

이스라엘잉어 장관 수축에 관여하는 약물수용체에 관한 연구

윤효인 · 한경오 · 박승춘 · 조준형* · 오태광**

충남대학교 수의과대학, 가축위생연구소*

한국과학기술원 유전공학연구소**

(1994년 5월 9일 접수)

Characterization of the drug receptors responsible for intestinal contraction in Israeli carp

Hyo-in Yun, Kyong-oh Han, Seung-chun Park,
Joon-hyoun Cho*, Tae-kwang Oh**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University
Veterinary Research Institute*

Genetic Engineering Research Institute, KAIST**

(Received May 9, 1994)

Abstract : In order to elucidate the characterization of receptors involved in intestinal motility of Israeli carp, spontaneously contracting Israeli carp intestinal preparations were prepared and mounted in the organ chambers for contraction traicings using a polygraph. Various contractile agonists were treated and their dose-response curves were constructed. EC₅₀ values(pD₂) of each agonist on specific receptors, pA₂ values of competitive antagonists against some agonists, and K_i values of noncompetitive antagonists against some agonists were analyzed for characterization of receptors related with the intestinal contraction.

Results obtained through the experiments were summarized as follows:

1. Acetylcholine(ACh) exhibited biphasic dose-response curves: initial ACh-induced dose dependent contractions were observed in pM levels but followed by decreased response in in-between concentration levels. Dose dependent contractions reappeared in μ M level. The peaks in pM and μ M levels appeared in 10^{-13} M and 3×10^{-5} M, respectively.

2. Carbachol(CaCh) exhibited dose dependent contractions from 10^{-9} M to 10^{-5} M, and its pD₂ values were higher than those of ACh(5.60 ± 0.11). ACh and CaCh exhibited equiactive contractions. Nicotine had no effects on contractile responses of Israeli carp intestine.

3. ACh-induced responses were inhibited by atropine(K_i: 7×10^{-8} M), a muscarinic antagonist, in a non-competitive manner. But CaCh-induced responses were inhibited by both antimuscarinic atropine(pA₂: 9.52 ± 0.14) and selective M₂ antagonistic 4-DAMP(pA₂: 8.16 ± 0.09), in competitive manners. Nicotine receptor antagonistic de-camethonium and hexamethonium had no effects on ACh-and CaCh-induced contractions. Therefore, the cholinergic receptor related to intestinal motility of Israeli carp was assumed as M₂ type.

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대육성)과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

4. In Israeli carp intestine, 5-HT (serotonin) exhibited dose dependent contractions in concentration range from 10^{-8} M to 10^{-5} M. The maximal responses, however, were corresponded to about 50% of those of ACh or CaCh. 5-HT induced contractions were inhibited by 5-HT₂ antagonistic ketanserin ($K_i: 7.8 \times 10^{-4}$ M) in a non-competitive manner, but not by both of anti 5-HT₁ spiperone and anti 5-HT₃ MDL-72222. Hence, 5-HT₂ receptors are suggested to be existed in Israeli carp intestine.

Key words : Israeli carp, drug receptor, muscarinic, 5-HT, 4-DAMP, spiperone

서 론

Otto Loewi¹에 의해 콜린성 신경전달물질인 acetylcholine (ACh)이 개구리의 적출 심장을 수축시킴이 처음 밝혀진 이래, ACh은 포유류의 장관수축에 관여하는 주요한 신경전달물질로 작용하고 있음을 잘 알려져 있다^{2,6}. 그러나 포유류의 장관수축은 ACh 이외에도 histamine, serotonin, purine, substance P⁷⁻¹⁰ 등 다양한 내인성물질들에 의해 매개되며, 이를 물질이 각각 관여하는 수용체가 포유류의 장관에 분포하고 있음이 밝혀져 있다. 어류의 위장관 운동도 포유류와 마찬가지로 신경 체액성 기전에 의해 이루어지고 있다¹¹⁻¹⁵. Burnstock et al¹⁶은 강송어의 위장에는 미주신경이 그리고 장관에는 미주신경 및 내장신경 등 콜린성 신경이 분포하고 있다고 보고하였다. 그러나 어류의 위장관에 분포하는 미주신경은 포유류와 달리 어종에 따라 그 기능이 상이함이 밝혀졌는데, 연어 및 뱀장어¹⁷ 등에서는 미주신경이 흥분하면 오히려 위장관이 억제되며, 가자미¹⁸의 위장관에 분포하는 미주신경은 장관의 수축-이완 혼합작용에 관여하고 있다. 어류의 약물 수용체에 대한 연구는 Nilsson 과 Fange¹⁹이 경골어류의 일종인 Gadus morhua의 위장절편에서 ACh에 의해 나타난 강렬한 수축작용이 콜린성 차단제인 atropine 및 hyoscine에 의해서 억제됨을 관찰하고 콜린성 수용체의 존재를 지적하였다. 한편 Holmgren et al²⁰은 무지개송어 장관에는 비아드레날린성-비콜린성(NANC) 수용체도 존재함을 제안하였다. 그 후 Burka et al²¹는 무지개송어 장관 절편이 carbachol (CaCh) 과 5-hydroxytryptamine (5-HT)에 의해 용량 의존적으로 수축반응이 증가되었고, 이들의 반응이 각각 무스카린성 차단제인 atropine과 세로토닌성 차단제인 ketanserin에 의해서 억제되었으나 절차단제인 hexamethonium과 신경 전도차단제인 tetrodotoxin에 의해서는 영향을 받지 않음으로써 무스카린성 및 세로토닌성 수용체가 존재한다고 보고하였다. 그러나 아직까지 포유류의 장관수축에 깊이 관여하는 histamine이 어류의 장관에 수축을 일으킨다는 보고는 접한 바가 없다. 뿐만 아니라 최근 약물 수용체이론이 진전됨에 따라 장관수축에 관여하는 수용체의 미세분류가 포유류에서 잘 밝혀져 있

