

REVIEW ARTICLE

변비와 연관된 중개연구 현황

이현직, 박경식

계명대학교 의과대학 내과학교실

Current Status of Translational Research on Constipation

Hyun Jik Lee and Kyung Sik Park

Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Constipation is one of the most common gastrointestinal disorders with a prevalence up to 16.5% in the general population. It is frequently multifactorial and the pathophysiologic mechanism of constipation is not fully understood. Many preclinical studies of constipation have used animal models. Translational research using these animal models is essential to the investigation of neurogenic and myogenic mechanisms of colon, and to the estimation of the clinical efficacy of new drugs. In this review, we discuss some of the current translational research projects on constipation using animal models. (**Korean J Gastroenterol 2016;68:143-147**)

Key Words: Constipation; Translational medical research; Gastrointestinal motility; Colon

서론

변비는 흔한 소화기 질환들 가운데 하나로 국내의 경우 유병률이 16.5%까지 보고되고 있으며,¹ 변비로 인한 환자의 증상은 매우 다양한 반면 치료 후에도 증상의 충분한 개선이 쉽지 않은 질환이다.^{2,3} 증상이 심할 경우 일상 생활에 지장을 초래하거나 정신적인 고통을 주기도 하며, 변비 해결을 위해 약물 치료를 할 경우 사용되는 약제에 따라 오남용, 부작용 등이 나타나기도 한다. 변비의 병태생리는 매우 다양하여 대장이나 항문의 원발성 기능 저하뿐 아니라 다양한 종류의 약물이나 여러 전신 질환 등 이차적 병인들이 이 질환과 관련되어 있다. 변비를 일으키는 약제들로는 마약성 진통제, 제산제, 칼슘 차단제, 항파킨슨 약물 등이 있으며, 전신 질환들로는 당뇨병, 갑상선기능저하증, 요독증, 코칼슘혈증, 파킨슨병, 뇌졸중 등이 대표적이다.⁴

대장의 기능들 가운데 배변과 관련된 기능은 대장 내용물

의 이동, 보관, 배출 등의 대장운동 기능과 관련된 과정인데, 대장 내용물의 이동 과정에는 내장신경계의 조절을 통한 대장 평활근의 수축과 이완이 조화롭게 이루어지는 것이 필수적이다. 또한 배변과정에는 운동신경뿐만 아니라 감각신경도 중요한 역할을 한다.⁵ 이처럼 서로 다른 기전들이 변비와 관련되며 이 기전들을 규명하기 위해 다양한 동물실험이 이루어져 왔는데, 획득된 정보들이 일반적으로 한두 가지의 단면만 보여준다는 제한점에도 불구하고 동물실험은 대장운동을 지배하는 기전과 대장 기능 장애와 관련된 연구에 있어서 흥미로운 가능성들을 보여주고 있다. 만성 변비의 치료를 위하여 운동이나 풍부한식이섬유 섭취 등 생활 양식 변화, 부피형성 하제, 삼투성 하제, 자극성 하제 등의 약물치료, 행동치료 및 외과적 치료 등 여러 방법들이 전통적으로 시도되어 왔으며 최근 전통적인 약물 요법의 한계를 극복하기 위해 새로운 약물들이 다양하게 개발되고 있다. 이런 시도나 개발에 있어 동물실험은 가장 기초적이고 필수적이며, 일반적으로 다양한 방법으로

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2016. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 박경식, 41931, 대구시 중구 달성로 56, 계명대학교 동산의료원 내과

Correspondence to: Kyung Sik Park, Department of Internal Medicine, Keimyung University Dongsan Medical Center, 56 Dalseong-ro, Jung-gu, Daegu 41931, Korea.
Tel: +82-53-250-7088, Fax: +82-53-250-7442, E-mail: seenae99@dsmc.or.kr

Financial support: None. Conflict of interest: None.

실험 동물에게 변비를 유발한 후 질병의 경과나 병의 발생 형태, 투약에 따른 변화를 규명함으로써 이를 응용하여 약제 개발 등의 연구를 진행한다. 본 고에서는 이러한 다양한 동물실험 모델을 이용하여 이루어진 대장의 변비 기전 관련 연구와, 새롭게 개발된 약물에 관한 연구 등에 대하여 소개하고자 한다.

