

## 抗 Histamine劑와 Muscarinic Receptor와의 相互作用(I)

心臟 muscarinic receptor에 대한 作用

李神雄 · 朴令珠 · 李正秀 · 河光源\* · 陳甲德

영남대학교 약학대학 · \*국립보건원 요골과

(Received February 16, 1988)

### Interaction of Antihistaminics with Muscarinic Receptor(I)

Action on the cardiac muscarinic receptor

Shin-Woong Lee, Yeung-Joo Park, Jeung-Soo Lee,

Kwang-Won Ha\* and Kap-Duck Jin

College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 682 and \*Devison of Cosmetic and Medical Device, National Institute of Health, Seoul 122, Korea

**Abstract**— $[^3\text{H}]$  Quinuclidinyl benzilate(QNB) binding assays were performed in the dog ventricular sarcolemma fraction enriched approx. 32-fold in sarcolemma compared to the starting homogenate to elucidate the effect of antihistaminics on cardiac muscarinic receptor. Chlorpheniramine(CHP) inhibited specific binding of  $[^3\text{H}]$ QNB and delayed the equilibrium binding. The rate constants at 37°C for formation and dissociation of the QNB receptor complex were  $0.38 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  and  $1.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , respectively. The mean value for the dissociation constant from the pairs of the rate constants was 43.2 pM and this value was similar to the value(44.8pM) determined from Scatchard analysis. CHP decreased association rate constant, indicating increase in  $K_D$  value. Decrease in affinity without affecting the binding site concentration( $B_{\text{max}}$ ) for  $[^3\text{H}]$ QNB binding by CHP was also demonstrated by Scatchard analysis.  $K_i$  values for  $\text{H}_1$ -blockers that inhibited specific  $[^3\text{H}]$ QNB binding were 0.02~4.8 $\mu\text{M}$ . Cimetidine with  $K_i$  value of 230 $\mu\text{M}$ , however, was ineffective in displacing  $[^3\text{H}]$ QNB binding at concentration of 50 $\mu\text{M}$ . The Hill coefficient for  $\text{H}_1$ -blockers were about one. The results indicate that  $\text{H}_1$ -antihistaminics inhibit  $[^3\text{H}]$  QNB binding by interaction with myocardiac muscarinic cholinergic receptor and anticholinergic side effects of these drugs are mainly due to this receptor blocking mechanism.

Histamine  $\text{H}_1$ -receptor차단제는 histamine의  $\text{H}_1$ -receptor에 histamine과 경쟁적으로 작용하여<sup>1~4)</sup> histamine에 의한 기관지,<sup>5)</sup> 장 및 기타 평활근의 수축<sup>6,7)</sup>이나 모세혈관의 투과성 증가같은 allergy반응<sup>8)</sup>을 억제하는 약물로서 항 histamine 효과의에도 중추효과,<sup>9~11)</sup> 부교감신경 차단효과, 국소마취효과등의 다양한 효과를 나타낸다.

일반적으로 임상에서  $\text{H}_1$ -blocker를 질병의 치료 또는 예방의 목적으로 사용할 때 가장 흔히 볼 수 있는 부작용인 구갈 및 기관지 분비억제의 증상은 대부분의  $\text{H}_1$ -blocker들이 가지고 있는 atropine 유사작용에 기인하며,  $\text{H}_1$ -blocker들

의 멀미(motion sickness)에 대한 효과도 부교감신경 차단효과에 기인하는 것으로 생각되어지고 있다.<sup>12,13)</sup> 이러한  $\text{H}_1$ -blocker의 작용은  $\text{H}_1$ -blocker가 scopolamine과 같이 중추에서 acetylcholine에 길항하여 멀미의 치료효과를 나타낸다는 보고<sup>14,15)</sup>와  $\text{H}_1$ -blocker들이 muscarinic antagonists인  $[^3\text{H}]$ propylbenzylcholine의 muscarinic receptor결합을 억제한다는 보고<sup>16)</sup> 등으로 미루어 acetylcholine의 유리억제나 대사, 배설과 같은 의적요소보다는 주로 muscarinic receptor에 대한 직접작용에 기인할 가능성이 크다.

본 연구에서는 histamine  $\text{H}_1$ -receptor 차단제와

muscarinic receptor와의 상호작용에 관한 지견을 얻고 나아가 수종 항 histamine제의 muscarinic receptor에 대한 작용을 비교검토하기 위하여, 개 심실로부터 형질막을 분리하고 형질막의 [ $^3\text{H}$ ] quinuclidinyl benzilate 결합에 미치는 항 histamine제의 영향을 조사하였으며, 또 수종 항 histamine제들 사이에 muscarinic receptor에 대한 작용의 차이가 있는지를 검토하였다.

### 실 험 방 법

**실험 재료 및 시약—재료:** 개의 심장은 도살 즉시 적출, 운반하여 사용하였고, filter는 Whatman회사로부터 구입한 GF/B filter를 사용하였다.

**시약:** [ $^3\text{H}$ ]Quinuclidinyl benzilate(QNB, 67Ci/mmol)는 New England Nuclear Co.로부터, tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), ethylene-glycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid(EGTA),  $\text{NaN}_3$ , atropine sulfate, PK/LDH mixed enzyme, 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOP), 2,5-diphenyloxazole (POP)은 Sigma Chemical Co.로부터 구입 사용하였고, 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

**개 심실 형질막의 분리—**형질막의 분리는 Van Alstyne등의 방법<sup>17)</sup>을 수정한 Lee등의 방법<sup>18)</sup>에 준하였다. 자용구별없이 심방 및 기타 주위조직을 제거, 무게를 단 후 가위로 세절하였으며 세절된 심실근을 무게의 5배가 되는 5mM  $\text{NaN}_3$ , 10mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.0, 용액(medium A)에 넣고 polytron(PT20)으로 5초동안 2번(0.5max) 균질화한 다음 8,700×g에서 20분동안 원심분리하였다. Pellet에 5배 용량의 medium A를 다시 가하고 glass homogenizer 중에서 teflon pestle을 1번 통과(80% max, 140W), 원심분리(20min, 8,700×g)한 후 pellet에 6배 용량의 10mM Tris·Cl, pH7.4, 용액(medium B)을 가하고, teflon pestle을 4번 통과시킨 후 원심분리(20min, 8,700×g)하였다. 이 과정을 3회 반복하고, 매회 상정액을 모아 35,000×g에서 20분동안 원심분리