는데^{22,23}. 어류의 장관운동에서도 이러한 수용체의 미세분류도 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 실험에서는 우리나라에서 다량 양식되고 있는 이스라엘잉어의 장관 평활근에서 약물 수용체에 관한 연구가 국내외적으로 전무함에 착안하여, 이스라엘잉어의 장관에서 콜린성, 세로토닌성의 존재를 밝히고 이들 수용체의 subclass를 최근에 개발된 선택적 효능제 및 길항제를 이용하여 미세분류하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 본 실험에 사용된 동물은 충남 금강 상류 양식장에서 사육된 900-1200 g (체장 25-30 cm)의 이스라엘잉어를 실험실에서 7 일간 건강상태를 확인한 후 실험전 24 시간 절식시킨 후 실험에 공시하였다.

실험약물 : 본 실험에 사용된 약물은 실험 당일 Krebs 용액에 용해하여 stock solution을 만들어 이를 회석하여 사용하였다. 사용약물은 다음과 같다. 콜린성 약물로는 acetylcholine chloride(Sigma)를 사용하였으며 특히 선택적인 콜린성 약물로는 M₁ 효능제(4-hydroxy-2-butynyl) trimethylammoniumchloride m-chlorocarbanilate(McN-A-343)(RBI)를 이용하였으며 니코틴성 약물로 nicotine (Sigma)을, 그리고 무스카린성 길항제로는 atropine sulfate(Sigma)와, 선택적인 M₂ 길항제 4-diphenyl-acetoxy-N-methylpiperidine (4-DAMP)(RBI)를, 그리고 니코틴성 길항제인 hexamethonium bromide(Sigma)와 decamethonium bromide(Sigma)를 이용하였다. 또한 세로토닌성 약물로는 5-hydroxytryptamine(Sigma)과 선택적인 5-HT₁ 길항제인 spiperone(RBI), 5-HT₂ 길항제인 ketanserin (RBI) 그리고 5-HT₃ 길항제인 3-tropanyl-3-5-dichlorobenzoate(MDL-72222)(RBI)를 사용하였다.

이스라엘잉어의 장관표본 제작 및 현수 : 이스라엘잉어의 두부를 절단하여 치사시킨 후 신속하게 장관을 적출하여 95% O₂-5% CO₂ 가스가 연속 공급되는 Krebs 용액이 담긴 용기에서 2 cm의 장관 절편을 만든 후, 온수성 어류의 최적수온으로 알려진 25°C²⁵가 유지

되는 organ bath에 넣고 조직의 한쪽 끝을 organ both 저부의 hook에 고정하고 다른 한쪽 끝은 등장성 변환기(T3 isotonic/auxotonic transducer)에 1.5 g의 부하장력을 주어 1 시간 이상 평형을 유지시킨 후 사용약물을 첨가시켜 생리기록기(Oscillograph Washington MD4: BioScience, UK)에 묘기했다. 온도에 따른 장관운동의 변화를 알아보기 위해 15°C가 유지되는 조건에서 같은 방법에 의해 장관운동을 묘기하였다.

약물 첨가 방법 : Organ bath에서 장관 절편을 1 시간 이상 평형시킨 후 각 약물이 나타낼 수 있는 최고 반응의 70% 정도를 나타내는 용량에 3 분간 노출 시킨 후에 3 회 수세함으로써 약물에 대한 장관 수용체의 과감작이나 탈감작을 방지하였다²⁶. 약물에 대한 장관 수축운동의 용량-반응곡선을 구하기 위하여, 위의 장관절편을 20 분 정도 다시 평형시킨 후 사용약물을 Van Rossum^{27,28}의 방법에 따라 누적적으로 첨가하였다. 이 때 첨가된 최종약물의 용량이 organ bath에 담긴 Krebs 용액 용량의 7% 을 초과하지 않도록 하였고²⁶, 약물 첨가 시간 간격은 해당용량의 반응을 충분히 확인하기 위해 5 분으로 하였다^{26,29}.

약물의 50% 반응용량 (pD_2)의 측정 : 각 효능제에 대한 용량-반응 곡선을 작성한 후 최대반응의 50%에 해당하는 용량을 Van Rossum 방법에 의해 구하였으며, 이에 의해 각 효능제의 상대적인 potency를 비교하였다^{30,31}. 한편 길항제를 미리 전처치한 후에 나타난 효능제의 50% 반응 용량의 변동을 측정하였다.

경쟁적 길항작용을 가진 길항제의 pA_2 측정 : 효능제의 용량-반응 곡선이 길항제의 전처치에 의해 우측으로 평행 이동이 되며 그 최대반응이 길항제의 존재에 의해 변화되지 않은 경우에, 3 개 용량의 길항제에 대한 효능제의 용량-반응 곡선을 작성한 후 각각의 pD_2 의 비 (dose-ratio)를 계산하여 Schild의 방법³²에 의해 pA_2 를 구하였다.

비경쟁적 길항작용을 가진 길항제의 dissociation constant 측정 : 효능제의 용량-반응 곡선이 길항제의 전처치에 의해 pD_2 는 거의 변화되지 않으나 그 최대반응이 현저하게 저하되는 경우, 길항제는 비경쟁적 억제 작용을 가지고 있으므로 pA_2 는 측정할 수가 없다. 이럴 경우에 비경쟁적 길항제의 해당 수용체에 대한 상대적 친화성은 해리상수에 의해 구할 수가 있다³⁰.

