약학회지 제29권 제 4 호 165~175 (1985)
Yakhak Hoeji Vol. 29, No. 4

中樞性 抗高血壓藥이 腦內 神經傳達物質의 生合成 酵素에 미치는 影響

尹 再 順
梨花女子大學校 藥學大學

(Received April 18, 1985)

The Effect of Centrally Active Antihypertensive Agent on Biosynthetic Enzyme Activity of Neurotransmitter in Brain

Jae Soon Yun
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

Abstract—It has been reported that clonidine is α_2-adrenergic agonist, potent new hypotensive drug in human with low dose. The change in blood pressure is implicated in the concentration, release, uptake and metabalism of catecholamine and activity of catecholamine synthesizing enzyme in specific brain areas. Thus the experiment was set up to investigate the effect on the enzyme activity of clonidine alone and that of clonidine pretreated with imipramine or tranylcypromine by measuring activity of the Dopa-forming enzyme, tyrosine hydroxylase (TH) and epinephrine forming enzyme, phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT) in brain and adrenal gland. The TH activity in brainstem and substantia nigra is decreased by intraperitoneally administered clonidine 0.1mg/kg twice a day for 5 days, but increased in the rats pretreated with imipramine 10mg/kg intraperitoneally given 26hrs and 5hrs before decaptitation. However the TH activity in all regions of brain is increased in rats pretreated with tranylcypromine 10mg/kg intraperitoneally twice a day for 5 days. The effect of clonidine on TH activity is due to inhibition release of norepinephrine by activation of presynaptic α_2-adrenoreceptor, axon terminal result in the decrease of TH activity in brain. The increasing of TH activity in brain results in attenuation of the role of clonidine by pretreated with imipramine or tranylcypromine in rats. The activity of PNMT was not significantly affected by clonidine, imipramine and tranylcypromine in adrenal gland.

Clonidine은 imidazoline系 α-adrenaline性效能藥으로 血壓降下 및 徐脈效果가 밝혀져[1~5] 本態性 高血壓 治療藥으로 使用되고 있다. 神經傳達物質에 對하여 presynaptic α-adrenaline受容體를 介在한 norepinephrine (NE) 유리의 feedback機構가 보고된 以來[6] clonidine은 α_2-adrenaline受容體에 높은 親和性 있는 α_2-agonist[7~9]로 中樞의 presynaptic-α_2-adreno receptor를 活性化시켜 NE유리를 억제하며,[10~12] 또한 clonidine은 中樞뿐만 아니라 中樞作用에 比하여 重要하지는 않으나 末稍作用도 일으키는 兩作用이 있어 交感神經傳導를 억제한다.[13~14] clonidine의 中樞作用機轉은 延髓의 血管運動中樞, 심장調節中樞의 pre- 및 postsynaptic α-adrenoreceptor를 자극하여 中樞神經系로 부터의 交感神經興奮의 자극전도를 억제하는 동시에 壓受容體반사를 촉진하여 迷走神經 興奮증가로 심장運動과 心博出量을 감소시켜 血壓을 下降시키며[15~16] 初期의 一過性 血壓上昇은 clonidine의 末稍的 α-受容體에 對한 직접적인 자극으로 血管이 收縮되었기 때문이라 하였다[17~21]

血壓變化의 직접적인 要因은 中樞神經系 支配下에서 末稍神經系의 흥분성에 依하며[22~23] 이때 神經末端과립에서 유리되는 神經傳達物質이 重要한 役割을 하고 이 神經傳達物質인 catecholamine

의 生合成은 NE의 농도, 방출, 재흡수 및 대사와 연관되어 있어 catecholamine 방출이 증가되면 catecholamine合成의 속도제한효소인 tyrosine hydroxylase의 活性이 증가한다.

한편, clonidine과 다른 약물과의 血壓에 미치는 相互作用에 있어 3환계 및 monoamine oxidase inhibitor (MAOI)系 항우울약 투여로 clonidine의 中樞的 血壓降下作用이 감소 或은 消失되었다는 보고가 있다[24-26] 삼환계 항우울약은 神經末端膜의 투과성을 감소시켜 유리된 NE의 재도입을 저해하므로 synapse의 NE농도가 증가하며[27-28] MAOI계 항우울약은 MIO억제에 의한 amine농도를 증가시키며 또 이를 介在하여 catecholamine 合成 및 유리억제, 또는 직접적인 神經傳達物質 및 僞傳達物質作用 등 아직 確立되지 않은 많은 作用이 血壓變化와 연관되어 있다.

본 실험은 血壓變化 조절 기전에 神經系의 役割이 매우 重要하여[29] 그 要因이 되고 있는 神經傳達物質을 生合成하는 酵素活性이 中樞性抗高血壓藥, 3環系 및 MAOI系 항우울약에 依하여 받는 영향을 검토해 보고자 흰쥐에 clondine, imipramine 및 tranylcypromine을 단독 또는 병용투여하였을 때 腦幹, 視床下部 黑質 및 末梢 장기인 副腎에서 catecholamine 合成酵素인 tyrosine hydroxylase와 phenylethanolamine N-methyltransferase를 測定해 봄으로써 神經傳達物質 活性에 미치는 이들 약물의 단독효과 또는 併用效果의 相互關係를 비교 검토하였다.

實 驗 方 法

實驗動物—생후 9주의 Sprague-Dawley계 (SD계) 숫흰쥐를 10일 이상 사육하여 주위환경에 적응시킨 후 체중 220~270g의 쥐를 사용하였으며 고형사료(삼양유지) 및 물을 자유롭게 공급하였다.