한 후 microsome을 얻었다. Medium B에 부유시킨 microsome 7~8ml를 hand driven glass homogenizer로 5회 통과시킨 다음, 20ml의 24% (W/V) sucrose용액 표면에 microsome이 섞이지 않도록 천천히 가하여 microsome층이 되게 한 후, 73,400×g에서 30분동안 원심분리하였다. Sucrose 용액과 medium B사이의 생긴 우유빛의 형질막층을 채취하고 약 10배 용량의 medium B를 가한 후 73,400×g에서 30분간 다시 원심분리하였으며, 형질막 단백질의 농도가 1.5~2mg/ml가 되도록 pellet에 소량의 medium B를 가하여 균질화한 다음 실험에 사용하였다. 분리한 각 분획의 단백질 농도는 bovin serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry등의 방법<sup>19)</sup>에 준하여 측정하였다.

**ATPase활성 측정—**ATPase활성은 spectrophotometric coupled-enzyme assay<sup>20)</sup>에 의하였다. 즉 ATPase활성은 10mM KCl, 100mM NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ (Vanadium free), 25mM L-histidine(pH 7.4), 0.4mM NADH (Sigma), 1mM phosphoenol pyruvate(PEP: tricyclohexylamine salt, Sigma), 14units의 pyruvate kinase, 20units의 lactic dehydrogenase를 함유하는 용액중에 단백질 10~20 $\mu\text{g}$ 을 가한 후 340nm에서 NADH산화에 기인한 흡광도의 감소를 기록함으로써 측정하였으며 반응온도는 37°C로 유지하였고 반응액의 최종용적은 2.5ml로 하였다.

Mitochondrial ATPase활성은 총 ATPase 활성에서 5mM  $\text{NaN}_3$  존재하에서 나타나는 ATPase활성을 뺀값으로 하였으며, ouabain sensitive ATPase( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase)활성은 총 ATPase활성에서  $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$  ouabain 존재하에 측정된 ATPase활성을 뺀값으로 하였다. 또 5mM  $\text{NaN}_3$ ,  $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$  ouabain 및 100 $\mu\text{M}$  EGTA 존재하에 나타나는 ATPase활성을 residual ATPase활성으로, residual ATPase활성에서 200 $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ 를 가함으로써 증가되는 ATPase활성을  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase활성으로 간주하였다.

**형질막의 [ $^3\text{H}$ ]QNB결합실험—**형질막의 [ $^3\text{H}$ ] QNB결합실험은 50mM Tris·Cl(pH7.4), 10mM

MgCl<sub>2</sub>, 20μg의 형질막, 50pM [<sup>3</sup>H]QNB 및 항 histamine제의 存在 또는 不在下에 37°C에서 시행하였다. 반응액을 일정시간동안 incubation한 후, 50mM Tris·Cl(pH 7.4) 및 10mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 병냉의 세척액 5ml를 가하여 반응을 종료시키고, 즉시 GF/B glass fiber filter 상에서 여과하였으며, 5ml의 세척액으로 filter를 3회 세척한 다음 10ml의 scintillation액이 든 vial에 넣고 12시간동안 방치, 그 방사능을 측정하였다. 이 때 [<sup>3</sup>H]QNB의 비특이 결합은 2×10<sup>-6</sup>M atropine존재하에서 측정하였다.

Kinetic method에 의한 dissociation constant (K<sub>D</sub>)의 계산은 dissociation rate constant(k<sub>-1</sub>)와 association rate constant(k<sub>1</sub>)의 비로 하였다. k<sub>-1</sub>는 상술한 medium중에 형질막 단백질과 [<sup>3</sup>H]QNB를 가하고 평형에 도달하는 시간(90min)까지 incubation한 후, atropine 또는 atropine과 H<sub>1</sub>-blocker를 가한 다음 주어진 시간에 일정량의 medium을 취하고 여과, 세척 및 방사능을 측정 한 후, 처음 결합된 [<sup>3</sup>H]QNB의 반이 해리되는 시간(t<sub>1/2</sub>)으로부터 계산하였다(k<sub>-1</sub>=0.693/t<sub>1/2</sub>).

k<sub>1</sub>은  $k_1 = \frac{k_{obs} - k_{-1}}{[I]}$  으로부터 계산하였으며(k<sub>obs</sub>=observed first-order rate constant, [I]=radio-labeled drug의 농도), 여기에서 k<sub>obs</sub>는 [<sup>3</sup>H]QNB 평형결합의 반이 결합되는 시간(t<sub>1/2</sub>)으로부터 계산하였다(k<sub>obs</sub>=0.693/t<sub>1/2</sub>).

한편 Scatchard analysis를 시행할 때는 상술의 medium중에 여러농도의 [<sup>3</sup>H]QNB를 가하고 형질막을 가한 다음, 37°C에서 90분간 반응시켰으며 반응을 종료시킨 후 여과, 세척 및 방사능을 측정, 각 농도에서의 [<sup>3</sup>H]QNB결합을 계산하여 K<sub>D</sub>와 B<sub>max</sub>를 구하였다.

실험 결과

형질막분획의 단백질 수율 및 정제도—개 심실 형질막의 [<sup>3</sup>H]QNB결합에 미치는 항 histamine제의 영향을 알아보기 위하여, 먼저 심실로부터 분리한 형질막분획의 수율과 정제도를 알아보았다.

심실조직 단백질은 본 성적에서 분리한 micr-

Table I—Protein yield and recovery during preparation of ventricular sarcolemma from dogs.

	Protein (mg/g wet wt.)	Recovery from homogenate(%)
Homogenate	60.6±3.25	—
Microsome	1.42±0.33	2.2±0.25
Sarcolemma	0.0775±0.004	0.13±0.04

Values are the mean±SEM of five different preparations.

Table II—Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of subcellular fractions prepared from dog ventricle.

