

틸라피아 배대동맥의 콜린성 반응의 특성

최동립 · 정준기*

국립수산진흥원 서해수산연구소 군산분소

*부산수산대학교 수산과학대학 어병학과

경골어류의 혈관평활근에 대한 choline 작동성 조절기작을 규명하기 위한 목적의 일환으로 틸라피아의 배대동맥(dorsal aorta)에 대한 acetylcholine 효과와 이들 효과의 매개에 관여하는 수용체의 subtype에 대한 연구를 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. Acetylcholine은 틸라피아의 배대동맥에 대하여 농도의존적인 혈관수축반응만을 나타내었으며, 이와 같은 반응은 혈관내피세포와 methylene blue에 의해 영향을 받지 않았다.

2. Acetylcholine에 의한 농도의존적인 혈관수축반응곡선은 비선택적인 muscarine 수용체 길항제인 atropine과 선택적인 M_2 -수용체 길항제인 gallamine의 경우 그 농도가 증가함에 따라 현저하게 오른쪽으로 평행이동되었으나, 선택적인 M_1 -수용체 길항제인 pirenzepine에 의해서는 고농도($1 \times 10^{-5}M$)에서만 약간 이동되었다.

3. Acetylcholine의 수축효과는 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin에 의해 거의 영향을 받지 않았다.

4. Acetylcholine의 혈관수축반응은 calcium제거 생리적 완충용액에서는 거의 소실되었으나, calcium 유입차단제인 verapamil에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다.

이상의 실험결과에서 acetylcholine은 틸라피아 배대동맥에 대하여 내피세포와는 무관하게 혈관수축효과를 나타내었다. Acetylcholine에 의한 이 수축은 주로 M_2 -subtype의 수용체를 매개하며 receptor-linked Ca^{2+} channel을 통하여 유입된 세포질내의 Ca^{2+} 에 의해 일어난다고 사료된다.

Key words : Tilapia dorsal aorta, Cholinergic receptor, Acetylcholine, Vasoconstriction, Ca^{2+} channel

Acetylcholine은 중추신경계와 말초신경계의 중요한 신경전달물질중의 하나로서 각종 부위의 콜린성 수용체와 결합하여 흥분시키므로 그 작용이 매우 다양하다(Tayer, 1985; Wastek and Yamamura, 1981).

지금까지 전신혈관계에 있어서 포유류의 경우 아드레날린성 신경지배가 우세한 반면 경골어류에서는 콜린성 신경지배가 우세한 것으로 알려져 있다

(Burnstock, 1969; Kirby and Burnstock, 1969). 이미 송어와 무지개송어, 대서양 대구의 적출혈관에 대한 acetylcholine의 농도의존적인 혈관 수축효과로 콜린성 수용체의 존재를 확인한 바 있다(Kirby and Burnstock, 1969; Holmgren and Nilsson, 1974; Klaverkamp and Dyer, 1974). 또한 이러한 acetylcholine의 효과가 atropine에 의해 차단됨으로서 이 반응이 muscarine 수용체를 매개 하는 것으로 추

정하였다(Kirby and Burnstock, 1969; Klaverkamp and Dyer, 1974). 최근에 무지개 송어에 있어서 혈관내피세포 존재시 acetylcholine의 수축반응이 calcium ionophore A23187에 의한 이완작용으로 감소되는 반응을 나타내며, 이 반응은 cyclo-oxygenase 억제제인 methylene blue에 의해 정상적인 수축반응으로 회복되는 것으로 보고되었다(Miller and Vanhoutte, 1986). 따라서 이러한 내피세포 의존성 이완반응은 Guanylate cyclase계에 의해 매개하며, 또한 methylene blue의 효과가 meclofenate에 의해 저해받는 것으로 보아 이 반응에는 prostanoid의 생성이 연관되어 있는 것으로 추정되었다. 즉, 무지개 송어의 적출혈관에 있어서 methylene blue에 의해 회복되는 calcium ionophore A23187의 이완작용은 prostanoid가 혈관평활근의 Guanylate cyclase계를 활성화에 따른 것으로 여겨진다(Miller and Vanhoutte, 1986). 그러나 경골어류의 경우 혈관계의 콜린성 조절기전에 관한 연구는 주로 muscarine 수용체에 관한 기능적 실험을 통한 것이다. 따라서 수용체의 존재만이 확인되어 있을 뿐 수용체의 특성이나 그 subtype의 존재는 알려지지 않고 있다.