약물반응의 평가 및 통계처리 : 각 약물에 대한 장관의 수축반응을 polygraph에 표기하여 그 변화 폭을 mm로 표시하였고, 각 약물의 효능은 ACh과 CaCh의 최대반응에 대한 비율로써 비교 평가하였다. 각 실험군에서 얻은 반응에 대한 수치는 mean \pm SEM으로 나타되었으며, Student의 unpaired t-test를 이용하여 통계

학적으로 유의성을 검정하였다.

결 과

ACh의 장관 수축반응에 대한 atropine, decamethonium, hexamethonium의 영향 : ACh은 이스라엘잉어 장관 평활근에서 뚜렷한 수축반응을 나타내었다(Fig 1). 그러나 그 용량-반응곡선은 포유류에서 일반적으로 관찰되는 것과는 다르게 이분상(biphasic) 형태를 보였다. 즉, 10^{-8} M과 10^{-3} M 사이에서 용량 의존적으로 반응이 증가하는 양상을 보여주었고, 낮은 용량 수준인 10^{-16} M과 10^{-13} M 사이에서도 용량 의존적인 수축 반응을 나타내었다. 이때 낮은 용량 수준에서 나타난 최대수축반응은 높은 용량에서 나타난 최대수축반응의 약 30% 정도에 해당되었다(Fig 1). ACh의 최소 유효용량은 15.35 ± 0.14 이었고, pD_2 는 5.36 ± 0.14 로 계산되었다. 무스카린 성 수용체 길항제인 atropine은 ACh에 의한 이스라엘 장관의 수축반응을 억제하였으며(Fig 2), 이러한 억제 양상은 atropine의 용량을 증대시켰을 때 더욱 증가하였으며, atropine 용량이 10^{-9} M, 3×10^{-9} M에서 각각의 최고수축반응은 77%, 64%, 49%로 나타났다. 이때 ACh의 pD_2 는 각각 5.30 ± 0.12 , 5.25 ± 0.18 , 5.29 ± 0.32 로 변화가 관찰되지 않아 이스라엘잉어 장관에서 atropine은 ACh에 대해 비경쟁적인 억제양상을 보여주었다. 그리고 니코틴성 수용체 길항제인 decamethonium은 ACh의 pD_2 나 최고 수축반응에는 영향을 주지 않았다(Table 1).

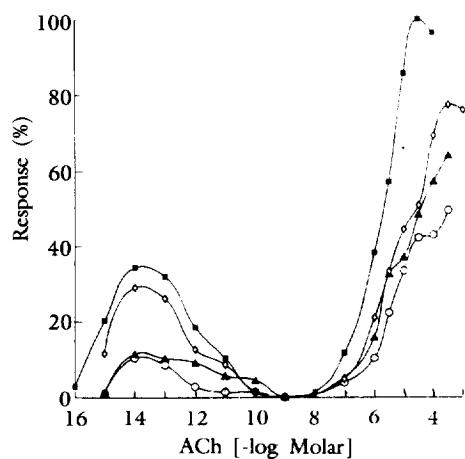


Fig 1. Mean dose response curves for ACh in isolated Israeli carp intestinal smooth muscle in the absence (■) and presence of atropine 10^{-9} M (○), 3×10^{-9} M (▲) and 10^{-8} M (◆), respectively (25°C).

Table 1. Effects of cholinergic antagonists on the response of ACh in Israeli carp intestinal smooth muscle at 25°C (mean values \pm SEM)

	Atropine (M)				Decamethonium (M)				Hexamethonium (M)			
	0	10^{-9}	3×10^{-8}	10^{-8}	0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
pD ₂	5.60 ± 0.11	5.30 ± 0.21	5.25 ± 0.15	5.29 ± 0.32	5.74 ± 0.22	5.35 ± 0.11	5.52 ± 0.20	5.60 ± 0.28	5.56 ± 0.04	5.52 ± 0.15	5.32 ± 0.17	5.24 ± 0.25
Max resp	17.11 ± 1.70	12.33 ± 2.80	10.96* ± 2.27	8.47 ± 2.29	16.31 ± 1.67	16.57 ± 1.85	18.53 ± 1.32	15.53 ± 2.76	15.50 ± 2.65	17.73 ± 2.26	16.16 ± 1.03	15.56 ± 1.41
n	18	6	6	8	8	6	6	6	7	5	6	5
K _i	7.14×10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pD₂ : negative log molar conc. to produce half maximal effect.

Max resp : maximal response in mm.

n : the number of observations.

K_i : antagonist dissociation constant.

Statistically significant difference ($p < 0.005$)

CaCh의 장관수축반응에 대한 atropine, 4-DAMP, decamethonium, hexamethonium의 영향 : CaCh은 이스라엘잉어 장관 평활근에서 뚜렷한 수축반응을 나타내었다. 그러나 CaCh은 ACh과는 다르게 이스라엘 잉어 장관 평활근에서 10^{-9} M과 10^{-5} M 사이의 용량에서만 용량 의존적으로 뚜렷한 수축반응을 나타내었으며, ACh에서 보여준 최대수축반응과 동일한 수준의 반응을 보여주었다(Fig 3). CaCh의 최소 반응 용량(-

log M)은 9.05 ± 0.080 이었고, pD₂는 6.52 ± 0.15 로서 ACh과 비교시 상대적인 potency가 큰 것으로 나타났다(Table 2). CaCh의 반응에 대해 무스카린성 수용체 길항제인 atropine은 ACh에서와 달리 10^{-9} M, 3×10^{-8} M, 10^{-8} M에서 용량 의존적으로 CaCh의 용량반응곡선을 오른쪽으로 이동시켰으며(Fig 4), 이때의 pD₂치는 각각 5.92 ± 0.12 , 5.52 ± 0.20 , 5.10 ± 0.32 으로 (Table 2), 그 억제양상은 경쟁적이었다. CaCh에 대한 atropine의 pA₂ 치는 9.52 ± 0.14 로 나타났고 기울기는