	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase activity (μmol Pi/mg/hr)
Homogenate	4.4±1.2
Sarcolemma	142.6±12.3
Purification(fold)	32.4±3.8

Aliquots of the fraction suspended in 10mM Tris·Cl(pH 7.4) were added to individual cuvette containing the media(see Methods). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was determined by measuring the difference between total ATPase activity and activity present after addition of 2.5×10<sup>-4</sup>M ouabain. Values are the mean±SEM of five different assays.

osome중으로 약 2.2%, 형질막분획중으로 약 0.13%가 이행되었다. 여기서 얻은 형질막 분획의 단백질 수율은 심실 100g당 약 8mg으로서 아주 적었으나, 형질막 marker인 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 활성은 형질막분획이 homogenate보다 약 32배 더 크게 나타났다(Table I, II).

형질막분획의 ATPase활성—분리한 형질막중에 형질막이외의 subcellular fraction의 오염정도를

Table III—ATPase activity of sarcolemmal fraction prepared from dog ventricle.

	ATPase activity (μmol Pi/mg/hr)
Total	156.4±12.1
Azide sensitive(Mitochondrial)	3.5±0.1
Ouabain sensitive(Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -)	142.6±12.3
EGTA sensitive(Ca <sup>2+</sup> -)	2.3±0.06
Residual(Mg <sup>2+</sup> -)	8.0±2.9

Measurement of ATPase activity was carried out as described in Methods. Values are mean±SEM of five different assays.

mitochondrial ATPase, Ca<sup>++</sup>-ATPase 및 residual ATPase활성으로 측정하였던 바, 형질막분획의 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase활성은 total ATPase활성의 약 92%를 차지하였으며 기타 ATPase활성은 total ATPase활성의 약 8%정도에 불과하였다(Table III). 본 성적으로부터 형질막분획은 mitochondria, 근소포체 및 수축성 단백질의 오염이 비교적 적은 순도높은 형질막분획인 것으로 추정되었다.

[<sup>3</sup>H]QNB결합의 time course—심장muscarinic

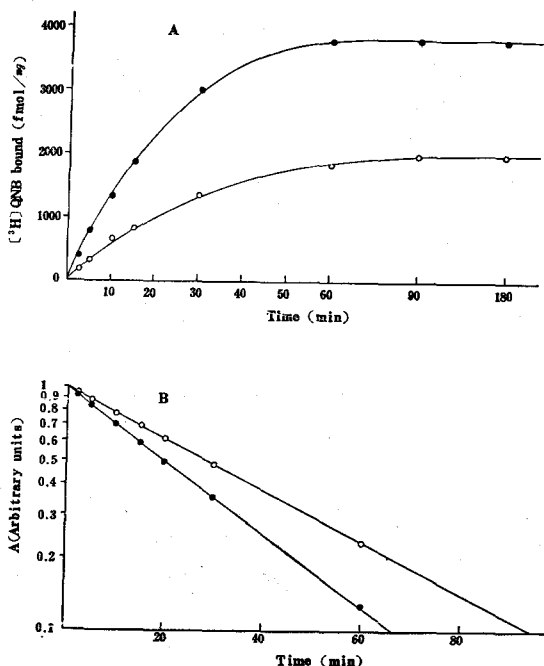


Fig. 1-A Time course of [<sup>3</sup>H]QNB binding to dog cardiac sarcolemma.

Sarcolemmal proteins (20μg) were incubated with 5×10<sup>-11</sup>M [<sup>3</sup>H]QNB at 37°C in the presence of 50mM Tris·Cl and 10mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 5ml and the reaction terminated at time intervals by rapid vacuum filtration over glass fiber filters. ●, control; ○, in the presence of chlorpheniramine (5μM). The data shown are the mean of three independent experiments.

B: Pseudo-first-order binding of [<sup>3</sup>H]QNB to cardiac sarcolemma replotted from data of Fig. 1A. (Be-B)/B (log scale) versus time is shown, where Be and B are radioligand bound to sarcolemma at equilibrium and at time t, respectively.

receptor에 대한 [<sup>3</sup>H]QNB의 평형결합 시간을 알아보기 위하여 시간 경과에 따른 [<sup>3</sup>H]QNB결합을 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와같이, 대조형질막은 50mM Tris·Cl(pH7.4)와 10mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 medium중에서 [<sup>3</sup>H]QNB와 결합하여 약 60분에 평형에 도달하였으나, 5μM chlorpheniramine(CHP) 존재하에서는 약 90분으로 지연되었으며, [<sup>3</sup>H]QNB 평형결합의 반이 결합되는 시간(t<sub>1/2</sub>)은 대조군 및 5μM CHP처리군에서 각각 약 20분, 약 28분이었다. 여기서 계산된 [<sup>3</sup>H]QNB결합의 observed first-order rate constant(k<sub>obs</sub>)는 각각 약 0.0349min<sup>-1</sup> 및 0.0246 min<sup>-1</sup>으로서 CHP에 의해 [<sup>3</sup>H]QNB결합의 association이 지연됨을 알 수 있었다.

[<sup>3</sup>H] QNB 결합에 대한 chlorpheniramine (CHP)의 I<sub>50</sub>치—[<sup>3</sup>H]QNB결합의 반을 억제하는 CHP의 I<sub>50</sub>치를 알아보기 위하여 여러농도의 CHP 존재하에서 [<sup>3</sup>H]QNB결합실험을 행한 결과, CHP의 농도 증가에 따라 그 억제정도도 증대되었으며 [<sup>3</sup>H]QNB결합의 반을 억제하는 CHP의 농도(I<sub>50</sub>)는 약 5.1±0.3μM(n=4)이었다(Fig. 2).

