

소 부신수질 Muscarine 수용체의 성질

이신웅* · 이해태

영남대학교 약학대학

Properties of Muscarinic Receptor in Bovine Adrenal Medulla

Shin-Woong LEE* and Hae-Tae LEE

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received November 26, 1994; accepted December 10, 1994)

Abstract—The nature of the muscarinic receptors in bovine adrenal medulla was investigated in this study. [³H]Quinuclidinyl benzilate(QNB) specifically bound to a single class of muscarinic receptor with a K_D value of about 70 pM in bovine adrenal medullary, cardiac ventricular and ileal homogenates. Pirenzepine inhibition curves of [³H]QNB binding to cardiac ventricular and ileal homogenates were steep, indicating the presence of a single class of binding site for pirenzepine with a K_i value of 990 nM and 508 nM, respectively. However, pirenzepine/[³H]QNB competition binding curves in adrenal medulla suggested the presence of two binding sites (Hill coefficient=0.59) with a high(M₁) and a low(M₂) affinity. Respective K_i values for pirenzepine were 16 nM and 633 nM, with 44% of total sites having a high affinity(M₁). Gallamine, which is selective to cardiac M₂-receptor, inhibited [³H]QNB binding to adrenal medullary, cardiac ventricular and ileal homogenates with K_i values of 12 μM, 6 μM and 13 μM, respectively. Thus, the binding affinities of pirenzepine and gallamine for M₂-receptor in adrenal medulla were similar to those in ileum, which contains the M₃-receptor. These results indicate that the M₁- and M₃- muscarinic receptor subtypes coexist in the bovine adrenal medulla.

Keywords □ muscarinic receptor, bovine adrenal medulla, receptor subtype, [³H]QNB binding.

부신수질에서 분비되는 catecholamine은 응급시 순환 기 기능을 유지하는데 매우 중요하며 이의 분비는 부신수질로 가는 교감신경 절전섬유에 의하여 조절된다. 즉 위장신경(splanchnic nerve) 자극에 의해 교감신경 절전 섬유 말단에서 유리되는 acetylcholine이 부신수질의 acetylcholine receptor에 결합하여 크롬 친화성 세포(chromaffin cells)로부터 catecholamine을 분비한다. 그러나, catecholamine의 분비에 관여하는 acetylcholine receptor는 동물의 종(species)에 따라 차이가 있어, 고양이의 경우 nicotinic receptor와 muscarinic receptor가 모두 관여하나(Borges 등, 1986, 1987; Kirpekar 등, 1982), 병아리 부신에서는 muscarinic receptor만이(Ledbetter와 Kirshner, 1975; Knight와 Baker, 1986), hamster나 소(bovine)부신에서는 nicotinic receptor만이(Liang과 Perlman, 1979; Kayaalp와 Neff, 1979) catecholamine 유리를 매개 할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 이와같이, 고양이

및 병아리 부신의 muscarinic receptor 흥분은 catecholamine 분비를 매개하는 반면, 소 부신의 muscarinic receptor 흥분은 크롬 친화성 세포(chromaffin cells)의 cyclic GMP형성(Yanagihara 등, 1979; Derome 등, 1981)과 phosphatidylinositol(PI) turnover는 증가(Mohd-Adnan과 Hawthorne, 1981; Fisher 등, 1981)시키면서 catecholamine 분비는 오히려 억제하는 것으로 보고(Almazan 등, 1984; Forsberg 등, 1986)되어 있다.

한편, muscarinic receptor는 선택적인 길항제인 pirenzepine에 대한 친화성의 차이에 따라 친화성이 높은 M₁-receptor와 친화성이 낮은 M₂-receptor로 대별되었으며(Hammer 등, 1980; Hammer와 Giachetti, 1982), M₂-receptor는 다시 gallamine(Clark와 Mitchelson, 1976; Burke, 1986), AF-DX 116(Hammer 등, 1986; Giachetti 등, 1986), himbacine(Gilani와 Cobbin, 1986; Lazareno와 Roberts, 1989) 및 methoctramine(Melchiorre 등, 1987; Giraldo 등, 1988) 등에 친화성이 큰 M₂-receptor와 4-DAMP(Barlow 등, 1976; De Jonge 등, 1986; Eglén과

* To whom correspondence should be addressed.

Whiting, 1987), HSD(Mutschler와 Lambrecht, 1984) 등에 친화성이 큰 M_3 -receptor로 세분되었고, 대뇌피질과 교감신경절에는 주로 M_1 -receptor, 심장에는 M_2 -receptor, 이하선 및 회장 평활근에는 M_3 -receptor가 분포되어 있는 것으로 알려지고 있다(Brown 등, 1980; Watson 등, 1986a, b; Nilvebrant, 1986; Doods 등, 1987; Birdsall 등, 1987; Delmondo 등, 1989; Watson과 Arkinstall, 1994). 부신수질의 muscarinic receptor 역시 catecholamine 분비와 관련된 기능적 실험뿐만 아니라 muscarinic receptor에 선택적으로 결합하는 방사능 표지약물 결합실험을 통하여 쥐, 고양이, 소 등에서 확인 되었다. Yamanaka 등(1986, 1988)은 소 부신수질에는 M_1 -과 M_2 -receptor가 공존함을, Borges 등(1987)은 고양이 부신수질에는 M_2 -receptor만이 존재하는 것으로 보고하였으며, Ballesta 등(1989)은 전술한 부신수질에서의 catecholamine 분비에 대한 muscarinic receptor 효능제의 반응성의 차이가 소와 고양이 부신수질에 존재하는 muscarinic receptor subtypes의 분포가 다른데 기인한 것으로 추정하였다. 그러나, 이러한 부신수질의 세포막에 존재하는 muscarinic M_2 -receptor가 심장 M_2 -receptor와 같은 것인지, 회장 및 이하선에 있는 M_3 -receptor와 같은 것인지에 관해서는 현재까지도 알려지지 않고 있다.