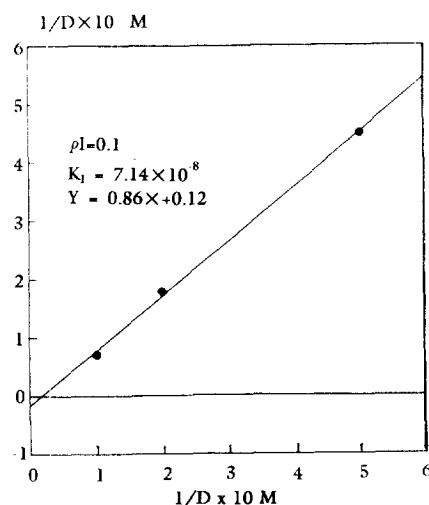


Fig 2. Double reciprocal plot $1/D$ vs. $1/D' \times 10$ for atropine on Israeli carp intestinal smooth muscle using ACh as agonist (25°C). Correlation coefficient (r)=0.99. p : the fraction of receptors bound by antagonist.

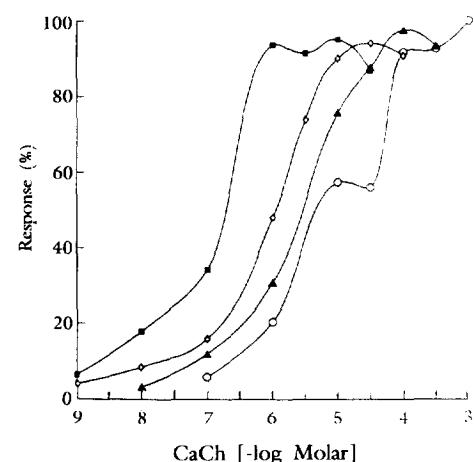


Fig 3. Mean dose response curves for CaCh in isolated Israeli carp intestinal smooth muscle in the absence (■) and presence of atropine 10^{-9} M (□), 3×10^{-8} M (▲) and 10^{-8} M (○), respectively (25°C).

0.93, 상관계수는 0.99로 높은 상관관계를 보여주었다 (Fig 4). 선택적인 M_2 수용체 길항제인 4-DAMP는 용량의존적으로 CaCh의 용량반응곡선을 오른쪽으로 평행이동시켰으며 (Fig 5), 이 때 CaCh의 pD_2 는 각각 6.00 ± 0.27 , 5.07 ± 0.13 , 4.82 ± 0.29 이었다 (Table 2). CaCh에 대한 4-DAMP의 pA_2 치는 8.16 ± 0.09 이었으며, 기울기는 0.97, 상관계수(r)는 0.98이었다 (Fig 6).

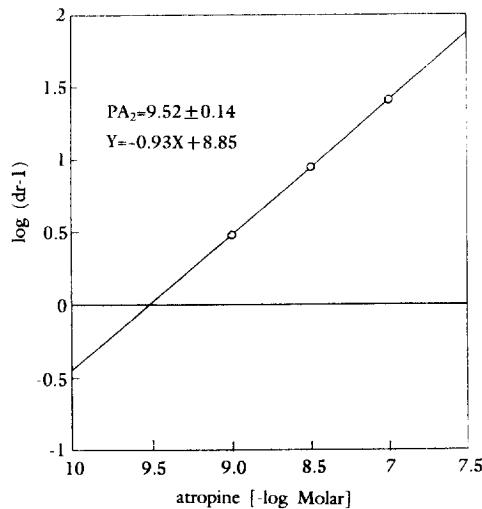


Fig 4. Schild plot for atropine on Israeli carp intestinal smooth muscle using CaCh as agonist (25°C). Correlation coefficient(r)=0.98.

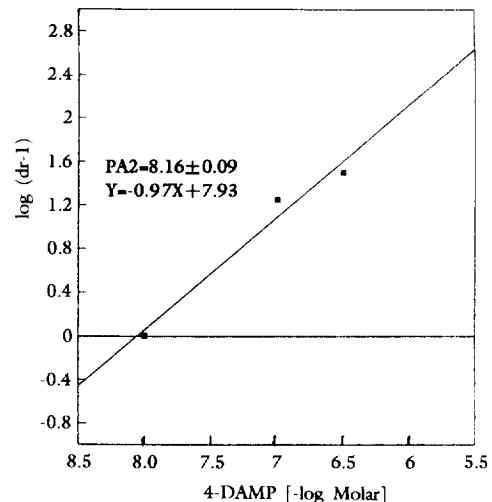


Fig 6. Schild plot for 4-DAMP on Israeli carp intestinal smooth muscle using CaCh as agonist (25°C). Correlation coefficient (r)=0.98

5-hydroxytryptamine (5-HT)의 장관수축반응에 대한 ketanserin, spiperone, MDL-72222의 영향 : 5-HT는 이스라엘 잉어 장관 평활근에서 수축반응을 보여주었다 (Fig 7). 5-HT는 10^{-8} M과 10^{-5} M 범위에서 이스라엘 잉어의 장관 평활근의 자동성 수축반응을 증가시켰으나, 그것의 최고반응은 ACh과 CaCh에 의한 최고반응의 약 50% 정도에 지나지 않았으며, 이 때 5-HT의 pD_2 치는 6.36 ± 0.19 로서 CaCh과는 거의 유사한 수치

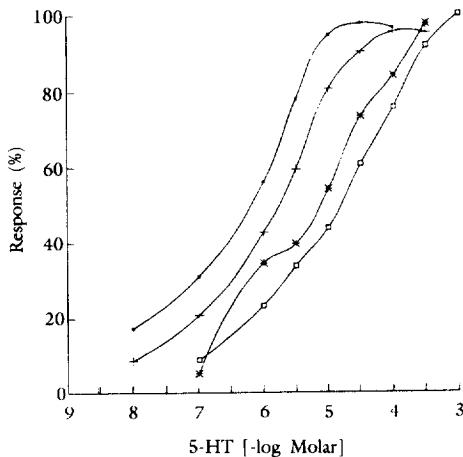


Fig 5. Mean dose response curves for CaCh in isolated Israeli carp intestinal smooth muscle in the absence(■) and presence of 4-DAMP 10^{-8} M (+), 10^{-7} M (▲) and 3×10^{-7} M (○), respectively