Muscarine 수용체는 절후(postganglionic) 부교감신경 섬유가 주요세포(effect cell)에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 근래에 와서 agonist와 antagonist들의 반응성의 차이를 관찰한 논문에서 muscarine 수용체에는 성질이 서로 다른 각종 subtype이 존재하는 것으로 추정되었으며, 선택적인 muscarine 수용체 차단제인 pirenzepine이 소개됨에 따라 적어도 2가지 이상의 muscarine 수용체 subtype이 제안되었다(Hammer et al., 1980). Muscarine 수용체 중 pirenzepine에 민감한 수용체를 M₁ 수용체로 구분하고, 완전차단이 되지 않는 수용체를 M₂ 수용체로 구분하였으며(Hammer and Giachetti, 1982), 이들 수용체 subtype의 분포정도가 조직의 종류에 따라 현저한 차이가 있음도 밝혀졌다(Hammer and Giachetti, 1982; Lee et al., 1992; Watson et al., 1983). 즉, 대뇌, 자율신경절, 폐에는 주로 M₁-수

용체가 분포되어 있고(Watson et al., 1986a; Watson et al., 1986b; Bloom et al., 1987), 심장, 장평활근, 방광, 외분비선에는 주로 M₂-수용체가 분포되어 있다(Lee et al., 1992; Watson et al., 1983; Brown et al., 1980; Nilvebrant, 1986). 최근에 와서는 cardio-selective muscarine antagonist인 AF-DX 116의 발견으로 이 약물에 민감한 수용체와 민감성이 낮은 수용체로 구분하였다(Giachetti et al., 1986; Hammer et al., 1986). 따라서 muscarine 수용체는 M₁, M₂ 및 M₃로 구분할 수 있으며, 이들은 pirenzepine, AF-DX 116, 4-DAMP 및 Dicyclomine의 네가지 길항제에 대한 감수성 차이에 따라 구분할 수 있다(Doods et al., 1987).

Muscarine 수용체는 포유류의 경우 세포막의 Ca²⁺-channel과 연관되어 있는 것으로 알려져 있으나(Singer et al., 1982), 경골어류에 있어서는 이에 관한 연구가 이루어지지 않고 있다. 또한 포유류의 경우에는 적출혈관을 사용한 약리학적 및 생리학적인 연구가 다수 이루어져 있으나 경골어류에 있어서는 거의 연구가 부족한 실정에 있다.

따라서 본 연구는 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 적출 배대동맥에 대한 acetylcholine과 그 각종 길항제를 사용하여 콜린성 수용체의 조절작용의 일단을 밝히고자 하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 실험어

부산수산대학교 부속 양어장에서 공급받은 평균 체중 800 g 인 암수 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)를 평균수온 22°C, 평균 용존산소 6.4 ppm, 평균 pH 7.4인 지하수에 7일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 혈관 표본제작

실험어의 두부를 강타함으로써 폐사시키고 개복한

후 척추와 함께 나란히 놓여 있는 배대동맥을 적출하였다. 적출한 혈관은 신속히 생리적 완충용액 (mM : NaCl 100 ; KCl 20 ; CaCl₂ 3.0 ; MgCl₂ 3.0 ; NaHCO₃ 30 ; glucose 5.6)이 담긴 petri dish에 옮겨 주위 결체조직을 조심스럽게 제거한 후 혈관의 길이 방향으로 절단하여 길이가 3 mm인 단편이 되게 하였다. 이중 일부 혈관에서는 stainless needle로 혈관 내벽을 부드럽게 문지름으로써 혈관내피를 제거 시켰다(Furchgott and Zawadski, 1980).

3. 실험 방법

혈관표본을 95% O₂-5% CO₂ 혼합 가스로 포화시킨 생리적 완충용액이 담긴 20ml 용적의 반응조 (organ bath) 내로 옮겨 30 gauge stainless needle로 만든 두개의 L자 모양의 고리 사이에 걸어 한쪽 끝은 지지봉에 고정하고 다른 한쪽끝은 physiograph recorder(Narco MK IV)에 연결된 Myograph force transducer(Narco F-60)에 연결하였다. 반응조 내의 온도는 30°C로 유지하고, 혈관표본은 0.5 g 의 기본 장력(resting tension)하에 90분 동안 방치함으로써 안정시켰다. 이 기간 중 반응조 내의 생리적 완충용액을 15분 간격으로 교환하였다.

안정된 혈관 표본에 대하여 1×10^{-5} M의 acetylcholine으로 30분 간격으로 2회 최대수축을 유도한 후 세척하였다. 다시 60분간 방치하여 안정시킨 다음 acetylcholine의 수축 및 이완 효과를 측정하였다.

Acetylcholine의 혈관에 대한 이완 효과를 측정하기 전에 norepinephrine(NE, 1×10^{-5} M) 으로 미리 수축시킨 후 acetylcholine을 적용하였으며, 한편 수축 효과를 관찰하기 위하여서는 전처리없이 acetylcholine농도를 단일 혹은 누적으로 증가시켜 넣었다. 혈관 표본에 대한 acetylcholine의 누적 농도-수축반응곡선(cumulative concentration-contractile response curve)은 각 농도에 대한 반응이 평형점에 도달했을 때 반응조 내의 농도를 약 3배씩 증가시켜 감으로서 얻었다. 최대 수축 반응 유도 후 세척하여 혈관표본을 기본 장력으로 회복시킨

다음 60분 간격을 두고 4번 반복하여 얻었다.

