

## 고령 백서에서 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 이용한 대장의 생리기능적 변화의 분석\*

이화여자대학교 의과대학 내과학교실  
김 성 은 · 정 성 애

= Abstract =

### Evaluation of Colonic Physiologic Properties in Old Rats using *in vitro* and *in vivo* Techniques

Seong-Eun Kim · Sung-Ae Jung

Department of Internal Medicine, Ewha Womans University College of Medicine,  
Ewha Medical Research Institute

**Objectives :** As the lifespan of men have been extended, the interest in functional aging process of each organs is increasing. The aim of this study was to investigate objectively several physiological changes in aged colon, using rats.

**Methods :** We used old healthy Sprague-Dawley rats (n=33, over 17months), and young rats (n=28, 8-10weeks). Glass bead expulsion tests were done *in vivo*, and colon transit and muscle tension were measured *in vitro*.

**Results :** For glass bead expulsion, more time was needed significantly in young rat group (p=0.028). The speed of colon transit was accelerated in distal colon significantly regardless of age, but the number of rats with complete transt was superior in young rat group. Development of tension in response to Carbachol was not different significantly between two groups (p=0.345).

**Conclusion :** Colonic functional decline with age was observed through *in vivo* and *in vitro* study. Further studies are required to determine the real influences on a living body and the mechanisms involved in this motor change.

**KEY WORDS :** Age · Colonic function · Rat.

## 서 론

변비는 비정상적으로 장내에 대변이 오래 잔류하는 상태를 의미하는 것으로 우리나라도 식습관의 변화 및 현

\*본 연구는 이화여자대학교 의과대학 동창회 창립 50주년 기념 학술 연구비 지원에 의한 연구임.

대 문명화에 따른 심리적 요인 등에 따라 증가 추세에 있는 것으로 보인다. 변비의 빈도는 여러 통계에서 젊은 연령의 인구보다 노인층에서 더 높은 것으로 보고되어 있고, 특히 임상적으로는 노인층에서 분변매복 형태가 많이 관찰되며, 연령이 증가함에 따라 대장통과시간이 유의하게 증가하는 것으로 여겨지고 있다<sup>1-3)</sup>. 이는 노령화에 따라 평활근과 신경이 퇴행성 변화를 하기 때문인 것

으로 알려져 있으나, 아직 객관적으로 명확하게 기전이 밝혀져 있지는 않다.

최근에는 장관 조직을 생체의 조건으로 수조 내에 관류액을 관류시켜 조절한 뒤 생리적인 기능을 평가하는 실험연구들이 활발히 진행되어 위장관운동기능에 대한 생리적인 실험이 가능하게 되었고, 특히 장관 평활근 조직의 기능 평가에 매우 유용하다<sup>1)</sup>.

본 연구에서는 사람의 연령으로는 70대에 해당하는 17개월 이상된 고령의 백서를 이용하여 대장통과시간의 변화와 말단 대장에서의 운동 기능, 대장 근육의 수축력을 측정하여, 고령에서 관찰되는 대장의 생리적 기능 변화를 객관적으로 비교분석하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

Sprague-Dawley rat 암컷을 이용하였다. 건강한 17월령 이상(17~30월령)의 고령의 백서 33마리와, 대조군으로 사용할 2월령의 어린 백서 28마리를 모두  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 40% 습도의 환경에서 아침 6시부터 저녁 6시까지 12시간 동안으로 조도 유지하였다. 급식 등의 조작없이 자유로 먹이를 섭취하게 하였다.

### 2. 방 법

#### 1) Bead expulsion

총 61마리의 모든 백서를 두 연령군으로 분류하여 17개월 이상(70~138주령)의 고령의 백서 33마리와 대조군으로 사용할 8~10주의 어린 백서 28마리에서 항문으로 직경 5mm의 유리 구슬을 삽입하여 항문연에서부터 20mm 안에 위치시키고 다시 항문으로 배출되는 bead expulsion time을 측정하였다. 측정은 각 마리당 2~3회 시행하되 약 1주의 간격을 두고 시행하였고 각 측정값의 평균을 구하여 최종값으로 하였다.

