

장상피에서의 Nitric Oxide Synthase 양성세포에 관한 연구*

이화여자대학교 의과대학 해부학교실, 의과학연구소 신경과학부
한 후 재

= Abstract =

Expression of Constitutive Nitric Oxide Synthase by Gastrointestinal Epithelial Cells

Hoo Jae Hann

Department of Anatomy, Division of Neuroscience, College of Medicine,
Ewha Medical Research Center, Ewha Womans University

The present study investigated if constitutive nitric oxide synthase(cNOS), especially neuronal type, is expressed in gastrointestinal epithelial cells of rat. Expression of cNOS was immunohistochemically determined. Some gastric epithelial cells were found to express cNOS. Although less than that by the gastric epithelial cells, cNOS was also found to be expressed by the intestinal epithelial cells. Thus it is possible that constitutive type of nitric oxide synthase in gastrointestinal epithelial cells may play a role in normal gastrointestinal function.

KEY WORDS : Gastrointestinal epithelium · Constitutive nitric oxide synthase.

서 론

Nitric oxide(NO)는 생체내의 중요한 생물학적 전달자로서 여러 장기 및 세포에서 다양한 역할을 하고 있다. 대표적으로 면역기능의 매개, 혈관확장, 신경전달물질로서의 기능 등이 알려져 있다. 인체 방어기전에서 NO는 포식세포의 매개체로 작용하며¹⁾²⁾, 혈관내피세포에서 방출되는 NO는 아세틸콜린 등에 의한 평활근 이완 및 혈관확장작용을 매개한다고 한다³⁾⁴⁾. 또한 1991년 Garthwaite는⁵⁾ 뇌조직도 NO를 생성할 수 있음을 발견하였고 NO가 신경전달물질인 glutamate의 작용에 중요

*본 연구는 1995학년도 이화여자대학교 의과대학 동창회 학술연구지원에 의한 것임.

한 역할을 한다고 하였다⁵⁾⁶⁾. 그 기능이 다양하듯 nitric oxide synthase(NOS)에는 최소한 3가지 종류가 밝혀져 있으며 과거에는 NADPH-diaphorase 염색으로 NOS의 존재를 간접적으로 증명하였으나 최근에는 NOS에 대한 항체 개발로 보다 직접적인 연구가 가능해졌다.

소화기에서도 정상생리나 각종 질환시의 병태생리상 NO가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 많은 보고에서 그 존재가 증명된 바 있다⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾. 그러나 대부분 장신경절 신경원에서의 보고일 뿐 장상피에서의 형태학적인 보고가 없는 실정이다. 이에 본 연구자는 장상피에서 면역조직화학염색을 시행하여 constitutive NOS의 존재 유무 및 그 분포를 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

실험동물은 무게 200~250gram의 Sprague-Dawley계 성숙 흰쥐 5마리를 사용하였다. 희생 전 12시간 동안은 물만 먹었다.

2. 실험방법

흰쥐 4마리는 에테르로 마취후 동물고정대에서 흉곽을 열고 오른 심방귀를 절개한 후 생리적 식염수로 관류하고 4% paraformaldehyde 고정액(in PBS, pH 7.4)으로 관류고정하였다. 고정된 위와 소장 일부를 적출하여 동일 고정액에 1시간 후고정하였다. 장표본을 약 1cm 크기로 잘라 7% sucrose 용액(4℃)에 하루밤 두었다가 액체질소에 미리 냉각시킨 isopentane 용액에 넣어 급속냉동시켰다. -70℃ deep freezer에 보관하였다가 8 μ m로 절편을 만들어 면역염색 전까지 4℃에 보관하였다. 이중 일부조직은 위의 방법과 동일하나 cryoprotection을 하지 않는 방법, paraformaldehyde 고정 후 파라핀블럭을 만드는 방법을 이용하여 표본을 만들었다. 1마리는 고정하지 않고 냉동절편 후 acetone에 고정하는 방법으로 표본을 만들어 표본처리과정이 면역염색에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