試藥—Clonidine hydrochloride, tranylcypromine은 Sigma chemical Co.에서 구입하였고 imipramine HCl은 L.S.-Row material-Ltd제품을 사용하였다.

효소활성측정용 시약인 bovin serum albumin, S-adenosylmethionine, catalase (43mg protein/ml, 40,000 Sigma unit/mg protein), L-Dopa, L-tyrosine, mercarptoethanol, phenylethanolamine, 6MPH$_4$ 등은 sigma 제품을 사용하였고 Folin-ciocalteu phenol reagent (Shinyo pure, chem. Co. Ltd), Al_2O_3 (Merk. chem. co.), 무수 EtOH (Anachemia), Tris-base (Fluka), EDTA, toluene 및 K, Na-tartrate 등은 Junsei chem. Co., $K_3Fe(CN)_6$, Na_2CO_3, $HClO_4$, KH_2PO_4 및 isoamyl alcohol (Hayashi pure chem. Ind.), $NaHCO_3$, AcOH등 모든 시약은 특급을 사용하였다.

^{14}C-tyrosine (specific radioactivity 57.9m ci/m mole), ^{14}C-S-adenylmethionine (S.R.A. 58.9 mci/m mole), aquassure는 New England Nuclear 제품을 사용하였다.

測定機器—Tyrosine hydroxylase (TH)와 phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) 活性測定에 liquid scintillation counter (Packard Tri-CARB 300CD)를 사용하였고 protein 측정에는 spectrophotometer UV-240 (Shimadzu)를 使用하였다.

藥物投與 및 臟器摘出法—숫 흰쥐 5~10마리를 한 군으로 하여 대조군에는 saline용액 0.5ml를 1일 2회 5일간 복강내 주사하였다. Clonidine단독 투여군에는 1회에 0.1mg/kg를 1일 2회 5일간 총 1.0mg/kg을 복강내 투여하였다. Tranylcypromine단독 투여군에는 1회에 10mg/kg를 1일 2회 5일간 총 100mg/kg을 복강내 주사하였다. Tranylcypromine과 clonidine 병용투여군은 tranylcypromine 총량 100mg/kg을 1회에 10mg/kg로 분할 전처리한 3시간 후 clonidine 총량 1.0mg/kg을 1회에 0.1mg/kg로 분할하여 1일 2회 5일간 복강내 주사하고 2시간 후에 단두도살하였다. Imipramine단독 투여군은 saline 0.5ml을 1일 2회 5일간 복강내 주사하면서 4 및 5일째에는 1일

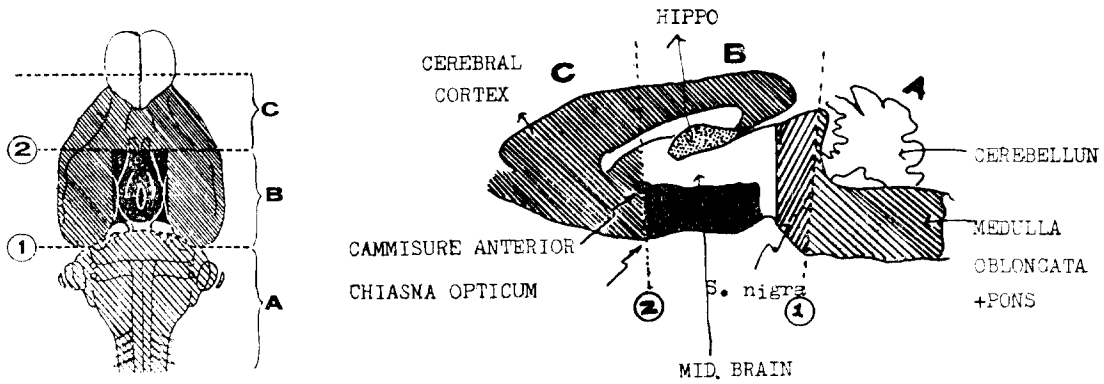

Fig. 1—Diagrammatic representation of dissection procedure for rat brain. Dotted lines indicate positions of initial sections.

1회에 한하여 saline대신 imipramine 10mg/kg를 1일 1회 2일간 총 20mg/kg을 복강내 주사하였다. Imipramine과 clonidine병용 투여군은 saline 0.5ml을 1일 2회 3일간 복강내 주사한 3시간 후, 그리고 4,5일째는 saline대신 imipramine 총량 20mg/kg을 1회에 10mg/kg로 분할하여 1일 1회 2일간 복강내 주사한 3시간 후 clonidine 0.1mg/kg을 1일 2회 5일간 총 1.0mg/kg을 복강내 주사하였다. 모든 군에서 최종으로 clonidine을 투여한 2시간 후에 단두도살하였다.

이상과 같이 약물을 투여한 흰쥐들은 단두도살하여 즉시 뇌를 주의깊게 두개골로 부터 꺼내어 주위 오물을 흡수 제거하고 냉동시켰다. Glowinski가 시행한 方法[59]에 따라 氷上 유리판에서 뇌 各部位를 해부분리하였다. 처음에 anterior commissure를 지나는 optic chiasma線에서 横行切斷하여(section B) 그 上部를 除去하고 Fig. 1에서와 같이 視床下部를 取하였다. 菱腦(Rhombence phalon, A)는 대뇌피질의 下部에서 수직으로 横行切斷하여(Section A) 소뇌부분을 주의깊게 除去하고 腦幹을 取하였으며 이것은 연수와 뇌교에 상당하다. 다음에 대뇌피질의 밑部分을 위로 올리고 2mm정도를 수직으로 横行切斷하여 黑質을 취하였다. 다음에 복부개열하고 양쪽 副腎을 적출하였으며 이상 적출한 腦 各部位組織은 즉시 −70°C로 급냉보관하여 酵素活性 測定用 組織으로 使用하였다.