본 론

1. 카할 간질세포와 내장신경계

변비와 관련된 병태생리학적 요인들 가운데 최근 고령에서 신경근 퇴화(neuromuscular degeneration) 현상에 대해 관심이 모아지고 있다. 이런 요인에 의해 서행형 변비가 발생할 수 있으나 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않은 상황이다.⁶ 연령 증가에 따른 내장 신경 지배의 변화와 관련하여 이루어진 동물 연구들에는 설치류(rodents)가 가장 이상적인 동물로 알려져 있는데, 이는 설치류의 위장관 기능 노화가 사람과 비슷하여 나이에 따른 근육층 신경(myenteric neurons)의 소실이 보이며, 대장 통과 시간 지연과 이에 따른 변비가 관찰되기 때문이다.^{7,8} 노화된 기니피그(guinea pig)의 소장에서는 신경 세포(neuronal cell) 자체의 크기는 변화가 없으나 근육층 신경(myenteric neuron) 세포의 숫자에 있어 절반 정도의 감소가 관찰되었으며,⁹ 쥐(rat)를 사용한 연구에서는 근육층 신경의 밀도가 노화에 따라 감소하며 배설물 입자(fecal pellets)의 크기 감소와 직접적으로 관련됨이 관찰되었다.⁸ 이러한 연구 결과들은 사람에서 나이에 따라 근육층 신경세포의 밀도가 감소하며 이에 따라 대장 배출 능력이 저하될 가능성을 시사한다. 또한 위장관 운동에는 신경 요인과 신경 외적 요인이 작용하는데 이 가운데 위장관의 주기적 수축(phasic contraction)은 서파(slow wave)라는 자발적인 전기적 활동에 의해 발생한다.¹⁰ 서파는 카할 간질세포(interstitial cells of Cajal, ICC)에서 발생하며 ICC는 대장 평활근과 간극 연결(gap junction)를 통해 연결되어 전기적 연동(electrical coupling)을 한다.¹¹ 서행성 변비에서는 대장 평활근의 ICC 수 및 근육층 내의 흥분성 신경전달물질을 발현하는 신경세포의 수도 감소되어 있는 것으로 알려져 있다.^{5,12}

2. 대장운동

대장운동은 복잡하고 간헐적이며 대장의 각 영역에 따라 다르다. 지금까지 동물실험을 통해 대장운동에 대한 연구가 다양하게 진행되었으며, 실험 동물의 대장운동과 사람의 대장운동은 서로 다른 면도 있다고 보고되기도 하였다. 사람의 대장운동은 크게 비추진성 운동(non-propagating motor activity) 혹은 분절운동(segmental activity)과 추진성 운동(propagating motor activity)으로 나눌 수 있다. 비추진성 운

동은 대장운동의 주된 형태로 5-50 mmHg의 수축으로 나타나는데 대개 일부 영역에 국한된 분절 형태로 나타나며, 단독 또는 무리를 지어서 불규칙성으로 나타난다. 반면 추진성 운동은 장관 내의 내용물들이 항문 쪽으로 이동할 수 있도록 일정 거리의 대장근육이 연속적으로 수축하는 것을 의미한다.⁵ 대장운동과 관련된 연구들을 살펴보면, 사람 대장에서 운상근 서파의 활성이 분당 2-4회의 빈도로 발생하며, 서파의 활성 성상이나 공간 조직구성은 개와 돼지 대장에서와 의미 있게 유사하였다.¹³ 또한 사람 대장에서 추진성 운동은 작은 포유류의 대장에서 관찰되는 이동성 복합 운동과 유사하여, 사람 대장에서의 추진성 수축 운동에 대해 이해하기 위해 쥐, 기니피그 등의 실험실 동물 연구가 많이 진행되었다. 특히 쥐는 대장 배출 운동 기초 연구에 가장 이상적인 동물모델로 증명되었는데, 이는 작은 크기로 인하여 전 대장이 대장복합 운동 또는 추진운동에 관여하는 내인성 신경 경로의 손상 없이 생체 외 연구에 사용될 수 있기 때문이다.¹⁴⁻¹⁶ 최근에는 대장 및 직장 운동복합군(motor complexes)에 대해 여러 연구들이 발표되고 있으며, 기니피그 대장에서 'occult reflex'라는 대장 통과시간 장애와 관련된 새로운 기전에 대한 가능성이 제시되고 있다.¹⁷ 또한 대장 유전자 조작 방법의 출현과 특정 유전자 녹아웃(knockout) 동물모델들의 발달로 많은 발전이 있었으며, 소화관운동 연구에 있어서도 유전자 녹아웃 쥐 모델이 많이 이용되고 있다.¹⁶