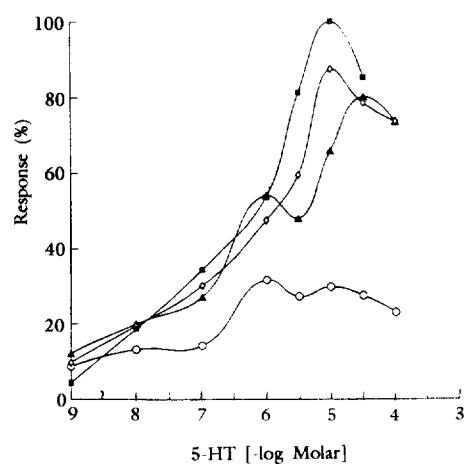


Fig 7. Mean dose response curves for 5-HT in isolated Israeli carp intestinal smooth muscle in the absence(■) and presence of ketanserin 10^{-7} M (+), 10^{-6} M (▲) and 3×10^{-6} M (○), respectively

Table 2. Effects of cholinergic antagonists on the response of CaCh in Israeli carp intestinal smooth muscle at 25°C (mean values \pm SEM)

	Atropine (M)				4-DAMP (M)				Decamethonium (M)			Hexamethonium (M)		
	0	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	0	10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	0	10^{-5}	10^{-4}	0	10^{-4}	10^{-3}
pD ₂	6.52	5.92*	5.5**	5.10**	6.35	6.00	5.07***	4.82***	6.64	6.72	6.66	6.57	6.46	6.54
	± 0.18	± 0.12	± 0.20	± 0.32	± 0.06	± 0.27	± 0.13	± 0.28	± 0.25	± 0.16	± 0.21	± 0.17	± 0.24	± 0.15
Max resp	16.40	16.22	16.82	17.25	17.35	16.96	17.33	17.76	14.50	15.50	16.25	15.50	16.25	15.25
n	12	8	8	7	8	6	5	6	4	3	4	4	4	4
pA ₂	9.52 ± 0.14				8.16 ± 0.09									

pA₂ : negative log molar conc of antagonist under 2 times agonist conc for the same effect.

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Table 3. Effects of serotonergic antagonists on the response of 5-HT in Israeli carp intestinal smooth muscle at 25°C (mean \pm SEM)

	Ketanserin (M)				Spiperone (M)			MDL-72222 (M)		
	0	10^{-7}	10^{-6}	5×10^{-6}	0	3×10^{-7}	10^{-6}	0	3×10^{-7}	10^{-6}
pD ₂	6.40	6.55	6.37	6.70	6.29	6.37	6.10	6.38	6.59	6.74
	± 0.17	± 0.14	± 0.22	± 0.27	± 0.11	± 0.18	± 0.25	± 0.13	± 0.25	± 0.19
Max resp	8.65	7.57	6.94	2.58*	9.23	9.50	8.53	8.76	8.50	8.96
n	10	6	7	7	6	4	6	5	4	5
K _i	7.8×10^{-4}									

K_i : antagonist dissociation constant.

n : the number of observations.

Max resp : maximal response in mm

* P<0.05

로 나타났으나 ACh의 pD₂치보다는 높았다(Table 3). 5-HT에 의한 장관의 수축반응은 선택적인 5-HT₂ 길항제인 ketaserin을 10^{-7} M과 10^{-6} M 전처치하였을 때 5-HT 반응의 억제정도는 크지 않았으나, 5×10^{-6} M에서는 현저한 억제양상을 관찰할 수 있었다(Fig 8). 이스라엘 잉어 장관 절편에서의 5-HT의 최대 수축반응은 ketanserin이 0M, 10^{-7} M, 10^{-6} M 및 5×10^{-6} M에서 각각 8.65, 7.57, 6.94 및 2.58 mm이었으며, 5-HT의 pD₂치는 각각 6.36, 6.55, 6.37 및 6.70로 변화가 없음을 미루어 보아, ketaserine은 5-HT에 대해 비경쟁적으로 작용하였다 (Table 3). Ketanserin의 해리상수는 $7.80 \times 10^{-4} M$ 이었고, 기울기는 1.07, 상관계수(r)는 0.99로 높은 상관 관계를 나타내었다(Fig 7). 이스라엘 잉어 장관에 분포하는 5-HT의 수용체의 세분류를 확인하기 위해 5-HT₁ 수용체 선택적 길항제인 spiperone(3×10^{-7} M까지)과 5-HT₃ 수용체

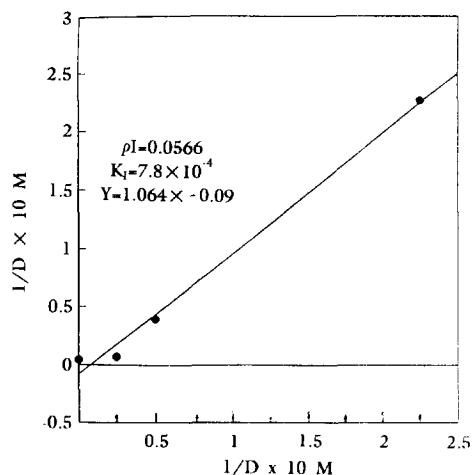


Fig 8. Double reciprocal plot $1/D$ vs. $1/D$ for ketanserin on Israeli carp intestinal smooth muscle using 5-HT as agonist (25°C). Correlation coefficient (r)=0.99. pI : the fraction of receptors bound by antagonist.