3. 면역조직화학염색

0.2% Triton X-100 용액으로 처리하고 2% NGS(normal goat serum)을 포함한 인산염 완충용액에서 1시간 incubation시킨 후 rabbit anti-nNOS(neuronal NOS) 항체(transduction)와 4℃에서 16~20시간 반응시켰다. 인산염 완충용액으로 각 5분씩 5회 세척후 Vectastain ABC kit(Elite)를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하고 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시켰다. 또한 적절한 항체농도를 결정하고자 각각 1:100, 1:250, 1:500의 세가지 농도로 희석한 일차항체를 이용하였다.

결 과

1. 표본처리 및 항체농도

면역조직화학염색 결과 표본처리과정에 따라 많은 차

이를 보였다. 가장 깨끗하고 조직의 완전성이 보존된 방법은 파라핀블럭을 만든 경우였으며(Fig. 5) 면역조직화학염색상 가장 적절한 방법은 paraformaldehyde 고정후 냉동절편을 만든 경우였다(Fig. 1, 2, 3). Paraformaldehyde 고정후 냉동절편을 만든 경우에는 비특이적 반응 없이 적절한 면역염색 결과를 얻을 수 있었으며 cryoprotection의 유무는 조직의 보존이나 면역염색에 모두 영향을 미치지 않았다. 단 모든 냉동절편 표본의 경우처럼 조직의 완전성은 파라핀블럭에 비해서는 많이 떨어졌다. 파라핀표본은 조직의 보존은 좋아 매우 깨끗한 조직을 얻을 수 있었으나, 면역조직화학염색시 비특이적 반응이 높게 나타났다(Fig. 5). 한편 냉동절편을 만든 후 acetone에 고정하는 방법은 조직의 수축이 심하여 면역염색을 시행하지 않았다.

장상피에서의 면역염색에 적절한 일차항체 농도를 알아보기 위하여 각각 1:100, 1:250, 1:500의 희석농도를 이용하였으며, 1:250의 일차항체농도에서 가장 적절한 면역염색결과를 얻을 수 있었다.

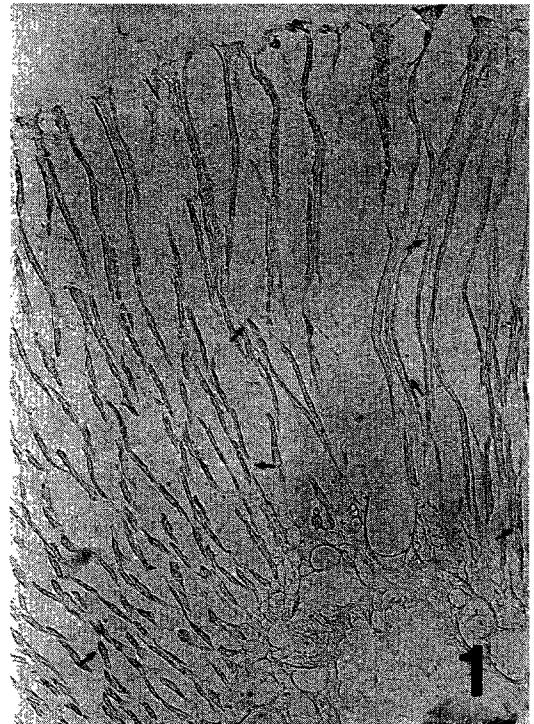


Fig. 1. Several NOS-positive cells(arrows) are noted in the lower portion of gastric mucosa. They are scattered in the isolated fashion(immunostain, $\times 100$).

