

## 기니픽 상기도의 Vasoactive Intestinal Polypeptide 함유 신경의 분포

경상대학교 의과대학 이비인후과학교실  
전시영 · 성재준 · 송병욱 · 박정제 · 정태기 · 심보성

= Abstract =

### Distribution of Vasoactive Intestinal Polypeptide - Containing Nerves in the Upper Airway of the Guinea Pig

Sea Young Jeon, M.D., Jae Jun Sung, M.D., Byung Uk Song, M.D.,  
Jung Je Park, M.D., Tae Gee Jung, M.D., Bo Seong Sim, M.D.

*Department of Otolaryngology, College of Medicine, Kyung Sang University, Jin Ju, Korea*

Vasoactive intestinal polypeptide(VIP) is a 28-amino acid peptide extracted from porcine duodenum as a potent vasodilator, originally. Current evidence suggests that VIP mediates inhibitory-nonadrenergic noncholinergic effects in the respiratory tract of several species, including human. It has been reported that vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves relax the airway smooth muscle and blood vessels and stimulate glandular secretion in the airway mucosa.

The present study was undertaken to localize VIP-containing nerves in the upper airway of the guinea pig using rabbit anti-VIP serum and avidin-biotin-complex method.

VIP-containing nerves were distributed around glands, excretory duct, along sinusoid wall and around small blood vessels of nasal mucosa and distributed in the smooth muscle of trachea. Some VIP-containing ganglion cells were distributed in the sphenopalatine ganglion.

In conclusion, these finding imply that VIP coexists with acetylcholine along the cholinergic nerve fibers in the airway mucosa and has regulatory function in glandular secretion, vasodilation and bronchodilation in the upper airway of the guinea pig.

**KEY WORDS** : Vasoactive intestinal polypeptide · Immunohistochemistry nasal  
mucosa · Sphenopalatine ganglion · Tracheal smooth muscle

### 서론

자율 신경계에는 acetylcholine과 norepin-

ephrine에 의해 조절되는 전통적인 교감신경  
및 부교감신경 외에도 acetylcholine과 norep-  
inephrine의 길항체에 의하여 차단되지 않는

신경 기전이 있는데 이를 nonadrenergic noncholinergic (NANC) 신경기전이라하며 이는 소화 기관에서 가장 먼저 보고되었다<sup>116)</sup>. NANC신경 기전은 기관지 확장, 기관지 수축, 혈관 확장, 혈관 수축과 점액 분비에 관여를 하며, 여러 종류의 신경 전달 물질이 이에 관여하는 것으로 추측된다<sup>11)</sup>. 호흡기관에 분포하는 NANC신경 기전의 신경 전달 물질로는 vasoactive intestinal polypeptide(VIP), neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, neurokinin A, substance P등이 있다고 알려져 있다<sup>11)</sup>. NANC신경에는 흥분성과 억제성 신경 기전이 있는데, 특히 억제성 NANC(i-NANC)신경 기전은 기도의 평활근을 이완시키며, 비점막에서 점액을 분비하고 혈관을 확장시키는 것으로 알려져 있다<sup>117)</sup>. 현재까지의 여러 다른 연구에 의하면 vasoactive intestinal polypeptide (VIP)와 nitric oxide(NO)가 i-NANC신경 기전을 조절하는 것으로 추측되어 지며<sup>112)</sup>, 콜린성 신경 섬유내에서 아세틸콜린과 함께 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>111)</sup>.

VIP는 28 개의 amino acid로 구성된 peptide이며, 원래는 돼지의 십이지장에서 추출되어 혈관 확장을 유발하는 것으로 그 존재가 처음 알려졌다<sup>116)</sup>. 호흡기관에서 VIP는 기도 평활근의 이완 및 혈관 확장의 역할을 하며, 점막하 분비선을 자극하여 점액 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>112)7)13)14)15)20)</sup>. 따라서 기도 점막에서 VIP 함유 신경 섬유의 분포를 밝히는 것은 기도점막내에서 VIP의 생리학적 반응뿐 아니라 비염, 비알레르기의 발병 기전에서의 VIP의 역할을 밝히는데 필요한 기본적인 연구 과제라고 사료된다<sup>118)</sup>.