3. 변비 관련 동물모델

최근에는 변비 관련 동물모델을 이용하여 새로운 약제, 유산균 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 이러한 동물모델을 제작하기 위한 변비 유발 방법에 대해 살펴보면 다음과 같다.

쥐에게 활성탄소를 경구 투여하여 변비를 유발하는 방법은 위장관 점막 표면에 부착된 활성탄소가 위장관의 배출기능을 줄이고, 이에 따라 위장관 체액 감소 및 운동 감소 등을 유발하게 된다. 활성탄소를 이용한 변비 쥐 모델은 활성탄소 유발 비장 및 위 기능 저하 기전으로 잘 확립되어 있다.¹⁸ 또한 loperamide를 경구(3-10 mg/kg) 또는 피하주사(0.15 mg/100 g)로 하루 1-2회 투여하여 변비 쥐 모델을 만들 수 있으며, 무긴장성 변비 모델(atonic constipation)은 clonidine을 이용하여 만든다.¹⁹⁻²¹ 그 뿐 아니라 쥐에게 물핀을 직접 투여하여 변비를 유발하기도 하며²² diphenoxylate를 위 내 투여함으로써 서행형 변비 쥐 모델을 만들 수도 있는데, 한 연구에서는 aquaporin 단백질의 변화나 대장 근육층의 c-kit 하향조절(down-regulation)과 서행성 변비의 관련 가능성에 대해 제시하기도 하였다.²³

4. 제4형 5-hydroxytryptamine (5-HT₄) 수용체

위장관에는 다양한 종류의 5-hydroxytryptamine (5-HT) 수용체가 존재하고 있으며, 각각 서로 다른 기능을 갖고 있다. 그 중 특히 5-HT₄ 수용체는 연동운동 증가, 위배출 증가, 장관 분비 증가 등을 촉진하는데, 장관 신경세포의 신경전달을 항진시키며 장관 평활근의 원위부 이완을 유발하여 위장관 운동성을 증가시킨다.²⁴ 위장관의 다양한 5-HT 수용체들을 목표로 장관 내로 세로토닌을 주입하는 동물실험들은 주로 쥐와 기니피그를 대상으로 오래 전부터 이루어져 왔다.²⁵