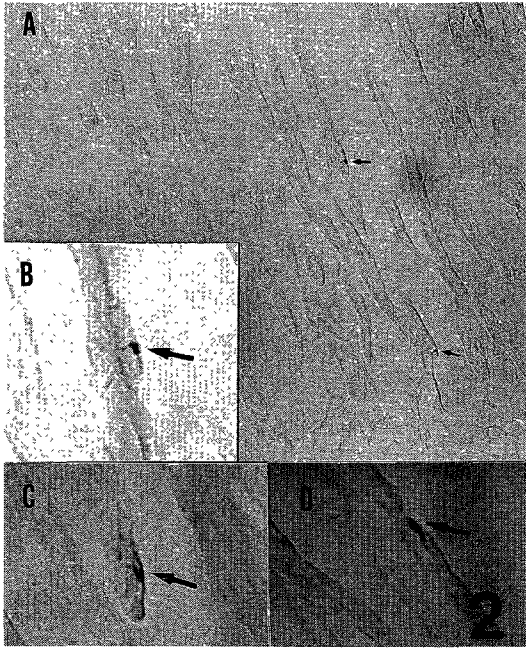


Fig. 2. Fig. 2A shows scattered NOS-positive cells(arrows) in gastric mucosa(immunostain, ×200). Fig. 2B, C, D shows individual NOS-positive cells(immunostain, ×500).

2. 면역조직화학염색

위점막상피에서는 드물게 양성세포가 발견되었다. 이들 양성세포는 모두 기저부와 경부에 국한되어 있었으며 표면쪽의 상피에서는 양성세포가 전혀 발견되지 않았다(Fig. 1, 2A, 2B, 2C, 2D). 이러한 세포들은 군집을 이루거나 인접하여 나타나지 않고 단독으로 분포하였다. 소장상피에서도 면역염색 양성세포가 나타났으나 그 빈도는 위점막에 비해 매우 낮았으며 모두 기저부에 위치하고 있었다. 위점막상피에서와 마찬가지로 군집을 이루거나 인접하지 않고 단독으로 분포하였다(Fig. 3A, 3B, 3C, 3D).

고 찰

최근 중요한 생물학적 전달자(biological messenger)로서 알려진 NO는 여러 장기나 세포에서 발견되면서 그에 대한 관심이 점차 높아지고 있으며 현재까지는 면역기능의 조절, 혈관 확장, 뇌와 말초신경계에서의 신경전달물질로서의 기능 등이 알려져 있다²⁾.

NO는 포식세포의 작용에 있어 중요한 매개체로 작용

한다¹⁾. 즉 NO의 전구물질인 arginine을 배양액에서 제거하거나 배양액에 arginine 유도체를 처리하면 포식세포의 중앙 제거효과나 살균작용이 소실됨을 볼 수 있으며²⁾ 포식세포의 NOS는 정상상태에서는 존재하지 않는 inducible type으로 알려져 있다¹⁾. 온전한 내피세포에서도 반감기 5초 이내의 매우 불안정한 물질이 방출되며^{3,4)} 이것이 혈관확장작용을 보이는 NO이다. 또한 1991년 Garthwaite는⁵⁾ 뇌조직도 NO를 생성할 수 있음을 발견하였고 NO가 신경전달물질인 glutamate의 작용기전에 중요한 역할을 한다고 하였다^{5,6)}.

그러나 NO는 반감기가 매우 짧은 불안정한 물질이어서 주로 생화학반응에 의해 NO 생성을 증명하거나, NADPH-diaphorase 반응을 보아 NOS의 존재를 간접적으로 증명하는 연구가 주로 이루어져 왔다. 그러나 최근에는 NOS에 대한 항체 개발로 많은 형태학적 연구가 가능해졌으며 포식세포의 inducible type(제 2형)과 내피세포(제 3형) 및 신경조직(제 1형)의 constitutitional type에 대한 항체가 모두 개발되어 있다.

NO는 상기의 기본기능 외에도 여러 조직 및 장기에서 다양한 기능을 하고 있음이 밝혀지고 있다. 소화기계통에서는 장간막 혈관내피세포 및 장신경원에서 분비되어 장점막 순환의 조절, 연동운동과 괄약근 기능 조절에 관여한다고 한다. 그러나 정상 장점막의 완전성 유지나 장운동 조절 등에 꼭 필요한 NO도 과량 생성되면 여러 가지 이상을 초래할 수 있다. 즉 염증성 장질환이나 내독소증시 과량생성되어 장점막 혈액순환 및 장운동기능의 심각한 이상을 초래한다고 알려져 있다¹³⁾.