VIP 함유 신경 섬유를 밝히기 위한 방법으로는 방사선 동위원소를 이용한 자가방사기록법(autoradiographic method), 면역형광법, 그리고 면역조직화학적 기법이 많이 이용되어 왔다<sup>25)6)11)</sup>. 면역조직화학적 기법중 고도의 감수성을 가져 최근 널리 보편화된 avidin-biotin-complex(ABC)기법<sup>4)9)</sup>을 이용하여 기

니픽 기도점막내에서 VIP를 동정하면 기니픽 기도점막내에서 VIP 함유 신경 섬유의 분포를 밝힐 수 있다.

본 연구의 목적은 ABC법을 이용하여 기니픽 상기도내에서 VIP 함유 신경 섬유의 분포를 밝힘으로서 상기도내에서의 VIP신경 지배의 작용 기전을 밝히고자 하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 조직의 처리

실험 동물로는 체중 300-350 g의 외견상 건강해 보이는 기니픽을 사용하여 연구하였다. Ketamine hydrochloride(Ketalar<sup>®</sup>, 0.075 mg/g)와 xylazine hydrochloride (Rompun<sup>®</sup>, 0.001 mg/g)의 혼합 용액을 복강내 주사하여 전신마취하고 전흉벽을 절개하여 심장을 노출시킨 후, 우심방을 절개하여 실험시키고 좌심실을 통하여 대동맥에 18게이지 도관을 삽입한 후 0.9% 생리식염수 200-300 cc를 관류시키고 이어 400-600 cc의 Zamboni고정액으로 관류 고정하였다. 비배부 절개를 통하여 비강을 노출시킨 후 비중격을 3 x 5 mm의 크기로 절취하였다. 경부 피부를 절개하고 흉쇄유돌근과 피내근(strap muscle)을 제친 후 기관을 노출시키고 5 mm의 기관 절편을 취하였다. 사골동을 제거하고 안구및 안와내벽을 제거한 후 상악 신경의 근위부에서 5 x 5 mm의 익구개절(sphenopalatine ganglion)을 절취하였다. 양성 대조 군으로는 복부를 절제한 후 십이지장을 5 mm 길이로 조직을 취하였다. 전술한 방법으로 얻은 조직을 4°C의 동고정액에서 6시간 더 후고정하고, 0.1 M 인산 완충 용액에 5분간 3회 세정한 후, 25% sucrose 첨가 인산완충 용액에서 24시간 세정하였다. 조직절편은 O.C.T compound 에 포매, 동결시킨 후 -20°C cryostat에서 8 μm 두께의 연속 냉동 절편을 제작하여 gelatin coated slide에 올려 냉동 보관하였다.

## 2. 면역조직화학적 염색

냉동 절편은 실온에서 30 분 이상 건조시켜 0.1 M 인산 완충 용액에서 5분간 3회 세정하고 증류수에서 1 분간 세정하였다. 다음으로 0.5% 과요오드산(periodic acid)에 10분 처리하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제하였다. 이후 증류수에서 1분간 세정하고 0.1M 인산 완충 용액에서 5분간 3회 세정한 후, 정상 혈청 용액(3% normal goat serum, 1% bovine serum albumin(BSA) and 0.3% Triton X - 100)으로 실온에서 2시간 동안 처리하고, 이어서 희석한 1차항체(1 : 2,000 rabbit anti-VIP serum, Chemicon)에 4 °C에서 14 시간 이상을 반응시켰다. 다음으로 0.1M 인산 완충 용액에서 5분간 5회 세정한 후, 1 : 200 biotinylated anti-rabbit goat IgG에 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1M 인산 완충 용액에서 5분간 5회 세정한 후, avidin-biotin-complex(Vectastain® ABC reagent, Vector)에 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 0.1M 인산 완충 용액으로 5분간 5회 세정한 후, 기질 액(0.025 % diaminobenzidine, 0.04 % nickel chloride, 0.03% hydrogen peroxide in PBS)내에서 정색 반응시키고, 0.1M 인산 완충 용액에서 5분, 그리고 흐르는 물에서 10분간 세정하였다. Methylgreen으로

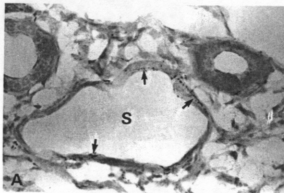


Fig. 2. Nasal septum. A. VIP-containing nerve fibers(Arrows) run along the wall of sinusoids(S) B. VIP-containing nerve fibers(Arrow) run around small blood vessels(b) Original magnification ; A x 400, B x 400.

