

항 Histamine 제와 Muscarinic Receptor 와의 상호작용(II) —대뇌 Muscarinic M₁ Receptor 에 대한 작용—

이신웅 · 박영주 · 박인숙 · 이정수

영남대학교 약학대학

(Received May 21, 1990)

Interaction of Antihistaminics with Muscarinic Receptor(II) —Action on the cerebral muscarinic M₁ Receptor—

Shin-Woong Lee, Young-Joo Park, In-Sook Park and Jeung-Soo Lee

College of Pharmacy, Yeungnam University Kyongsan 713-749, Korea

Abstract— A single uniform population of specific, saturable, high affinity binding site of [³H] guinclidinyl benzilate(QNB) was identified in the rat cerebral microsomes. The K_d value(37.2 pM) for [³H]QNB calculated from the kinetically derived rate constants was in agreement with the K_d value(48.9 pM) determined by analysis of saturation isotherms at various receptor concentrations. Dimenhydrinate(DMH), histamine H₁-blocker, increased K_d value for [³H] QNB without affecting the binding site concentrations and this effect resulted from the ability of DMH to slow [³H]QNB-receptor association. Pirenzepine inhibition curve of [³H]QNB binding was shallow(nH=0.52) indicating the presence of two receptor subtypes with high (M₁-site) and low(M₂-site) affinity for pirenzepine. Analysis of these inhibition curves yielded that 68% of the total receptor populations were of the M₁-subtype and the remaining 32% of the M₂-subtype. K_i values for the M₁- and M₂-subtypes were 2.42 nM and 629.3 nM, respectively. K_i values for H₁-blockers that inhibited [³H]QNB binding varied with a wide range (0.02-2.5 μM). The Pseudo-Hill coefficients for inhibition of [³H]QNB binding by most of H₁-blockers examined except for oxomemazine inhibition of [³H]QNB binding were close to one. The inhibition curve for oxomemazine in competition with [³H]QNB was shallow(nH=0.74) indicating the presence of two receptor populations with different affinities for this drug. The proportion of high and low affinity was 33:67. The K_i values for oxomemazine were 0.045 ± 0.016 μM for high affinity and 1.145 ± 0.232 μM for low affinity sites. These data indicate that muscarinic receptor blocking potency of H₁-blockers varies widely between different drugs and that most of H₁-blockers examined are nonselective antagonist for the muscarinic receptor subtypes, whereas oxomemazine might be capable of distinguishing between subclasses of muscarinic receptor.

Keywords □ Antihistamines, muscarinic receptor, cerebrum.

Histamine H₁-receptor 길항제는 histamine 의 H₁-receptor 차단작용 이외에도 muscarinic receptor 차단작용이 있음이 잘 알려져 있다.^{1,2)} 항 histamine 제의 muscarinic receptor 차단작용은 이들 약물을 allergy 질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용할 때 흔히 나타나는 구갈 증상이나 중추신경 억제증상³⁻⁵⁾과 같은 부작용의 직접적인 원인이 되기도 하나 멀미(motion sickness)예방⁶⁻⁹⁾의 주

작용이 되기도 한다.

최근 Lee 등¹⁰⁾은 histamine H₁-receptor 길항제가 개 심장 muscarinic receptor 에 대한 [³H] quinuclidinyl benzilate(QNB)의 association 을 억제함으로써 [³H]QNB 의 affinity 를 감소시키며, 이러한 작용이 항 histamine 제의 종류에 따라 현저한 차이가 있어 이들 약물 사용시 부교감신경 차단에 의한 부작용을 감소시키기 위해서는 그 약물

선정이 매우 중요함을 시사한 바 있다.

약물-receptor 상호작용은 약물에 대한 조직의 반응성을 측정하여 추정할 수도 있다. 그러나 약물이 receptor에 결합하여 최종 반응을 일으키기까지는 많은 복잡한 과정을 거치기 때문에 그 결과해석이 어려운 반면 receptor 결합실험은 약물-receptor 상호작용을 연구할 수 있는 더욱 직접적인 접근방법이 된다.

Muscarinic receptor 역시 이 receptor에 결합하는 방사능 표지약물이 개발되므로써 조직 중의 분포상태나 약물과의 상호작용에 관한 보다 폭 넓은 연구가 가능해졌으며,¹¹⁻¹⁵⁾ 근래 선택적인 muscarinic receptor 길항제인 pirenzepine의 소개로 muscarinic receptor에도 성질이 다른 subtype이 존재한다는 직접적인 근거를 제시할 수 있게 되었다. 즉 pirenzepine에 affinity가 큰 M₁-site와 affinity가 적은 M₂-site로 대별되며 대뇌, 자율신경절, 폐에는 M₁-receptor의 분포가 많고¹⁶⁻¹⁸⁾ 심장, 소장, 방광에는 M₂-receptor의 분포가 많은 것으로 알려지고 있다.¹⁹⁻²²⁾ 따라서 전술한 바와 같은 M₂-receptor population이 많은 심장 muscarinic receptor에 대한 항 histamine제의 작용과 그 potency의 순위를 그 receptor의 성질이 다른 대뇌 muscarinic receptor에 대한 이들 약물의 작용으로 추정, 설명하기가 곤란하다.

본 실험에서는 항 histamine제의 muscarinic receptor 차단작용이 이들 subtype에 대한 선택성을 가지는지 또는 atropine, scopolamine과 같이 선택성이 없는지²⁶⁾를 알아보기 위하여 비교적 M₁-site가 많은 대뇌로부터 microsome을 분리하고 이 microsome의 muscarinic receptor 결합에 미치는 항 histamine제의 영향을 심장 muscarinic receptor에 대한 이들의 작용성과 비교 검토하고자 하였다.

실험방법

재료 및 시약—실험동물은 외관상 건강한 체중 250~300g의 rat를 사용하였으며, filter는 Whatman 회사로부터 구입한 GF/B filter를 사용하였다. [³H]Quinuclidinyl benzilate([³H]QNB, 42.3 Ci/mmol)는 New England Nuclear Co.로부터

ter, tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), atropine sulfate, 1,4-bis[2-(*p*-phenyloxazolyl)]benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole(POP)은 Sigma Chemical Co.로부터 구입 사용하였고, pirenzepine 및 항 histamine제는 국립보건원으로부터 실험용으로 제공받았으며, 이외의 모든 시약은 특급 내지 일급품을 사용하였다.

쥐 대뇌로부터 microsome의 분리—뇌 microsome은 Mayrand 등²⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 제조하였다. 체중 250~300g의 rat를 단두도살하고 뇌를 적출, 빙냉의 10 mM Tris. Cl(pH 7.4)(Medium A) 중에 가하고 대뇌를 분리, 가위로 세절한 다음 여기에 뇌 무게의 약 30배가 되는 medium A를 가하고 이를 blender로 5초씩 4번 균질화한 후 1,100g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 7,700g에서 20분간 원심분리하고 이 상등액을 다시 55,000g에서 30분간 원심분리하여 microsome 분획을 얻었으며 이 분획을 소량의 medium A 중에 부유시켜 -70°C에 저장하였다가 필요시 사용하였다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등의 방법²⁵⁾으로 측정하였다.

[³H]Quinuclidinyl benzilate(QNB)결합실험—[³H]QNB 결합실험은 여과법에 의하였다. 즉 50 mM Tris. Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 일정농도의 [³H]QNB 및 항 histamine제를 함유하는 용액 중에 단백질을 가하고 총용적이 1 ml 되게 한 후 37°C에서 일정시간 반응시킨 다음 50 mM MgCl₂ 및 10 mM Tris. Cl(pH 7.4)를 함유하는 빙냉의 세척액 5 ml로 반응을 종료, 즉시 GF/B filter 상에서 여과하였다. Filter를 5 ml의 세척액으로 3회 세척, scintillation vial에 넣은 다음 8 ml의 scintillation액(PPO: 6g, POPOP: 225 mg, Triton X-100: 500g, Toluene: 1l)을 가하고 12 시간 이상 방치, liquid scintillation counter로 그 radioactivity를 측정하였다.