1) 5-HT₄ 활성화에 대한 생체 외 실험

5-HT 수용체에 대해서는 기니피그의 회장에서 분리된 표본을 이용하여 처음으로 생체 외 실험이 진행되었다.²⁶ 각각 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ 수용체에 따른 기능, 5-HT에 대한 친화도, 선택적 효능제 또는 길항제 등에 대하여 연구되었다.²⁶ 5-HT 수용체들 가운데 5-HT₄ 수용체의 활성화는 회장 분리 표본에서 콜린성 신경(cholinergic neuron)의 활성화에 의하여 유도된 수축을 유발한다. 또한 5-HT₄ 수용체의 활성화는 흥분성 또는 억제성 방법으로 소화기 운동을 조절하는데, 동물의 종과 해부학적 구조에 따라서 차이를 보여서^{24,27} 쥐에서는 식도, 회장의 이완이 유발되며, 기니피그에서는 위, 회장, 결장이 수축하게 된다. 사람의 분리된 대장 표본 실험에서 5-HT₄ 수용체 자극은 쥐에서와 동일하게 윤상근의 이완을 유발하였다.²⁸⁻³³ 5-HT₄ 수용체 자극은 콜린성 신경전달을 통한 종주근의 수축을 유발하는 반면, 윤상근은 이완됨으로써 변의 이동에 대해 저항성을 줄여주는 역할을 하는 것으로 보고되었다.^{34,35} 몇 가지 연구를 살펴보면, Reeves 등²⁹은 1991년 쥐 식도의 5-HT 수용체 유발 이완에 대해 조사하기 위해 체중 120-180 g의 암컷 윈스타 쥐의 식도를 이용하였으며, 1995년 발표된 한 연구에서는 5-HT₄ 수용체 기전에 대해 사람의 대장, 쥐의 식도와 쥐의 회장에서 비교 결과가 발표되었다.²⁸ 쥐의 식도, 기니피그의 대장을 이용하여 이루어진 한 연구에서는 5-HT₄ 선택적 수용체 효능제가 변비 등 대장운동 질환의 해결 가능성을 제시하기도 하였다.³⁶ 이후에도 여러 연구자들이 쥐나 기니피그의 대장, 수술을 받은 변비 환자나 대조군 조직의 분석을 통하여 다양한 5-HT₃ 및 5-HT₄ 수용체에 선택적으로 작용하는 약물에 대한 연구 결과들을 발표하였다.^{37,38}

2) 5-HT₄ 활성화에 대한 생체 실험

대장 연동운동의 발생에는 내장신경계, 특히 근육층신경절기에 있는 많은 수의 흥분성 운동신경과 억제성 운동신경의 정교하고 정형화된 조절 작용이 필요하다.⁵ 이러한 기전을 이해하기 위하여 앞서 기술한 바와 같이 절제 조직을 이용한 많은 생체 외 연구들이 이루어져 왔다. 1999년 Furuichi 등³⁹은 뇌 조직의 국소신경전달물질의 측정에 주로 사용되었던 미

세투석법(microdialysis method)을 개의 장 조직에 이용함으로써 처음으로 생체 내 분석을 시행하였는데, 이 연구에서는 개의 소장 장간막신경총을 포함하여 근육층 주위에 이식된 미세투석 섬유(fiber)를 통하여 간질내 용질 농도를 측정함으로써 장관 수축과 내인성 아세틸콜린 분비 정도를 동시에 측정할 수 있었다. 이 연구의 결과로 장의 콜린성 신경에서 분비된 아세틸콜린의 국소적 상승이 신경 흥분 유도 수축과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 유사한 방법으로 개 위점막하 조직의 간질액에서 prostaglandin E2 농도, 쥐 위점막하 조직의 간질액에서 뉴로텐신 이화작용 정도, 그리고 토끼 위장관에서 산화질소분비 정도 등을 생체 내에서 미세투석법에 의해 측정할 수 있었다.

3) 5-HT₄ 수용체 작용제

Cisapride는 생리적 조건(physiological condition)의 개 소장 내에서 아세틸콜린 증가와 동시에 장 운동 활동을 증가시키며, 위 운동을 증가시킨다.²⁷ Cisapride의 위장관 운동 활성 기전은 분리된 기니피그의 소장을 이용한 생체 외 실험에서 콜린성 신경과 관련된 5-HT₄ 수용체 활성을 통하여 알려졌다, 쥐를 이용한 생체 실험에서는 아세틸콜린 분비와 관련됨이 밝혀졌다.⁴⁰⁻⁴²

Mosapride도 정상 쥐에서 위 배출을 증가시켰고 개에서 위장관 운동 활성을 자극하였다. 결과적으로 동물에서 5-HT₄ 수용체가 자극되면 장관 콜린성 신경으로부터 아세틸콜린 분비를 자극시키고 위장관 운동성이 증가됨을 알게 되었다.⁴³