현재까지 포유동물의 장에서의 보고들에 의하면 단핵구¹⁴⁾, 과립구¹⁵⁾, 신경원^{16,17)}, 근육세포¹⁸⁾, 장상피¹⁹⁾, 비만세포²⁰⁾ 등이 모두 NO를 생성한다고 하며 장내 세균에 의해서도 NO가 생성된다고 하였다²¹⁾. 그중 가장 활발히 연구가 진행되는 것은 장신경절 신경원에 대한 연구로 1992년 Costa등은⁷⁾ guinea pig의 소장에서 NOS 양성 신경원들이 근육층신경절기(myenteric plexus)에 많이 존재한다고 하였고 Berezin등은²²⁾ 고양이의 소장과 결장에서 NOS가 VIP를 포함한 장신경원에 같이 존재하는 것을 발견하였다. 그 외에도 신경원에서의 NOS 분포나 다른 신경전달물질과의 공존 및 상호작용에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다^{7,8,9,10,11,12)}.

최근들어 장점막 방어기전에서의 기능이 알려지면서 정상 장상피세포에서도 NO가 만들어지리라는 보고들이

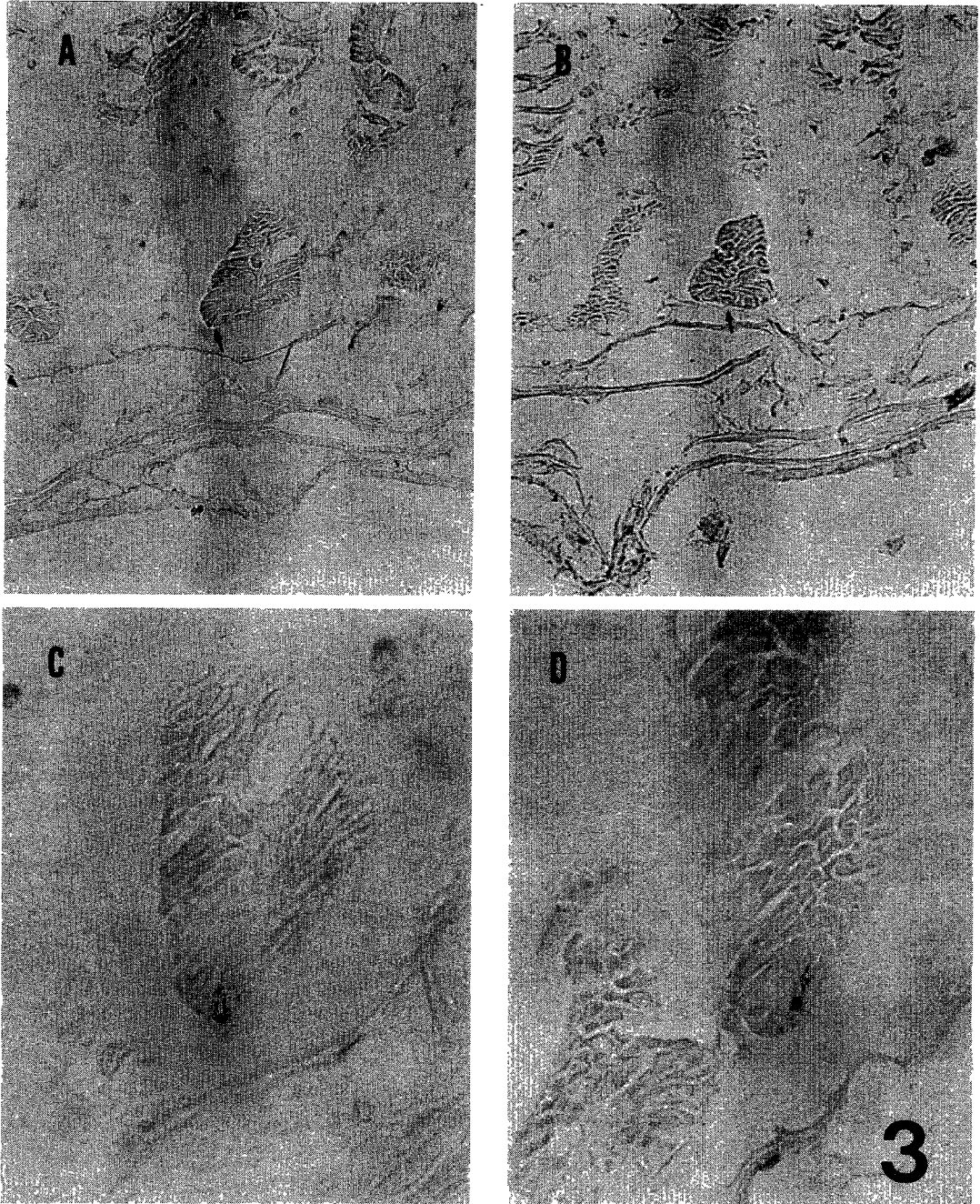


Fig. 3. A few NOS-positive cells are noted in the mucosal epithelium of small intestine. They are located at the base and scattered in the isolated fashion(immunostain, A, B $\times 200$; C, D $\times 1000$).

나오고 있다. MacNaughton등은²³⁾ NO를 외부에서 투여하거나 내부에서 생성시키면 강력한 위점막보호작용을 보인다고 하여 위점막상피에도 NOS가 존재하리라고

보고하였고, Whittle등도²⁴⁾ 흰쥐의 정상 장상피에 constitutional type의 NOS, 아마도 제3형의 NOS가 존재할 것이라고 보고하였다. M'rabet-Touil등도²⁵⁾ 돼지