[³H]QNB의 muscarinic receptor 결합에 의한 specific radioactivity는 total radioactivity에서 전술의 medium 중에 10⁻⁶ M atropine을 공존시켰을 때 나타나는 nonspecific radioactivity를 뺀 값으로 하였다.

Muscarinic receptor에 대한 [³H]QNB의 K_d

치 측정— ^3H QNB의 dissociation constant (Kd)는 kinetic 실험과 saturation 실험으로 측정하였다. Kinetic method에서는 dissociation rate constant (k_{-1})와 association rate constant (k_1)의 비로 Kd($Kd=k_{-1}/k_1$)를 계산하였으며, k_{-1} 은 전술한 medium 중에 단백질 ($50\ \mu\text{g}$)과 ^3H QNB ($300\ \text{pM}$)를 가하고 평형에 도달하는 시간까지 incubation 한 후, atropine($10^{-6}\ \text{M}$)를 가하고 주어진 시간에서 일정량($1\ \text{ml}$)의 medium을 취하여 여과, 세척 및 방사능을 측정하였으며, 처음 결합된 ^3H QNB의 반이 해리되는 시간($t_{1/2}$)으로부터 산출하였다($k_{-1}=0.693/t_{1/2}$). k_1 은 $k_1=k_{\text{obs}}-k_{-1}/[I]$ 으로부터 구하였으며 (k_{obs} =observed first-order rate constant, $[I]$ =radiolabelled drug의 농도), 여기에서 k_{obs} 는 ^3H QNB 평형결합의 반이 결합되는 시간($t_{1/2}$)으로부터 계산하였다($k_{\text{obs}}=0.693/t_{1/2}$).

한편, saturation 실험에서는 전술의 medium 중에 여러 농도의 ^3H QNB와 단백질을 가한 다음 37°C 에서 180분간 반응시켰으며 반응을 종료시킨 후, 여과, 세척 및 방사능을 측정하여 각 농도에서의 ^3H QNB 결합을 산출한 다음 Kd와 B_{max} 를 구하였다.

^3H QNB 결합억제에 대한 비표지약물의 dissociation constant (Ki)치 측정—비표지약물의 dissociation constant (Ki)는 Cheng 등²⁰⁾의 방법으로 산출하였다. 즉 ^3H QNB 결합의 50%를 억제하는 비표지 약물의 농도 (IC_{50}), ^3H QNB의 Kd 및 사용한 ^3H QNB의 농도 (F)로부터 유도한 $Ki=\text{IC}_{50}/(1+F/Kd)$ 의 식으로부터 산출하였다.

Hill coefficient—Muscarinic receptor에 대한 ^3H QNB 결합의 Hill coefficient는 Scatchard analysis에서 얻은 자료를 $\text{Log}(Y/1-Y)=n\ \text{log}[F]-\text{log}[Kd]$ 에 적용, Hill plot하여 구하였다 ($Y=B/B_{\text{max}}$, $F=^3\text{H}$ QNB의 농도, n =Hill coefficient).

^3H QNB 결합억제에 대한 항 histamine 제의 Hill coefficient는 여러 농도의 항 histamine 제 존재하에서 ^3H QNB 결합억제 정도를 측정하고 이를 $\text{Log}(I/100-I)=n\ \text{log}[D]-\text{log}[\text{IC}_{50}]$ 에 적용시켜 Hill plot하여 구하였다 (I =% inhibition, n =Hill coefficient, D =비표지약물의 농도).

비표지약물에 의한 muscarinic receptor subtype 추정—Pirenzepine 또는 항 histamine 제에 의한 ^3H QNB 결합억제의 결과를 Munson 등²⁷⁾의 two-site model에 적용, 분석한 후 two-site model에 적합할 경우 high affinity site와 low affinity site의 분포비 및 각 site에 대한 affinity (Ki)를 산출하였다.

실험결과

시간경과에 따른 ^3H QNB 결합변화— ^3H QNB의 평형결합 시간을 알아보기 위하여 $300\ \text{pM}$ ^3H QNB 존재하에서 시간경과에 따른 ^3H QNB 결합 정도를 조사하였다(Fig. 1). 대뇌 muscarinic receptor에 대한 ^3H QNB의 특이결합은 시간경과에 따라 증가되다가 90분에 거의 평형에 도달하였으나 비특이결합은 incubation 시간에 영향을 받지 않았을 뿐 아니라 전체결합의 3% 미만이었다. 또한 microsome을 ^3H QNB와 평형에 도달하는 충분한 시간인 180분간 incubation 한 후 $10^{-6}\ \text{M}$ atropine을 가했을 때는 receptor에 결합된 ^3H QNB가 dissociation 되었으며 이 과정 역시 time dependent하였다. 즉 대뇌 microsome의 ^3H QNB 결합은 가역적이며, $300\ \text{pM}$ ^3H QNB 존재하에서 반이 결합되는 시간은 약 15분, 반이 해리되는 시간은 약 140분임을 알 수 있었다.

대뇌 muscarinic receptor의 ^3H QNB 결합특성—대뇌 microsome의 ^3H QNB 결합이 포화성인지 또 ^3H QNB 결합을 위한 QNB의 affinity (Kd)와 결합부위농도 (B_{max})가 어느 정도인지를 알아보기 위하여 여러 농도의 ^3H QNB ($25\sim 1500\ \text{pM}$) 존재하에서 ^3H QNB 결합실험을 시행하여 보았다. 예비실험결과 $25\ \text{pM}$ ^3H QNB 존재하에서 microsome의 ^3H QNB 결합이 평형에 도달하는 시간이 150분이었으므로 본 실험에서도 microsome과 ^3H QNB를 평형에 도달하는 충분한 시간인 180분간 incubation 하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 대뇌 microsome의 ^3H QNB 결합은 ^3H QNB의 농도를 증가시키면 따라 증가되다가 $800\ \text{pM}$ 에서 최대에 이르는 포화성 결합이었다. 이 결과를 Scatchard analysis했을 때 각 점의 직선성이 인정되었다는 점 (Fig. 2)과

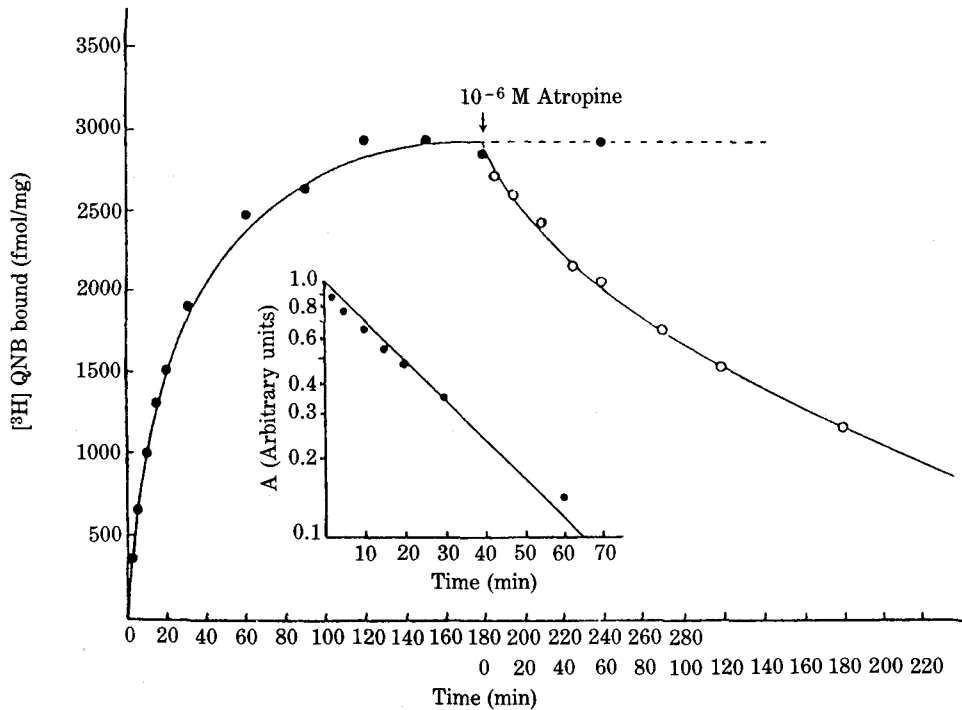


Fig. 1—Time course of the specific [³H] QNB binding and dissociation of [³H] QNB from muscarinic receptor in the rat cerebrum.