위 내의 5-HT₄ 수용체의 위치와 기계적 활성도는 세 부분, 즉 저부, 체부, 전정부에서 각각 다르다는 것이 기니피그를 이용한 동물실험 연구에서 알려졌다.^{44,45} 대장에서는 5-HT₄ 수용체 유도 반응은 사람과 기니피그의 절제 조직에서 각각 다르게 나타났는데 사람 대장에서는 이완 반응이, 기니피그에서는 수축 반응이 나타났다.^{28,33,46} 근육층신경절기와 근육층 사이의 5-HT₄ 수용체 밀도의 차이가 사람보다 기니피그에서 명확하게 나타났는데, 기니피그 대장에서는 5-HT₄ 수용체 분포가 근육층신경절기에 대부분 존재하였으나 사람 대장에서는 다르게 관찰되었다.⁴⁴

이후 개발된 새로운 약제들의 효능에 대한 동물실험 연구 결과들이 지속적으로 발표되어 왔으며 2000년대에 들어와 각 약제들의 임상시험 결과들이 발표되기 시작하였다. Prucalopride의 생체 외 및 생체 실험 연구에서 위장관 연동운동을 유발 및 촉진한다는 것이 밝혀졌고^{47,48} 건강인 지원자에서도 동일한 효과를 나타내었다.^{37,49} 이를 기반으로 이후 53명의 만성 변비 환자를 대상으로 이루어진 prucalopride의 효과에 대한 2상 탐색연구 결과가 발표되었는데 prucalopride 투약 그룹에서 위약 그룹보다 배변횟수 증가, 첫 대변시간 감소와 대변 굳기 감소 등 변비 증상의 호전이 관찰되었다.⁵⁰ 이후 만성

변비와 변비형 과민성 장증후군 환자들을 대상으로 이루어진 여러 2상 및 3상 연구에서 유효성이 입증되어⁵¹⁻⁵⁵ prucalopride는 치료약제로 승인되었고 국내에서도 2012년 12월부터 시판되고 있다.

이와 같이 특정 약제가 개발되어 임상에서 사용 허가가 이루어지기까지는 무수한 단계의 동물실험이 선행되어야 하기에 동물모델을 이용한 중개연구는 매우 중요한 학문 영역이라 할 수 있겠다.

결 론

동물모델이나 사람 대장 조직을 이용한 중개연구는 대장의 병태생리를 이해하는 데 있어 매우 중요한 역할을 해왔으며 변비와 관련된 다양한 요인에 대한 연구를 가능하게 하고 있다. 또한 새로운 약물을 개발하여 사람을 대상으로 한 임상 시험에 이르기까지는 무수한 동물실험이나 사람으로부터 절제된 조직을 이용한 중개 실험을 필요로 한다. 따라서 변비의 병태생리를 이해하고 새로운 치료법을 적용하는 연구에 있어서 이러한 중개연구는 매우 중요하며 기대가 되는 분야이다.