체 선택적 길항제인 MDL-72222(3×10^6 M까지)를 전처치 하였으나 5-HT 반응에 아무런 영향을 미치지 않았다 (Table 3).

고 칠

어류의 장관운동은 포유류에서와 같이 자율신경의 자극과 장관 조직층에 있는 intrinsic nervous system (Auerbach's plexus 및 Meissner's plexus)에 의해서 조절된다^{11-15, 26, 32}. Burnstock¹⁶는 경골어류에 속하는 강송어의 위장에는 미주신경이 분포하고 장관에는 미주신경과 내장신경이 분포되어 있고 이들 신경의 기능은 콜린성으로서 흥분시 장관수축이 일어난다고 보고하였다. 그러나 어종에 따라 위장관에 분포하는 미주신경 및 내장신경이 기능적으로 콜린성이 아닌 신경도 있는 것으로 알려져 있다^{17, 18}. 따라서 어류의 위장관에는 콜린성 수용체뿐만 아니라 비콜린성-비아드레날린성 수용체도 존재하고 있음이 제안되고 있다²⁰. 그러나 어종에 따른 각 약물 수용체에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 포유류의 콜린성 수용체는 일반적으로 무스카린성과 니코틴성으로 분류되고 있으나 최근에 특이적 길항제 사용이 가능해짐에 따라 무스카린성 수용체를 M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ subclass로^{24, 33, 34}, 그리고 니코틴성 수용체는 N_C, N_M³⁵로 세분류되고 있다. 한편 어류의 장관에 분포하는 콜린성 수용체에 관한 연구는 강송어의 장관 평활근에서 니코틴이 10⁻⁷ 과 10⁻⁴ g/ml 사이의 용량범위에서 강한 장관 수축반응을 일으키고 이러한 수축반응은 니코틴성 길항제인 hexamethonium에 의해 효과적으로 억제됨에 따라 니코틴성 수용체의 존재가 제안된 바 있다⁶. Edwards¹⁴는 ACh에 의한 가자미의 위장 수축운동이 무스카린성 길항제인 atropine에 의해 전형적으로 억제됨을 보고하여 무스카린성 수용체의 존재를 시사하였다. Burka et al²¹은 무지개송어 장관에 분포하는 무스카린성 수용체의 세분류에 대한 연구 결과, 이 어류의 장관에 분포하는 무스카린성 수용체를 M₂라고 보고하였다. 본 연구는 여러 어종의 장관에 분포하는 수용체의 상이함에 착안하여 아직까지 연구되지 않은 이스라엘잉어 장관 절편에서 콜린성 약물인 ACh 과 CaCh의 처리시 용량의존적으로 수축반응 (Fig 1, Fig 3)을 나타냄으로써 이스라엘잉어의 장관에서도 다른 어류와 마찬가지로 콜린성 수용체가 존재함을 알 수 있었다. 그러나 특이하게도 이스라엘잉어 장관에 대한 ACh의 반응은 pM 과 μ M수준에서 각각의 용량-반응곡선을 나타내는 이분상(biphasic)의 특성을

가지고 있음(Fig 1)을 관찰할 수 있었다. 이러한 ACh에 의한 어류장관에서의 이분상 반응은 가자미 위장에 서도 보고되어 있다¹¹. 이러한 현상은 포유류에서는 보고가 되어있지 않는 것으로 이스라엘잉어의 장관에는 ACh에 대해 천화도가 상이한 subtype 수용체의 존재를 암시하고 있다. 한편 콜린성 길항제인 atropine의 전처치에 의해 ACh 과 CaCh의 반응이 모두 억제되어 콜린성 수용체를 재확인할 수 있었으나 억제되는 양상이 ACh와 CaCh사이에는 차이점이 있었다(Fig 1, Fig 3). 즉 atropine에 의해 ACh의 반응은 비경쟁적으로 억제된 반면, CaCh의 반응은 경쟁적으로 억제되었다. 이러한 결과는 선택적 M₂길항제인 4-DAMP에 의해서도 동일한 현상을 보였다(Fig 4). 포유류에 있어서 atropine은 콜린성 약물의 반응을 경쟁적으로 억제한다는 사실과 비교해볼 때 어류 장관의 콜린성 수용체는 포유류의 그것과는 상이할 수 있음을 시사하고 있다. 또한 이러한 결과는 Burka et al²¹이 무지개송어의 장관에서 콜린성 약물 CaCh의 atropine에 의해 비경쟁적으로 억제됨을 보고한 사실과 일치하고 있다. 따라서 어류의 장관 수용체는 포유류³⁶⁻⁴⁰의 장관 수용체와는 다르며 어류 상호간에도 장관 수용체의 분포가 같지 않음을 알 수 있다. 또한 이스라엘잉어의 장관에 분포하고 있는 M₁ 선택적 효능제인 McN-A-343에 의해서는 수축효과가 없었으며, 장관수축이 선택적 M₂ 수용체 길항제인 4-DAMP에 의해 억제되는 것으로 미루어 보아 이스라엘잉어 장관에 분포하는 콜린성 수용체는 무스카린성 M₂ 수용체일 것으로 사료된다.