[³H] QNB binding was carried out at 37°C in the presence of 300 pM [³H] QNB under the same condition as described in Methods. Atropine (10⁻⁶ M) was added to the assay medium after incubation with [³H] QNB for 180 min. The amount of radioligand bound was then determined as a function of time after addition of atropine. Inset shows the association of [³H] QNB binding. Be-B/Be (log scale) versus time is shown, where Be and B are radioligand bound to microsome at equilibrium and at time t, respectively.

Hill plot 했을 때 (Fig. 3) Hill coefficient 가 1에 가까웠다는 점에서 [³H]QNB 는 일정한 단일 결합 부위에 결합한 것으로 추정되었다.

[³H]QNB 결합에 미치는 dimenhydrinate 의 영향—항 histamine 제인 dimenhydrinate 가 대뇌 muscarinic receptor 의 [³H]QNB 결합에 미치는 영향을 조사, 분석하기 위하여 dimenhydrinate (1 μM) 존재하에서 [³H]QNB 결합의 Scatchard analysis 를 시행하였던 바 dimenhydrinate 에 의하여 [³H]QNB 결합이 억제되고 Scatchard plot 했을 때 각 점을 잇는 회귀직선의 slope 가 증가되었으나 (Fig. 2), [³H]QNB 의 Hill coefficient 는 영향을 받지 않았다 (Fig. 3).

Table I 는 이 결과를 요약 정리한 것으로 대뇌 muscarinic receptor 에 대한 QNB 의 Kd 치 (약 116 pM) 는 1 μM 의 dimenhydrinate 에 의하

여 약 2.4배 증가되었으나 QNB 의 결합부위농도 (B_{max}) 는 dimenhydrinate 로 영향을 받지 않았으며 dimenhydrinate 존재하에서도 [³H]QNB 의 Hill coefficient 역시 약 1로서 대조군과 유사하였다.

[³H]QNB 의 association 및 dissociation 에 미치는 dimenhydrinate 의 영향—특정 receptor 에 대한 ligand 의 affinity 는 association rate constant 와 dissociation rate constant 로 결정되므로 dimenhydrinate 에 의한 [³H]QNB 의 muscarinic receptor 에 대한 affinity 감소가 association rate constant 의 감소에 기인하는지 또는 dissociation rate constant 의 증가에 기인하는지를 알아보았다.

Fig. 4A 는 300 pM 의 [³H]QNB 존재하에서 1 μM 의 dimenhydrinate 가 [³H]QNB 결합에 미

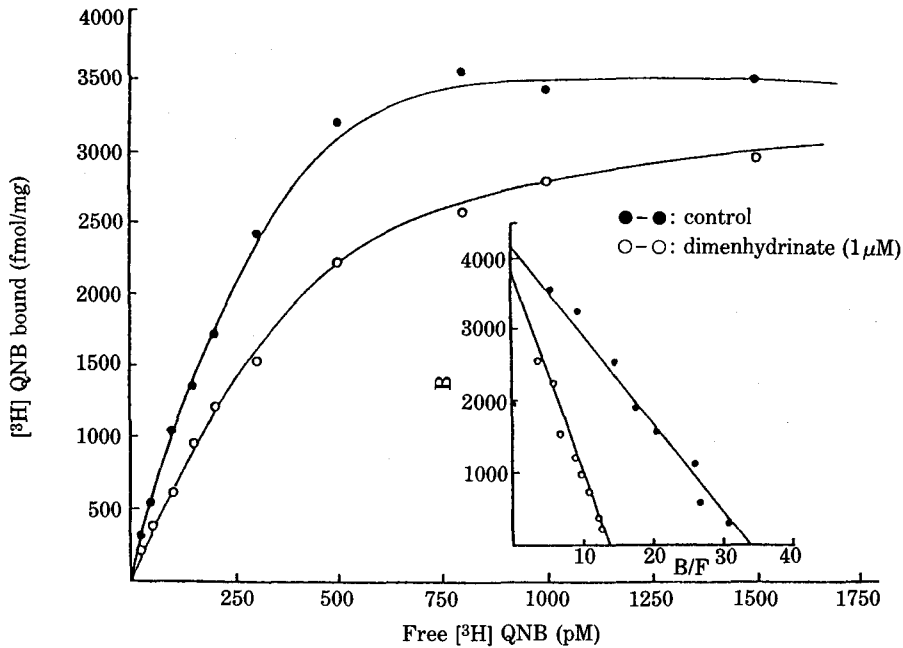


Fig. 2—A typical saturation experiment with $[^3\text{H}]$ QNB in rat cerebral microsome.

Microsomal protein ($50\ \mu\text{g}$) was incubated with various concentrations of $[^3\text{H}]$ QNB in the absence (\bullet) or presence (\circ) of dimenhydrinate ($1\ \mu\text{M}$) for 180 min at 37°C in a final volume of 1 ml. Other assay conditions were as described under "Methods". The inset shows a Scatchard plot of specific $[^3\text{H}]$ QNB binding. Bound $[^3\text{H}]$ QNB (B) was plotted as a function of bound $[^3\text{H}]$ QNB (B)/free $[^3\text{H}]$ QNB (F).

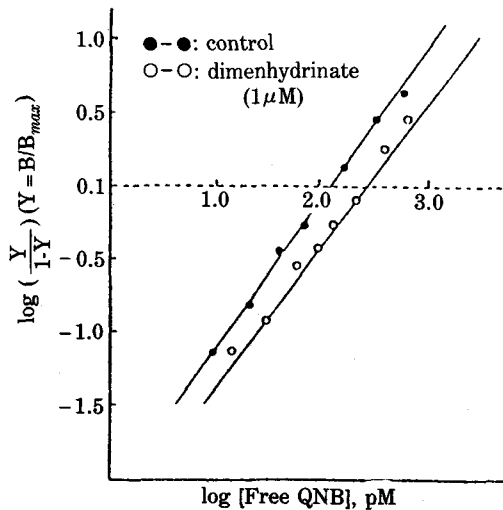


Fig. 3—Hill plot of $[^3\text{H}]$ QNB binding to rat cerebral microsome.

B: equilibrium binding at a given concentration of $[^3\text{H}]$ QNB.

B_{max} : binding site concentration calculated from Scatchard analysis.

Hill coefficient is taken as the slope of the regression line.

Table I—Effect of dimenhydrinate on binding parameters of $[^3\text{H}]$ QNB to rat cerebral microsome

	Kd (pM)	B_{max} (fmol/mg)	nH
Control	115.9 ± 10.4	4174.9 ± 258.6	1.02 ± 0.04
Dimenhydrinate ($1\ \mu\text{M}$)	$256.4 \pm 20.0^*$	3872.4 ± 382.6	1.03 ± 0.03

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

*: Significantly different from corresponding value of control ($p < 0.01$).

치는 영향을 관찰한 다음 시간 경과에 따른 결합변화를 도기한 것으로 $[^3\text{H}]$ QNB의 평형결합 도달시간이 대조군에서는 약 90분이던 것이 dimenhydrinate 존재하에서는 약 150분으로 지연되었으며, 평형결합의 반이 결합되는 시간($t_{1/2}$)은 대조군과 dimenhydrinate 군에서 각각 15.3분 및 41.9분이었다.