REFERENCES

1. Jun DW, Park HY, Lee OY, et al. A population-based study on bowel habits in a Korean community: prevalence of functional constipation and self-reported constipation. *Dig Dis Sci* 2006;51:1471-1477.
2. Suares NC, Ford AC. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1582-1591; quiz 1581, 1592.
3. Johanson JF, Kralstein J. Chronic constipation: a survey of the patient perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:599-608.
4. Lembo A, Camilleri M. Chronic constipation. *N Engl J Med* 2003;349:1360-1368.
5. Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. Constipation. 1st ed. Seoul: Medbook, 2013.
6. Zarate N, Spencer NJ. Chronic constipation: lessons from animal studies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:59-71.
7. El-Salhy M, Sandström O, Holmlund F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech Ageing Dev* 1999;107:93-103.
8. Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of age on cholinergic and inhibitory nonadrenergic noncholinergic responses in the rat ileum. *Eur J Pharmacol* 1996;303:79-86.
9. Peck CJ, Samsuria SD, Harrington AM, King SK, Hutson JM, Southwell BR. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:1075-1090.
10. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006;68:307-343.
11. Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999;514:515-531.
12. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010;59:882-887.
13. Rae MG, Fleming N, McGregor DB, Sanders KM, Keef KD. Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol* 1998;510:309-320.
14. Bywater RA, Small RC, Taylor GS. Neurogenic slow depolarizations and rapid oscillations in the membrane potential of circular muscle of mouse colon. *J Physiol* 1989;413:505-519.
15. Bywater RA, Spencer NJ, Fida R, Taylor GS. Second-, minute- and hour-metronomes of intestinal pacemakers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:857-861.
16. Spencer NJ. Control of migrating motor activity in the colon. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:604-610.
17. Dickson EJ, Spencer NJ, Hennig GW, et al. An enteric occult reflex underlies accommodation and slow transit in the distal large bowel. *Gastroenterology* 2007;132:1912-1924.
18. Suo H, Zhao X, Qian Y, et al. Therapeutic effect of activated carbon-induced constipation mice with *Lactobacillus fermentum* Suo on treatment. *Int J Mol Sci* 2014;15:21875-21895.
19. Hou ML, Chang LW, Lin CH, Lin LC, Tsai TH. Comparative pharmacokinetics of rhein in normal and loperamide-induced constipated rats and microarray analysis of drug-metabolizing genes. *J Ethnopharmacol* 2014;155:1291-1299.
20. Neri F, Cavallari G, Tsivian M, et al. Effect of colic vein ligation in rats with loperamide-induced constipation. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:896162.
21. Zhou M, Jia P, Chen J, et al. Laxative effects of Salecan on normal and two models of experimental constipated mice. *BMC Gastroenterol* 2013;13:52.
22. Kon R, Ikarashi N, Hayakawa A, et al. Morphine-induced constipation develops with increased aquaporin-3 expression in the colon via increased serotonin secretion. *Toxicol Sci* 2015;145:337-347.
23. Li Z, Zheng H, Li GB, Zhi H, Yuan WT. Alterations of Cajal cells in the colon of slow transit constipation rats. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2013;16:777-779.
24. Hegde SS, Eglen RM. Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J* 1996;10:1398-1407.
25. Buchheit KH, Buhl T. Prokinetic benzamides stimulate peristaltic activity in the isolated guinea pig ileum by activation of 5-HT₄ receptors. *Eur J Pharmacol* 1991;205:203-208.
26. Taniyama K, Makimoto N, Furuichi A, et al. Functions of peripheral 5-hydroxytryptamine receptors, especially 5-hydroxytryptamine₄ receptor, in gastrointestinal motility. *J Gastroenterol* 2000;35:575-582.
27. Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility. *Pharmacol Rev* 1995;47:631-651.
28. McLean PG, Coupar IM, Molenaar P. A comparative study of functional 5-HT₄ receptors in human colon, rat oesophagus and rat ileum. *Br J Pharmacol* 1995;115:47-56.