#### 2) 장관 운동 생리검사

총 61마리의 백서 중 bead expulsion test를 마친 17월령 이상의 고령 백서 11마리와 12주령 백서 6마리에서 bead의 대장 통과 시간을 측정하였고, 이들 중 각각 5마리에서 대장의 일부를 근육 절편으로 만들어 근육장력을 측정하였다.

#### (1) 관류액의 준비

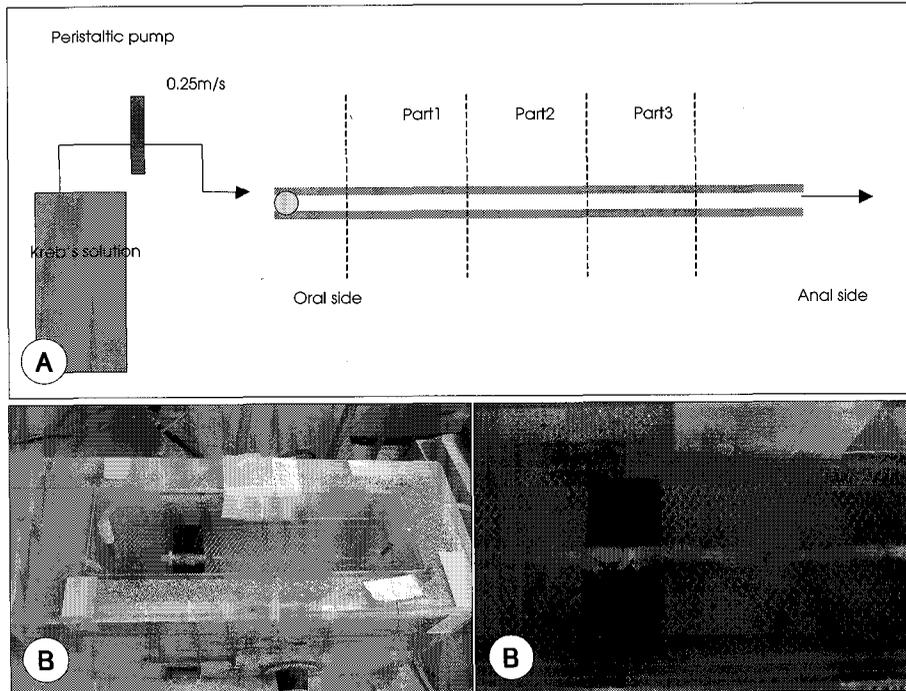
Kreb 용액에 2g의 dextrose(glucose)와 2.1g의  $\text{NaHCO}_3$  및 95%  $\text{O}_2/5\%\text{CO}_2$ 을 10~15분간 용해시키고 증류수를 첨가하여 만든 II의 Amber's Kreb's 용액을 관류액으로 이용한다.

#### (2) 대장 통과 시간의 측정

Ketamin 1.5ml/Kg(57.68mg/ml)을 복강내 투여하여 마취한 후 심천자하여 희생시키고, 맹장에서 30mm 원위부 지점에서부터 가능한 직장 상방까지의 대장을 적출하였다. 조직을 바로 산소가 투여되고 있는 Kreb용액에 담그고 내강의 분변 및 장관막의 손질을 한 후, 근육 장력 실험에 사용하기 위한 원위부 약 10mm 부위를 절단하고 나머지 양 끝을 직접 제작한 관류액이 담겨진 욕조의 양끝에 고정하였다. 관류액은 Kreb용액으로 온도를  $37^\circ\text{C}$ 로 유지하였고 혼합 기체를 지속적으로 공급하였다. 약 60분간 관류액의 조건이 일정해지도록 평형을 유지한 후, 색이 있는 5mm 직경의 bead를 구획단에 넣고, 연동펌프(Masterflex 7523-30 with cartilage 3519-85, Cole-Palmer, Chicago, IL, USA)를 통해 유속 0.25 m/sec로 관류액을 통과시키면 절제된 장 조직에서 연동수축과가 유발되어 bead가 항문측으로 이동하게 되었다. 장의 가운데 일정 부위를 20mm 간격의 3구획으로 나누어 각 구획을 통과하는 대장통과시간을 측정하였다(Fig. 1). 각각에 대하여 3~5회 반복 측정하여 평균을 구하여 최종값을 정하였다.