따라서, 본 연구에서는 muscarinic receptor에 선택적으로 결합하는 [3 H]QNB (quinuclidinyl benzilate)를 이용하여 부신수질 muscarinic receptor에 대한 pirenzepine과 gallamine의 결합성질을 조사하고, 이를 M_2 -receptor가 주로 분포하는 심실 및 M_3 -receptor가 주로 분포하는 회장에서의 이들 약물의 결합성질과 비교, 검토하여 부신수질의 muscarinic receptor subtypes의 성질에 관한 지견을 얻고자 하였다.

실험방법

실험재료 및 시약

소의 부신수질, 심장 및 회장은 도살장에서 도살 즉시 적출하여 빙냉의 10 mM Tris · Cl-용액(Medium A) 중에 넣어 급송한 것을 사용하였다.

[3 H]Quinuclidinyl benzilate (QNB, 41.6 Ci/mmol)는 Amersham사로 부터, atropine sulfate, tris(hydroxymethyl) aminomethane(Tris), 2,5-diphenyloxazole(PPO), 1, 4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene(POPOP), pirenzepine dihydrochloride 및 gallamine triethiodide는 Sigma사로부터 구입 사용하였고, 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

부신수질 homogenate의 제조

빙냉의 10 mM Tris · Cl-용액(pH 7.4, Medium A) 중에서 지방조직과 피질부위를 제거한 후 가위로 세절하고 여기에 부신수질 무게의 10배가 되는 medium A를 가하고 이를 blender로 균질화한 후 1,000×g에서 10분간 원심

분리 하였다. 상정액을 12,000×g에서 10분간 원심분리한 후 그 상정액을 다시 45,000×g에서 30분간 원심분리 하고 그 pellets를 소량의 medium A에 부유시켜 필요시 사용 하였다.

심실 homogenate의 제조

빙냉의 Medium A 속에서 주위조직과 atrium을 제거한 후 심실무게의 6배가 되는 medium A를 가하여 blender로 균질화 하고 8,600×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 pellets에 다시 6배의 medium A를 가하고 homogenizer로 균질화한 후 8,600×g에서 20분간 원심분리(2회반복)하였으며 각각의 상정액을 모아 45,000×g에서 30분간 원심분리하였다.

회장 homogenate의 제조

빙냉의 Medium A 속에서 주위조직과 장내용물을 제거한 후 가위로 세절하고 회장무게의 6배가 되는 medium A를 가하여 blender로 균질화한 후 3,600×g에서 10분간 2회 원심분리하고 45,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 모든 homogenate의 단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

[3 H]QNB 결합실험

[3 H]QNB 결합실험은 여과법에 의하였다. 즉 50 mM Tris · Cl(pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 일정농도의 [3 H]QNB 및 비표지 약물을 함유하는 medium 속에 homogenate를 가하여 총용적이 5 ml가 되게한 후 37°C에서 150분간 반응시킨 다음 빙냉의 세척액(50 mM Tris · Cl, 10 mM $MgCl_2$) 5 ml를 가하여 반응을 종결 시키고, 즉시 glassfiber filter(Whatman GF/B)상에서 흡입여과하였다. Filter를 세척액 5 ml로 3회 세척, scintillation vial에 넣고 광원 하에서 2시간 건조한 다음 8 ml의 scintillation fluid를 가하여 12시간 이상 방치 후, liquid scintillation counter로 그 radioactivity를 측정하였다. [3 H]QNB의 특이결합은 전체결합에서 10^{-6} M atropine 존재하에서 측정되는 비특이 결합을 뺀 값으로 하였다.

[3 H]QNB 결합의 kinetic parameters

전술의 [3 H]QNB 결합실험 medium중에 여러 농도의 [3 H]QNB와 단백질을 가한 다음 37°C에서 150분간 반응시켰으며 반응을 종료시킨 후 여과, 세척 및 방사능을 측정하여 [3 H]QNB 각 농도에서의 [3 H]QNB 결합을 측정하였다. [3 H]QNB 결합의 affinity(K_D)와 결합부위농도(B_{max})는 [3 H]QNB 각 농도에서의 [3 H]QNB 결합(B)을 $B = -K_D \cdot B/F + B_{max}$ 에 적용시켜 Scatchard plot하여 구하였고 (F : [3 H]QNB의 free concentration), Hill coefficient (nH)는 [3 H]QNB의 포화결합 실험에서 얻은 자료를 $\log(Y/1-Y) = n \cdot \log[F] - \log[K_D]$ 에 적용시킨 다음 각 점을 잇는 회귀선으로 부터 구하였다($Y = B/B_{max}$, n = Hill coefficient).

비표지 약물의 Hill coefficient(nH)

[3 H]QNB 결합억제에 대한 비표지 약물의 Hill coefficient는 여러 농도의 비표지 약물 존재하에서 [3 H]QNB

결합억제 정도를 측정하여 이를 다음식에 적용시켜 Hill plot하여 구하였다.

$$\log\left(\frac{I}{100-I}\right) = n \cdot \log[D] - \log[IC_{50}]$$

I: 비표지 약물 일정농도[D]에서의 $[^3H]QNB$ 결합 억제 %

비표지 약물의 dissociation constant(Ki)

비표지 약물의 dissociation constant(Ki)는 Cheng 등 (1973)의 방법으로 산출하였다. 즉 $[^3H]QNB$ 결합의 50%를 억제하는 비표지 약물의 농도(IC₅₀), 사용한 $[^3H]QNB$ 의 농도(F) 및 $[^3H]QNB$ 의 dissociation constant(K_D)로 부터 유도된 $Ki = IC_{50}/(1 + F/K_D)$ 의 식에 의하여 산출하였다.