Fig. 4B에서는 300 pM의 $[^3\text{H}]$ QNB와 mi-

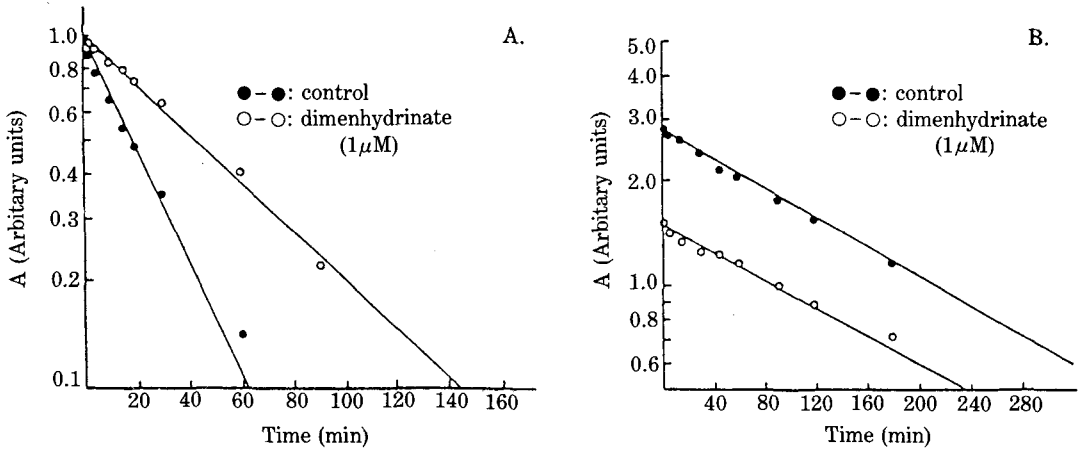


Fig. 4—Pseudo first-order binding of [³H] QNB to rat cerebral microsomes (A) and dissociation of [³H] QNB from muscarinic receptor-QNB complex (B).

Table II—Effect of dimenhydrinate on the kinetic constants of [³H] QNB binding to rat cerebrum

	k_1 (min ⁻¹ , M ⁻¹ × 10 ⁶) ^a	k_{-1} (min ⁻¹ × 10 ³) ^b	Kd (pM) ^c
Control	135.7 ± 12.7	4.90 ± 0.07	37.2 ± 3.8
Dimenhydrinate (1 μM)	37.7 ± 2.3	4.95 ± 0.28	131.8 ± 4.8

^a Calculated from $k_1 = (k_{obs} - k) / [I]$, where k_{obs} is the observed first order approach to equilibrium derive from studies shown in Fig. 4-A.

^b Derived from dissociation of [³H] QNB shown in Fig. 4-B

^c Calculated from $Kd = k_{-1} / k_1$

Values are the mean ± S.E.M. of four separate determinations.

osome을 1 μM의 dimenhydrinate를 함유하거나 함유하지 않는 medium 중에서 180분 동안 incubation하여 평형결합에 도달하게 한 다음 1 μM의 atropine을 가하고 시간경과에 따른 [³H] QNB의 dissociation 정도를 나타내었다. 본 실험에서 atropine을 가하기 전의 평형결합의 반이 dissociation되는 시간($t_{1/2}$)은 대조군과 dimenhydrinate군에서 다같이 약 140분으로 dimenhydrinate는 QNB의 dissociation에는 영향을 미치지 않았다.

Table II은 Fig. 4-A, B의 결과로 구한 association rate constant(k_1), dissociation rate constant(k_{-1}) 및 이들의 비로부터 계산된 dissociation constant(Kd)를 정리한 것으로 1 μM의 dimenhydrinate는 [³H]QNB 결합의 k_1 은 약 3.5 배 감소시켰으나 k_{-1} 에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 이로부터 계산된 muscarinic receptor에 대

한 QNB의 Kd치가 대조군에서 약 37 pM 이던 것이 1 μM의 dimenhydrinate에 의하여 약 132 pM으로 약 3.5배 증가되었다.

Receptor 농도에 따른 Kd치의 변화—전술의 실험결과, [³H]QNB 결합의 Scatchard analysis에서 구한 QNB의 Kd치와 rate constant로 구한 QNB의 Kd치 사이에는 상당한 차이가 있었다. 본 실험에서는 Scatchard 실험에서 측정된 높은 Kd치가 사용한 receptor 농도가 높는데 기인한 것인가를 알아보기 위하여 receptor 농도를 달리하면서 Scatchard analysis를 시행하고 각 receptor 농도에서 측정된 QNB의 Kd치와 receptor 농도와의 상관성을 조사하였다. Fig. 5는 receptor 농도에 따른 Kd치의 변화를 도시한 것으로 receptor 농도가 증가함에 따라 Kd치도 증가함을 나타내고 있다. 여기서 muscarinic receptor에 대한 QNB의 실제 Kd치는 receptor 농도가 무한히 낮을 때의

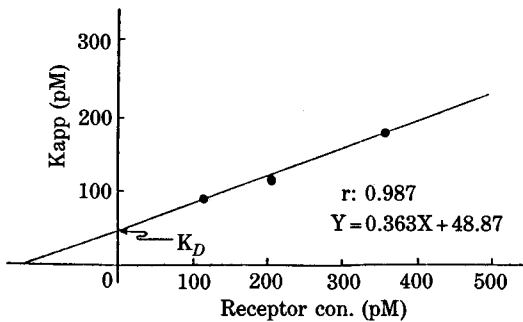


Fig. 5—Effect of receptor concentration on the value of the apparent dissociation constant (K_{app}). Saturation binding of $[^3H]$ QNB were performed at various concentrations of cerebral protein. K_{app} values were plotted as a function of receptor concentration. The K_d at infinitely low receptor concentration (Y intercept) was 48.9 ± 12.5 pM ($n=3$).

K_d 치인 48.9 ± 12.5 pM(3예)인 것으로 추정할 수 있었으며, 이 K_d 치는 rate constant 로 구한 K_d 치와 유사하였다.

$[^3H]$ QNB 결합에 미치는 pirenzepine 의 영향—본 실험에서 분리한 대뇌 microsome 에 muscarinic receptor 결합제인 pirenzepine 에 affinity 가 큰 M_1 -site 와 affinity 가 적은 M_2 -site 가 어느 정도 분포되어 있는지를 조사하고자 $[^3H]$ QNB 와 pirenzepine 의 경쟁적 결합실험을 시행하여 Fig. 6

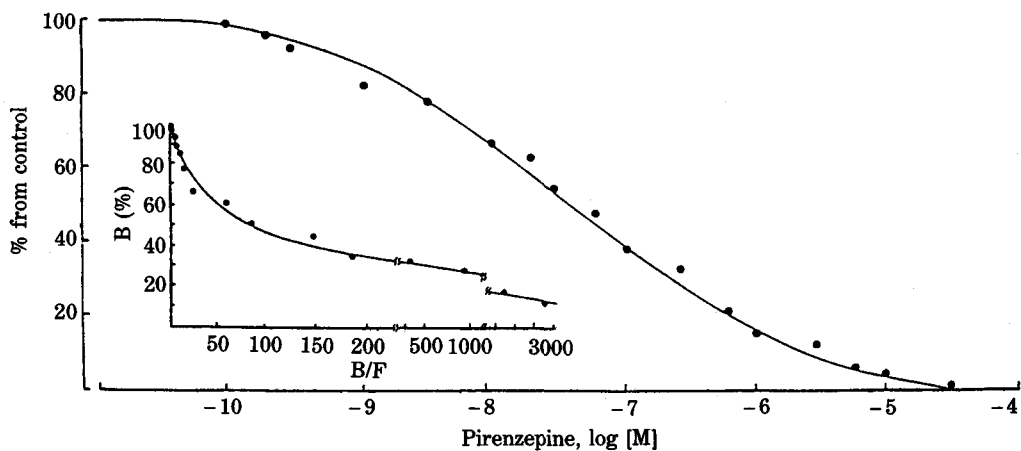


Fig. 6—Inhibition of $[^3H]$ QNB binding by pirenzepine to rat cerebral microsomes.