#### (3) 근육 장력 측정

(2)의 실험을 시작하기 전에 미리 절단해 놓았던 길이 약 10mm의 원위부 대장 조직을, 실온에서 95%  $\text{O}_2/5\%\text{CO}_2$ 의 혼합기체로 포화된 Kreb 용액이 채워진 용기 내에서 현미경하에서 미세수술기구를 이용하여 점막층과 점막하층을 박리하고 윤상근이 표면에 노출되는 절편을 만들었다. 윤상근의 결을 세로로 하여 길이 10mm, 너비 0.3mm의 절편으로 만들었으며, 실크 실로 절편 양쪽에 고정용 고리를 만든 뒤 절편을 5ml 챔버에 담겨 절편의 한쪽 끝은 챔버 하단의 유리 고리에 연결하고, 다른 한쪽 끝은 strain gauge transducer에 연결하여 등축성 장력을 메킨토시 IIc 컴퓨터에 내장된 MacLab 프로그램을 이용하여 기록하였다. 절편을 담은 챔버에는 혼합 기체가 충분히 공급되고 온도가  $37^\circ\text{C}$ 로 유지되는 Kreb용액을 채워 넣었으며, 절편에는 1g의 기초 장력을 가하여 최소 60분



**Fig. 1.** Estimation of colonic transit time. The excised colon was placed into a bath containing Krebs's solution at 37 °C saturated 95% O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as above. Total 60mm(part1-3) was observed, and the time taken for moving beads (5mm diameter) about each 20mm was measured. A : Experimental model, B : Real setting.

간 온도 및 흥분성이 일정해질 때까지 평형을 유지시켰다.

폴린성 효현제인 카바콜 10<sup>-8</sup>~10<sup>-5</sup>M을 챔버에 교대로 채워 절편이 잠기게 하였을 때에, 컴퓨터 모니터를 통해 확인되는 수축반응을 어린 쥐와 고령의 쥐 두 군에서 비교하였다.

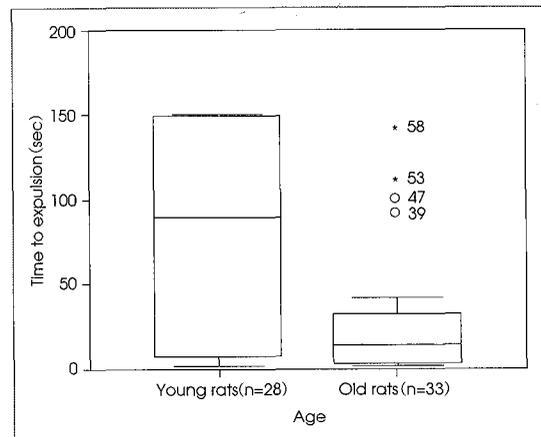
### 3) 통계학적 분석

각 변수에 대한 결과는 평균±표준오차로 기록하였다. 통계는 SPSS(version 11.0)를 이용하였는데, 어린 백서와 고령의 백서 두 군 간의 Bead expulsion time 및 대장통과시간의 비교 분석을 위하여 Mann-Whitney *U* test를 사용하였고, 카바콜에 반응하는 윤상근의 수축 정도를 두 군간에서 비교 분석하기 위하여 repeated two-way ANOVA를 이용하였다. *p*값이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. Bead expulsion 시간의 비교

대장 말단에서 5mm 구슬이 빠져 나오는데 걸린 시간은



**Fig. 2.** Comparison of bead expulsion time between two age groups. Bead expulsion time was delayed significantly in young age group ( $p=0.028$ ).