비표지 약물에 의한 muscarinic receptor subtypes의 분류

비표지 약물과 $[^3H]QNB$ 와의 muscarinic receptor에 대한 경쟁적 결합실험 결과를 Hofstee plot 했을 때 각 점의 직선성이 인정되지 않고 Hill plot 했을때 Hill coefficient가 1보다 작다고 인정될 때는 이 성적을 Munson 등(1980)의 two-site model에 적용·분석하여 각 site에 대한 affinity(Ki) 및 각 site의 분포정도를 추정하였다.

통계처리

실험결과는 평균치 ± 평균오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's t test에 의하였다.

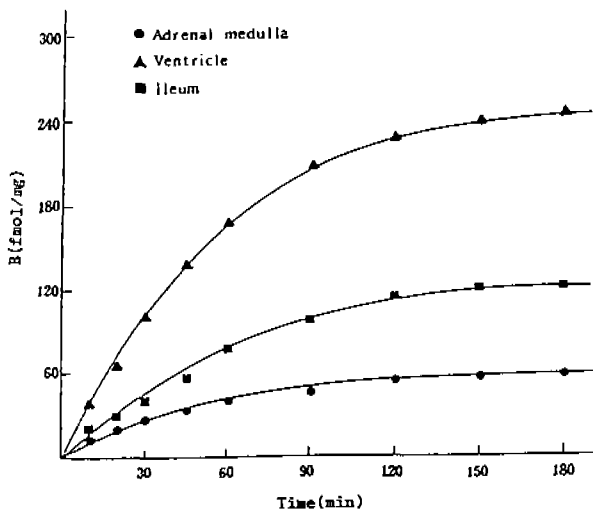


Fig. 1. Time course of $[^3H]QNB$ binding to bovine adrenal medulla, ventricle and ileum. Homogenates(adrenal medulla and ileum : 1mg protein, ventricle : 0.5mg protein) were incubated with 100 pM $[^3H]QNB$ at 37°C in presence of 50 mM Tris Cl and 10 mM MgCl₂ in a final volume of 5 ml and the reaction terminated at time intervals by rapid vacuum filtration over glass fiber filters. Each data point represents the mean of three independent experiments.

실험결과

부신수질, 심실 및 회장에서 시간 경과에 따른 $[^3H]QNB$ 결합

각 조직에서 muscarinic receptor에 대한 $[^3H]QNB$ 의 평형결합 도달 시간을 알아보기 위하여 시간 경과에 따른 $[^3H]QNB$ 결합정도를 조사하였다(Fig. 1). 50 mM Tris · Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl₂ 및 100 pM $[^3H]QNB$ 를 함유하는 medium중에 각 조직 단백질을 가했을 때 세 조직의 $[^3H]QNB$ 특이결합은 모두 시간 경과에 따라 증가 되다가 약 120분에 거의 평형에 도달하였다. 따라서 이후 실험에서는 $[^3H]QNB$ 평형결합에 도달하는 충분한 시간인 150분을 반응시간으로 하였다.

단백질 농도 변화에 따른 $[^3H]QNB$ 결합변화

Fig. 2는 100 pM의 $[^3H]QNB$ 를 함유하는 medium중에 여러 농도의 부신수질 homogenate를 가하고 37°C에서 150분간 반응시킨 다음 단백질 농도 증가에 따른 $[^3H]QNB$ 의 결합정도를 나타낸 것으로, 단백질 농도가 증가함에 따라 $[^3H]QNB$ 의 특이결합이 정비례하여 증가하였다. 본 실험에서 단백질 1 mg을 사용하였을 때의 방사능이 약 2,000 cpm으로서 $[^3H]QNB$ 결합실험의 결과해석이 더욱 용이 할것으로 생각되었으므로 이후 부신수질을 이용하는 실험에서는 단백질 1 mg을 사용하였다.

부신수질, 심실 및 회장 muscarinic receptor에 대한 $[^3H]QNB$ 의 kinetic parameters

비표지 약물인 pirenzepine과 gallamine의 muscarinic receptor에 대한 결합상수(Ki)를 추정하기 위해서는 $[^3H]QNB$ 의 결합상수(K_D)를 알아야 하므로 먼저 부신수질, 심실 및 회장에서 $[^3H]QNB$ 의 포화결합 실험을 시행하

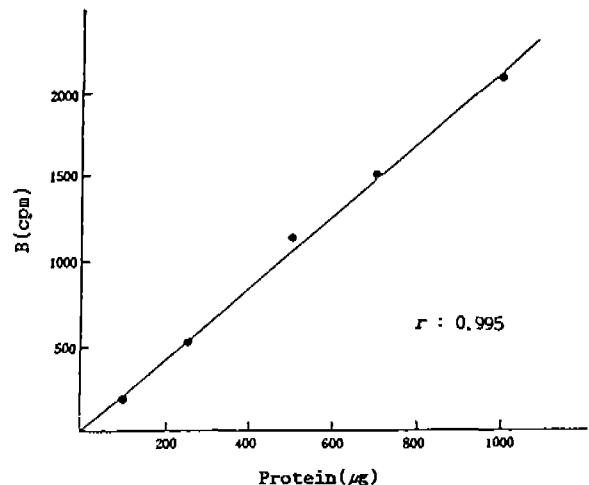


Fig. 2. Tissue linearity of the specific $[^3H]QNB$ binding to the adrenal medulla. 100 pM of $[^3H]QNB$ was incubated with various concentrations of protein for 150 min at 37°C. Each point is the mean of three assays.