酵素活性 測定用 試料製造—Homogenize관에 뇌간, 시상하부, 흑질 및 부신을 각각 넣고 冷 homogenize 완충용액(0.2% triton含有 5mM K-P 완충액 pH 7.0) 600μl, 500μl, 500μl, 2ml를 각각 가하여 homogenize하고 27000×G로 10分間 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 이상 모든 조작은 4°C에서 행하였다.

Tyrosine hydroxylase 活性測定法— Reis[30] 및 Renaud法[31]을 보완하여 測定하였다. 각 조직을 homogenize한 상등액 50μl를 取하여 4°C에서 反應混合液〔1M-NaAc완충액 (pH 5.8) 7.5μl, tyrosine (final conc, 2×10^{-4}M) 5μl, H_2O 1.5μl, ^{14}C-tyrosine (0.1μci/μl) 5.0μl, 15mM 6-dimethyltetra hydropteridine (6-MPH_4) in 420mM mercaptoethanol 5.0μl, catalase (1000 unit) 1μl〕 25ml를 加하여 30°C에서 20분간 진탕 反應시킨 後 L-β 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA) 10μg을 含有한 0.4N-$HClO_4$ 1ml로 反應을 中止시킨 後 4°C에서 2500×G로 10분간 원심분리하였다. Blank는 H_2O 50μl에 反應混合液을 加하여 전조작을 같이하였다.

상등액을 取하여 2% Na-EDTA: 0.35M KH_2PO_4 (5 : 15) 혼합액 0.5ml을 加한 後 N-NaOH로 pH를 8.6으로 조절, Al_2O_3을 충진한 column에 통과시킨 후 0.5N-HAC 4ml로 溶出시킨 용액을 scintillation vial에 받고 aquassure 15ml를 가한 後 방사능을 liquid scintillation counter로 測定하였다. 反應混合液 25μl에 aquassure 15ml를 加한 後 방사능을 測定하여 比較値로 하였다.

Phenylethanolamine-N-methyltransferase 活性測定法—Denorey등[32]에 의하여 보완된 Saaredra變法[33]으로 測定하였다. Homogenize한 상등액 25μl에 H_2O 25μl를 가한 後 4°C에서 反應混合液〔25mM phenolethanolamine 20μl, 1M-tris HCl (pH 8.6) 15μl, adenosyl-L-methionine, S-〔methyl-^{14}C〕(^{14}C-SAM, 0.02μci/μl) 완충액 5.9μl, H_2O 9.1μl〕 50μl를 加하였다. Blank는 H_2O 50μl로 하였다.

37°C에서 15분간 진탕 反應시킨 後 0.5M Na-borate (pH 10) 0.5m를 加하여 反應을 中止시키고 3% isoamylalcohol合有 toluene 6ml를 加하여 20초간 강하게 진탕시킨 후 4,700×G로 5분간 원심분리하였다. 상등액 4ml를 scintillation vial에 取하여 40°C의 기류하에서 2시간 유상을 증발시킨다음 無水 EtOH 1ml와 aquassure 10ml를 加하여 norepinephrine으로 도입된 ^{14}C-SAM의 radio-activity를 liquid scintillation counter로 측정하였다. 混合용액 50μl에 aquassure 10ml를 加하고 radioactivity를 측정하여 비교치로 하였다. 이 모든 시료는 duplicate로 하였다.

Protein量 測定—Lowry등 法[34]에 依하여 測定하였다. 各組織을 homogenize한 상등액 一部를 取하여 Lowry등의 Folinphenol法으로 測定하였고 標準物質로는 bovin serum albumin을 使用하였다.

모든 data는 平均 ±S.E.M.으로 表示하였고 student's t test를 利用하여 差의 有意性檢定을 하였다.

實 驗 結 果 및 考 察

Clonidine 單獨投與群—Clonidine·HCl을 1回에 0.1mg/kg씩 1日 2回 5日間 복강내 투여하였을 때 腦 各部位의 tyrosine hydroxylase (TH)活性變化는 對照群에 比하여 腦幹에서는 49.1%, 黑質에서 66.7%의 有意的($p<0.05$)인 減少를 하였으며 視床下部에서는 有意的인 差가 없었다 (Table I).

高血壓患者에게 clonidine을 경구투여하면 혈장內 norepinephrine (NE), epinephrine (EP)농도가 현저하게 감소하였다는 보고가 있으며[35] Laverty등은[36] 高用量의 clonidine을 急性투여한 흰

Table I—The effect of clonidine on tyrosine hydroxylase (TH) activity in brain region of male rats.

Group	Total dose (mg/kg)	Brain stem		Hypothalamus		Substantia nigra	
		TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)
Saline (Control)	—	53±9	100	72±22	100	105±29	100
		(400±50)		(98±46)		(224±77)	
Clonidine	1.0	27±4*	50.9	92±7	127.8	35±9*	33.3
		(207±25)		(104±30)		(70±9)	

Each value represents mean±S.E. of 8 experimental animals. TH activity is expressed in parenthesis as *pmole*/brain region/20min. Clonidine was administered 0.1 *mg/kg* i.p. twice daily for 5 days. (total 1.0 mg/kg). *Significantly different from the control group ($p<0.05$).