[<sup>3</sup>H]QNB의 dissociation rate constant에 미치는 CHP의 영향—심장 muscarinic receptor에 결합된 [<sup>3</sup>H]QNB의 dissociation정도를 알아보기 위하여 [<sup>3</sup>H]QNB의 dissociation rate constant를 Chase방법<sup>21)</sup>으로 측정하여 보았다. 즉 50pM

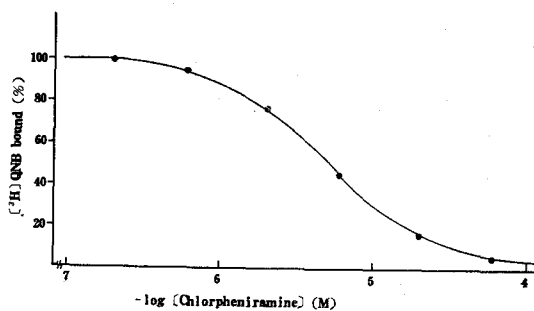
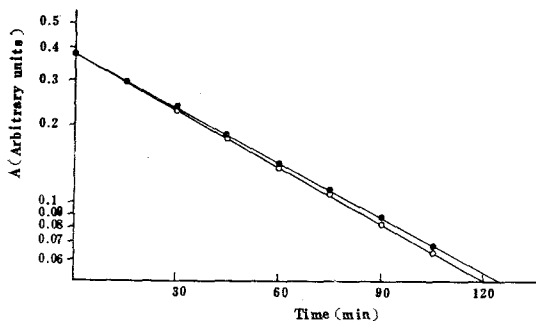


Fig. 2-Inhibition of [<sup>3</sup>H]QNB binding by chlorpheniramine to cardiac sarcolemma.

Sarcolemmal proteins (20μg) were incubated with 50pM [<sup>3</sup>H]QNB for 90min at 37°C in the presence of various concentration of chlorpheniramine in a final volume of 5ml. The data shown are the mean of four independent experiments.



**Fig. 3**—Effect of chlorpheniramine (5 $\mu$ M) on dissociation of [ $^3$ H]QNB from muscarinic receptor-QNB complex. [ $^3$ H]QNB equilibrium binding was carried out at 37°C in the presence of 50pM [ $^3$ H]QNB under the same condition as described in Method. After incubation for 90min, 10 $^{-6}$ M atropine (•) or 10 $^{-6}$ M atropine plus 5 $\times$ 10 $^{-6}$ M CHP (○) was added into the incubation medium. Aliquot was removed at the given time and filtered. The amount of radioactivity associated with the receptor, A, was plotted (log scale) versus time. The ordinate has been arbitrarily scaled. The data shown the mean of three independent experiments.

[ $^3$ H]QNB와 형질막을 전술의 medium중에서 90분동안 incubation하여 평형결합에 도달하게 한 다음 1 $\mu$ M atropine과 5 $\mu$ M CHP를 가하고 일정 시간경과 후 receptor에 결합되어 있는 [ $^3$ H]QNB에 의한 방사능을 측정하였다. Fig. 3은 각 시간에서 측정한 방사능을 대수눈금으로 plot한 것으로 각 점이 직선상에 있는 점으로 보아 이 반응이 first-order kinetics에 해당됨을 알 수 있었으며, 본 실험에서 평형결합의 반이 해리되는 시간( $t_{1/2}$ )은 대조군과 5 $\mu$ M CHP처리군에서 다같이 약 43분으로서 5 $\mu$ M CHP는 atropine에 의한 QNB의 dissociation에는 아무런 영향을 미치지 못하였다.

**CHP에 의한 dissociation constant의 변화**—Dissociation constant가 dissociation과 association rate constant의 비로 결정된다는 것은 주지의 사실이다. Table IV는 muscarinic receptor에 대한 [ $^3$ H]QNB결합의 rate constant와 이들의 비로부터 계산된 dissociation constant( $K_D$ )를 나타낸 것으로, muscarinic receptor에 대한 [ $^3$ H]QNB의

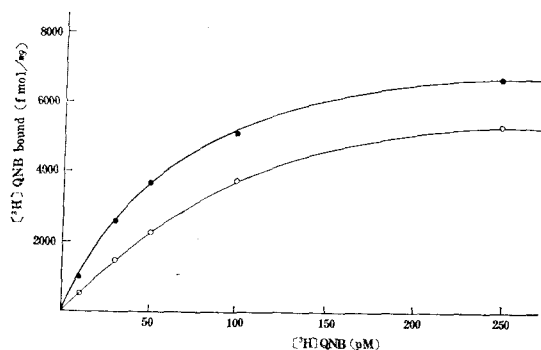
**Table IV**—Effect of chlorpheniramine on the kinetic constants of [ $^3$ H] QNB binding to dog cardiac sarcolemma.

	a $k_1$ (min $^{-1}$ M $^{-1}$ $\times 10^9$ )	b $k_{-1}$ (min $^{-1}$ $\times 10^{-3}$ )	c $K_D$ (pM)
Control	0.377 $\pm$ 0.036	16.0 $\pm$ 1.8	43.2 $\pm$ 5.5
5 $\mu$ M Chlorpheniramine	0.166 $\pm$ 0.071	16.3 $\pm$ 1.12	97.9 $\pm$ 11.5

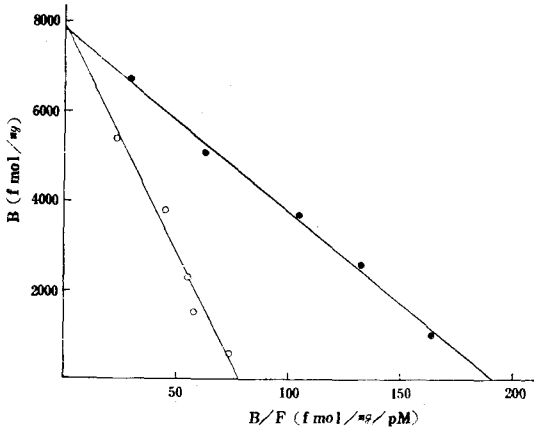
a: Calculated from  $k_1 = (k_{obs} - k_{-1}) / [I]$   
 b: Derived from dissociation of [ $^3$ H]QNB  
 c: Calculated from  $K_D = k_{-1} / k_1$   
 Values are the mean  $\pm$  SEM of three assays.

$k_1$ 은 5 $\mu$ M CHP에 의해 약 2.3배 감소되었으나,  $k_{-1}$ 은 거의 영향을 받지 않았다. 따라서 이로부터 계산된  $K_D$ 치는 5 $\mu$ M CHP군에서 약 2.3배 높았다.