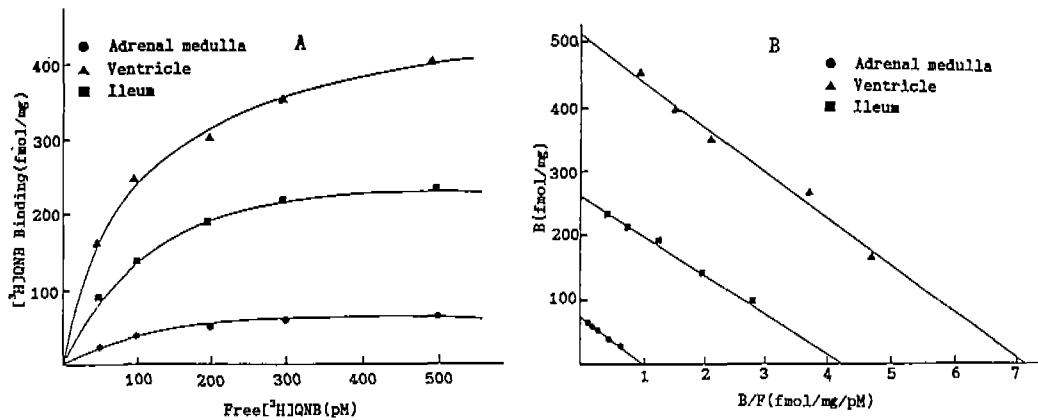


Fig. 3. Saturation experiment with $[^3\text{H}]\text{QNB}$ in bovine adrenal medulla, ventricle and ileum.

Homogenates (adrenal medulla and ileum: 1 mg protein, ventricle: 0.5 mg protein) were incubated with various concentrations of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ for 150 min at 37°C in a final volume of 5 ml. Other assay conditions were as described under "Methods". A: Saturation curves. B: Scatchard plot of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding data shown in A. Bound $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (B) was plotted as a function of bound $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (B)/free $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (F). Each point represents the mean of three experiments.

Table I. The binding parameters of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ to bovine adrenal medulla, ventricle and ileum

	K_D (pM)	B_{\max} (fmol/mg)	nH
Adrenal medulla	74.7 ± 7.0	71.2 ± 2.6	1.07 ± 0.04
Ventricle	76.8 ± 4.8	511.6 ± 20.8	1.01 ± 0.01
Ileum	70.2 ± 5.1	260.3 ± 12.1	1.01 ± 0.02

K_D and B_{\max} were calculated from Scatchard analysis. Hill coefficient (nH) was estimated from Hill plot. Values are the mean \pm S.E.M. of three experiments.

였다. 각 조직에서의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합은 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 농도 증가에 따라 증가하다가 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 약 500 pM에서 거의 포화되는 포화성 결합이었으며, 이 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 포화결합 실험성적을 Scatchard plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되었고 (Fig. 3-A, B), Hill plot했을 때 Hill coefficient가 1에 가까웠다 (Table. I).

본 실험결과에서 부신수질, 심실 및 회장은 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 에 대해서 affinity가 같은 단일 muscarinic receptor가 있는 것으로 추정할 수 있었으므로 이 부위에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 K_D 치를 산출 하였던 바, 세 조직에서 약 70 pM로서 유사하였으며 결합부위 농도(B_{\max})는 각각 71.2, 511.6, 260.3 fmol/mg이었다.

부신수질, 심실 및 회장의 muscarinic receptor 농도

전술의 실험에서, 분리한 homogenate의 단백질 mg당 muscarinic receptor 농도는 심실이 가장 높고 회장, 부신수질의 순이었으나 각 조직의 단백질 수율이 각각 다르므로 이를 조직의 muscarinic receptor 농도로 간주할 수 없다. 따라서, 각 조직의 단백질 수율을 지표로 조직 g당 receptor 농도를 측정 하였던 바, Table II에서 보는 바와 같이, 회장이 약 670 fmol로 가장 높았고, 부신수질과 심실은 약 300 fmol로 유사하였다.

Table II. Comparison of muscarinic receptor concentration in bovine adrenal medulla, ventricle and ileum

	Receptor density (fmol/g tissue)	N
Adrenal medulla	284.5 ± 47.8	6
Ventricle	305.4 ± 14.7	4
Ileum	668.2 ± 91.9	4

N: Number of experiment. Values are the mean \pm S.E.M.

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 pirenzepine과의 경쟁적 결합실험

Muscarinic receptor는 선택적인 길항제인 pirenzepine에 대한 affinity의 차이에 따라 affinity가 높은 M_1 -receptor와 affinity가 낮은 M_2 -receptor로 대별된다. 본 실험에서 분리한 부신수질, 심실 및 회장 homogenate중에 분포되어 있는 muscarinic receptor subtype이 M_1 -receptor인지 M_2 -receptor인지를 확인하고 그 분포 정도를 알아보기 위하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 pirenzepine의 경쟁적 결합 실험을 시행하였다. 부신수질에서 pirenzepine에 의한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합억제 곡선은 아주 완만하였으며 (Fig. 4), 이 결과를 Hill plot했을 때 Hill coefficient가 0.59로서 1보다 유의하게 작았을 뿐 아니라 (Fig. 4, Inset) Hofstee plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되지 않았다 (Fig. 5).