20분간 대조 염색을 시행하고 에탄올과 xylene에서 연속 탈수 처리후, polymount 액으로 포매하여 광학 현미경하에서 관찰하였다.

양성대조군으로 소장 절편을 사용하였으며, 음성대조군으로는 일차 항체를 처리하지 않은 각 조직의 절편을 사용하였다.

## 결 과

VIP 함유 신경 섬유는 기니픽 비점막의 선 조직주위, sinusoid 벽, 소혈관의 주위로 분포

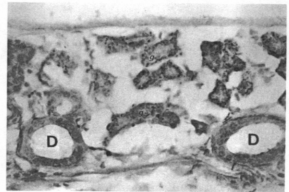
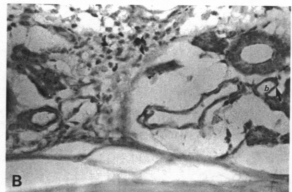


Fig. 1. Nasal septum VIP-containing nerve fibers form a network around glands(g) and ducts(D). Original magnification ; x 400.



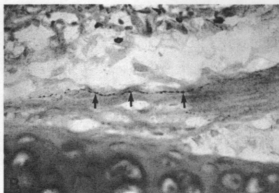
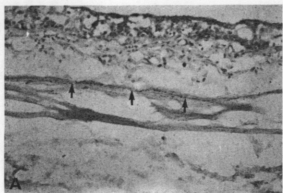


Fig. 3. Trachea. A few VIP-containing nerve fibers(Arrows) are scarcely distributed in tracheal smooth muscle of the guinea pig. Original magnification ; A x 200, B x 400.

하였다. 선 조직에서는 주로 분비선과 분비관의 주위에 망상 분포하고, 분비선의 내부에도 다수의 VIP함유 신경 섬유가 점상분포하고 있음이 관찰되었다(Fig. 1). 혈관 조직에서는 섬세한 섬유상으로 VIP함유 신경 섬유가 sinusoid 벽을 따라 달리고 있음을 관찰할 수 있었으며, 소혈관주위에서도 분포하고 있음이 관찰되었다(Fig. 2 A, B). 기관 벽에서는 비점막과는 달리 분비선 및 혈관 내에서는 거의 VIP 함유 신경 섬유가 관찰되지 않았으며, VIP 함유 신경 섬유가 평활근내에서 소량 분포하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3 A,

B). 익구개절에서는 소량의 VIP 함유 신경절(ganglion cell)의 분포를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

양성 대조군으로 사용한 기니픽 십이지장에서는 평활근내의 myenteric plexus와 점막하 결체조직에서 VIP함유 신경 섬유의 분포가 관찰되었으며(Fig. 5), 일차 항체를 처리하지 않은 음성 대조군 비점막, 기관 점막, 그리고 십이지장내에서는 염색 소견이 관찰되지 않았다.

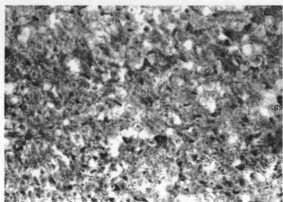


Fig. 4. Sphenopalatine ganglion. A few VIP-containing ganglion cells(gg) are distributed in the sphenopalatine ganglion. Original magnification ; x 400.

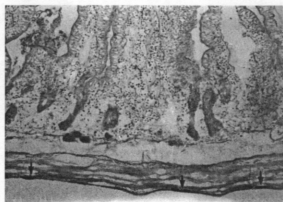


Fig. 5. Positive control(duodenum). VIP-containing nerve fibers are distributed along the myenteric plexus(Arrows) and within the submucosal stroma. Original magnification ; x 200.