이중, 첫번째 농도 반응 곡선은 반응조 내에 다른 약물이 존재하지 않는 상태로서 대조군에 해당하며 나머지 농도 반응 곡선은 반응조 내 일정 농도의 다른 약물이 존재하는 상태로 실험군에 해당한다. 다른 약물, 즉 atropine, pirenzepine, gallamine, indomethacin등은 acetylcholine에 대한 농도 반응 곡선을 작성하기 20분전에 미리 반응조 내에 처치하였다.

한편, acetylcholine의 혈관 수축 반응과 세포내 calcium 이용과의 관계를 알아보기 위하여 단일 농도의 acetylcholine(1×10^{-6} M)에 의한 수축 반응을 얻은 후 60분간 평형을 유지한 다음 calcium을 제거한 생리적 완충용액 혹은 verapamil을 처치하여 30분간 방치한 후 두번째 수축 반응을 얻었다. Calcium제거 생리적 완충용액의 조제는 정상적인 생리적 완충용액의 조성 중 CaCl₂만 제거하였다.

4. 실험 약물

본 실험에 사용된 약물들은 다음과 같다. : Acetylcholine chloride, atropine, indomethacin, methylene blue, norepinephrine, verapamil hydrochloride(Sigma Chemical company, St. louis, MO, USA) ; gallamine tethiodide, pirenzepine dihydrochloride(Research Biochemicals Incorporated, Natick, MA, USA). Norepinephrine과 indomethacin을 제외한 모든 약물들은 사용 직전에 증류수에 녹여서 사용하였으며, Norepinephrine은 0.1N HCl용액에 녹여 증류수로 희석하여 사용하였고, indomethacin은 동일 농도의 Na₂CO₃용액에 녹여서 증류수로 희석하여 사용하였다.

5. 자료 분석

Acetylcholine 각 농도에 대한 농도 반응 곡선은 acetylcholine(1×10^{-5} M)에 의한 최대 수축 반응에 대한 백분율로서 나타내었으며, 최대 수축 반응을

나타내는 acetylcholine의 농도(EC_{50})는 개개의 누적 농도 반응곡선 상에서 보간법에 의하여 구하였다. 각 길항제의 효력을 나타내는 PA_2 ($-\log K_b$)는 아래와 같은 Schild 방정식(Arunlakshana and Schild, 1959)을 이용하여 구하였다.

$$\log(A'/A-1) = \log B - \log K_b$$

여기서 B는 길항제의 농도이며, A'와 A는 각각 길항제가 있을 때와 없을 때의 acetylcholine의 EC_{50} 값이며, K_b 는 길항제의 해리상수를 나타낸다. 모든 실험 결과는 평균값 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)로 나타내었고, 자료의 통계학적 유의성은 student's *t* test로 비교하여 *p*의 값이 0.05이하일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 혈관에 대한 acetylcholine의 효과

Acetylcholine($3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-6}$ M)은 적출 틸라피아 배대동맥에 대하여 농도 의존적인 수축반응을 나타내었으며, 이와같은 acetylcholine의 혈관수축

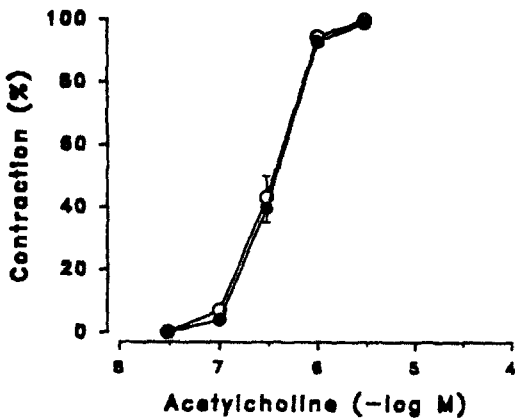


Fig. 1. The concentration-contraction responses to acetylcholine in tilapia dorsal aorta with (●, n=6) and without (○, n=6) endothelium. Values are expressed as a percentage of maximal response to acetylcholine(1×10^{-5} M). Data points are means \pm S.E.M..

반응은 내피세포의 존재유무에는 영향을 받지 않았다(Fig. 1). 혈관수축반응에 대한 acetylcholine의 역치 농도와 최고반응농도는 각각 1×10^{-7} M과 3×10^{-6} M이었으며, ED_{50} 값은 3.8×10^{-7} M이었다. 또한 acetylcholine (1×10^{-6} M)은 norepinephrine(1×10^{-6} M)으로 미리 수축시킨 혈관에 있어서는 내피세포의 존재유무에는 관계없이 이완반응을 나타내지 않았고 오히려 수축반응을 더욱 증가시켰다(Fig. 2).