부신수질에서의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 pirenzepine의 경쟁적 실험결과는 본 실험에서 분리한 부신수질 homogenate의 muscarinic receptor에는 pirenzepine에 대하여 친화성이 서로 다른 두 종류의 subtype이 존재함을 시사하므로, 이를 Munson 등(1980)의 two-site model에 적용시켜 분석한 결과, 부신수질에는 pirenzepine에 친화성이 높은 M_1 -site가 약 44%, 친화성이 낮은 M_2 -site가 약 56% 분포되어 있는 것으로 나타났으며, 각 site에 대한 IC_{50}

치료부터 Cheng 등(1973)의 방법으로 계산된 pirenzepine의 M₁-, M₂-site에 대한 Ki치는 각각 16 nM과 633 nM이었다(Table III).

한편, 심실 및 회장에서 pirenzepine에 의한 [³H]QNB

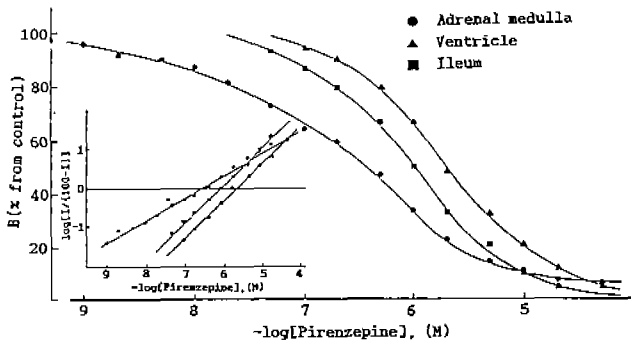


Fig. 4. Inhibition of [³H]QNB binding by pirenzepine to bovine adrenal medulla, ventricle and ileum. Homogenates were incubated with 100 pM [³H]QNB and various concentrations of pirenzepine for 150 min at 37°C. Other assay conditions were as described under "Methods". Inset : Hill plot of the inhibition data. B represents the percentage inhibition of [³H]QNB binding at a given pirenzepine concentration. Each point represents the mean of three separate experiments.

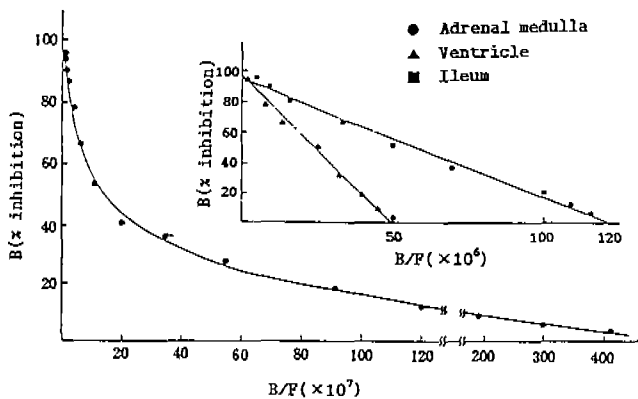


Fig. 5. Hofstee plot of the inhibition data in Fig. 4. B represents the percentage inhibition of [³H]QNB binding and F the free pirenzepine concentration.

Table III. Ki values of pirenzepine for the total receptor populations(M₁+M₂), the M₁-receptors and the M₂-receptors in bovine adrenal medulla, ventricle and ileum

Organ	Receptor	Ki (nM)	nH	% of total site
Adrenal medulla	Total	132.7 ± 0.3	0.59 ± 0.03	100
	High affinity (M ₁)	16.4 ± 6.7		43.8 ± 0.96
	Low affinity (M ₂)	632.8 ± 106.0		56.2 ± 0.96
Ventricle	Total	990.0 ± 105.6*	0.98 ± 0.03	100
Ileum	Total	507.7 ± 58.8	0.91 ± 0.01	100

The non-linear Hofstee plot shown in Fig. 5 (adrenal medulla) was analysed according to a two-site model by LIGAND as described by Munson *et al.* The M₁ and M₂ represent high and low affinity sites for pirenzepine, respectively. Values are the mean ± S.E.M. of three separate experiments. *Significantly different from corresponding value of ileum and low affinity site of adrenal medulla (p<0.01).

결합억제 곡선은 부신수질에 비해 그 경사가 급하였으며 (Fig. 4), 이 결과를 Hill plot 했을 때 Hill coefficient가 거의 1에 가까웠고(Fig. 4, Inset), Hofstee plot하였을 때 각 점의 직선성이 인정되었다(Fig. 5). 따라서, 심실 및 회장에는 부신수질과는 달리 pirenzepine에 친화성이 같은 단일 muscarinic receptor가 존재하는 것으로 추정되며 이들 부위에 대한 pirenzepine의 Ki치는 심실 및 회장에서 각각 990 nM과 508 nM이었다(Table III).

[³H]QNB와 gallamine과의 경쟁적 결합실험

Gallamine이 심실 M₂-receptor에 대하여 선택성이 큰 것으로 알려지고 있으므로 부신수질 muscarinic receptor의 gallamine에 대한 affinity를 조사하여 이를 심실과 회장에서의 affinity와 비교하여 보았다.

