamine (5-HT). Soc Neurosci Abstr 24: 1081, 1998.

Abstract

Changes of Immunoreactivities of Calcium Channel α_{1B} Subunit in Myenteric Plexus of Capsaicin Treated Adult Rats

Seung-Hwa Park, Sang-Hyun Kim, Kyoung-Rae Kim¹, Ung-Chae Park¹

Department of Anatomy, ¹General Surgery, College of Medicine, Konkuk University

This study was performed to investigate the changes of immunoreactivities of calcium channel α_{1B} subunit in myenteric plexus of capsaicin treated adult rats.

Sprague Dawley rats (about 200 g) were injected with capsaicin (50 mg/kg) subcutaneously. Ileal myenteric plexus was prepared by whole mount preparation method in 1 day, 2 days, 1 week and 4 weeks after capsaicin treated adult rats. Each myenteric plexus was reacted with NADH-TR and immunostained with α_{1B} subunit. Myenteric ganglion cell numbers were counted by image analyzer.

In control group myenteric plexus was arranged in rectangular appearance; myenteric ganglia and internodal strand were immunoreacted with α_{1B} subunit. Immunoreactive cells were 56.0% of total myenteric neurons. Total numbers of immunoreactive cells decreased by 19.0%, 37.9% and 64.9% in 1 day, 2 days, and 1 week after capsaicin treated group respectively. In 4 weeks after capsaicin treated group, immunoreactivities of α_{1B} subunit were increased compared to that of the 1 week after group. However total numbers of immunoreactive cells decreased by 43.9% compared to that of the control group.

In conclusion, we confirmed that immunoreactivities of α_{1B} subunit were decreased until 1 week after capsaicin treatment and recovered progressively after that time. It will take more than 4 weeks latency to recover the control immunoreactivities of α_{1B} subunit.

Key words : Adult rat, Myenteric plexus, Capsaicin, Calcium channel α_{1B} subunit, Immunohistochemistry