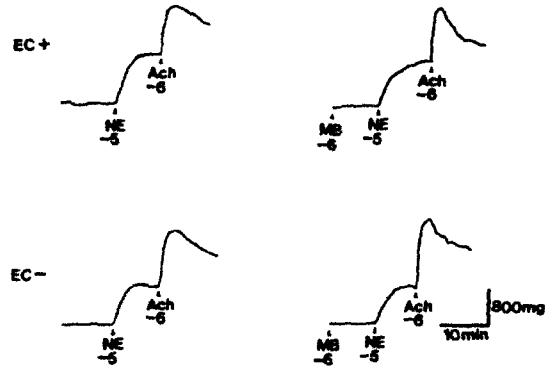


Fig. 2. The effects of acetylcholine(Ach) on the endothelium-intact and denuded aorta that were pre-contracted with norepinephrine(NE) in the absence and presence of methylene blue(MB). All concentrations are final bath concentrations and are expressed as log units. EC+ and EC- signifies endothelium-intact and denuded aortas, respectively.

2. Acetylcholine의 수축효과에 대한 muscarine 수용체 차단 영향

배대동맥의 acetylcholine의 누적농도에 의한 수축반응곡선은 비특이적 muscarine 수용체 차단제인 atropine(Fig. 3)과 선택적인 M_2 수용체 차단제인 gallamine(Fig. 4)의 농도가 증가함에 따라 오른쪽으로 평행이동되었다. Arunlakshana와 Schild 방정식에 의해 계산한 이들 차단제의 수용체에 대한 친화력(PA_2)과 기울기 값은 atropine의 경우는 7.32 ± 0.3 과 0.84 ± 0.28 이었으며, gallamine의 경우는 6.23 ± 0.26 과 0.82 ± 0.25 이었다(Table 1).

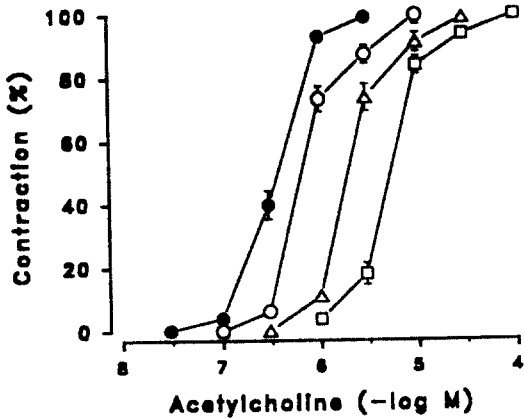


Fig. 3. Cumulative dose-response curve to acetylcholine in tilapia dorsal aorta under the absence (●) and presence of increasing concentrations (○, 10^{-6} ; △, 3×10^{-6} ; □, 10^{-5} M) of atropine. All responses are expressed as a percentage of the maximal response to acetylcholine in the absence of atropine. Data points are given as the mean \pm S.E.M. (n=6-12).

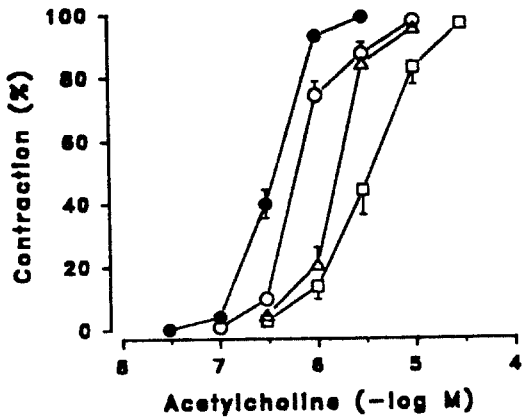


Fig. 4. Cumulative dose-response curve to acetylcholine in tilapia dorsal aorta under the absence (●) and presence of increasing concentrations (○, 10^{-6} ; △, 3×10^{-6} ; □, 10^{-5} M) of gallamine. All responses are expressed as a percentage of the maximal response to acetylcholine in the absence of gallamine. Data points are given as the mean \pm S.E.M. (n=6-12).

Table 1. Effects of muscarinic antagonists on the contractile response to acetylcholine in isolated tilapia dorsal aorta

Antagonists	pA_2^a	slope ^b
Atropine	7.32 ± 0.30	0.84 ± 0.28
Pirenzepine	5.02 ± 0.25	—
Gallamine	6.23 ± 0.26	0.82 ± 0.25

Values are given as means \pm S.E.M.

a : pA_2 values were calculated from $-\log[KB]$

b : slope of Arunlakshana-Schild plot

반면에 선택적인 M_1 수용체 차단제인 pirenzepine은 적요농도 중 가장 높은 농도(1×10^{-5} M)에서만 acetylcholine에 의한 수축반응곡선을 약간 오른쪽으로 이동되었다(Fig. 5).