쥐에서 선조체를 除外한 各部位의 catecholamine量이 有意的으로 증가하였으며, 이는 神經末端에서 catecholamine 유리를 억제하기 때문이라 하였다.

本實驗에서 clonidine을 투여하였을 때 TH活性이 腦幹과 黑質에서 有意性있게 低下한 것은 clonidine이 α_2-adrenoreceptor를 자극하여 NE유리가 억제되어 神經末端內 NE量 增加로 因해 end product inhibition으로 TH活性이 減少한 것이라고 사료되며 이것은 clonidine을 투여하였을 때 腦幹등 腦 各部位의 NE含量이 현저하게 增加하였다는 報告로 미루어 clonidine에 依한 TH活性 減少는 시납프스前膜으로부터의 NE 유리억제에 依한 axon terminal 內 NE量增加와 깊은 關聯이 있음을 알 수 있다.

이것을 뒷받침하는 Gysling등[37]의 實驗으로 α_2-antagonist를 흰쥐에 투여하였을 때는 흰쥐의 海馬內 TH活性이 增加하였다고 보고하였다. Fuxe[38,39]등은 clonidine 투여시 시상하부에서 NE turnover를 감소시켰다고 보고하였다. Charney등[40]은 이것을 化學的 方法으로 증명하였다. 즉 clonidine의 뇌中 pre-α_2-adrenoreceptor 흥분으로 neurone에서 NE의 firing rate와 turnover가 감소됨을 化學的 方法으로 증명하고자 NE 대사산물인 3-methoxy-4-hydroxyphenethylene glycol(MHPG) 値가 감소함을 증명하였다.

Adrenaline 效能 神經末端의 TH活性은 NE含量 및 turnover와 아주 밀접한 관계가 있어 中樞神經에서 catecholamine利用率과 연관되어 있으므로[41] 視床下部는 clonidine 투여로 tournover가 감소하였으므로 neuron내의 NE合成에 관여하는 TH活性에는 有意的인 變化가 없는 것으로 사료된다. α-效能藥은 adenylcyclase活性化를 介在한 cyclic-3′5′-adenosine monophosphate(cyclic-AMP)농도 증가作用이 있으며 이 cyclic-AMP는 TH活性化에도 관여한다는 보고가 있다[42,43] 한편, α_2-效能藥은 α_2-adrenoreceptor를 活性化시켜 cyclic-AMP 産生효소인 adenylcyclase 活性을 抑制한다고 하였으므로[44] clonidine은 cyclic-AMP의 産生을 抑制하여 TH活性化에 관여하지 않음으로서 TH活性이 clonidine에 依해서 低下되었다는 機轉도 생각할 수 있다.

Imipramine前處置 後 clonidine投與群—Clonidine HCl 1回에 0.1mg/kg을 1日 2回 5日間 복강내 투여하면서 4,5日째는 clonidine 투여 3시간 전에 imipramine 10mg/kg으로 1일 1회 2日間 전처치한 흰 쥐의 腦中 TH活은 clonidine單獨 投與 群에 比하여 腦幹, 視床下部 및 黑質에서 각각 44.4%, 91.3%, 111.4%의 有意的인 增加率을 볼 수 있었다(Table Ⅱ).

이는 imipramine에 依해 NE 再導入이 차단되어 clonidine單獨投與群보다 神經末端의 NE 含量이 減少된 결과 유리 NE의 end product inhibition이 弱化되어 TH活性이 增加되었다고 사료되며 이는 同一實驗에서 腦幹中 NE量이 clonidine 單獨投與群에 比하여 47%의 有意的인 減少를 나타낸 것[45]과 一致하였다. Clonidine과 3環系抗우울약을 慢性的으로 併用投與時 腦의 presynaptic α_2-adrenoreceptor의 감수성을 낮추므로 그 이상 더 NE 방출을 억제하지 않고 NE유리가 增加된다는 報告도 있다.[46] 또한 clonidine투여에 의한 흰쥐 뇌中 MHPG値와 normetanephrine 감소는 antidepressant 併用投與로 弱化되어 MHPG의 뇌와 혈장中 농도가 높아졌을때 clonidine에 의해 α_2-adrenoreceptor 흥분으로 감소된 turnover가 antidepressant에 의해 억제되었기 때문이라고 보고되었다.[40,47,48]

따라서 삼환계 抗우울약에 依한 presynaptic-α_2-adrenoreceptor를 介在한 NE 유리증가와 NE 再導入抑制로 synapse에서 NE농도는 增加되나 神經末端의 NE量은 減少되므로 negative feedback 機轉에 依해서 또한 clonidine에 의한 turnover의 감소가 antidepressant 전처리로 弱化되어 NE의 turnover 증가에 의해서 TH活性이 增加되었다고 생각된다. 이러한 神經化學的 data는 어떤 특수

Table II—The effect of clonidine, imipramine and clonidine pretreated with imipramine on tyrosine hydroxylase (TH) activity in brain region of male rats.