Fig. 6에서 보는 바와같이 gallamine에 의한 [³H]QNB 결합억제 곡선은 세 조직에서 모두 완만하였고, 이 성적을 Hill plot했을 때 Hill coefficient가 1보다 유의하게 작았다(Inset). Table IV는 [³H]QNB 결합의 50%를 억제하는 gallamine의 농도로 부터 계산된 gallamine의 Ki치를 요약한 것으로, 부신수질에서의 gallamine의 Ki

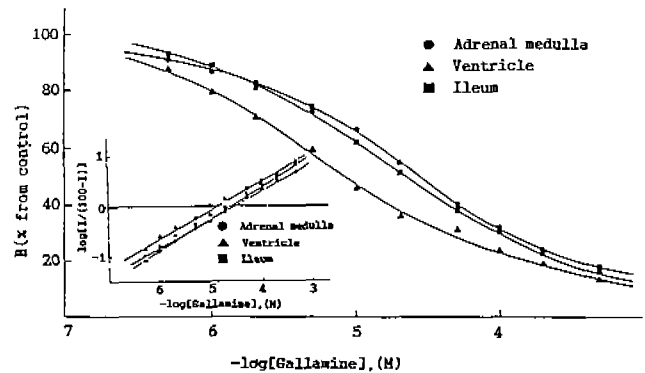


Fig. 6. Inhibition of [³H]QNB binding by gallamine to bovine adrenal medulla, ventricle and ileum. Homogenates were incubated with 100 pM [³H]QNB and various concentrations of gallamine for 150 min at 37°C. Other assay conditions were as described under "Methods". Inset : Hill plot of the inhibition data. Hill coefficient is taken as the slope of the regression line. Each point represents the mean of three separate experiments.

Table VI. K_i values of gallamine for the total muscarinic receptors in bovine adrenal medulla, ventricle and ileum

	K_i (μ M)	nH
Adrenal medulla	11.8 ± 1.1	0.56 ± 0.04
Ventricle	$5.7 \pm 0.7^*$	0.60 ± 0.01
Ileum	13.2 ± 0.2	0.61 ± 0.02

Values are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments. *Significantly different from corresponding value of adrenal medulla and ileum ($p < 0.01$).

치는 회장에서와 유사하였으나 심실에서의 K_i 치 보다는 약 2배가 컸다.

고 찰

본 실험결과 부신수질에는 pirenzepine에 친화성이 높은 M_1 -receptor와 친화성이 낮은 M_2 -receptor가 공존하며, 이 M_2 -receptor에 대한 pirenzepine과 gallamine의 affinity가 회장 muscarinic receptor에 대한 이들 약물의 affinity와 유사함을 알았다.

$[^3H]$ Quinuclidinyl benzilate(QNB)는 muscarinic receptor에 선택적으로 작용하는 길항제로 muscarinic receptor의 성질을 파악하고 이 receptor와 약물과의 상호작용을 연구하는데 널리 이용되어 왔다(Yamamura와 Snyder, 1974; Lee 등, 1993; 1994). 본 실험에서도 부신수질, 심실 및 회장 muscarinic receptor에 대한 $[^3H]$ QNB 결합이 가역적이고 포화성이었음을 뿐 아니라, 세 조직에서 $[^3H]$ QNB결합의 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점에서 $[^3H]$ QNB는 단일 muscarinic receptor에 결합하는 선택적인 약물임을 알 수 있었고, muscarinic receptor에 대한 $[^3H]$ QNB의 affinity 역시 세 조직에서 약 70 pM로 유사하였으며, 이는 중추신경계 및 평활근에서의 affinity와도 유사하여 $[^3H]$ QNB가 장기에 대한 선택성이 없음을 확인할 수 있었다.

한편, muscarinic receptor는 선택적인 길항제인 pirenzepine(Hammer 등, 1980)에 대한 친화성의 차이에 따라 친화성이 높은 M_1 -receptor(대뇌피질, 교감신경절 등)와 친화성이 낮은 M_2 -receptor(심장, 장평활근 등)로 분류되어 왔으나, 근래 심장의 M_2 -receptor와 회장평활근 또는 이하선의 M_2 -receptor에 대하여 각각 선택적인 약물이 소개됨으로서 pirenzepine의 M_2 -receptor는 다시 심장 M_2 -receptor와 회장 M_3 -receptor로 구분되었다(Doods 등, 1987; Delmondo 등, 1989; Watson과 Arkinstall, 1994). 본 실험에서 심실과 회장 muscarinic receptor에 대한 pirenzepine 결합의 Hill coefficient가 1에 가까웠고 이 부위에 대한 pirenzepine의 K_i 치(500~1000 nM)가 이미 보고(De Jonge 등, 1986)된 M_2 -receptor에 대한 K_i 치와 유사한 점으로 보아 소 심실과 회장에도 pirenzepine에 친화성이 낮은 단일 M_2 -receptor가 존재하는 것

으로 생각된다. 일반적으로, pirenzepine의 M_2 -receptor가 존재하는 심장과 회장에서 pirenzepine에 대한 affinity도 회장이 심장보다 약 2배 큰 것으로 보고(Doods 등, 1987; Watson 등, 1986) 되어 있고, 본 실험에서도 이와 동일한 결과를 얻었으므로 만약 부신수질에서 M_2 -receptor의 존재가 확인되면 이 M_2 -receptor가 pirenzepine에 대한 결합성질 면에서 심장과 같은지 또는 회장과 같은지를 추정할 수 있을 것이다.