The concentration of $[^3H]$ QNB was 300 pM. Assay conditions were as described under "Methods". Inset: Hofstee plot of the competition binding data. B represents the percentage inhibition of $[^3H]$ QNB binding and F the free pirenzepine concentration. Each point represents the mean for five separate determinations.

Table III—Apparent K_i value of pirenzepine/ $[^3H]$ QNB competition binding curves to the total ($M_1 + M_2$) receptors, the M_1 -receptors and M_2 -receptors

Receptors	K_i (nM)	nH	% of total receptors
$M_1 + M_2$	9.6 ± 2.4	0.52 ± 0.03	100
M_1	2.4 ± 0.9		68 ± 4.7
M_2	629.3 ± 135.0		32 ± 4.7

The non-linear Hofstee plot shown in Fig. 6 was analysed according to a two-site model. The M_1 - and M_2 -receptors represent high and low affinity sites for pirenzepine, respectively. Values are the mean \pm S.E.M. of 5 separate determinations.

에 나타내었다.

300 pM 의 $[^3H]$ QNB 존재하에서 pirenzepine 은 10^{-10} M 에서부터 $[^3H]$ QNB 결합을 억제하기 시작하여 3×10^{-5} M 에서는 거의 $[^3H]$ QNB 결합을 일으키지 않았다. 이와 같이 pirenzepine 의 $[^3H]$ QNB 결합억제 곡선은 아주 완만하여 이를 Hofstee plot 한 바 각 점의 직선상이 인정되지 않았을 뿐 아니라 Hill plot 하였을 때 Hill coefficient 역시 0.52 였다. 이 결과로서 대뇌에는 pirenzepine 에 affinity 가 서로 다른 두 종류의 muscarinic receptor subtype 가 존재함을 추정 확인할 수 있었다. 따라서 $[^3H]$ QNB 와 pirenzepine

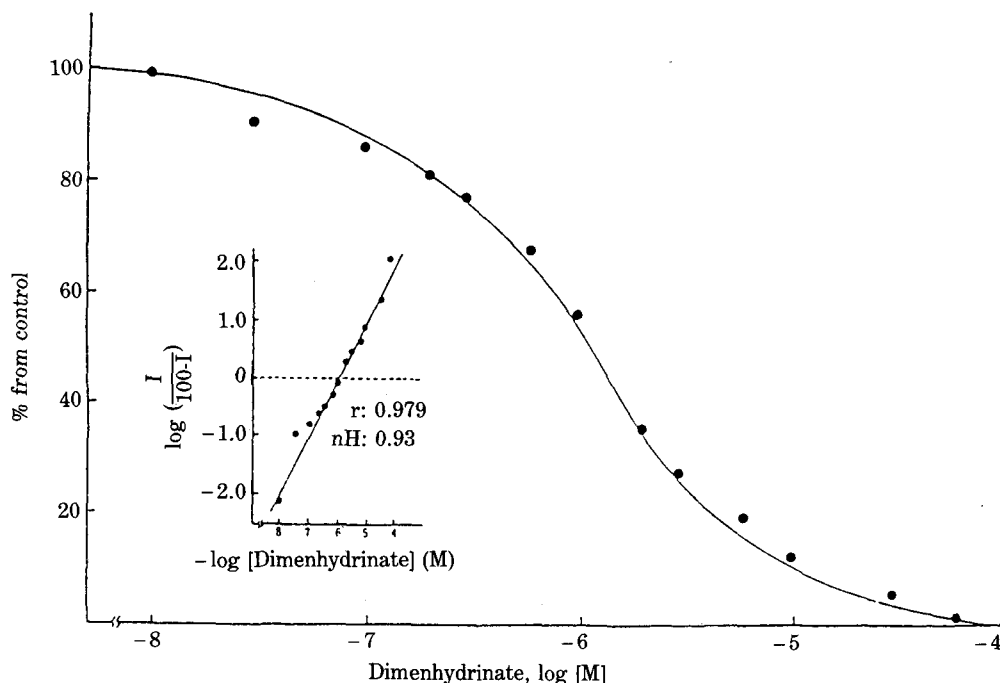


Fig. 7—Inhibition of [³H] QNB binding by dimenhydrinate to rat cerebral microsome.

Microsomes were incubated with 300 pM of [³H] QNB and various concentrations of dimenhydrinate for 180 min at 37°C. Inset: Hill plot of the inhibition data. I represents the percentage inhibition of [³H] QNB binding. Each data point is the mean for 3 separate determinations.

의 경쟁적 결합곡선을 Munson 등²⁷⁾의 two-site model로 분석한 결과 대뇌에서 M₁-site가 약 68%, M₂-site가 약 32% 분포되어 있는 것으로, M₁과 M₂-site에 대한 pirenzepine의 K_i치는 각각 2.4 nM 및 630 nM인 것으로 추정되었다(Table III).

[³H]QNB 결합억제에 대한 dimenhydrinate의 dissociation constant(K_i)—대뇌 muscarinic receptor에 dimenhydrinate에 대한 단일 결합부위가 있는지 또는 pirenzepine에서와 같이 affinity가 다른 결합부위가 있는지를 알아보고 아울러 이 부위에 대한 dimenhydrinate의 K_i치를 추정하여 보았다.

Fig. 7은 각 농도의 dimenhydrinate에 의한 [³H]QNB(300 pM) 결합억제 정도를 %로 나타내고 이를 Hill plot한 것으로 Hill coefficient가 0.93으로 1에 가까웠다. 따라서 dimenhydrinate는 QNB와 같이 선택성이 없이 단일결합 부위에 결합하는 것으로 추측되었으며, [³H]QNB 결합의 50%를 억제하는 dimenhydrinate의 농도(IC₅₀,

1.2 μM)로부터 이 부위에 대한 dimenhydrinate의 K_i치가 약 340 nM임을 추정할 수 있었다(Table IV).

수증 항 histamine제의 대뇌 muscarinic receptor에 대한 작용 비교—여러 가지 항 histamine제의 [³H]QNB 결합억제 작용을 비교하고 그 결합부위에 대한 지견을 얻고져 여러 농도의 각 항 histamine제 존재하에서 [³H]QNB 결합실험을 시행한 다음 각 억제곡선을 분석, Hill coefficient(nH)와 K_i치를 구하였다(Fig. 8, Table IV).

대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합은 본 실험에 사용된 각 항 histamine제에 의하여 용량 의존적으로 억제되었으며(Fig. 8), 대부분 약물에서 억제 곡선의 Hill slope(nH)가 1에 가까웠으나 oxomemazine의 경우 Hill slope가 0.74로서 상당히 완만한 양상을 보였다. 따라서 muscarinic receptor subtype에 대한 선택성이 없는 것으로 추정된 항 histamine제의 K_i치를 IC₅₀치로부터 계산하였던 바 0.02~2.5 μM로서 약물의 종류에 따라 현저한 차이가 있었다. 이 중 alkylamine 유도체인