Group	Total dose (mg/kg)	Brain stem		Hypothalamus		Substantia nigra	
		TH S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)
Clonidine	1.0	27±4*	100	92±7	100	35±9*	100
		(207±25)		(104±30)		(70±9)	
Imipramine	20.0	55±6	—	59±20	—	186±850	
		(426±23)		(97±33)		(385±140)	
Imipramine	20.0	39±6*	144.4	176±42*	191.3	74±30*	211.4
+ Clonidine	1.0	(389±32)		(354±96)		(138±60)	

Each value represents mean±S.E. of 6~8 experimental animals. TH activity is expressed in parenthesis as *pmole*/brain region/20min. Clonidine was administered 0.1mg/kg i.p. twice daily for 5 days (total 1.0mg/kg) in clonidine alone group. Imipramine was administered 10mg/kg i.p. once daily for 2days after(total 20mg/kg) in imipramine group and imipramine+clonidine group. Clonidine was administered 3hrs pretreatment with imipramine. *Significantly different from clonidine treated group ($p<0.05$).

작용이나 生理현상의 지표와 밀접한 관련이 있으므로[47,40] clonidine 투여시 혈장中 MHPG와 normetanephrine을 화학적으로 측정하여 α_2-adrenoreceptor 흥분으로 NE의 turnover가 감소됨을 확인하는 同時에 α_2-adrenoreceptor 흥분으로 仲介되는 腦幹, 神床下部에 있는 血壓조절중추, 혈관운동중추, 심장조절중추의 신경末端에서 NE 유리 억제로 교감신경 흥분의 전달이 弱化되어 clonidine의 血壓低下도 併行해서 나타났다. 또한 imipramine 전처치로 clonidine에 의한 turnover와 血壓감소가 약화되어 MHPG値 上昇과 同時에 血壓도 上昇되어 神經化學的 data가 生理的 data인 血壓변화와 一致됨을 나타내어 血壓에 미치는 clonidine의 영향과 imipramine의 전처치 후 clonidine의 영향은 뇌內 NE 變化에 따라 밀접한 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

Tranylcypromine 前處理 후 clonidine 投與群—Tranylcypromine(TCP) 10mg/kg을 복강내 주사한 3시간 後에 clonidine 0.1mg/kg을 1日 2回 5日間 복강내 주사하고 clonidine 투여 2시간 後 腦 各部位를 摘出하여 TH活性을 測定하였을 때 TH活性은 clonidine 單獨投與群에 比하여 腦幹, 視床下部 및 黑質에서 각각 377.8%, 96.7% 및 600%의 매우 有意的인 증가율을 나타냈다(Table Ⅲ).

MAOI인 pargyline이 中樞 및 末梢組織에서 NE 및 dopamine 生合成率을 減少시켰는데 이는 monoamine性 neurotransmitter에 대한 MAO의 作用을 억제하여 이들의 농도가 增加됨으로서 TH活性을 end product inhibition하고 또 MAOI는 neuron의 firing rate를 減少시켜 NE合成이 阻止되었기 때문이다.[49] TCP는 MAO 阻害作用뿐만 아니라 고유의 NE 유리작용도 있어서 이것이 初期血壓上昇의 原因이 되고있다. Iriye등[50]은 MAOI系 항우울약이 腦中의 phosphorylase 活性을 增加시킨다고 하였으며 TH活性은 cyclic-AMP 依存 proteinkinase에 依하여 인산화되므로서 活性化된다고 하였다.[50,53]

本實驗에서 TCP單獨投與 및 TCP前處理後 clonidine 投與하였을 때 腦 各部位의 TH活性이 增

Table III—The effect of clonidine, tranylcypromine and tranylcypromine+clonidine on TH activity in brain region of male rats.

Group	Total dose (mg/kg)	Brain Stem		Hypothalamus		Substantia nigra	
		TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)	TH. S. activity (*pmole/mg* protein)	ratio of control (%)
Clonidine	1.0	27±4	100	92±7	100	35±9	100
		(207±25)		(104±30)		(70±9)	
Tranylcypromine	100.0	136±11	—	212±17	—	890±137	—
		(1,000±75)		(312±34)		(2025±259)	
Tranylcypromine	100.0	129±5***	477.7	181±14**	196.7	245±77*	700
+Clonidine	1.0	(1019±39)		(225±60)		(642±250)	

Each value repesents mean±S.E. of 6~8 experimental animals. TH activity is expressed in parenthesis as *P mole*/brain region/20 min. Clonidine was administered 0.1mg/kg i.p. twice daily for 5days (total 1.0mg/kg). Tranylcypromine 10mg/kg was given intraperitoneally twice daily for 5days (total 100mg/kg). In the tranylcypromine+clonidine group, clonidine was administered after 3hrs pretreatment with tranylcypromine. *, **, ***; Significantly different from clonidine treated group ($p<0.05$*, $p<0.01$**, $p<0.001$***).

加된 것은 TCP가 phosphorylase活性 增加시켜 TH活性을 上昇시켰을 可能性과 firing rate 增加作用에 依한 feed back機轉으로 TH活性이 增加되었다고 생각되므로 腦 各部位에서 clonidine에 依한 TH 活性低下作用이 TCP前處理로 逆轉된 것은 clonidine에 依하여 減少된 NE turnover가 TCP 고유의 NE유리 촉진작용에 依해서 NE turnover가 增加하여 axon terminal의 NE量 減少로 TH 活性이 上昇한 것이라고 사료된다.