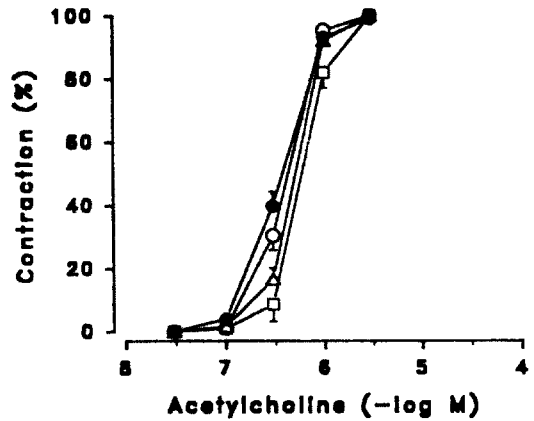


Fig. 5. Cumulative dose-response curve to acetylcholine in tilapia dorsal aorta the absence (●) and presence of increasing concentrations (○, 10^{-6} ; △, 3×10^{-6} ; □, 10^{-5} M) of pirenzepine. All responses are expressed as a percentage of the maximal response to acetylcholine in absence of pirenzepine. Data points are given as the mean S.E.M. (n=6-12).

3. Acetylcholine의 수축효과에 대한 indomethacin의 영향

Acetylcholine의 농도의존적인 혈관수축반응은,

cyclooxygenase를 억제하여 prostaglandins의 생성을 방해한다고 알려져 있는 indomethacin(1×10^{-5} M)에 의해 아무런 영향을 받지 않았다(Fig. 6).

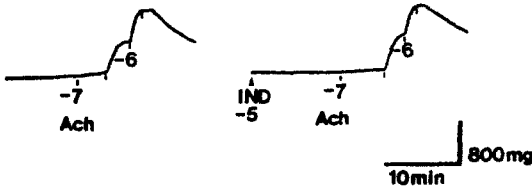


Fig. 6. Effects of indomethacin(IND) on the contractile response to acetylcholine(Ach) in isolated tilapia dorsal aorta. Indomethacin(1×10^{-5} M) did not affect the contractile response to acetylcholine. Indomethacin was treated 30 min before the second concentration-response curve to acetylcholine. All concentrations are final bath concentrations and are expressed as log units.

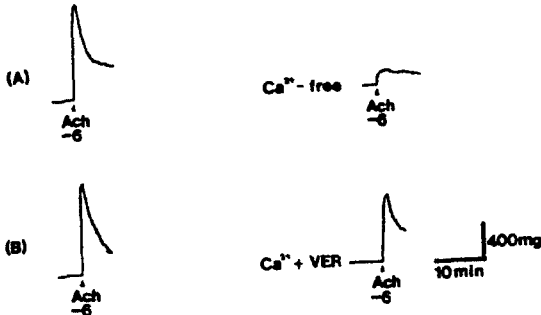


Fig. 7. Effects of Ca^{2+} -free solution(A) and verapamil(B) on the contractile response to acetylcholine(Ach, 1×10^{-6} M) in isolated tilapia dorsal aorta. Verapamil(VER, 3×10^{-6} M) was added 20 min before the second response to acetylcholine. All concentrations are final bath concentrations and are expressed as log units.

4. Acetylcholine의 수축효과에 대한 calcium 제거 생리적 완충용액과 calcium 유입 차단제인 verapamil의 영향

Acetylcholine(1×10^{-6} M)은 정상적인 생리적

완충용액 하에서는 신속하고 강한 혈관수축효과를 나타내었으나, calcium이 제거된 생리적 완충용액 하에서는 수축효과가 현저히 억제되었다. 그러나 calcium 유입 차단제로 알려진 verapamil(3×10^{-6} M)을 전처리에 의하여는 수축효과에 거의 영향을 주지 않았다(Fig. 7). 정상적인 생리적 완충용액하에서 acetylcholine(1×10^{-6} M)의 혈관수축반응을 100%로 하였을때 calcium 제거된 생리적 완충용액 하에서의 반응은 약 17%, verapamil 존재하에서의 반응은 약 80%에 해당하였다.

고 찰

일반적으로 acetylcholine은 콜린성 신경전달물질로서 포유동물의 혈관평활근에 대해서 개체의 종이나 혹은 같은 종이라도 혈관 부위에 따라서 수축(Sakai, 1981; Altieri *et al.*, 1985; Vanhoutte, 1974; Ciba and Tsukada, 1990) 또는 이완작용(Furchgott and Zawadzki, 1980; Furchgott, 1983; Luscher and Vanhotte, 1988)을 나타낸다고 알려져 있다. Acetylcholine의 혈관수축작용은 혈관평활근내 muscarine 수용체에 대한 직접작용 혹은 혈관내피 세포에 분포한 muscarine 수용체 자극에 따른 혈관수축물질(endothelium-derived contracting factor: EDCF)를 매개하는 간접적인 작용으로 구분된다(Luscher and Vanhoutte, 1986; Usui *et al.*, 1983). 한편 이완작용은 혈관내피세포의 muscarine 수용체의 자극을 통해 유리되는 혈관이완물질(endothelium-derived relaxing factor: EDRF)를 매개한다고 알려져 있다(Cherry *et al.*, 1982; Chand and Altura, 1981; Furchgott, 1984). 그러나 본 실험에서는 acetylcholine은 적출 틸라피아 배대동맥에 대해서 내피세포의 존재여부에 영향을 받지 않는 농도의존적인 수축반응을 나타내었으며(Fig. 1), 또한 norepinephrine으로 미리 수축시킨 적출 틸라피아 배대동맥에 대해서도 acetylcholine은 이완효과를 나타내지 않았으며 오히려 혈관표본의