Fig. 4. Silver staining for argentaffin cells shows several stained cells and their distribution were similar to the NOS-positive cells(Fontana-Masson stain for Argentaffin granules, $\times 200$).

장상피에서 NOS의 존재를 증명하였으나 이들은 이러한 반응이 이유를 끝낸 동물에서 주로 나타난다고 하여 장내 미생물의 자극에 의한 inducible type일 것이라 추측하였다.

이상과 같은 생화학적인 연구 외에도 NOS의 위치를 형태학적으로 증명하고자 하는 노력도 다양하게 진행되고 있다. Grozdanovic등이²⁶⁾ 생쥐의 비뇨기상피, 장관계 및 담관계의 일부 점막세포에서 양성반응을 확인하였으며 Chhatwal등은²⁷⁾ 결장에서 용종, 종양 등의 질환에서 정상시 보다 NOS 활성이 저하된다고 보고하였다. 그러나 이들 보고는 모두 NADPH-diaphorase 반응을 이용한 간접적인 보고로 그 신뢰도가 떨어진다고 보겠다. 최근 NOS 항체를 이용한 보고로는 1992년 Schmidt등이²⁸⁾ 흰쥐의 위점막에서의 양성반응을 확인하였고 Kugler등도²⁹⁾ brush cell에서 NOS의 존재를 확인한 바 있다. 그러나 이러한 연구들은 모두 위점막에 국한된 연구일 뿐 소장상피에서의 제 1형 NOS를 증명한 연구는 아직 없었다.



Fig. 5. Photograph of paraffin-embedded tissue shows well-preserved tissue integrity, but high background in immunostain(immunostain, $\times 200$).