MAOI계 항우울약을 장기투여후 clonidine을 투여하면 clonidine에 의한 血壓低下作用이 소실된다는 臨床的 報告[54]로 미루어 신경末端에서의 TH活性 增加는 clonidine의 血壓低下를 억제하는데 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

Phenylethanolamine N-methyl transferase活性變化—Clonidine을 1回에 0.1mg/kg을 1日

Table IV—The effect of clonidine, imipramine and clonidine + imipramine on phenylethanolamine-N-methyltransferase(PNMT) activity in adrenal gland of male rats.

	Control	Clonidine	Imipramine	Imipramine +Clonidine	Tranylcypromine	Tranylcypromine +Clonidine
Total dose (*mg/kg*)	—	1.0	20.0	20.0+1.0	100.0	100.0±1.0
PNMT specific activity (*pmole/mg* protein/15min)	476±37	548±194	634±68	438±123	671±142	745±112
PNMT activity (*pmole*/adrenal/15min)	2031±74	2005±455	2457±403	2243±732	2683±542	2535±696
Ratio of control	100	115.1	133.2	92.0	140.9	156.5

Each value represents mean±S.E. of 6~8 experimental animal.Clonidine was administered 0.1mg/kg i.p. twice daily for 5 days.(total 1.0mg/kg) Imipramine was administered 10mg/kg i.p. once daily for 2days (total 20mg/kg). In the imipramine+clonidine group, imipramine was administered 3hrs before the treatment with clonidine. Tranylcypromine was administered 10mg/kg i.p. twice daily for 5days (total 100mg/kg). In the TCP+clonidine group. TCP was administered before 3hrs treatment with clonidine.

2회 5日間 단독으로 或은 clonidine투여 3시간 전에 imipramine 10mg/kg으로 1일 1회 2일간 전처리한 흰쥐 副腎의 PNMT活性을 radiometric method에 依하여 liquid scintillation counter로 測定하여 總 protein量으로 나눈 PNMT specific activity로 表示하였을 때 clonidine 및 imipramine 단독투여시 或은 imipramine 전처치後 clonidine 투여시에도 對照群에 比하여 有意的인 差는 없었다. 따라서 本 實驗에서는 clonidine이나 imipramine이 부신의 PNMT活性에는 영향을 미치지 못하였다.

또 Tranylcypromine 10mg/kg을 전처리한 3시간 後에 clonidine 0.1mg/kg 투여를 1日 2回 6日間 계속한 다음 최종투여 2시간 後에 부신의 PNMT活性을 測定하였을 때 대조군에 비하여 유의적인 差가 없었다. 그러므로 本 實驗에서는 clonidine이나 tranylcypromine이 부신의 PNMT活性에 별 영향을 미치지 못하였다(Table IV).

이상에서 clonidine, imipramine 및 tranylcypromine은 末梢臟器인 부신中 catecholamine量과 그 合成酵素活性에는 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

그러나 내장신경 절제한 spontaneously hypertensive rat에 clonidine 투여 5~10분후 전기적 자극을 주면 부신으로부터 catecholamine 유리率이 감소되고 동맥血壓과 심장 박동률도 감소하였다는 clonidine의 부신에 대한 작용의 보고가[56~58] 있으며 또 중추성 흥분약이 말초기관인 부신中 TH 活性을 증가하였다는 보고도 있으므로 clonidine이 부신中 효소活性에 미치는 영향은 中樞性 抗高血壓作用 뿐만 아니라 中樞神經 支配下의 末梢器管에 미치는 여러 作用과 더불어 더 광범위하게 연구되어야 한다고 사료된다.

結 論

中樞性 抗高血壓藥 clonidine이 腦와 副腎中의 catecholamine合成효소 活性에 미치는 效果와 이에 대한 三環系 항우울약 imipramine과 MAOI계 항우울약 tranylcypromine이 미치는 영향을 알아보고자 clonidine, imipramine 및 tranylcypromine을 단독 또는 imipramine과 tranylcypromine을 각각 전처리후 clonidine을 투여한 一定時間後에 뇌의 여러조직과 부신을 적출하여 tyrosine hydroxylase, phenylethanolamine-N-methyl transferase活性을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Clonidine은 tyrosine hydronylase活性을 腦幹에서 49.1% 黑質에서 66.7%의 有意的인 감소율을 나타내었다.

2. Imipramine과 clonidine併 用投與時는 腦中 tyrosine hydroxylase 活性은 腦幹에서 44.4%, 視床下部에서 91.3%, 黑質에서 111.4%로 有意的인 증가율을 나타내어 clonidine의 tyrosine hydroxylase活性 저하는 imipramine에 의해서 소실되었음을 알 수 있다.

3. Tranylpromine은 clonidine에 의해 감소된 腦幹, 視床下部, 黑質에서의 tyrosine hydroxylase 活性을 각각 377.8%, 96.7%, 600%의 매우 有意的인 증가율을 나타내었다.

4. Clonidine, imipramine, tranylcypromine은 副腎中의 PNMT 活性에 별 영향을 미치지 않았다.

本 研究를 진행함에 있어서 研究費의 一部는 文教部研究 助成費로 充當하였음. 이에 謝意를 表합니다.