수축반응을 더욱 증가시켰다. 이와같은 작용은 내피세포를 제거하거나 혹은 methylene blue 적용으로 영향을 받지 않았다(Fig. 2). 반면에 acetylcholine의 수축작용은 비특이적 muscarine 수용체의 차단제인 atropine에 의해 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 무지개송어의 적출 복대동맥(ventral aorta)에 대한 acetylcholine의 혈관 수축효과와 일치하였다(Miller and Vanhoutte, 1986). 그러므로 적출 틸라피아 배대동맥에 대한 acetylcholine의 혈관 수축효과는 내피세포에서 유래되는 EDRF나 혹은 EDCF와 무관하게 혈관평활근에 존재하는 muscarine 수용체에 대한 직접작용의 결과라고 사료된다. 이같은 실험 결과는 경골어류의 전신혈관에서는 혈관 평활근의 muscarine 수용체를 매개하여 강력한 콜린성 혈관 수축효과를 나타낸다는 사실과 일치하였다(Reite, 1969; Wood, 1977).

현재까지 알려진 바에 의하면 muscarine 수용체에는 성질이 서로 다른 2개 이상의 subtype이 존재하는 것으로 추정되고 있으며(Goyal and Rattan, 1978; Birdsall *et al.*, 1978), 이중 선택적인 muscarine 수용체 차단제인 pirenzepine에 대해 친화력이 큰 수용체가 M₁-수용체, 친화력이 적은 수용체가 M₂-수용체로 분류되어 있다(Hammer and Giachetti, 1982). 포유류의 혈관평활근의 반응을 매개하는 muscarine 수용체의 subtype은 내피세포에서 EDRF 유리에 관여하는 것은 M₂-subtype이며, 반면에 혈관평활근에 대한 직접적인 수축을 매개하는 것은 M₁-subtype이라고 알려져 있다(Enlen and whiting, 1985; El-Kasher and Catravas, 1987). 그러나 경골어류에서는 그 subtype이 아직까지 규명되어 있지 않다. 따라서 적출 틸라피아 배대동맥표본에 선택적인 M₁-수용체 길항제로 알려진 pirenzepine(Brown *et al.*, 1980)과 선택적인 M₂-수용체 길항제로 알려진 gallamine(Potter *et al.*, 1984)을 전처리하고 acetylcholine의 혈관수축효과에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서는 gallamine은 acetylcholine 수축효과를 억제하였으며 농도가 증

가함에 따라 acetylcholine 농도반응곡선이 오른쪽으로 평행이동되었다(Fig. 4). 반면, pirenzepine은 적용농도 중 가장 높은 농도에서만 농도반응곡선을 약간 오른쪽으로 평행이동시켰다(Fig. 5). 그리고 Schild plot을 이용하여 계산한 적용 길항제들의 친화력(pA₂) 값은 gallamine의 경우, 6.23 ± 0.26, atropine은 7.32 ± 0.3, pirenzepine은 5.02 ± 0.25를 나타내었다(Table 1). 따라서 적출 틸라피아 배대동맥에는 주로 M₂-subtype의 수용체가 분포한다고 추정할 수 있다.

콜린성 수용체의 활성은 각종 조직에서 prostaglandin 혹은 cyclooxygenase에 의한 arachidonic acid 유래 대사산물의 생성이 증가되며, 이 대사산물들이 muscarine 수용체를 통한 acetylcholine의 효과를 매개한다고 알려져 있다(Singh, 1980; El Kashaf and Catravas, 1985; Usui *et al.*, 1983; Junstad and Wennmalm, 1974). 그러나 실험은 cyclooxygenase 억제제인 indometacin은 acetylcholine의 혈관수축효과에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보아(Fig. 6) 틸라피아 적출 배대동맥에 대한 acetylcholine의 수축작용에 prostaglandin류가 관여는 없음을 알 수 있다.