어린 백서에서 평균 80±72초, 고령의 백서에서 평균 34±45초로, 어린 백서가 통계적으로 의미있게 시간이 오래 걸렸다( $p=0.028$ ) (Fig. 2). 각 군에서 5마리씩의 백서에서 5회에 걸쳐 구슬이 항문으로 나오는 시간을 측정할 결과 매 번의 측정 값들 사이에는 유의한 차이가 없었다.

## 2. 대장 통과 시간의 비교

연령의 구분없이 모든 백서에서의 bead의 구획 통과는 구획 3, 즉 항문과 가까운 대장 말단에서 평균 209±146초로 다른 구획에 비하여 의미있게 빨라지는 것을 볼 수 있었고, 구획 1(평균 423±291초)과 구획 2(평균 441±223초)의 통과 시간 사이에는 의미있는 차이가 없었다(Fig. 3). 실험을 진행하였던 17마리 중에서 9마리(52.9%)에서만 bead가 전 대장을 완전히 통과하였는데, 어린 백서는 83%(5/6마리), 고령의 백서는 36%(4/11마리)에서 관찰할 수 있었다. 전 대장의 통과가 가능하였던 9마리의 백서 중 연령군별 구획 별 이동시간에는 의미있는 차이가 없었다(Table 1).

## 3. 운상근 장력의 변화

대장 근육 절편을 이용하여  $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ M의 카바콜을 처리하였을 때, 두 군 모두에서 누적 농도-반응 곡

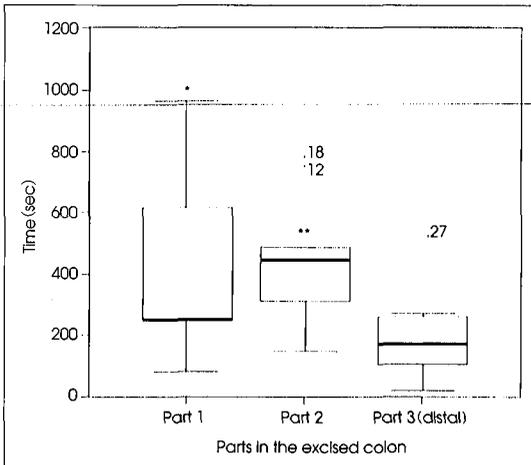


Fig. 3. Comparison of bead transit time in each part of the excised colon. \* : part 1 vs part 3 :  $p=0.03$ . \*\* : part 2 vs part 3 :  $p=0.02$ .

선상 농도가 증가함에 따라 수축이 증가하는, 즉 농도에 의존적인 소견을 보였다. 두 연령군 간에 카바콜에 반응하는 대장 근육의 수축 정도는 유의한 차이가 없었다( $p=0.345$ ) (Fig. 4).

## 고찰

수명 연장으로 인해 노화에 대한 관심이 높아지면서 각 분야의 많은 연구를 통하여 고령화에 대한 세포학적, 분자생물학적 성과들이 이루어지고 있으나, 통합적인 장 기능을 설명하기에는 아직까지 많은 한계가 있다. 특히 생리학적 실험에 한계가 있는 인간의 대장에 있어서는 더욱 그러하다. 과거의 여러 통계 자료에 의하여 변비의 빈도는 젊은 연령의 인구보다 노인층에서 더 높은 것으

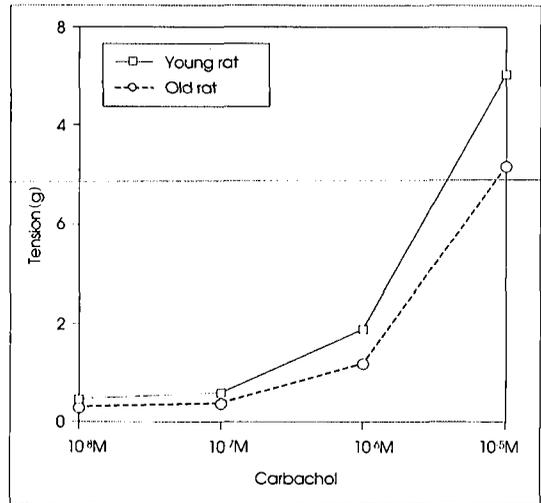


Fig. 4. Comparison of carbachol induced contraction of circular muscle between two age groups. By repeated measured analysis, the muscular response in old rats was not significantly different with the response in young rats ( $p=0.345$ ).