## 고 찰

기도 점막에서 VIP 함유 신경 섬유는 분포에 대한 연구는 과거 여러 가지 면역조직화학적 염색법으로 이미 보고되고 있다<sup>25,6,11)</sup>. VIP 함유 신경 섬유의 분포는 문헌에 따라 약간의 차이가 있으나, 일반적으로 비점막에서는 비선 주위, 상피하층 소혈관 주위로 분포한다고 알려져 있으며<sup>11,18)</sup>, 기관 벽에서는 기도 평활근, 분비선, 및 혈관 주위에 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 기니픽에서의 저자들의 연구 결과 비점막에서 VIP 함유 신경 섬유의 분포는 주로 비선 주위와 sinusoid 벽을 따라 분포하였으며 점막하층, 소혈관주위에서는 상대적으로 낮은 분포를 보였다. 이는 실험 동물의 차이에 따른 결과라 사료되며, 또한 기능적으로 비점막의 조직학적 특성상 sinusoid가 venous erectile tissue에서 주된 혈관 조직으로 소혈관에 비하여 상대적으로 많이 관찰되기 때문이라고 사료된다. 그리고 비점막의 mucosal blanket과 분비관 내부에서도 양성 소견을 관찰할 수 있었는데 이는 신경 종말에서 유리된 비 분비물 내의 VIP라 사료된다.

일반적으로 비점막내 혈관은 precapillary resistance vessels, 모세혈관, 정맥 그리고 venous erectile tissue(venous sinusoids with smooth muscle)와 동-정맥문합으로 구성되어 있는데, VIP는 resistance vessel에 대하여 prostaglandin E<sub>2</sub>, histamine, bradykinin, substance P와 함께 혈관 이완에 관여하여 비충혈을 초래하는 것으로 알려져 있으며, capacitance vessel에는 histamine만이 혈관 이완에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 그러나 기니픽 비점막에서는 VIP 함유 신경 섬유가 capacitance vessel인 sinusoid벽을 따른 분포가 관찰되었는데 이러한 소견은 VIP가 capacitance vessel의 이완에도 관여하여 비충혈을 초래할 수 있다는 형태학적인 단서가 될 수 있다고 사료된다.

기니픽 기도 점막에서 VIP 함유 신경 섬유

의 분포 밀도를 부위 별로 살펴볼 때 비선과 분비관, sinusoid 벽과 소혈관, 기도평활근 순이었으며, 비선과 분비관 주위에서 가장 많이 분포하는 것은 VIP가 기도 점막에서 분비 조절 물질로서의 역할이 가장 주된 것임을 시사하며, sinusoid 벽과 소혈관 주위에서의 분포는 국소 혈류량을 조절하는 혈관 운동 조절 물질로서의 역할을 하고 있음을 나타내는 형태학적인 단서라고 사료된다. 또한 문헌 고찰에 의하면 VIP의 기도 이완 기능은 혈관 확장 기능에 비하여 약 1/10 정도라고 보고되고 있는데, 이는 본 실험에서 관찰한 바와 같이 VIP 함유 신경 섬유의 기도평활근내의 낮은 분포를 뒷받침해 주는 기능적 소견이라 사료된다<sup>1)</sup>.

NANC 신경에는 흥분성과 억제성 신경전달이 알려져 있는데<sup>1)</sup>, VIP 함유 신경 섬유는 기도 내에서는 억제성 NANC 효과를 중개하여 비점막의 분비를 촉진하고, 혈관을 이완시키며 기도 평활근을 이완시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 기도점막내 VIP 함유 신경 섬유의 분포에 대한 동정은 기도 내에서 외부 자극에 대한 생리적 반응 뿐 아니라 비염, 비 알레르기 같은 기도 점막 과민 반응(hyperreactivity)등의 발병 기전에 VIP의 역할을 이해하는 형태학적인 단서가 될 수 있다고 사료된다<sup>18)</sup>.

최근에 NO역시 억제성 신경 전달 물질로서 작용하는 것으로 추정되고 있다<sup>1)</sup>. 따라서 호흡기도내 신경조직에서 NO의 존재와 분포를 밝히는 연구도 필요할 것으로 사료된다.

기도점막내 VIP 함유 신경 섬유의 분포에 대한 동정은 기도 내에서 외부 자극에 대한 생리적 반응 뿐 아니라 비염, 비 알레르기 같은 기도 점막 과민 반응(hyperreactivity)등의 발병 기전에 VIP의 역할을 이해하는 형태학적인 단서가 될 수 있다고 생각한다<sup>18)</sup>.