**[ $^3$ H]QNB결합의 Scatchard analysis**—전술의 실험에서 형질막의 [ $^3$ H]QNB결합에 미치는 CHP의 영향을 확인하기 위하여, 5 $\mu$ M CHP존재 하에서 [ $^3$ H]QNB결합의 Scatchard analysis를 시행하여 보았다. Fig. 4는 [ $^3$ H]QNB농도 증가에 따른 [ $^3$ H]QNB결합정도를 도시한 것으로 10~250pM [ $^3$ H]QNB 농도 범위내에서 농도 증가에 따라 [ $^3$ H]QNB결합이 증가되었다. Fig. 4의 saturation curve를 Scatchard plot했을 때(Fig. 5), 각 점이 직선상에 있는 것으로 보아 형질막에는 QNB에 대하여 affinity가 같은 단일결합부



**Fig. 4**—A typical single experiment of specific [ $^3$ H]QNB binding to dog cardiac sarcolemma. Sarcolemmal proteins (20 $\mu$ g) were incubated in duplicate with various concentrations of [ $^3$ H]QNB. •: control, ○: chlorpheniramine (5 $\mu$ M). Nonspecific binding was defined in the presence of 2 $\times$ 10 $^{-6}$ M atropine.



**Fig. 5**—Scatchard plot of [<sup>3</sup>H]QNB binding to dog cardiac sarcolemma. Bound [<sup>3</sup>H]QNB/free [<sup>3</sup>H]QNB (B/F) was plotted as a function of specific [<sup>3</sup>H] QNB bound (B) to the sarcolemma. The data of Scatchard analysis are the results obtained in Fig. 4. ●: control, ○: chlorpheniramine(5µM).

**Table V**—Effect of chlorpheniramine on the binding parameters of [<sup>3</sup>H]QNB to dog cardiac sarcolemma.

	$K_D$ (pM)	$B_{max}$ (fmol/mg)
Control	44.8 ± 4.7	7856.4 ± 607.5
5µM Chlorpheniramine	102.1 ± 10.5	8259.5 ± 923.0

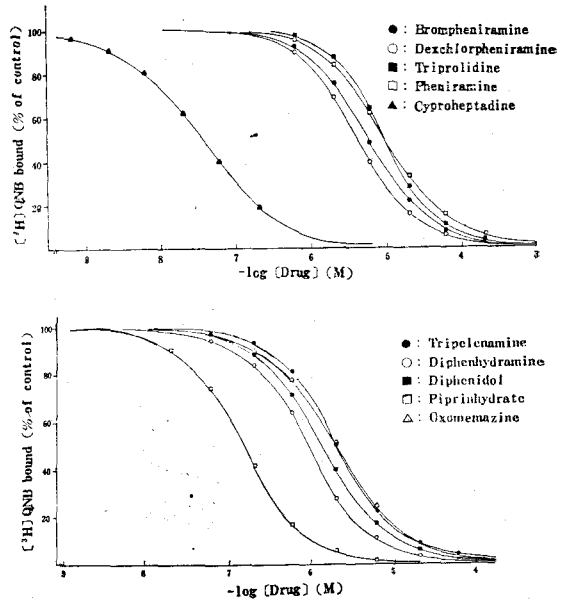
$K_D$  and  $B_{max}$  were calculated from Scatchard analysis.

Values are mean ± SEM of five different assays.

위가 존재하는 것으로 생각된다.

Table V는 Scatchard analysis로 계산된 [<sup>3</sup>H]QNB결합의  $K_D$ 치와  $B_{max}$ 치를 종합, 요약한 것으로 각군의  $K_D$ 치는 rate constant로 구해진  $K_D$ 치와 유사하였고, 여기에서도 CHP에 의해 [<sup>3</sup>H]QNB결합의  $K_D$ 치가 약 2.3배 증가되었다. 그러나 [<sup>3</sup>H]QNB의 결합부위농도( $B_{max}$ )는 CHP로 영향을 받지 않았다. 이로보아 CHP에 의한 [<sup>3</sup>H]QNB결합의  $K_D$ 치 증가는 association감소에 기인한 것으로 생각된다.

[<sup>3</sup>H]QNB결합에 대한 수종 항 histamine제의 영향 비교—수종 항 histamine제의 muscarinic receptor에 대한 [<sup>3</sup>H]QNB결합의 억제정도를 비



**Fig. 6**—Inhibition of [<sup>3</sup>H]QNB binding by antihistaminics to dog cardiac sarcolemma.

Sarcolemma proteins (20µg) were incubated with 50pM [<sup>3</sup>H] QNB for 90min at 37°C in the presence of various concentrations of drugs. Each point denotes the mean of three or four independent experiments.

교해 보기 위하여, 각 항 histamine제의  $I_{50}$ 치를 구하고 여기서부터  $K_i$ 치<sup>22)</sup>를 계산하였다(Fig. 6, Table V).  $H_1$ -blocker의  $K_i$ 치는 0.02~4.8 µM로서  $H_1$ -blocker의 종류에 따라 현저한 차이가 있었다. 이중 alkylamine유도체인 cyproheptadine(약 19nM)과 piperazine유도체인 piprinhydrate(약 80nM)가 다른  $H_1$ -blockers(약 0.5~5 µM)보다 [<sup>3</sup>H]QNB결합 억제작용이 현저하게 강한 반면,  $H_2$ -blocker인 cimetidine(약 230µM)은 [<sup>3</sup>H]QNB결합 억제작용이 거의 없었다. 한편 전형적인 muscarinic receptor차단제인 atropine의  $K_i$ 치는 약 1nM로서 cyproheptadine보다 약 20배 강하였다. 또한 여러농도의 각 항 histamine제 존재하에서 시행한 형질막의 [<sup>3</sup>H]QNB결합 실험 결과를 Hill plot하여 구한 Hill coefficient(nH)는  $H_1$ ,  $H_2$ -blocker 및 atropine에서 각각 약 1로 유사하였다.