포유류의 장관을 강력하게 수축시키는 것으로 알려진 5-HT⁴¹⁻⁴⁵는 강송어¹⁶ 및 무지개송어²¹의 장관에서도 현저한 수축반응을 보고하였다. 5-HT 수용체는 최근 Gaddum과 Picarelli⁴³에 의해 처음으로 5-HT 수용체가 M, D 두형태의 수용체로 존재한다고 보고된 이래 현재 까지 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ 세 종류의 수용체가 알려지고 있다⁴². 본 실험에서 5-HT₁가 이스라엘잉어 장관에서 용량의존적으로 장관 평활근을 수축시켜 세로토닌성 수용체가 존재함을 알 수 있었다. 그러나 세로토닌은 ACh 과 CaCh에 비해 그 효능이 약 50%에 불과하여, 포유류^{44, 45} 및 무지개송어²¹와 비교할 때 상이한 결과를 얻었다. 이스라엘잉어 장관에 분포하는 세로토닌성 수용체의 미세분류를 하기 위해 선택적인 5-HT₂ 길항제인 ketanserin를 전처치하였을 때 5-HT반응이 효과적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 한편 선택적인 5-HT₁ 길항제인 spiperone 과 5-HT₃ 길항제인 MDL-72222는 5HT에 의한 이스라엘잉어 장관의 수축운동에 하등의 영향을 주지 않았기 때문에 이스라엘잉어의

장관운동에 관여하는 세로토닌성 수용체는 5-HT₂임을 추정하였다. 이러한 결과는 무지개송어²¹의 장관에 세로토닌성 수용체인 5-HT₂가 존재한다는 결과와 동일하였다. 이상의 연구 결과를 종합하면 이스라엘잉어 장관 평활근은 외부에서의 신경이 절단된 후에도 자동성 수축반응이 나타나 포유류에서와 마찬가지로 intrinsic nerve system이 존재함을 추정할 수 있었고 또한 이스라엘잉어의 수축반응에는 콜린성 및 세로토닌성 수용체가 관여하였다. 특히 콜린성 및 세로토닌성 선택적 길항제를 사용함으로써 이스라엘잉어 장관 수축에 관여하는 콜린성 수용체는 무스카린성 M₂이며, 세로토닌성 수용체는 5HT₂일 것으로 추정하였다. 본 연구에서 밝혀진 이스라엘잉어 장관에 분포하는 수용체의 세 분류에 관한 연구는 향후 receptor-binding assay나 생화학적 연구를 추구하여 보완되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

이스라엘잉어 장관 운동에 관여하는 약물 수용체의 특성을 구명하기 위해 적출장관 절편을 이용하여 장관의 수축반응에 관여하는 것으로 알려진 여러 수축제의 용량-반응 곡선을 구하여 50% 반응용량 (pD_2)을 결정하였다. 아울러 각종 수축제에 대한 길항제의 pA_2 및 K_i 를 구함으로써 이스라엘잉어 장관에 분포하는 약물 수용체의 특성을 더욱 추구하여 보았다. 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 이스라엘잉어 장관에서 ACh은 이분상의 용량-반응 곡선을 나타내었다. 즉, μ M수준에서 용량의존적인 수축 반응을 나타내어 10^{-1} M에서 peak를 보였다가 용량을 증가시킴에 따라 반응이 저하되다가 다시 μ M 수준에서 용량의존적인 수축반응을 나타나 3×10^{-5} M에서 peak를 보았다.

2. 이스라엘잉어 장관에서 CaCh은 10^9 ~ 10^5 M 용량에서 용량의존적인 수축반응을 나타내었으며 CaCh의 pD_2 치 (5.63 ± 0.14)보다 크게 나타났고, ACh과 CaCh은 동등한 최고수축반응을 나타내었다. 니코틴은 이스라엘잉어의 장관 수축반응에 영향을 주지 않았다.

3. ACh의 반응은 무스카린성 길항제인 atropine에 의해서 비경쟁적으로 억제된 반면 ($K_i: 7.14 \times 10^{-8}$ M), CaCh의 반응은 atropine ($pA_2: 9.52 \pm 0.14$)과 선택적인 M₂ 길항제인 4-DAMP ($pA_2: 8.16 \pm 0.09$)에 의해서 각각 경쟁적으로 억제되었다. 니코틴성 길항제인 decamethonium과 hexamethonium은 ACh과 CaCh의 반응에 영향을 주지 않았다. 따라서 이스라엘잉어의 장관

운동에 관여를 하는 콜린성 수용체는 M₂ 수용체로 사료되었다.

4. 5-HT (serotonin)은 이스라엘잉어 장관 평활근에 용량의존적으로 수축반응을 일으켰으며 (10^8 ~ 10^5 M), 최고수축반응은 ACh과 CaCh에 의한 반응의 50% 정도에 지나지 않았다. 5-HT에 의한 장관의 수축반응은 선택적인 5-HT₂ 길항제인 ketanserin에 의해 비경쟁적으로 억제되었으나 ($K_i: 7.8 \times 10^{-4}$ M), 선택적인 5-HT₁, 5-HT₃ 길항제인 spiperone (10^{-6} M까지)과 MDL-72222 (10^{-6} M까지)에 의해서 억제되지 않았기 때문에 이스라엘잉어의 장관 평활근에는 5-HT₂ 수용체가 존재하는 것으로 추정하였다.

참 고 문 헌

1. Loewi O, Navratil E. Über humorale Übertraghakeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflüger Arch Gesamte Physiol* 1926; 114: 678-688.
2. Wood JD. Intrinsic neural control of intestinal motility. *Ann Rev Physiol* 1983; 43: 33-51.
3. Gershon MD, Erde SM. The nervous system of the gut. *Gastroenterology* 1981; 80: 1571-1594.
4. Kazie T. Effect of adrenergic factors on peristalsis and acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* 1971; 16: 367-373.
5. Costa M, Furnesis JB. The site of action at 5-H₁ in nerve muscle preparations from guinea-pig small intestine and colon. *Br J Pharmacol* 1979; 65: 237-248.
6. Sarna S, Stodard C, Belbeck L, et al. Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complex. *Am J Physiol* 1981; 241: 616-623.
7. Ash ASF, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol* 1966; 27: 427-439.
8. Peroutka SJ. 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Rev Neurosci* 1988; 11: 45-60.
9. Campbell G, Gibins IL. Nonadrenergic, noncholinergic transmission in the autonomic nervous system: Purinergic nerves. In: Kalsner S, ed. *Trends in Autonomic Pharmacol* Vol 1. Baltimore:Urban & Schwarzenberg, 1979; 103-143.
10. Pernow B, Substance P. *Pharmacol Rev* 1983; 35:

- 85-141.
11. Edwards DJ. Reactions of the isolated plaice stomach to applied drugs. *Comp Gen Pharmac* 1972; 3: 345-358.
 12. Burnstock G. Reversible inactivation of nervous activity in a fish gut. *J Physiol* 1958; 141: 35-45.
 13. Grove DJ, Campbell G. Effects of extrinsic nerve stimulation on the stomach of the flathead, *Platycephalus bassensis cuvier and valenciennes*. *Comp Biochem Physiol* 1978; 63C: 373-380.
 14. Edwards DJ. Electrical stimulation of isolated vagus nerve-muscle preparations of the stomach of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Comp Gen Pharmac* 1972; 3: 235-242.
 15. Young JZ. Nervous control of stomach movements in dogfishes and rays. *J Mar Biol* 1980; 60: 1-17.
 16. Burnstock G. The effect of drugs on spontaneous motility and on response to stimulation of the extrinsic nerves of the gut of a teleostean fish. *Brit J Pharmacol* 1958; 13: 216-226.
 17. Campbell G. Inhibitory vagal innervation of the stomach in fish. *Comp Biochem Physiol* 1975; 50C: 169-170.
 18. Stevenson SV, Grove DJ. The extrinsic innervation of the stomach of the plaice *Pleuronectes platessa* L. 1. The vagal nerve supply. *Comp Biochem Physiol* 1977; 58C: 143-151.
 19. Nilsson S, Fange G. Adrenergic and cholinergic vagal effect on the stomach of a teleost (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol* 1969; 30: 691-694.
 20. Holmgren S, Nilsson S. On the non-adrenergic, non-cholinergic innervation of the rainbow trout stomach. *Comp Biochem Physiol* 1981; 70C: 65-69.
 21. Burka JF, Braund HA, Blair RMJ. The effects of temperature on contractile mechanisms of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) intestine. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68: 700-704.
 22. Steinbach JH, Ifune C. How many kinds of nicotinic acetylcholine receptors are there. *Trends Neurosci* 1989; 12: 3-6.
 23. Parker RB. Measurement of drug-receptor dissociation constants of muscarinic agonist on intestinal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 180: 62-70.
 24. Pedder EK, Phike E, David P, et al. Modulation of the structure-binding relationships of antagonists for muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1516-1567.
 25. 김인배. 국내 양식 어업의 현황과 내수면 양어를 위한 사료 개발 전망. *대한수의학회지*. 1988; 28: 3-12.
 26. Ian K. Textbook of in vitro practical pharmacology. London: Blackwell Scientific Publications 1984; 1-87.
 27. Van Rossum JM, Van den Krink FG. Cumulative dose-response curves. I. Introduction to technique. *Arch Int Pharmacodyn* 1963; 143: 240-246.
 28. Van Rossum JM, Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose response curves in isolated organ and evaluation of drug parameter. *Arch Int Pharmacodyn* 1963; 143: 299-330.
 29. Bjorn R. Determination of dissociation constant and relative efficacies of oxotremorine analogs at muscarinic receptors in the guinea-pig ileum by pharmacological procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229: 259-270.
 30. Kenakin TP. Pharmacologic analysis of drug receptor interaction. New York : Raven Press Books Ltd. 1986; 227-242.
 31. Ronald JT, Leonard SJ. The dose-response relation in pharmacology. New York : Springer-Verlag Inc 1980; 49-110.
 32. Guyton AC. Textbook of medical physiology. 6th ed. Philadelphia : WA Saunders Co, 1981; 138-800.
 33. Minneman KP. α -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol Rev* 1980; 40: 87-119.
 34. Frank D, Jorgen WLE, Reinhold T, et al. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 727-733.
 35. William BP, Palmer T. Principles of drug action. 3th ed. New York : Churchill Livingstone, 1990; 103-200.
 36. Birdsall NJW, Hulme EC. Muscarinic receptor subclasses. In : Lamble JW, Abbott AC ed, *Receptors again*, Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1984; 5-30.

37. Jim KF, Macia RA, Matthews WP. Role of receptor reserve in the inhibition of alpha-1 adrenoceptor-mediated pressor responses by calcium antagonist in the pithed rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 89-94.
38. Eglen RM, Whiting RL. Competitive and non-competitive antagonism exhibited by selective antagonists at atrial and ileal muscarinic receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1987; 90: 701-707.
39. Kenakin TP. Tissue and receptor selectivity: Similarities and differences. *Adv Drug Res* 1986; 15: 17-109.
40. Rama SBV, Cheng HC. Dissociation constants of D- and L-lactoylcholines and related compounds at cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 180: 326-339.
41. Garrison JC, Rall TW. Goodmann and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 4th ed. Vol I. New York : Pergamon Press, 1990; 578-596.
42. Bladley PB, Engel G. Commentary proposals for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacol* 1986; 25: 563-576.
43. Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptors. *Br J Pharmacol* 1957; 12: 323-328.
44. Kilbinger H, Pfeuffer FI. Two types of receptors for 5-hydroxytryptamine on the cholinergic nerves of the guinea-pig mesenteric plexus. *Br J Pharmacol* 1985; 85: 529-539.
45. Feniuk W. An analysis of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction of isolated smooth muscle. *Neuropharmacol* 1984; 23: 1467-1472.
46. Morley CS. The mesenteric-portal vein. *Pharmacol Rev* 1991; 42: 287-325.