콜린성 신경절인 익구개결의 일부분에서 VIP 함유 신경절세포(ganglion cell)가 분포하는 것은 콜린성신경 섬유 내에서 VIP가 아세틸콜린과 함께 존재한다는 사실에 대한 간접적

## 결 론

본 실험은 ABC법을 이용하여 기니픽 상기도와 익구개절내의 VIP 함유 신경 섬유들의 분포를 증명하였다. VIP 함유 신경 섬유는 비점막내 분비선과 분비관 주위, sinusoid 벽과 소혈관주위를 따라 분포하였으며, 호흡기관에서는 기도 평활근내에 분포하였다. 익구개절내에서는 VIP 함유 신경세포질이 일부 분포함이 관찰되었다. 이는 VIP가 콜린성 신경섬유를 따라 아세틸콜린과 함께 존재하며, 기도 점막의 선분비조직, 국소적 혈류조절 및 기도 평활근 이완에 관여를 하는 형태학적인 단서가 된다고 사료된다.

## References

- 1) Barnes, PJ, Baraniuk NJ, Belvisi MG : *Neuropeptides in the respiratory tract. Am Rev Respir Dis* 144 : 1187-1198, 1991
- 2) Carstairs JR, Barnes PJ : *Visualization of vasoactive intestinal peptide receptors in human and guinea pig lung. J Pharmacol Exp Ther* 239(1) : 249-255, 1986
- 3) Chedotal A, Umbriaco D, Descarries L et al : *Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationship choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex. J Comp Neurol* 343 : 57-71, 1994
- 4) Coggy G, Dell OP, Viale E : *Avidin-biotin method. 2ed. Bristol Wright : pp54-70, 1986*
- 5) Dey RD, Hoffpaur J, Said SI : *Co-localization of vasoactive intestinal peptide and substance P - containing nerves in cat bronchi. Neuroscience* 24(1)

- 6) Dey RD, Shannon WL, Said SI : *Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cats, and human subjects. Cell Tissue Res* 220 : 231-238, 1981
- 7) Ellis JL, Farmer SG : *The effects of vasoactive intestinal peptide(VIP) antagonists, and VIP and peptide histidine isoleucine antisera on non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of tracheal smooth muscle. Br J Pharmacol* 96 : 513-520, 1989
- 8) Eccles R, Bende M, Widdicombe JG : *Nasal blood vessel. In : Mygind, N. and Pipkorn, U. Allergic and vasomotor rhinitis pathophysiological aspects. Copenhagen Munksgaard : 63, 1987*
- 9) Hsu SM, Raine L : *Versality of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. J Histochem Cytochem* 30(2) : 157-161, 1982
- 10) Hulshof SCJ, Dijkstra G, Beek EM et al : *Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary. Biol Reprod* 50 : 553-560, 1994
- 11) Laitinen A, Partanen M, Horvonen A et al : *VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Histochemistry* 82 : 313-319, 1985
- 12) Li CG, Rand MJ : *Evidence that part of the NANC relaxant response of ginea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. Br J pharmacol* 102 : 91-94, 1991
- 13) Martin JG, Wang A, Zacour M : *The effects of vasoactive intestinal polypeptide on cholinergic neurotransmission in an*

- isolated innervated guinea pig tracheal preparation. Respir Physiol 79 : 111-122, 1990*
- 14) Palmer JB, Cuss FM, Warren JB : *Effect of infused vasoactive intestinal peptide on airway function in normal subjects. Thorax 41 : 663-666, 1986*
  - 15) Peatfield AC, Barnes PJ, Bratcher C et al : *Vasoactive intestinal peptide stimulates tracheal submucosal gland secretion in ferret. Am Rev Respir Dis. 128 : 89-93, 1983*
  - 16) Said SI, Mutt V : *Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. Eur J Biochem 28 : 199-204, 1972*
  - 17) Said SI, Mutt V : *Relationship of spasmogenic and smooth muscle relaxant peptides from normal lung to other vasoactive compounds. Nature 265 : 84-86, 1977*
  - 18) Uddman R, Malm L, Sundler F : *The origin of vasoactive intestinal polypeptide(VIP) nerves in the feline nasal mucosa. Acta Otolaryngol 89 : 152-156, 1980*
  - 19) Webber SE, Widdicombe JG : *The effect of vasoactive intestinal peptide on smooth muscle tone and mucus secretion from the ferret trachea. Br J Pharmacol 91 : 139-148, 1987*