혈관평활근의 수축반응에 있어서 세포질내 calcium ions(Ca²⁺) 이 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이 세포질내 Ca²⁺의 원천은 세포외액내 Ca²⁺ (extracellular calcium)이나 혹은 세포내 endoplasmic reticulum내에 저장된 Ca²⁺ (intracellular calcium)이다. 세포외액내 Ca²⁺은 세포막의 voltage-dependent Ca²⁺ channel이나 혹은 receptor-linked Ca²⁺ channel을 통하여 세포질내로 유입된다(Bolton, 1979; Van Breenen *et al.*, 1979; Triggle, 1981; Weiss, 1981). 본 실험에서는 acetylcholine에 의한 혈관의 수축반응은 Ca²⁺ 제거 생리적 완충용액하에서는 거의 소실되었으나, Ca²⁺ 유입차단제인 verapamil에 의해서는 약 25% 정도 억제되었다(Fig. 7). Verapamil은 voltage-dependent Ca²⁺ channel을 차단한다고 보고되고 있다(Fleckenstein, 1977; Bo-

lton, 1979). 그러므로 적출 틸라피아 배대동맥에 대한 acetylcholine의 수축반응에는 거의 세포외액의 Ca^{2+} 만 관여하는 것으로 생각되며, 이 Ca^{2+} 의 세포내 유입은 voltage dependent Ca^{2+} channel 보다는 주로 receptor-linked Ca^{2+} -channel을 통하여 일어난다고 추정할 수 있다.

이상의 실험결과에서 종합하여 볼때 틸라피아의 배대동맥에 대한 acetylcholine의 수축효과는 내피 세포와는 무관하며, 주로 M_2 -subtype의 수용체를 매개하여 receptor-linked Ca^{2+} channel을 통하여 유입되는 Ca^{2+} 에 의한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Altieri, R. J., Kiritsy-Roy, J. A. and Catrivas, J. D. : Acetylcholine-induced contraction in isolated rabbit pulmonary arteries : Role of thromboxane A_2 . *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236 : 535-541, 1985.
- Arunlakshana, O. and Schild, H. O. : Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 14 : 48-58, 1959.
- Birdsall, M. J., Burgen, A. S. V. and Hulme, E. C. : The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 14 : 723-736, 1978.
- Bloom, J. W., Halonen, M., Lawrence, L. J., Rould, E., Seaver, N. A. and Yamamura, H. I. : Characterization of high affinity [3H]pirenzepine and [3H]quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rabbit peripheral lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 240 : 51-58, 1987.
- Brown, D. A., Forward, A. and Marsh, J. : Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 71 : 362-364, 1980.
- Burnstock, G. : Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmacol. Rev.*, 21 : 247-324, 1969.
- Chand, N. and Altura, B. M. : Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells : Role in lung vascular disease. *Science*, 213 : 1376-1378, 1981.
- Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. and Jothianandan, D. : Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72 : 2106-2110, 1982.
- Ciba, S. and Tsukada, M. : Predominant acetylcholine-induced vasoconstriction in isolated, perfused simian facial veins. *European J. Pharmacol.*, 191 : 311-318, 1990.
- Doods, H. N., Mathy, M. J., Davidesko, D., Von Charldo, K. J., De Jonge, A. and Van Zwieten, P. A. : Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M_1 , M_2 , M_3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242 : 257, 1987.
- Eglen, R. M. and Whiting, R. L. : Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilation. *Br. J. Pharmacol.*, 84 : 3-5, 1985.
- Fleckenstein, A. : Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *A. Rev. Pharmacol.*, 17 : 149-166, 1977.
- Furchgott, R. F. : Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 53 : 557-573, 1983.
- Furchgott, R. F. : Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24 : 175-197, 1984.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. : The obliga-

- tory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature(Lond.)*, 288 : 373-376, 1980.
- Goyal, R. K and Rattam, S. : Neurohumoral, hormonal and drug receptors for the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology*, 74 : 598-618, 1978.
- Hammer, R. and Giachetti, A. : Muscarinic receptor subtypes : M_1 and M_2 , biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, 31 : 2991-2998, 1982.
- Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V. and Hulme, E. C. : Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283 : 90-92, 1980.
- Holmgren, S. and Nilsson, S. : Drug effects on isolated artery strips from two teleosts, *Gadus morhua* and *Salmo gairdneri*. *Acta Physiol. Scand.*, 90 : 431-437, 1974.
- Junstad, M. and Wennmalm, A. : Release of prostaglandin from the rabbit isolated heart following vagal nerve stimulation or acetylcholine infusion. *Br. J. Pharmacol.*, 52 : 375-379, 1974.
- Kirby, S. and Burnstock, G. Comparative pharmacological studies of isolated spiral strips of large arteries from lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28 : 307-319, 1969.
- Klaverkamp, J. F and Dyer, D. C. : Autonomic receptors in isolated rainbow trout vasculature. *European J. Pharmacol.*, 28 : 25-34, 1974.
- Lee, S. -W., Lee, J. -S. and Park, Y. -J. Identification and classification of muscarinic receptors in the uterus. *Yak*, 36 : 220-229, 1992.
- Luscher, T. F. and Vanhoutte, P. M. : Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 8 : 344, 1986.
- Luscher, T. F. and Vanhoutte, P. M. : Endothelium-dependent responses in human blood vessels. *Trends pharmacol. Sci.*, 9 : 181, 1988.
- Miller, V. M. and Vanhoutte, P. M. : Endothelium-dependent responses in isolated blood vessels of lower vertebrates. *Blood Vessels*, 23 : 225-235, 1986.
- Nilvebrant, L. : On the muscarinic receptors in the urinary bladder and the putative subclassification of muscarinic receptors. *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.*, 1 : 1-45, 1986.
- Potter, L. T., Flynn, D. D., Hanchett, H. E., Kalinski, D. L., Lubner-Narod, J. and Mash, D. C. : Independent M_1 and M_2 receptors : Ligands, autoradiography and functions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 5 : Suppl. 22-31, 1984.
- Reite, O. B. : The evolution of vascular smooth muscle responses to histamine and 5-hydroxytryptamine. I. Occurrence of stimulatory actions in fish. *Acta Physiol. Scand.*, 75 : 221-239, 1969.
- Sakai, K. : Vasoconstriction produced by intracoronary cholinomimetic drugs in isolated donorperfused hearts of rhesus monkeys : Comparison with pig, dog and rabbit hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 3 : 500, 1981.
- Singh, J. : Prostaglandin release from rat stomach following vagal stimulation or administration of acetylcholine. *Eur. J. Pharmacol.*, 65 : 39-48, 1980.
- Taylor, P. : Cholinergic agonists. *In* The pharmacological basis of therapeutics, pp. 100-108, 7th ed., Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad F., Macmillan, New York, 1985.
- Triggler, T. J. : Calcium antagonists. Basic chemical and pharmacological aspects. *In* New perspec-