文 獻

1. R.W. Sattler and P.A. Van Zwieten, Acute hypotensive action of 2-(2, 6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (ST 155) after infusion into the cats vertebral artery. *Eur. J. Pharmacol.* **2**, 9(1967).
2. W. Kobinger and A. Walland, Investigation into the mechanism of the hypotensive effect of 2-(2,-dichlorophenylamino)-2-imidazoline HCl. *Eur. J. Pharmacol.* **2**, 155(1967).
3. H. Mme. Schmitt, A. Schmitt, J.R. Boissier, J.F. Giudicelli and J. Fichelle, Cardiovascular effects of 2-(2, 6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (ST 155). Ⅱ. Central sympathetic structure, *Eur. J. Pharmacol.* **2**, 340(1968).
4. G.P. Sherman, G.J. Grega, R.J. Woods and J.P. Buckley, Evidence for a central hypotensive mechanism of 2-(2, 6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline (Catapresan, ST 155), *Eur. J. Pharmacol.* **2**, 326 (1968).
5. H. Schmitt and S. Fernad, Evidence for an α-sympathomimetic component in the effects of catapresan on vasomotor centers: Antagonism by piperoxane. *Eur. J. of Pharmacol.* **14**, 98 (1971).
6. S.Z. Langer, Presynaptic regulation of catecholamine release, *Biochem. Pharmac.* **23**, 1793 (1974).
7. P.I. Korner, J.A. Angus, M.J. Lew and B.G.J. Heinzow, Characterization of the clonidine receptor site. *Chest*, **83**, (2, suppl.), 345 (1983).
8. S.Z. Langer, Presynaptis regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1793 (1974).
9. Titeler, Selective labeling of presynaptic receptor by H^3-dopamine H^3-apomorphine and H^3-clonidine: Labeling of post synaptic site by H^3-neuroleptics: *Life Sci.* **28**, 587 (1978).
10. K. Starke, U. Werner and H.J. Schumann, Actions of clonidine and 2-(2-Methyl-6-Ethyl-Carboxylamino-2-Oxazoline on postgangrionic autonomic nerves. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **195**, 282 (1972).
11. L.O. Farnebo and B. Hamberger, Drug induced changes in the release of 3H-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta. Physiol. Scand.* **371**, 35-44 (1971).
12. I.C. Medgett, M.W. McCulloch and M.J. Rand, Partial agonist action of clonidine on prejunctional and postjunctional α-adrenoreceptors. *N.S. Arch Pharmacol.* **304**, 215 (1978).
13. Goodman and Gilman's, *The Pharmacological basis of therapeutics. 6th ed.* Macmillan publishing Co. Inc., 797 (1980).
14. G. Haeusler, Clonidine-Induced inhibition of sympathetic nerve activity; No Indication for a central presynaptic or an indirect sympathomimetic mode of action. *N.S. Arch. Pharmacal.*, **286**, 97, (1974).
15. P.I. Korner, J.R. Oliver, P. Sleight, J.P. Chalmess and J.S. Robinson, Effect of clonidine on the baroreceptor heart rate reflex and on single aortic baroreceptor fiber discharge. *Eur. J. Pharmacol.* **28**, 189 (1974).
16. P.I. Korner and G.A. Head, Cardiovascular functions of central noradrenergic and serotonergic neurons in conscious rabbits Their contributions to the central actions of clonidine. *Chest* **83** (2, suppl.), 335, (1983).
17. Z.H. Israili, Correlation of pharmacological effects with plasma levels of antihypertensive drug in man. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 25 (1979).
18. J. Lovenstein, Diagnosis and treatment. *Ann. Int. Med.*, **92**, 74 (1980),
19. H.E. Connor, G.M. Drew and L. Finch, Clonidine induced potentiation of reflex vagal bradycardia in anaesthetized cats. *J. Pharm. Pharmacol.* **34**, 22(1982).
20. W. Kobinger, Central α-adrenergic systems as targets for hypotensive drugs. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **81**, 39(1978).
21. R.C. Srimal, K. Gulati and B.N. Dhawan, On the mechanism of central hypotensive action of clonidine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**, 1007 (1976).
22. P.M. Vanhoutte, T.J. Verbeuren and R.C. Webb, Local modulation of the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* **61**, 151 (1981).
23. M.F. Lokhandwala and D.C. Eikenberg, Presynaptic receptors and alterations in norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **33**, 1527 (1983).