**Table VI**— $I_{50}$  value for inhibition of [ $^3H$ ]QNB binding by antihistaminics to dog cardiac sarcolemma,  $K_1$  value and Hill coefficient.

	a $I_{50}$ ( $\mu M$ )	b $K_1$ ( $\mu M$ )	c nH	d n
<b>Alkylamines</b>				
Brompheniramine	5.5±0.4	2.8±0.2	1.26±0.12	3
Chlorpheniramine	5.1±0.3	2.5±0.1	1.06±0.10	4
Cyproheptadine	0.037±0.004	0.019±0.002	0.88±0.02	4
Dexchlorpheniramine	4.0±0.4	2.0±0.2	1.04±0.10	3
Pheniramine	9.5±0.9	4.8±0.5	0.97±0.07	3
Triprolidine	9.5±0.5	4.8±0.3	1.15±0.11	3
<b>Piperazines</b>				
Diphenidol	1.4±0.3	0.71±0.13	1.08±0.08	3
Piprinhydrate	0.15±0.02	0.08±0.01	1.16±0.10	4
<b>Ethanolamine</b>				
Diphenhydramine	0.9±0.1	0.46±0.05	1.15±0.11	4
<b>Ethylenediamine</b>				
Tripelenamine	2.0±0.3	1.0±0.15	1.14±0.10	3
<b>Phenothiazine</b>				
Oxomemazine	2.0±0.5	1.0±0.3	1.03±0.09	3
<b>H<sub>2</sub>-blocker</b>				
Cimetidine	480±40	230±20	1.20±0.10	4
<b>Muscarinic blocker</b>				
Atropine	0.0019±0.0003	0.001±0.0002	1.03±0.10	4

a: Concentration of antihistaminics which inhibited 50% of the specific [ $^3H$ ]QNB binding in the presence of 50pM [ $^3H$ ]QNB

b: Calculated from  $K_1 = I_{50} / (1 + F/K_D)$

c: Hill coefficient (nH) calculated from Hill plot

d: Number of independent determinations

**고 찰**

본 실험결과 histamine H<sub>1</sub>-receptor 차단제는 약물에 따라 정도의 차이는 있으나 심장형질막의 [ $^3H$ ]QNB결합을 억제하였으며, 이러한 작용은 [ $^3H$ ]QNB의 affinity의 감소에 기인함을 알았다.

[ $^3H$ ]QNB가 뇌<sup>23,24)</sup> 장종주근<sup>25)</sup> 심장<sup>26)</sup> 등 여러 조직에 결합하고 그 결합이 특정 receptor결합 조건인 포화성, 입체특이성, 높은 친화성등을 만족시키며,<sup>27)</sup> muscarinic receptor에 작용하는 약물의 약리학적 potency의 순위가 이들 약물에 의한 [ $^3H$ ]QNB의 dissociation순위와 같다는 점<sup>28)</sup>

에서 [ $^3H$ ]QNB는 cholinergic muscarinic receptor에 선택적으로 결합하는 약물로 muscarinic receptor와 약물과의 상호작용을 연구하는데 흔히 사용되고 있다. 본 실험에서 시행한 개 심실 형질막의 [ $^3H$ ]QNB결합도 포화성(saturable)이고 친화성이 높았으며 atropine으로 dissociation되었다. 뿐만 아니라 association과 dissociation rate constant로 계산된  $K_D(k_{-1}/k_1)$ 값이 saturation실험(Scatchard analysis)으로 구한  $K_D$ 값과 잘 일치하고 Hill coefficient가 1.0인 것으로 미루어 [ $^3H$ ]QNB는 형질막의 일정한 단일 muscarinic receptor site에 선택적으로 결합하는 것으로 생각된다. 이 점은 닭 심실<sup>26)</sup> 및 guinea pig회장<sup>28)</sup>에서 약리학적 작용으로 측정된 atropine의  $K_D$

값과 같은 조직에서 경쟁적 결합실험으로 측정된 atropine의  $K_D$ 값이 본 실험에서 [ $^3\text{H}$ ]QNB 결합억제제로부터 산출된 atropine의  $K_i$ 값(1nM)과 거의 일치하였고 atropine의 Hill coefficient 역시 1이었다는 점으로 더욱 뒷받침된다.

근래 Field 등<sup>29)</sup>은 muscarinic agonists 또는 antagonists로 임상적으로나 실험적으로 사용되는 약물 이외에도 benzilquinolium, decamethonium, chlorpromazine, imipramine, quinidine 등 여러 가지 약물들이 심장 muscarinic receptor에 대한 [ $^3\text{H}$ ]QNB결합을 억제하고 특히 이러한 작용은 이들 약물중 imipramine의 심장독성과 quinidine의 일부 부정맥치료효과와 관련이 있을 것으로 시사하였고, Yamamura와 Snyder<sup>23)</sup>는 항 histamine제인 chlorpheniramine과 brompheniramine이 쥐 뇌 homogenate의 [ $^3\text{H}$ ]QNB결합을 억제한다고 하였으며, Burgen과 Harbird<sup>16)</sup>도 쥐 대뇌 피질에서 diphenhydramine 등 6종의  $\text{H}_1$ -antagonists가 [ $^3\text{H}$ ]propylbenzylcholine의 muscarinic receptor결합을 억제한다고 보고하였다. 그러나 이러한  $\text{H}_1$ -antagonists에 의한 [ $^3\text{H}$ ]QNB결합억제가 association 또는 dissociation rate constant의 변화에 기인하는 affinity의 감소와 관계가 있는지 또는 결합부위의 감소와 관계가 있는지에 관해서는 알려지지 않고 있다. 본 실험에서 chlorpheniramine (CHP)은 개 심실형질막의 muscarinic receptor에 대한 [ $^3\text{H}$ ]QNB의 association을 억제하였으나, [ $^3\text{H}$ ]QNB결합의 반을 억제하는 농도로도 receptor로부터의 QNB의 dissociation rate에는 영향을 미치지 않았다. 이와같은 CHP에 의한 QNB의 affinity감소는 Scatchard analysis에서도 확인되었으나, 결합부위의 농도( $B_{\max}$ )는 CHP에 의해 영향을 받지 않았다. 일반적으로 muscarinic receptor에 직접 작용하는 약물은 QNB의 dissociation에 영향을 주지 않는데 비하여<sup>30)</sup> allosteric site에 작용하여 receptor를 차단하는 gallamine<sup>31)</sup>, quinidine<sup>32)</sup>, verapamil<sup>33)</sup> 및 bisquaternary oximes<sup>34)</sup>과 같은 약물은 muscarinic receptor에 결합한 ligand의 dissociation rate를 변화시킨다는 보고와 본 실험에서 CHP가 QNB의 cooperativity에 영향을 미치지 못했을

뿐 아니라 CHP의 Hill coefficient 역시 1에 가깝다는 점으로 미루어, CHP는 일정한 단일 muscarinic receptor의 QNB결합부위에 직접 결합하여 muscarinic receptor를 차단하는 것으로 생각된다.