- tives on calcium antagonists, pp. 1-18, ed., Weiss, G. B., Williams and Wilkins, Baltimore, 1981.
- Usui, H., Kurahashi, K., Ashida, K. and Fujiwara, M. : Acetylcholine-induced contractile response in canine basilar artery with activation of thromboxane A₂ synthesis sequence. *IRCS Med. Sci. Physiol.*, 11 : 418-419, 1983.
- Van Breemen, C., Aaronson, P. and Loutzenhiser, R. : Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmac. Rev.*, 30 : 167-208, 1979.
- Vanhoutte, P. M. : Inhibition by acetylcholine of adrenergic neurotransmission in vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 34 : 317-326, 1974.
- Wastek, G. J. and Yamamura, H. I. : *In* Neurotransmitter receptors, pp. 103-123, ed., Yamamura, H. I. and Enna S. J., Part 2, Chapman and Hall, London, 1981.
- Watson, M., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R. : A unique regulatory profile and regional distribution of [³H]pirenzepine binding in the rat provide evidence of distinct M₁ and M₂ muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.*, 32 : 3001-3011, 1983.
- Watson, M., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R. : [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, 1986a.
- Watson, M., Roeske, W. R., Vickroy, T. W., Smith, T. L., Akiyama, K., Gulta, K., Duckles, S. P., Serra, M., Adem, A., Nordberg, A., Gehlert, D. R., Wamsley J. K. and Yamamura, H. I. : Biochemical and functional basis of putative muscarinic receptor subtypes and its implications. *Trens. Pharmacol. Sci., Suppl.*, 7 : 46-55, 1986b.
- Weiss, G. B. : Sites of action of calcium antagonists in vascular smooth muscle. *In* New perspectives on calcium antagonists, pp. 83-94, ed., Weiss, G. B., Williams and Wilkins. Baltimore, 1981.
- Wood, C. M. : Cholinergic mechanisms and the response to ATP in the systemic vasculature of the rainbow trout. *J. Comp. Physiol.*, 122 : 325-342, 1977.

The characteristics of cholinergic responses in tilapia dorsal aorta

Dong Lim Choi · Joon-Ki Chung*

*Kunsan Laboratory, West Sea Fisheries Research Institute,
National Fisheries Research & Development Agency, Kunsan 573-030*

**Department of Fish Pathology, College of Fisheries Science,
National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea*

The present study was undertaken to investigate the physiological characteristics of the cholinergic responses in the tilapia dorsal aorta. In vessels under resting tension or precontracted with norepinephrine, acetylcholine caused only concentration-dependent vasoconstrictions. Contractile response to acetylcholine was not affected by the removal of endothelium or the application of methylene blue. Atropine, gallamine or pirenzepine shifted concentration-response curve to the right. However pirenzepine showed a similar effect on the curve only at high concentration (1×10^{-5} M). Acetylcholine-induced vasoconstriction was not markedly influenced by indomethacin, or verapamil, but was almost abolished in the calcium-free physiological buffer solution. These results suggest that acetylcholine produces only an endothelium-independent vasoconstriction in tilapia dorsal aorta and that the contractile effect of acetylcholine is mainly mediated by the activation of M_2 subtype receptor, which might be associated with the extracellular calcium influx through receptor-linked calcium channel.

Key words : Tilapia dorsal aorta, Cholinergic receptor, Acetylcholine, Vasoconstriction, Ca^{2+} channel