장상피에는 다수의 장내분비세포(enteroendocrine cell)가 존재하며 이중 에는 VIP를 분비하는 세포도 포함된다. 최근의 연구에서 VIP의 NO의 공존에 대한 연구보고들이 나오고 있어²²⁾ 이에 본 연구자는 최소한 장상피 일부세포에는 제 1형 NOS가 존재할 것이라 생각하였다. 본 연구결과 다른 연구에서처럼 위점막 상피내에서 NOS 양성세포를 발견할 수 있었으며 그 출현율은 매우 낮았다. 또한 소장상피에서도 제 1형 NOS에 대한 양성반응을 보이는 세포가 출현하였으며 이는 주로 기저부에 국한되어 있었다. 일부 표본에서는 argentaffin cell을 보기 위하여 Fontana-Masson염색을 시행하였으며, 그 결과 NOS 양성세포와 매우 유사한 분포를 보였다. 따라서 본연구에서 발견된 소장점막의 NOS 양성세포는 장내분비세포의 일부일 가능성이 높다고 하겠으나 동일표본에서 실시하지 않아 단정하기는 어렵다. 즉 장에서의 주된 NOS는 Mrabet-Touil²⁵⁾의 보고에서처럼 inducible type일 것으로 여겨지나 정상 장상피에서 분비되는 NO의 전부 혹은 일부는 본연구결과에 의하면

brain type NOS에 의해 생성될 가능성이 높다. 본연구에서는 아직까지 발견된 세포의 빈도가 낮고 부위별이나 연령별로 다각적인 연구가 시행되지 않아 그 기능적인 측면을 단정하기는 어려우나, 장내 정상생리 유지에 장내분비세포가 분비하는 다른 물질들처럼 고유의 기능을 가지거나 혹은 어떤 특정물질의 작용을 매개하리라 생각된다. 앞으로 보다 확실한 기능 및 세포의 종류 규명을 위하여 VIP 등과의 이중면역염색이나 전자현미경적 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

연구목적 :

장점막상피에서의 NOS의 존재 및 그 분포를 알아보고, 동시에 장상피 면역염색이 가장 적절한 일차항체 농도 및 조직처리방법을 정립하고자 하였다.

방 법 :

Sprague-Dawley계 흰쥐의 위 및 소장조직을 얻어 paraformaldehyde 고정후 냉동절편을 얻었다. anti-brain-type NOS(transduction)를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였으며 적절한 일차항체 농도를 알아보기 위하여 각각 1 : 100, 1 : 250, 1 : 500 농도를 사용하였고 파라핀조직에서도 같은 방법으로 면역염색을 시행하였다.

결 과 :

1) 위점막 및 소장점막상피의 기저부 세포의 일부에서 양성세포가 발견되었으며 이들은 군집을 이루지 않고 단독으로 분포하고 있었다.

2) 장상피에서의 면역염색 시행에 있어서 적절한 일차항체 농도는 1 : 250으로 나타났다.

3) 조직처리방법은 4% paraformaldehyde 고정후 냉동절편을 하는 방법이 면역염색상 가장 적절한 것으로 판단되었다.

결 론 :

소장점막상피에는 정상적으로 brain-type NOS가 존재함을 알 수 있었으며 앞으로 이 세포의 특성 및 그 기능에 관한 연구가 더 필요하리라 여겨진다.

■ 감사의 글

본 연구를 수행함에 있어 많은 도움을 준 김남식기술원, 박기숙조교 및 김소연, 이중수학생에게 감사드립니다.