24. F.T. Crews and C.B. Smith, Presynaptic alpha-receptor subsensitivity after long-term antidepressant treatment. *Science* **202**, 322(1978).
25. M.F. Sugrue, Effect of chronic antidepressant administration on rat brain α_2-adrenoceptor sensitivity. *Proc. Br. J. Pharmacol.* **73**, 241, (1981).
26. C.B. Smith, E.A. Garcia-Sevilla and P.J. Hollingsworth, α_2-Adrenoceptors in rat brain are decreased after long-term tricyclic antidepressant drug treatment. *Brain Res.* **210**, 413 (1981).
27. J. Glowinski and J. Axelrod, Inhibition of uptake of tritiated noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* **204**, 1318, (1964).
28. G.L. Klerman and J.O. Cole, Clinical pharmacology of imipramine and related antidepressant compounds. *Pharmacol. Rev.* **17**, 101 (1965).
29. D.M. Kuhn, W.A. Wolf and W. Lovenberg, Pressor effects of electrical stimulation of dorsal and median raphe nuclei in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 403(1980).
30. D.J. Reis, T.H. Joh and R.A. Ross, Effect of reserpine on activities and amounts of tyrosine hydroxylase and dopamine-β-hydroxylase in catecholamine neuronal system in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **163**, 775 (1975).
31. B. Renaud, S. Fourniere, L. Denoroy, M. Vincent, J.F. Pujol and J. Sassard, Early increase in phenylethanolamine-N-methyltransferase activity in a new strain of spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* **159**, 149 (1978).
32. L. Denorey, M. Heimburger, B. Renavd, S. Affara, J. Wepierr, Y. Cohen and J. Sassard, Effect of chronic β-blockers treatment on catecholamine synthesizing enzymes in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. pharmacol.* **30**, 2673 (1981).
33. Juan M. Saavedra, Miklos Palkovits, Michael J. Brownstein and Julius Alxelrod, Localization of phenylethanolamine-N-methyltransferase in the rat brain nuclei, *Nature* **248**, 695 (1974).
34. D.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
35. M. Hausen, W. Maurer, I. Thomas and W. Kubler, Einfluß von clonidine auf die Plasma-Katecholaminspiegel unter Ruhebedingungen und ergomethischer Belastung. *Dtsch med. Wschr.* **106**, 175 (1981).
36. R. Laverty and K.M. Taylor, Behavioural and biochemical effect of 2-(2, 6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (St 155) on the central nervous system. *Br. J. Pharmacol.* **35**, 253 (1969).
37. K. Gysling and R.H. Roth, Fuct. Regul. Menoamine enzyme: *Basic clin. aspects. Proc. Conf. 2nd.* p. 83 (1981).
38. Luc Rochette, Anne-Marie Bralet, and Jean Bralet, Effect of chronic clonidine treatment on the turnover of noradrenaline and dopamine in various regions of the rat brain. *N.S. Arch Pharmacol.* **319**, 40 (1982).
39. Kjell Fuxe, Gösta Jonsson, Per Bolme, Kurt Andersson, Luigi F. Agnati, Menek Goldstein and Tomas Hökfelt, Reduction of odrenaline turnover in cardiovascular areas of rat medulla oblongata by clonidine. *Acta. Physiol. Scand.* **107**, 177(1979).
40. D.S. Charney, G.R. Heninger, D.E. Sternberg, D.E. Redmond, J.F. Leckman, J.W. Maas and R.H. Roth, Presynaptic adrenergic receptor sensitivity in depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **38**, 1334 (1981).
41. N.G. Bacopoulos and R.K. Bhatnagar, Correlation between tyrosine hydroxylase activity and catecholamine concentration or turnover in brain regions. *J. of Neurochem.* **29**, 639(19).
42. J.E. Harris and R.J. Morgenroth, V.H. Ⅲ and Roth, R.H., Activation by cyclic 3′, 5′-adenosinemonophosphate of tyrosine hydroxylase in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 789 (1975).
43. W. Lovenberg, E.A. Bruckwick and I. Hambauer, ATP, cyclic AMP and magnesium increase the affinity of rat striatal tyrosine hydroxylase for its cofactor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72**, 2955(1975).
44. D. Atlas and S.L. Sabol, Interaction of clonidine and clonidine analogues with α-adrenergic receptors, *Eur. J. Biochem.* **113**. 521(1981).
45. 梨大 약대 약물학교실, 未發表.
46. F.T. Crews and C.B. Smith, Presynaptic alpha-receptor subsentivion after long--term antidepressant treatment. *Science* **202**, 322(1978).

47. G. Racagni, I. Mocchetti, G. Renna and V. Cuomo, In vivo studies on central noradrenergic synaptic mechanisms after acute and chronic antidepressants drug treatment: Biochemical and behavioral comparison. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **223**, 227 (1982).
48. Michael F. Sugrue, A study of the sensitivity of rat brain alpha$_2$-adrenoceptors during chronic antidepressant treatments. *N.S. Arch. Pharmacol.* **320**, 90 (1982).
49. E. Costa and J.L. Meek, Regulation of biosynthesis of catecholamines and serotonin in the CNS. *Ann. Rev. Pharmacol* **14**, 491(1974).
50. T.T. Iriye and F.A. Simmonds, Effect of tranquilizers and antidepressants on glycogen phosphorylase of rat brain. *Bichem. Pharmacol.* **20**, 1889(1971).
51. T.H. Joh, D.H. Park and D.J. Reis, Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic-AMP dependent protein kinase, Mechanism of enzyme activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 4744 (1978).
52. T. Yamauchi and H. Fujisawa, Evidence for phosphorylation of bovin adrenal tyrosine hydroxylase by cyclic-AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **82**, 514 (1978).
53. A.M. Edelman and J.D. Raese, Tyrosine hydroxylase: Studies on the phosphorylation of a purified preparation of the brain enzyme by the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**, 647 (1981).
54. L.J. Siever, R.M. Cohen and D.L. Murphy, Antidepressants and alpha$_2$—adrenergic autoreceptor desensitization. *Am. J. Psychiatry.* **138**, 681 (1981).
55. H. Togashi, Central and peripheral effects of clonidine on the adrenal medullary function in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **225**. 191 (1983).
56. K. Schimamura, H. Togashi, and H. Saito, Effect of clonidine on the function of the adrenal medulla in rats. *Res. Comm. Chem. Pharmacol.* **31**. 189 (1981).
57. A Wada, S. Sakurai, H. Kobayashi, N. Yanagihara and F. Izumi, α-Adrenergic receptors inhibit catecholamine secretion from bovin adrenal medulla. *Brain Res.* **252**, 189(1982).
58. J.W. Gibb and F.J. Kogan, Influence of dopamine synthesis on methamphetamine-induced changes in striatal and adrenal tyrosine hydroxylase activity. *N.S. Arch. Pharmacol.* **310**, 185 (1979).
59. J. Glowinski and L.L. Iversen, Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. *J. Neurochem.* **13**, 655 (1966).