29. Reeves JJ, Bunce KT, Humphrey PP. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *Br J Pharmacol* 1991;103:1067-1072.
30. Buchheit KH, Buhl T. Stimulant effects of 5-hydroxytryptamine on guinea pig stomach preparations in vitro. *Eur J Pharmacol* 1994;262:91-97.
31. Craig DA, Clarke DE. Pharmacological characterization of a neuronal receptor for 5-hydroxytryptamine in guinea pig ileum with properties similar to the 5-hydroxytryptamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;252:1378-1386.
32. Kilbinger H, Wolf D. Effects of 5-HT₄ receptor stimulation on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1992;345:270-275.
33. Briejer MR, Schuurkes JA. 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors and cholinergic and tachykinergic neurotransmission in the guinea-pig proximal colon. *Eur J Pharmacol* 1996;308:173-180.
34. Prins NH, Akkermans LM, Lefebvre RA, Schuurkes JA. 5-HT₄ receptors on cholinergic nerves involved in contractility of canine and human large intestine longitudinal muscle. *Br J Pharmacol* 2000;131:927-932.
35. Prins NH, Van Haselen JF, Lefebvre RA, Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Pharmacological characterization of 5-HT₄ receptors mediating relaxation of canine isolated rectum circular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1999;127:1431-1437.
36. Nagakura Y, Ito H, Kiso T, Naitoh Y, Miyata K. The selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄-receptor agonist RS67506 enhances lower intestinal propulsion in mice. *Jpn J Pharmacol* 1997;74:209-212.
37. Poen AC, Felt-Bersma RJ, Van Dongen PA, Meuwissen SG. Effect of prucalopride, a new enterokinetic agent, on gastrointestinal transit and anorectal function in healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1493-1497.
38. Nagakura Y, Akuzawa S, Miyata K, et al. Pharmacological properties of a novel gastrointestinal prokinetic benzamide selective for human 5-HT₄ receptor versus human 5-HT₃ receptor. *Pharmacol Res* 1999;39:375-382.
39. Furuichi A, Makimoto N, Ogishima M, et al. In vivo microdialysis assessment of nerve-stimulated contractions associated with increased acetylcholine release in the dog intestine. *Jpn J Pharmacol* 1999;79:109-112.
40. Bingham S, King BF, Rushant B, Smith MI, Gaster L, Sanger GJ. Antagonism by SB 204070 of 5-HT-evoked contractions in the dog stomach: an in-vivo model of 5-HT₄ receptor function. *J Pharm Pharmacol* 1995;47:219-222.
41. Taniyama K, Nakayama S, Takeda K, et al. Cisapride stimulates motility of the intestine via the 5-hydroxytryptamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;258:1098-1104.
42. Schuurkes JA, Van Nueten JM, Van Daele PG, Reyntjens AJ, Janssen PA. Motor-stimulating properties of cisapride on isolated gastrointestinal preparations of the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234:775-783.
43. Yoshida N, Omoya H, Oka M, Furukawa K, Ito T, Karasawa T. AS-4370, a novel gastrokinetic agent free of dopamine D₂ receptor antagonist properties. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1989;300:51-67.
44. Sakurai-Yamashita Y, Yamashita K, Kanematsu T, Taniyama K. Localization of the 5-HT₄ receptor in the human and the guinea pig colon. *Eur J Pharmacol* 1999;383:281-285.
45. Takada K, Sakurai-Yamashita Y, Yamashita K, et al. Regional difference in correlation of 5-HT₄ receptor distribution with cholinergic transmission in the guinea pig stomach. *Eur J Pharmacol* 1999;374:489-494.
46. McLean PG, Coupar IM. Stimulation of cyclic AMP formation in the circular smooth muscle of human colon by activation of 5-HT₄-like receptors. *Br J Pharmacol* 1996;117:238-239.
47. Briejer MR, Bosmans JP, Van Daele P, et al. The in vitro pharmacological profile of prucalopride, a novel enterokinetic compound. *Eur J Pharmacol* 2001;423:71-83.
48. Briejer MR, Prins NH, Schuurkes JA. Effects of the enterokinetic prucalopride (R093877) on colonic motility in fasted dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2001;13:465-472.
49. Bouras EP, Camilleri M, Burton DD, McKinzie S. Selective stimulation of colonic transit by the benzofuran 5HT₄ agonist, prucalopride, in healthy humans. *Gut* 1999;44:682-686.
50. Coremans G, Kerstens R, De Pauw M, Stevens M. Prucalopride is effective in patients with severe chronic constipation in whom laxatives fail to provide adequate relief. Results of a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Digestion* 2003;67:82-89.
51. Emmanuel AV, Roy AJ, Nicholls TJ, Kamm MA. Prucalopride, a systemic enterokinetic, for the treatment of constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1347-1356.
52. Tack J, van Outryve M, Beyens G, Kerstens R, Vandeplasse L. Prucalopride (Resolor) in the treatment of severe chronic constipation in patients dissatisfied with laxatives. *Gut* 2009;58:357-365.
53. Camilleri M, Kerstens R, Rykx A, Vandeplasse L. A placebo-controlled trial of prucalopride for severe chronic constipation. *N Engl J Med* 2008;358:2344-2354.
54. Joslyn A, Stevens M, De Pauw M, Kerstens R. Prucalopride (PRU) is safe and generally well tolerated in elderly patients with chronic constipation (CC). *Am J Gastroenterol* 2000;95:2537-2538.
55. Sloots CE, Poen AC, Kerstens R, et al. Effects of prucalopride on colonic transit, anorectal function and bowel habits in patients with chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:759-767.