References

- 1) Nathan CF, Hibbs JB Jr : *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. *Curr Opin Immunol* 1991 ; 3 : 65-70
- 2) Lowenstein CJ, Snyder SH : *Nitric oxide, a novel biologic messenger*. *Cell* 1992 ; 70 : 705-707
- 3) Ingarro LJ : *Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990 ; 30 : 535-560
- 4) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : *Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology [Review]*. *Pharmacol Rev* 1991 ; 43 : 109-142
- 5) Garthwaite J : *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system*. *Trends Neurol Sci* 1991 ; 14 : 60-67
- 6) Bredt DS, Snyder SH : *Nitric oxide, a novel neuronal messenger*. *Neuron* 1992 ; 8 : 3-11
- 7) Costa M, Furness JB, Pompolo S, Brookes SJ, Bornstein JC, Bredt DS, et al : *Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine*. *Neurosci Lett* 1992 ; 148(1-2) : 121-125
- 8) Foster ER, Southam E : *The intrinsic and vagal extrinsic innervation of the rat stomach contains nitric oxide synthase*. *Neuroreport* 1993 ; 4(3) : 275-278
- 9) Li ZS, Murphy S, Furness JB, Young HM, Campbell G : *Relationships between nitric oxide synthase, vasoactive intestinal peptide and substance P immunoreactivities in neurons of the amphibian intestine*. *J Auton Nerv Syst* 1993 ; 44(2-3) : 197-206
- 10) Messenger JP : *Immunohistochemical analysis of neurons and their projections in the proximal colon of the guinea-pig*. *Arch Histol Cytol* 1993 ; 56(5) : 459-474
- 11) Singaram C, Sengupta A, Sweet MA, Sugarbaker DJ, Goyal RK : *Nitric oxide and peptidergic innervation of the human esophagus*. *Gut* 1994 ; 35(12) : 1690-1696
- 12) Ward SM, Xue C, Sanders KM : *Localization of nitric oxide synthase in canine ileocolonic and pyloric sphincters*. *Cell & Tissue Res* 1994 ; 275(3) : 513-527
- 13) Salzman AL : *Nitric oxide in the gut*. *New Horiz* 1995 ; 3(1) : 33-45
- 14) Suschek C, Rothe H, Fehsel K, Enczann J, Kolb-

- Bachofen V : *Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. IL-1 beta mediated induction regulated by tumor necrosis factor and INF-gamma. J Immunol* 1993 ; 151(6) : 3283-3291
- 15) Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, et al : *Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Lancet* 1993 ; 342(8867) : 338-340
- 16) Nichols K, Staines W, Krantis A : *Nitric oxide synthase distribution in the rat intestine : A histochemical analysis. Gastroenterology* 1993 ; 103 : 1928-1949
- 17) Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC : *Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. Cell* 1993 ; 75(7) : 1273-1286
- 18) Kostka P, Daniel EE : *Effect of endotoxin and time on the induction of nitric oxide synthase in the canine ileum. Abstr. Gastroenterology* 1993 ; 104 : A1066
- 19) Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJR : *Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial viability in rats. Am J Physiol* 1993 ; 265 : G214-G218
- 20) Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P : *Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. Am J Physiol* 1994 ; 266(2 pt 1) : G222-G229
- 21) Brittain T, Blackmore R, Greenwood C, Thomson AJ : *Bacterial nitrite-reducing enzymes[Review]. Eur J Biochem* 1992 ; 209(3) : 793-802
- 22) Berezin I, Snyder SH, Bredt DS, Daniel EE : *Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine. Am J Physiol* 1994 ; 266(4Pt1) : C981-989
- 23) MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL : *Endothelium-derived relaxing factor(nitric oxide) has protective action in the stomach. Life Sci* 1989 ; 45 : 1869-1876
- 24) Whittle BJR, Berry S, Lopez BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S : *Detection of the synthase enzyme that forms the endogenous vasodilator, nitric oxide in the rat gastric mucosa. Abstr Gastroenterology* 100(5 pt 2)
- 25) M'Rabet-Touil H, Blachier F, Morel MT, Darcy-Vrillon B, Duee PH : *Characterization and ontogenesis of nitric oxide synthase activity in pig enterocytes. FEBS* 1993 ; 331(3) : 243-247
- 26) Grozdanovic Z, Baumgarten HG, Bruning G : *Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. Neuroscience* 1992 ; 48(1) : 225-235
- 27) Chhatwal VJ, Ngoi SS, Chan STF, Chia YW, Mochhala SM : *Aberrant expression of nitric oxide synthase in human polyps, neoplastic colonic mucosa and surrounding peritumoral normal mucosa. Carcinogenesis* 1994 ; 15(10) : 2081-2085
- 28) Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F : *Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH -diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. J Histochem Cytochem* 1992 ; 40(10) : 1439-1456