생체내에서 부신수질로부터의 catecholamine의 분비는 주로 부신수질로 가는 교감신경 절전섬유의 흥분에 의해 유리되는 acetylcholine에 의하여 매개된다. 부신수질에서 acetylcholine이 nicotinic receptor에 작용하여 catecholamine을 분비한다는 것은 이미 오래전부터 알려진 주지의 사실이나, 부신수질에서의 muscarinic receptor의 존재나 그 역할에 대해서는 불명한 점이 많다. 근래 기능적 실험이나 방사능 표지약물 결합실험을 통하여 부신수질에서의 muscarinic receptor가 확인되었으나, 실험동물의 종(species)에 따라 muscarinic receptor 효능제에 대한 반응이 다르고, 전술한 muscarinic M_1 -및 M_2 -receptor의 분포상태도 다른 것으로 보고 되어있다. Yamanaka 등(1986)은 소(bovine) 부신수질에 M_1 -과 M_2 -receptor가 공존함을 시사하였으며, Ballesta 등(1989)은 고양이 부신수질에는 M_2 -receptor만 존재하며 methacholine, oxotremorine 등과 같은 muscarinic receptor 효능제에 의하여 catecholamine 분비가 촉진되는데 비해 소 부신수질에는 M_1 -과 M_2 -receptor가 공존하면서도 muscarinic receptor 효능제에 의하여 catecholamine 분비가 촉진되지 않음을 관찰하여 동물에 따른 효능제의 반응성의 차이가 부신수질에 있는 muscarinic receptor subtype이 다른데 기인하는 것으로 추정하였다. 이와같이, 부신수질에는 M_2 -receptor가 존재하거나 또는 M_1 -및 M_2 -receptor가 같이 있는 것으로 알려져 있으나, 부신수질의 이 M_2 -receptor가 심장 M_2 -receptor에 속하는지 혹은 회장 M_3 -receptor에 속하는지에 관해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

본 실험결과, 소 부신수질에서 pirenzepine의 Hill coefficient가 1보다 작은 것으로 보아 부신수질에는 pirenzepine에 대하여 affinity가 다른 두 종류의 subtype이 존재하는 것으로 추정되었으며, 각 subtype에 대한 K_i 치가 각각 16 nM 및 633 nM로서 이미 보고된(Yamanaka 등, 1986) pirenzepine의 M_1 - 및 M_2 -receptor에 대한 K_i 치와도 유사하여 부신수질에 있는 두 종류의 subtype이 pirenzepine의 M_1 - 및 M_2 -receptor임을 시사한다. 뿐만 아니라, 본 실험에서 부신수질 M_2 -receptor에 대한 pirenzepine의 K_i 치가 심실의 M_2 -receptor에 대한 K_i 치(990 nM)보다는 적고 회장 M_3 -receptor에 대한 K_i 치(508 nM)와 유사하였다는 점에서 부신수질의 M_2 -receptor는 심실에 있는 M_2 -receptor라기 보다는 회장에 있는 것과 같은 M_3 -receptor인 것으로 추정된다. 이 점은 심실 M_2 -

receptor에 선택성이 크다고 알려져 있는 gallamine에 대한 affinity 측면에서도 부신수질은 회장과 유사하였으나 심실보다는 gallamine에 대한 affinity가 작았다는 점에서 더욱 뒷받침된다. 따라서, 소(bovine)의 부신수질에 있는 muscarinic receptor는 M₁-receptor와 M₃-receptor로서 부신수질에는 이들 두 종류의 receptor subtype가 공존하는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

“이 논문은 1994학년도 영남대학교 학술연구조성비에 의한 것임”을 감사드립니다.

참고문헌

- Almazan, G., Aunis, D., Garcia, A. G., Montiel, C., Nicolas, G. P. and Sanchez-Garcia, P. P. (1984). Effect of collagenase on the release of ³H-noradrenaline from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Brit. J. Pharmacol.* **81**, 599-610.
- Ballesta, J. J., Borges, R., Garcia, A. G., Hidalgo, M. J. (1989). Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiology.* **418**, 411-426.
- Barlow, R. B., Berry, K. J., Glenton, P. A. M., Nikolaou, N. M. and Soh, K. S. (1976). A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29°C and in ileum at 29°C and 37°C. *Br. J. Pharmacol.* **58**, 613-620.
- Birdsall, N. J. M., Curtis, C. A. M., Eveleigh, P., Hulme, E. C., Pedder, E. K., Poyner, D., Stockton, J. M. and Wheatley, M. (1987). Muscarinic receptor subclasses. *In cellular and molecular basis of cholinergic function.* ed. Dowdall, M. J. and Hawthorne, J. N. pp. 46-55. Weinheim, F. R. G.: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Borges, R., Sala F. and Garcia A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J. Neurosci. Methods* **16**, 389-400.
- Borges, R., Ballesta, J. J. and Garcia, A. G. (1987). M₂-muscarine receptor associated ionophore at the cat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 965-972.
- Brown, D. A., Forward, A. and Marsh, J. (1980). Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* **71**, 362-364.
- Burke, R. E. (1986). Gallamine binding to muscarinic M₁ and M₂ receptors studied by inhibition of [³H]pirenzepine and [³H]QNB binding to rat brain membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **30**, 58-68.
- Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor with causes 50 percent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- Clark, A. L. and Mitchelson, F. (1976). The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* **58**, 323-331.
- De Jonge, A., Doods, H. N., Riesbos, J. and van Zwieten, P. A. (1986). Heterogeneity of muscarinic receptor binding sites in rat brain, submandibular gland and atrium. *Br. J. Pharmacol.* **89**, p. 551
- Delmondo, R. E., Michel, A. D. and Whiting, R. L. (1989). Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 457-464.
- Derome, G., Tseng, R., Mercier, P., Lemaire, J. and Lemaire, S. (1981). Possible muscarinic regulation of catecholamine secretion mediated by cyclic GMP in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 855-860.
- Doods, H. L., Mathy, M.-J., Davidesko, D., van Charldorp, K. J., de Jonge, A. and van Zwieten, P. A. (1987). Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and *in vitro* experiments for the putative M₁, M₂ and M₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 257-262.
- Eglen, R. M. and Whiting, R. L. (1987). Competitive and non-competitive antagonism exhibited by selective antagonists at atrial and ileal muscarinic receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **90**, 701-707.
- Fisher, S. K., Holz, R. W. and Agranoff, B. W. (1981). Muscarinic receptors in chromaffin cell cultures mediate enhanced phospholipid labeling but not catecholamine secretion. *J. Neurochem.* **37**, 491-497.
- Forsberg, E. J., Rojas, E. and Pollard, H. B. (1986). Muscarinic receptor enhancement of nicotine-induced catecholamine secretion may be mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 4915-4920.
- Giachetti, A., Micheletti, R. and Montagna, E. (1986). Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarinic M₂ receptor antagonist. *Life. Sci.* **38**, 1663-1672.
- Gilani, A. S. H. and Cobbin, L. B. (1986). The cardioselectivity of himbacine. A muscarinic receptor antagonist. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **332**, 16-20.
- Giraldo, E., Micheletti, R., Montagna, E., Giachetti, A., Vigano, M. A., Ladinsky, H. and Melchiorre, C. (1988). Binding and functional characterization of the cardioselective muscarinic antagonist methoctramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 1016-1020.
- Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V. and Hulme, E. C. (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature (Lond.)* **283**, 90-92.
- Hammer, R. and Giachetti, A. (1982). Muscarinic receptor subtypes. M₁ and M₂ biochemical and functional characterization. *Life. Sci.* **31**, 2991-2998.
- Hammer, R., Giraldo, E., Schiavi, G. B., Monferini, E. and Ladinsky, H. (1986). Binding profile of a novel cardioselective muscarinic receptor antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in rat. *Life. Sci.* **38**, 1653-1662.
- Kayaalp, S. O. and Neff, H. H. (1979). Cholinergic muscarinic receptors in bovine adrenal medulla. *Neuropharmacol.* **18**, 909-911.
- Kirpekar, S. M., Prat, J. C. and Schiavone, M. T. (1982). Effect of muscarine on the release of catecholamines from the perfused adrenal gland of the cat. *Brit. J. Pharmacol.* **77**,