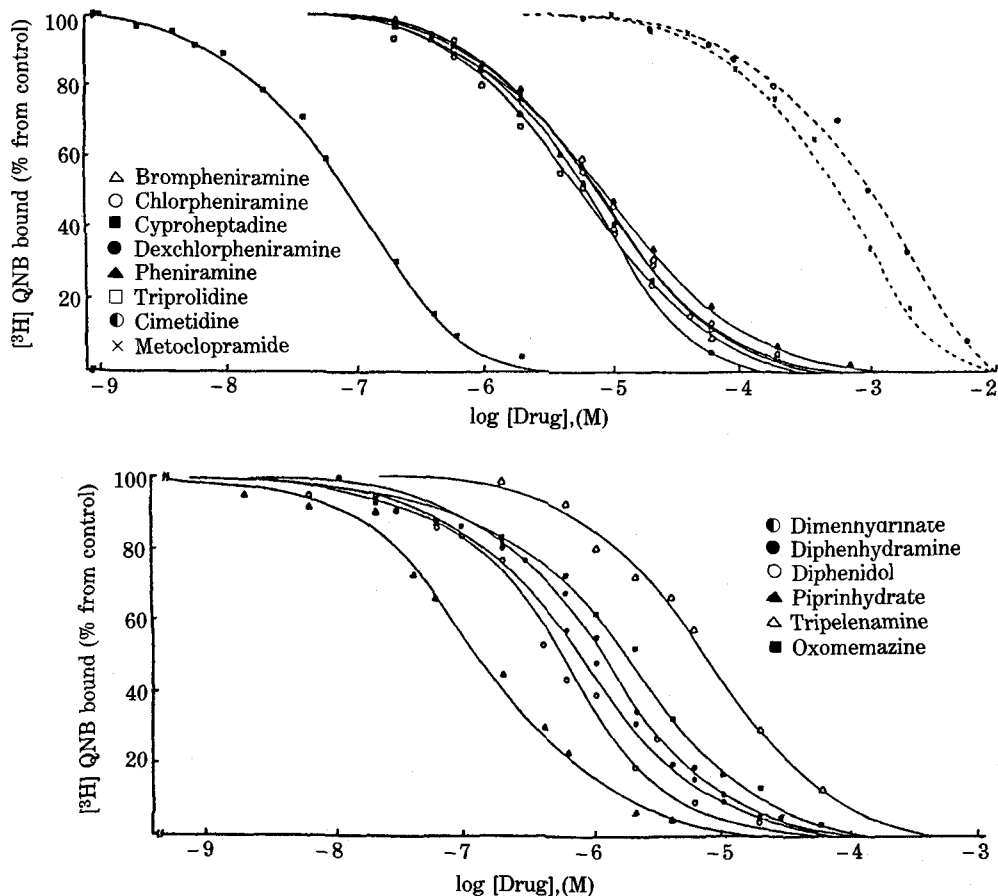


Fig. 8—Inhibition of $[^3\text{H}]$ QNB binding by antihistaminics to rat cerebrum.

Microsomes ($50\mu\text{g}$) were incubated with 300 pM $[^3\text{H}]$ QNB for 180 min at 37°C in the absence or presence of various concentrations of drugs. Each data point is the mean for three or four separate determinations.

cyproheptadine (21 nM), piperazine 유도체인 piprinhydrate (39 nM) 및 phenothiazine 유도체인 promethazine (37 nM)이 다른 항 histamine 제보다 $[^3\text{H}]$ QNB 결합억제 작용의 potency가 현저하게 강하였다. 한편, H_2 -receptor 차단제인 cimetidine ($223\mu\text{M}$)과 dopamine 길항제인 metoclopramide ($152\mu\text{M}$)는 $[^3\text{H}]$ QNB 결합억제 작용이 매우 미약하였다.

본 실험에서 oxomemazine에 의한 $[^3\text{H}]$ QNB 결합억제 곡선은 two-site model에 적합하였다. 이를 분석한 결과 highaffinity site와 low affinity site에 대한 K_i 치가 각각 $0.045\mu\text{M}$ (K_H) 및 $1.2\mu\text{M}$ (K_L)이었고 그 분포비는 33 : 67이었다.

대뇌와 심장에서 항 histamine 제의 muscarinic receptor 차단작용 비교—항 histamine 제의 대뇌

muscarinic receptor에 대한 affinity가 심장 muscarinic receptor에 대한 affinity와 상관성을 가지는지를 알아보기 위하여 본 실험의 대뇌에서 측정된 K_i 치와 Lee 등¹⁰이 심장에서 측정된 K_i 치간의 상관관계를 조사하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 oxomemazine을 제외하고는 조직간의 차이가 없었다. 그러나 대뇌에서 측정된 oxomemazine의 low affinity site에 대한 K_i 치는 Fig. 9의 성적에서 도출된 회귀방정식에 적합한 반면, oxomemazine의 high affinity site에 대한 K_i 치는 이 상관식에 적합하지 않았다.

고 찰

본 실험결과 대부분의 histamine H_1 -blocker는

Table IV—Inhibition of [³H] QNB binding by antihistaminics to the rat cerebrum

Drug	IC ₅₀ (μM) ^a	Ki (μM) ^b	nH ^c	n ^d
Alkylamines				
Brompheniramine	6.76 ± 0.80	1.88 ± 0.22	0.95 ± 0.04	3
Chlorpheniramine	6.34 ± 1.42	1.77 ± 0.40	1.12 ± 0.20	3
Cyproheptadine	0.76 ± 0.01	0.021 ± 0.003	1.10 ± 0.04	3
Dexchlorpheniramine	5.95 ± 0.81	1.66 ± 0.23	1.04 ± 0.09	3
Pheniramine	8.93 ± 0.54	2.49 ± 0.15	0.90 ± 0.02	3
Tripolidine	5.62 ± 0.20	1.57 ± 0.05	0.92 ± 0.05	3
Piperazines				
Diphenidol	0.56 ± 0.14	0.15 ± 0.04	0.92 ± 0.04	4
Piprinhydrate	0.14 ± 0.01	0.039 ± 0.002	0.92 ± 0.07	3
Ethanolamines				
Dimenhydrinate	1.23 ± 0.32	0.34 ± 0.09	0.93 ± 0.02	3
Diphenhydramine	0.87 ± 0.08	0.22 ± 0.02	0.89 ± 0.03	3
Ethylenediamine				
Tripelenamine	7.95 ± 0.86	2.21 ± 0.24	0.94 ± 0.04	3
Phenothiazines				
Oxomemazine K _H + L	1.63 ± 0.31	0.45 ± 0.09	0.74 ± 0.03	4
K _H (33%)	0.16 ± 0.06	0.045 ± 0.016		
K _L (67%)	4.14 ± 0.84	1.15 ± 0.23		
Promethazine	0.13 ± 0.03	0.037 ± 0.010	1.15 ± 0.01	3
H₂-blocker				
Cimetidine	799.3 ± 139.7	222.7 ± 38.9	0.96 ± 0.07	3
Dopamine antagonist				
Metoclopramide	547.0 ± 71.6	152.3 ± 9.9	1.05 ± 0.12	3

^a Concentration of antihistaminics which inhibited 50% of the specific [³H] QNB binding in the presence of 300 pM [³H] QNB.

^b Calculated from $Ki = IC_{50} / (1 + F/Kd)$.

^c Hill coefficient (nH) calculated from Hill plot of the inhibition curves shown in Fig. 8.

^d Number of independent determinations.

K_H and K_L are apparent Ki values to the high and low affinity sites, respectively.

affinity가 같은 단일 muscarinic receptor site에 결합하는 반면 oxomemazine은 affinity가 서로 다른 두 종류의 site에 결합하여 [³H]QNB 결합을 억제하며, 이들 약물의 대뇌 muscarinic receptor 차단작용의 potency도 약물에 따라 현저한 차이가 있음을 알았다.