Table 1. Colon transit according to aging

Rats showing complete bead transit in excised colon sample (%)			
Young rat (n=6)	5 (83%)		
Transit time (sec)	Part 1	Part 2	Part 3
	422 ± 349	480 ± 196	149 ± 102
Old rat (n=11)	4 (36%)		
Transit time (sec)	Part 1	Part 2	Part 3
	425 ± 254	392 ± 275	145 ± 184
p value*	1.0	0.46	0.46

\* : young rat vs old rat in each part transit

로 보고되어 있고 연령이 증가함에 따라 대장 통과 시간이 유의하게 증가하는 것으로 여겨지고 있으나<sup>1-3)</sup>, 또 다른 연구에 의하면, 소화기관은 잔여보유기능이 매우 풍부하므로 노화 자체가 대부분의 장 기능에 직접적인 영향을 끼치지 않는다고 주장하고 있다<sup>5)6)</sup>. 저자들은 이 연구를 통하여 노화가 대장의 운동 기능에 얼마나 많은 영향을 끼칠 수 있는지에 대하여 알고자 하였고, 더 세분화된 수준의 연구 및 인간에게 근접한 동물 실험을 시행하는데 주요한 참고자료가 되고자 하였다.

유리구슬배출(Glass bead expulsion) 검사는 *in vivo* study로서 1967년에 Schottek에 의해 고안된 이래 약물에 의한 대장의 운동 기능을 평가하는데 매우 간단한 방법으로 여겨져 사용되어져 왔었다<sup>7-9)</sup>. 그러나, 현재까지 잘 알려져 있지 않은 장의 부위별 세부 조직의 차이가 운동 기능을 서로 다르게 할 가능성이 있고, 그 외에도 대장이란 기관은 단순히 내용물을 운반하는 역할만 하는 것이 아니라 수분을 흡수함으로써 말단으로 갈수록 내용물 점도의 변화를 일으키기 때문에 이것이 또한 장의 밀어내고 수축하는 기능에 영향을 일으킬 수 있어, 말단 대장의 운동 기능이 전 장의 운동 기능을 대표할 수는 없다고 생각된다<sup>10)</sup>. 이번 연구에서는 말단 대장에서의 추진력(propulsion)만을 관찰하기 위하여 시행한 것인데, 예상하였던 것과는 정반대로 어린 백서에서 배출시간이 의미있게 더 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 정확한 이유는 아직까지 설명할 수 없으나, 말단 대장 즉, 직장과 항문관의 상부에 닿게 된 bead로 인하여 역제반사신경 회로가 영향을 받아 내항문괄약근은 이완하고 외항문괄약근은 수축하게 되는 기능이 어린 백서에게서 더 활발하게 나타났을 수 있다<sup>10)11)</sup>. 또는 bead 삽입이라는 자극에 대하여 말단 대장이 이상적으로 수축했을 것이라고 추정할 수도 있겠으나, 이의 가능성은 떨어져 보이고 좀 더 잘 고안된 후속 실험이 필요하다.