본 실험결과, CHP 이외에도 여러가지  $\text{H}_1$ -blockers가 muscarinic receptor 차단작용을 가지고 있음을 알수 있었으며, 이들 약물의 muscarinic receptor에 대한  $K_D$ 값이 약물에 따라 다르게 나타났다(0.2~4.8 $\mu\text{M}$ ). 본 실험에서 측정된  $\text{H}_1$ -blockers의 muscarinic receptor에 대한  $K_D$ 값이 이미 보고<sup>35)</sup>된  $\text{H}_1$ -receptor에 대한  $K_D$ 값과 상당한 차이(6~1,000배)가 있었으나, 일반적으로 임상에서  $\text{H}_1$ -blocker를 투여시  $\text{H}_1$ -receptor의 작용을 완전히 차단할 수 있는 충분한 양을 사용하고 이때의 혈중농도는  $\text{H}_1$ -receptor에 대한  $K_D$ 값보다 훨씬 초과하게 될 것이므로 이 농도에서 일부 muscarinic receptor가 차단될 것으로 생각된다. 실제로 diphenhydramine 상용량(50mg)을 경구 및 정맥투여시 최고 혈중농도는 각각 50ng/ml(약 0.2 $\mu\text{M}$ ) 및 150ng/ml(약 0.6 $\mu\text{M}$ )로서<sup>36)</sup>  $\text{H}_1$ -receptor에 대한  $K_D$ 값(17nM)의 10~30배에 해당되며 이 농도는 muscarinic receptor에 대한  $K_D$ 값(0.46 $\mu\text{M}$ )과 유사하다는 점으로 보아 상용량으로도 상당한 muscarinic receptor 차단작용이 나타날 것으로 생각된다. 이러한 muscarinic receptor의 차단정도는 전술한 바와 같이  $\text{H}_1$ -blocker종류에 따라 다르며 그 potency의 순위 역시  $\text{H}_1$ -receptor를 차단하는 potency의 순위와 큰 차이가 있었다. 예를들면 diphenhydramine은 CHP에 비해  $\text{H}_1$ -receptor 차단작용은 약한데 muscarinic receptor 차단작용이 강하고, cyproheptadine과 brompheniramine 및 triprolidine은  $\text{H}_1$ -receptor 차단작용이 서로 비슷한데 비해 muscarinic receptor 차단작용은 cyproheptadine의 경우 brompheniramine보다 약 150배, triprolidine보다 약 250배 강하였다. 이는 임상에서 부교감신경 차단에 의한 부작용을 감소시키기 위해서 뿐만 아니라 전립선비대증 환자같은 부교감신경 차단작용을 가지는 약물을 사용할 수 없는 환자에게  $\text{H}_1$ -blocker를 사용할 때 그 약물선경이 때



우 중요하며 본 실험 결과가 이에 부합하는 의의있는 자료가 될수 있음을 시사한다.

결 론

Histamine H<sub>1</sub>-receptor 차단제와 muscarinic receptor와의 상호작용에 관한 지견을 얻고, 나아가 수종 항 histamine제의 muscarinic receptor에 대한 작용을 비교검토하기 위하여, 개 심실로부터 형질막을 분리하고 형질막의 [<sup>3</sup>H]QNB 결합에 미치는 항 histamine제의 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 50pM의 [<sup>3</sup>H]QNB 존재하에서 평형결합에 도달시간은 대조군과 5μM CHP처리군에서 각각 60분 및 90분이었다.
- 2) 5μM CHP는 [<sup>3</sup>H]QNB의 association을 지연시켰으나 dissociation에는 영향을 주지 않았다.
- 3) [<sup>3</sup>H]QNB결합의 K<sub>D</sub>와 B<sub>max</sub>가 대조군에서는 각각 44.8±4.7 pM 및 7,856.4±607.5 fmol/mg이었고, 5μM CHP 존재하에서는 각각 102.1±10.5 pM 및 8,259.5±923.0 fmol/mg이었다.
- 4) H<sub>1</sub>-blocker의 K<sub>i</sub>치는 H<sub>1</sub>-blocker종류에 따라 0.02~4.8μM범위내에 있었으나, H<sub>2</sub>-blocker인 cimetidine의 K<sub>i</sub>치는 약 230μM이었다.
- 5) 이상 실험결과는 CHP에 의한 심장 muscarinic receptor에 대한 [<sup>3</sup>H]QNB의 affinity감소가 [<sup>3</sup>H]QNB의 association억제에 기인하며 이러한 작용이 항 histamine제의 종류에 따라 현저한 차이가 있음을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 1987년도 영남대학교 교비 연구조성비 지원에 의하여 이루어졌습니다. 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Nakahata, N., Martin, M.W., Hughes, A.R., Hepler, J.R. and Harden, T.K.: H<sub>1</sub>-histamine receptors on human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* **29**, 188 (1985).