본 실험에서 대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합이 포화성이고 가역적이며 친화성이 클 뿐 아니라

atropine으로 그 결합이 억제되었다는 점과 QNB 결합의 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점으로 QNB는 대뇌에 있는 일정한 단일 muscarinic receptor site에 결합하는 것으로 생각되며 이러한 muscarinic receptor에 대한 QNB의 결합특성은 대뇌 이외의 여러 조직에서도 이미 보고된 바 있다.^{10,28-31)} 그러나 대뇌에서 QNB의 Kd치는 보고 논문에서 따라 10 pM-660 pM^{14,28,32-35)}의 상당한 차이

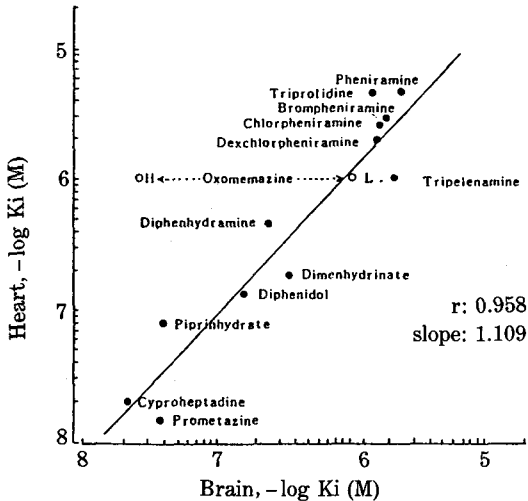


Fig. 9—Comparison of the affinities of antihistaminics determined in the cardiac sarcolemma and cerebral microsome.

Affinities are expressed as the dissociation constant, K_i . Apparent K_i values of antihistaminics to cardiac muscarinic receptors were cited from the data reported by Lee *et al.*¹⁰) Oxolamazine deviated significantly from the linear relationship observed for the other drugs and were therefore omitted from the regression analysis shown. The K_i values are the mean for 3-4 experiments in each tissue.

를 보이고 있고 본 실험결과에서도 포화결합실험으로 측정된 K_d 치 (115.9 pM)와 rate constant 로 구한 K_d 치 (40 pM)간에 약 3배의 차이가 있었다. 일반적으로 $[^3H]QNB$ 와 같이 receptor에 affinity가 큰 약물의 결합실험에 있어서는 상대적으로 낮은 농도의 조직을 사용한다 하더라도 사용한 receptor의 농도가 약물의 K_d 치에 가까워질 가능성이 있고 이 경우 포화결합실험에서 얻어지는 K_d 치는 사용한 receptor의 농도에 크게 영향을 받는다.³⁶⁾ 본 실험에서 receptor의 농도를 다르게 하면서 $[^3H]QNB$ 의 포화결합실험을 시행하였던 바 receptor 농도와 측정되는 K_d 치간에는 유의한 상관성이 있었고 이 상관식으로부터 receptor 농도가 무한히 낮은 경우의 K_d 치를 추정했을 때 실제 K_d 가 약 48.9 pM로 rate constant 로 구한 K_d 치에 매우 접근하는 점으로 미루어 포화결합실험에서 측정된 $[^3H]QNB$ 의 높은 K_d 치는 사용한 receptor의 농도가 높은 데 기인한 것으로 생각된다.

H_1 -blocker가 쥐 대뇌에서 $[^3H]QNB$ 또는 $[^3H]propylbenzylcholine$ 의 muscarinic receptor 결합을 억제한다는 보고^{2,37)}가 있으나 이들의 실험에서는 H_1 -blocker와 muscarinic receptor와의 상호작용 기전을 추구하지 않았을 뿐 아니라 사용한 약물의 종류가 적어 H_1 -blocker들간의 muscarinic receptor에 대한 작용의 potency를 비교 설명하기 곤란하다. 최근 Lee 등¹⁰⁾은 심실 혈질막에서 H_1 -blocker가 $[^3H]QNB$ 의 association을 억제하므로써 muscarinic receptor에 대한 QNB의 affinity를 감소시킨다고 하였으며 H_1 -blocker에 의한 muscarinic receptor 차단작용의 potency가 H_1 -blocker의 종류에 따라 현저한 차이가 있음을 밝혔다. 본 실험의 대뇌 microsome에서도 H_1 -blocker인 dimenhydrinate(DMH)가 $[^3H]QNB$ 의 association을 억제하여 affinity를 감소시켰으나 $[^3H]QNB$ 의 결합부위 농도와 $[^3H]QNB$ 결합의 cooperativity에 전혀 영향을 미치지 않았고 $[^3H]QNB$ 결합억제에 대한 DMH의 Hill coefficient 역시 1에 가까웠다는 점에서 DMH는 $[^3H]QNB$ 가 결합하는 단일 muscarinic receptor site에 $[^3H]QNB$ 와 경쟁적으로 결합할 것으로 생각된다. 이러한 muscarinic receptor 차단작용은 DMH 이외의 여러 가지 H_1 -blocker에서도 나타났으나 이들 H_1 -blocker들의 muscarinic receptor에 대한 K_i 치는 약물에 따라 상당한 차이가 있었으며 (0.02~2.5 μM), 이 muscarinic receptor 차단작용의 potency의 순위가 H_1 -receptor를 차단하는 potency의 순위와 큰 차이가 있었다. 이는 이들 약물을 H_1 -receptor 차단제로 사용할 때 muscarinic receptor 차단에 의한 부작용을 감소시키고 H_1 -receptor 차단효과를 증대시키기 위해서는 그 약물선택이 매우 중요함을 더욱 뒷받침하는 결과로 생각된다.

근래 Goyal 등³⁸⁾, Barlow 등^{39,40)}은 muscarinic receptor에 작용하는 agonist 및 antagonist의 반응성을 기초로 muscarinic receptor에는 성질이 다른 여러 종류의 subtype가 존재할 가능성을 시사하였다. 특히 선택적인 muscarinic receptor 길항제인 pirenzepine이 소개되므로써 muscarinic receptor는 pirenzepine에 affinity가 큰 M_1 -receptor와 affinity가 적은 M_2 -receptor로

크게 분류되고 있으며 M_1 -receptor는 대뇌피질, 말초신경절, 폐에 주로 분포되어 있고¹⁶⁻¹⁸⁾ M_2 -receptor는 외분비선, 심장, 평활근에 주로 분포되어 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁹⁻²²⁾ 본 실험에서도 대뇌에는 pirenzepine에 대한 affinity가 각각 2.42 nM 및 629.3 nM인 두 종류의 muscarinic receptor subtype가 존재하며 high affinity site (M_1)와 low affinity site (M_2)의 비가 약 68 : 32임을 확인할 수 있었다.

한편 본 실험에 이용된 H_1 -blocker와 [³H]QNB와의 경쟁적 결합곡선을 분석했을 때 대부분의 H_1 -blocker의 Hill coefficient가 약 1이었다는 점과 oxomemazine을 제외한 H_1 -blocker들의 muscarinic receptor에 대한 K_i 치가 receptor subtype population이 서로 다른 대뇌와 심실에서 유사하였다는 점은 이들이 atropine, scopolamine, QNB와 같이 muscarinic receptor subtype에 대한 선택성이 없이 단일 site에 결합함을 시사하고 있다. 그러나 oxomemazine의 경우 [³H]QNB 결합억제에 대한 Hill coefficient가 0.74로서 대뇌에는 이들 약물에 대하여 affinity가 다른 두 종류의 muscarinic receptor subtype가 존재할 것으로 추정되었다. 따라서 oxomemazine은 본 실험에서 검토된 대부분의 다른 H_1 -blocker와는 달리 muscarinic receptor subtype에 대한 선택성이 있는 약물로 분류할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 oxomemazine 의하여 분류될 수 있는 muscarinic receptor subtype를 pirenzepine의 M_1 - 및 M_2 -receptor와 연관지운다면 oxomemazine의 경우 M_2 -receptor가 주로 분포되어 있는 심실에서는 단일 muscarinic receptor site에 결합하고 이 부위에 대한 K_i 치가 대뇌의 low affinity site에 대한 K_i 치와 같은 반면, pirenzepine에서와 같이 대뇌에서 탐지된 high affinity site가 심실에서는 탐지되지 않았다는 점에서 대뇌에서 추정된 oxomemazine의 high affinity site와 low affinity site는 각각 pirenzepine의 M_1 - 및 M_2 -receptor와 연관성이 있을 것으로 추측된다.