장 근육에 대한 *in vitro* 실험의 잇점이자 필수요건은, 호르몬 등의 외적인 인자를 배제한 조건 하에서 선택적으로 근육 기능을 평가할 수 있으며 동시에 근육 자체는 *in vivo* 하에서와 거의 동일한 상황에서 시행되어야 한다<sup>4)</sup>. 대장 통과 시간의 측정과 근육 장력 측정 실험시, 백서의 혈액내 주요 이온 농도를 고려한 최대한 생리적인 용액을 이용하였고, 희생된 후의 대장 조직의 퇴화 속도가 다른 장기에 비해 매우 빠른 것을 감안하여 최대한

공기 노출을 줄이고자 하였다. 이렇게 하여 얻어진 거의 온전한 길이의 대장 조직에는 평활근, 내재 신경 및 일부 남아있는 신경전달 물질 등이 실험 육조 안에서의 운동력에 영향을 주게 되고 외부로부터의 신경조직과 이로부터의 신경전달물질 및 호르몬의 영향은 배제되었던 것이다.

말단부와 상부 대장의 운동력의 차이는 대장 통과 시간의 측정에서도 나타났는데, bead를 통과시키는 속도가 말단부에서만 의미있게 빨라지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 압력과의 전도 속도가 말단쪽으로 이동할수록 증가한다는 최근의 연구와도 어느 정도 부합한 소견이다<sup>12)</sup>. 그러나, 다양한 개체의 관장의 용적에 분변의 대용으로 일정한 부피의 bead를 이용하였고 점성의 변화가 존재하지 않았기 때문에, 상기하였듯이 분변의 부피와 점도가 배출 속도에 영향을 끼칠 수 있다는 점에서 연구의 한계가 있다<sup>10)13)</sup>.

대장통과시간 측정 실험에서 대장을 완전히 통과하는 비율은, 여러가지 연구 설계상의 제한점이 있음에도 불구하고 고령의 백서에서 확연히 적게 나타났다(83% vs 36%). 반면, 평활근 세포의 수용체에 작용하는 콜린성 효현제인 카바콜에 반응하는 대장 운상근의 수축 반응은 어린 백서에 비하여 유의한 차이가 없었다. 이는 다른 종의 설치류를 이용한 이전의 타연구와도 흡사한 결과를 보여준 것이었는데, 평활근 세포의 수용체가 변화한 평활근 자체의 문제는 아닌 것으로 생각되며, 평활근을 지배하고 있는 신경들, 특히 내재(intrinsic) 신경들 및 이로 인한 일부의 신경전달물질의 영향일 가능성이 있다<sup>14-18)</sup>. 이의 기전을 밝히기 위하여 신경전달물질 및 신경조직에 대한 면역조직화학 염색 등의 후속 연구가 필요하다. 또한 *in vitro* 상의 이러한 운동 기능의 변화가 실제적으로 *in vivo* 상의 개체에 어느 정도로 영향을 끼칠 수 있는지에 대하여는 확신할 수 없다. 실제로 한 동물 연구에서는 연령이 증가함에 따라 대장의 통과 시간이 지연되었으나, 변 굳기와 수분 함량은 연령과 관련성이 없었다고 주장하였는데<sup>16)</sup>, 상기의 의문에 대하여 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 대장통과시간 변화의 일관성 및 배변 일지를 비교하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통하여 백서가 노화할수록 대장의 운동기능이 저하하는 것으로 관찰되었으나, 실제적인 영향력과 세부적인 기전에 관하여는 잘

고안된 후속의 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 연구목적 :

수명이 연장됨에 따라서 노화에 의한 각 장기의 기능 변화에 관심이 높아졌다. 본 연구는 고령에서 관찰되는 대장의 여러 생리적 기능 변화를 백서를 이용하여 객관적으로 비교분석하고자 하였다.

### 방 법 :

건강한 17월령 이상의 고령의 백서 33마리와, 대조군으로 사용할 2월령의 어린 백서 28마리를 사용하여 *in vivo*에서 유리구슬배출실험을 하였고, 이들의 일부에서 *in vitro* 상의 대장통과시간 측정 및 근육 절편의 장력 측정을 시행하였다.