- 455-460.
- Knight, D. E. and Baker, P. F. (1986). Observations on the muscarinic activation of catecholamine secretion in the chicken adrenal. *Neurosci.* **19**, 357-366.
- Lazareno, S. and Roberts, F. F. (1989). Functional and binding studies with muscarinic M₂-subtype selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **98**, 309-317.
- Ledbetter, F. H. and Kirshner, N. (1975). Studies of chick adrenal medulla in organ culture. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 967-974.
- Lee, S. W., Park, Y. J. and Lee, J. S. (1993). Relative potency of antihistaminics for H₁ and muscarinic receptors. *Yakhak Hoeji* **37**, 397-407.
- Lee, S. W. and Kim, J. G. (1994). Binding profiles of oxemazine to the muscarinic receptor subtypes. *Korean J. Pharmacol.* **30**, 49-57.
- Liang, B. T. and Perlman, R. L. (1979). Catecholamine secretion by hamster adrenal cells. *J. Neurochem.* **32**, 927-933.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Melchiorre, C., Cassinelli, A. and Quaglia, W. (1987). Differential blockade of muscarinic receptor subtypes by polymethylene tetraamine. Novel class of selective antagonists of cardiac M₂ muscarinic receptors. *J. Med. Chem.* **30**, 201-204.
- Mohd-Adnan, N. A. and Hawthorne, J. N. (1981). Phosphatidylinositol labeling in response to activation of muscarinic receptors in bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* **36**, 1858-1860.
- Munson, P. J. and Rodbard, D. (1980). LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand binding system. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239.
- Mutschler, E. and Lambrecht, G. (1984). Selective muscarinic agonists and antagonists in functional tests. *Trends. Pharmacol. Sci.* **5**(Suppl), 39-44.
- Nilvebrant, L. (1986). Muscarinic receptors in the urinary bladder and the putative subclassification of muscarinic receptors. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* **59**(Suppl), 5-45.
- Watson, M., Roeske, W. R., Vickroy, T. W., Smith, T. L., Akiyama, K., Gulta, K., Duckles, S. P., Serra, M., Adem, A. M., Nordberg, A., Gehlet, D. R., Wamsley, J. K. and Yamamura, H. I. (1986a). Biochemical and functional basis of putative muscarinic receptor subtypes and its implications. *Trends. Pharmacol. Sci. Suppl.* **7**, 46-55.
- Watson, M., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R. (1986b). [³H] Pirenzepine and (-)[³H]quinuclidinyl benzilate binding to rat cerebral cortical and cardiac muscarinic cholinergic sites, I. Characterization and regulation of agonist binding to putative muscarinic subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 411-418.
- Watson, S. and Arkininstall, S. (1994). The G-protein linked receptor. Facts Book. pp. 8-18. Academic Press, San Diego.
- Yamamura, H. I. and Snyder, S. H. (1974). Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with [³H]QNB. *Mol. Pharmacol.* **10**, 861-867.
- Yamanaka, K., Kigoshi, S. and Muramatsu, I. (1986). Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3151-3157.
- Yamanaka, K., Muramatsu, I. and Kigoshi, S. (1988). Tetranitromethane modification of the muscarinic receptors in bovine adrenal medulla. *Japan. J. Pharmacol.* **48**, 67-76.
- Yanagihara, N., Isosaki, M., Ohuchi, T. and Oka, M. (1979). Muscarinic receptor mediated increase in cyclic GMP level in isolated bovine adrenal medullary cells. *FEBS Letters* **105**, 296-298.