- 2) Hill, S.J. and Young, J.M.: Characterization of [<sup>3</sup>H]mepyramine binding to the longitudinal muscle of guinea pig small intestine. *Mol. Pharmacol.* **19**, 379 (1981).
- 3) Schoeffter, P., Ghysel-Burton, J., Cabanie, M. and Godfraind, T.: Competitive and stereoselective histamine H<sub>1</sub>-antagonistic effect of cicletanide in guinea pig isolated ileum. *Eur. J. Pharmacol.* **136**, 235 (1987).
- 4) Levi, R. and Kuye, J.O.: Pharmacological characterization of cardiac histamine receptors: sensitivity to H<sub>1</sub>-receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **27**, 330 (1974).
- 5) Duncan, P.G., Brink, C., Adolphson, R.L. and Douglas, J.S.: Cyclic nucleotides and contraction/relaxation in airway muscle: H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> agonists and antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **215**, 434 (1980).
- 6) Toshimitsu, Y., Uchida, K., Kojima, S. and Shimo, Y.: Histamine responses mediated via H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-receptors in the isolated portal vein of the dog. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**, 404 (1984).
- 7) Hill, S.J., Young, J.M. and Marrian, D.H.: Specific binding of [<sup>3</sup>H]mepyramine to histamine H<sub>1</sub>-receptors in intestinal smooth muscle. *Nature (London)* **270**, 361(1977).
- 8) Rinkema, L.E., Bemis, K.G. and Fleisch, J.H.: Production and antagonism of cutaneous vascular permeability in guinea pig in response to histamine, leukotrienes and A23187. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**, 550 (1984).
- 9) Barbin, G., Palacois, M., Roclergas, E., Schwartz, J.C. and Garbarg, M.: Characterization of high affinity binding sites of [<sup>3</sup>H]histamine in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **18**, 1 (1980).
- 10) Richelson, E.: Tricyclic antidepressants block histamine H<sub>1</sub> receptor-mediated cyclic GMP formation by nerve cells. *Nature(London)* **274**, 176 (1978).
- 11) Chang, R.S.L., Tran, V.T. and Snyder, S.H.: Heterogeneity of histamine H<sub>1</sub>-receptors: species variations in [<sup>3</sup>H]mepyramine bindings of brain membranes. *J. Neurochem.* **32**, 1653 (1979).
- 12) Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and

- Murad, F.: *The Pharmacological basis of therapeutics*, 618 (1985).
- 13) Wood, C.D.: Antimotion sickness and antiemetic drugs. *Drugs* 17, 471 (1979).
  - 14) Chinn, H.I. and Smith, P.K.: Motion sickness. *Pharmacol. Rev.* 7, 33 (1955).
  - 15) Jaju, B.P. and Wang, S.C.: Effects of diphenhydramine and dimenhydratate on vestibular neuronal activity of cat: a search for the locus of their antimotion sickness action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 718 (1971).
  - 16) Burgen, A.S.V. and Harbird, C.J.: The effect of sulphhydryl block on the binding of H<sub>1</sub>-antagonist to the muscarinic receptor. *Br. J. Pharmacol.* 80, 600 (1983).
  - 17) Van Alstyne, E., Burch, R.M., Knickelbein, R. G., Hungerford, R.T., Gower, E.T., Webb, J.G., Poe, S.L. and Lindenmayer, G.E.: Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle. *Biochem. Biophys. Acta.* 602, 131 (1980).
  - 18) Lee, S.W., Schwartz, A., Adams, R.J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L.K. and Wallick, E.T.: Decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and [<sup>3</sup>H] ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 5, 682 (1983).
  - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
  - 20) Schwartz, A., Allen, J.C. and Harigaya, S.: Possible involvement of cardiac Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphate in the mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 31 (1969).
  - 21) Chase, D.G. and Rabinowiz, J.L.: Principles of Radioisotope Methodology, 2nd ed., Burgess Publ. Co. Minneapolis, p.235 (1962).
  - 22) Cheng, Y.C. and Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration (I<sub>50</sub>) of an enzymatic relation. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099 (1973).
  - 23) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 17, 1725 (1974).
  - 24) Wastexk, G.J. and Yamamura, H.J.: Biochemical characterization of the muscarinic cholinergic receptor in human brain: Alteration in Huntington's disease. *Mol. Pharmacol.* 14, 768 (1978).
  - 25) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzilate. *Mol. Pharmacol.* 10, 861 (1974).
  - 26) Sorota, S., Adam, L.P. and Pappano, A.J.: Comparison of muscarinic receptor properties in hatched chick heart atrium and ventricle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236, 602 (1986).
  - 27) Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Mehta, P.: The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 14, 737 (1978).
  - 28) Ehlert, F.J., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.: The nature of muscarinic receptor binding. *Handb. Psychopharmacol.* 17, 241 (1983).
  - 29) Fields, J.Z., Roeske, W.R., Morkin, E. and Yamamura, H.I.: Cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemical identification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253, 3251 (1978).
  - 30) Luthin, G.R. and Wolfe, B.B.: [<sup>3</sup>H] Pirenzepine and [<sup>3</sup>H] quinuclidinyl benzilate binding to brain muscarinic cholinergic receptors. Differences in measured receptor density are not explained by difference in receptor isomerization. *Mol. Pharmacol.* 26, 164 (1984).
  - 31) Nedoma, J., Tuček, S., Danilov, A.F. and Shelkovnikov, S.A.: Stabilization of antagonist binding to cardiac muscarinic acetylcholine receptor by gallamine and other neuromuscular blocking drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236, 219 (1986).
  - 32) Waelbroeck, M. De Neef, P., Robberecht, P. and Christophe, J.: Inhibitory effects of quinidine on rat heart muscarinic receptors. *Life Sci.* 35, 1069 (1984).
  - 33) Waelbroeck, M., Robberecht, P., De Neef, P. and Christophe, J.: Effects of verapamil on the

- binding properties of rat heart muscarinic receptors: Evidence for an allosteric site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 340 (1984).
- 34) Kloog, Y. and Sokolovsky, M.: Bisquaternary pyridium oximes as allosteric inhibitors of rat brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol* **27**, 418 (1985).
- 35) Tran, V.T., Chang, R.S.L. and Snyder, S.H.: Histamine H<sub>1</sub>-receptors identified in mammalian brain membranes with [<sup>3</sup>H]mepyramine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **75**, 6290 (1978).
- 36) Carruthers, S.G., Shoeman, D.W., Hignite, C.E. and Azarnoff, D.L.: Correlation between plasma diphenhydramine level and sedative and antihistaminic effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **23**, 375 (1978).