### 결 과 :

유리구슬이 배출되는데에는 어린 백서에서 통계적으로 의미 있게 긴 시간이 요구되었다( $p=0.028$ ). 연령의 구분없이 모든 백서에서의 대장통과시간은 대장 발단 구획에서 의미있게 빨라지던 것을 관찰할 수 있었고, 일정 시간 내에 완전한 대장의 통과가 가능하였던 백서의 수는 어린 연령군에서 두드러졌다. 대장 근육 절편을 여러 농도의 카바콜로 처리하였을 때 대장 근육의 수축 정도는 두 연령군 간에 유의한 차이가 없었다( $p=0.345$ ).

### 결 론 :

*in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통하여 백서가 노화할수록 대장의 운동기능이 저하하는 것으로 관찰되었으나, 실제적인 영향력과 세부적인 기전에 관하여는 잘 고안된 후속의 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## References

- 1) Lennard-Jones JE : *Constipation*. In : *Feldman M, Friedman LS, Sleisenger M, eds. Gastrointestinal and liver diseases. Volume 1. 7th ed. Philadelphia : WB Saunders, 2002 : 181-207*
- 2) Sonnenberg A, Koch TR : *Physician visits in the United States for constipation : 1958 to 1986*. *Dig Dis Sci* 1989 ; 34 : 606-611
- 3) Madsen JL : *Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times*. *Dig Dis Sci* 1992 ; 37 : 1548-1553

- 4) Percy WH : *In Vitro Techniques for the Study of Gastrointestinal Motility*. *Methods in Gastrointestinal Pharmacology, 1996 : 189-219*
- 5) Firth M, Prather CM : *Gastrointestinal Motility Problems in the Elderly Patient*. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1688-1700
- 6) 박효진 : 변비. In : 이상인, 박효진. 소화관 운동질환. 1st ed. 고려의학, 1999 ; 319-325
- 7) Jacoby HI, Lopez I : *A method for the evaluation of colonic propulsive motility in the mouse after ICV administered compounds*. *Dig Dis Sci* 1984 ; 29 : 551
- 8) Maria B, Giovanna I, Alessandra T : *Central tachykinin NK3 receptors in the inhibitory action on the rat colonic propulsion of a new tachykinin, PG-KII*. *Eur. J Pharmacol* 1999 ; 376 : 67-71
- 9) Robert BR, Joanne RM, Jacoby HI : *Colonic bead expulsion time in normal and  $\mu$ -opioid receptor deficient (CXBK) mice following central (ICV) administration of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid agonists*. *Life Sci* 1987 ; 41 : 2229-2234.
- 10) Ian JC, Simon JB : *Motility of the large intestine*. In : *Feldman M, Friedman LS, Sleisenger M, eds. Gastrointestinal-and-liver-diseases-Volume-2. 7th ed. Philadelphia : WB Saunders, 2002 : 1679-1691*.
- 11) Bell AM, Pemberton JH, Hanson RB, Zinsmeister AR : *Variations in muscle tone of the human rectum : Recording with an electromechanical barostat*. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : G17-25.
- 12) Cook IJ, Furukawa Y, Panagopoulos V, Collins PJ, Dent J : *Relationship between spatial patterns of colonic pressure and individual movements of content*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 ; 278 : G329-G341
- 13) Hammer J, Philips SF : *Fluid loading of the human colon : Effects on segmental transit and stool composition*. *Gastroenterology* 1993 ; 105 : 988-998
- 14) 박효진 · 지상원 · 임정현 · 이상인 : 기니 픽 실험적 대장위에서 대장 운동 기능의 변화. 대한 소화관운동학회지 2003 ; 9 : 53-58
- 15) David R, Dan G, John WW : *Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon*. *Am J Physiol* 1994 ; 267 : G515-522
- 16) McDougal JN, Miller MS, Burks TF, Kreulen DL : *Age-related changes in colonic function in rats*. *Am J Physiol* 1984 ; 247 : G542-546
- 17) Li M, Johnson CP, Adams MB, Sarna SK : *Cholinergic*

*and nitregeric regulation of in vivo giant migrating contractions in rat colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002 ; 283 : G544-G552*

18) Toku T, Ammar Q, Jung O, John WW : *Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. Brain Res 2000 ; 883 : 15-21*