그러나 oxomemazine의 high affinity site와 low affinity site의 비가 pirenzepine의 그것과 상당한 차이가 있었다는 점은 대뇌에 pirenzepine에 대해서는 affinity가 크나 oxomemazine에 대

해서는 affinity가 적은 다른 muscarinic receptor subtype가 존재할 가능성을 암시하고 있어 앞으로 이 점에 관하여 더욱 추구, 설명되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

Histamine H_1 -receptor 차단제와 대뇌 muscarinic receptor와의 상호작용 기전을 추구하고 H_1 -blocker들이 muscarinic receptor subtype에 대한 선택성이 있는지, 또 H_1 -blocker들 간에 대뇌 muscarinic receptor에 대한 작용의 potency에 차이가 있는지를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합은 300 pM의 [³H]QNB 존재하에서 90분에 평형에 도달하였다.

2. 대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합은 포화성이고 가역적이었으며 [³H]QNB 결합의 Hill coefficient는 1이었다.

3. [³H]QNB 결합억제에 대한 pirenzepine의 Hill coefficient는 0.52로서 대뇌에는 pirenzepine에 affinity가 큰 M_1 -receptor와 affinity가 적은 M_2 -receptor가 존재하였으며 M_1 -receptor와 M_2 -receptor의 비는 68 : 32이었다.

4. Dimenhydrinate는 [³H]QNB 결합의 association rate constant를 감소시켰으나 dissociation rate constant, 결합부위농도, 및 [³H]QNB 결합의 Hill coefficient에는 영향을 미치지 않았다.

5. Muscarinic receptor에 대한 H_1 -blocker들의 dissociation constant (K_i)는 0.02~2.5 μ M로서 H_1 -blocker에 따라 현저한 차이가 있다.

6. 대부분의 H_1 -blocker의 [³H]QNB 결합억제에 대한 Hill coefficient는 1에 가까웠으나 oxomemazine의 Hill coefficient는 0.74였다.

7. Oxomemazine에 대한 high affinity site와 low affinity site의 비는 33 : 67이었다.

8. 이상 실험결과, 대뇌에서 histamine H_1 -blocker의 muscarinic receptor 차단작용은 H_1 -blocker의 종류에 따라 현저한 차이가 있으며 대부분의 H_1 -blocker가 muscarinic receptor

subtype에 대한 선택성이 없는 반면 oxememazine은 이들 subtypes에 대한 선택성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

“이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”을 감사드립니다.

문헌

- 1) Burgen, A.S.V., Birdsall, N.J.M. and Hulme E.C.: Muscarinic receptor and the nature of their reaction with agonists and antagonists. IUPHAR Medical chemistry symposium, ed. Simkins, M.A., Oxford university press, p. 22 (1979).
- 2) Burgen, A.S.V. and Harbird, C.J.: The effect of sulphhydryl block on the binding of H₁-antagonists to the muscarinic receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 600 (1983).
- 3) Richelson, E.: Antimuscarinic and other receptor blocking properties of antidepressants. *Mayo Clin. Proc.*, **58**, 40 (1983).
- 4) Gilman, A. G., Goodman, L. S. Rall, T. V., and Murad, F.: The pharmacological basis of therapeutics. Seventh ed., Macmillan Publ. Co., New York, p. 620 (1985).
- 5) Carruthers, S.G., Shoeman, D.W., Hignite, C.E. and Azarnoff, D.L.: Correlation between plasma diphenhydramine level and sedative and antihistamine effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* April 375 (1978).
- 6) Wood, C.D.: Antimotion sickness and antiemetic drugs. *Drugs*, **17**, 471 (1979).
- 7) Cockel, R.: Antiemetics. *Practitioner*, **206**, 56 (1971).
- 8) Brand, J.J. and Perry, W.L.M.: Drugs used in motion sickness. *Pharmacol. Rev.*, **18**, 895 (1966).
- 9) Money, K.E.: Motion sickness. *Physiol. Rev.*, **50**, 1 (1970).
- 10) Lee, S.W., Park, Y.J., Lee, J.S., Ha, K.W. and Jin, K.D.: Interaction of antihistaminics with muscarinic receptor(I); Action on the cardiac muscarinic receptor. *Yakhak Haeji* **32(2)**, 16 (1988).
- 11) Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Hulme, E.C.: The binding of agonists to brain muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **14**, 723 (1978).
- 12) 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(Lond)*, **283**, 90 (1980).
- 13) Sewing, K.F., Londong, W., Stockbrugger, R.W., Jaup, B.H., Stockton, J., Birdsall, N.J.M., Hammer, R., Koelle, G., Heathcote, B.W. and Dotevall, G.: Classification of antimuscarinic substances. *Scan. J. Gastroenterol.*, **17(72)**, 265 (1982).
- 14) Luthin, G.R. and Wolfe, B.B.: Comparison of [³H]pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**, 648 (1984).
- 15) El-Fakahany, E.E., Cioffi, C.L. Abdellatif, M.M. and Miller, M.M.: Competitive interaction of pirenzepine with rat brain muscarinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **131**, 237 (1986).
- 16) 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. *Trends. Pharmacol. Sci. Suppl.*, **7**, 46 (1986).
- 17) 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 (1986).
- 18) 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 rabbits peripheral lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 51 (1987).
- 19) Brown, D.A., Forward, A. and Marsh, J.: Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **71**, 362 (1980).
- 20) Hammer, R. and Giachetti, A.: Muscarinic receptor subtypes; M₁ and M₂ biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, **31**, 2991 (1982).
- 21) Burke, R.E.: Gallamine binding to muscarinic M₁

- and M₂ receptors; Studied by inhibition of [³H]pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to rat brain membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **30**, 58 (1986).
- 22) Nilvebrant, L.: On the muscarinic receptors in the urinary bladder and the putative subclassification of muscarinic receptors. *Acta. Pharmacol. Toxicol. Suppl. I*, **59**, 15 (1986).
 - 23) Hammer, R. and Giachetti, A.: Selective muscarinic receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci. Suppl.* **5**, 18 (1984).
 - 24) Mayrand, R.R., Fullerton, D.S. and Ahmed, K.: Simple method for the purification of rat brain Na⁺, K⁺ adenosine triphosphatase(ATPase). *J. Pharmacol. Methods*, **7**, 279 (1982).
 - 25) 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).
 - 26) Cheng, Y.C. and Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant(Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition(IC50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099 (1973).
 - 27) Munson, P.J. and Rodbard, D.: LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Anal. Biochem.*, **107**, 220 (1980).
 - 28) Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Metha, P.: The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **14**, 737 (1978).
 - 29) Ehlert, F.J., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.: The nature of muscarinic receptor binding. *Handb. Psychopharmacol.*, **17**, 241 (1983).
 - 30) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with [³H]quinuclidinyl benzilate. *Mol. Pharmacol.*, **10**, 861 (1974).
 - 31) Sorata, S., Adams, L.P. and Papano, A.J.: Comparison of muscarinic receptor properties in hatched chick heart atrium and ventricle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 602 (1986).
 - 32) Aquilar, J.S., Criado, M. and De Robertis, E.: Pre- and postsynaptic localization of central muscarinic receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **57**, 227 (1979).
 - 33) Schiller, G.D.: Reduced binding of [³H]quinuclidinyl benzilate associated with chronically low acetylcholine esterase activity. *Life Sci.*, **24**, 1159 (1979).
 - 34) Luthin, G.R. and Wolfe, B.B.: [³H]Pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to brain muscarinic cholinergic receptors.: Differences in receptor density are not explained by differences in receptor isomerization. *Mol. Pharmacol.*, **26**, 164 (1984).
 - 35) Vanderheyden, P., Ebinger, G. and Vauquelin, G.: Different agonist binding properties of M₁ and M₂ muscarinic receptors in calf brain cortex membranes. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 4119 (1987).
 - 36) Chang, K.J., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P.: Quantitative aspects of hormone-receptor interactions of high affinity. Effects of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labelled and unlabelled hormones. *Biochem. Biophys. Acta.*, **406**, 294 (1975).
 - 37) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **17**, 1725 (1974).
 - 38) Goyal, R.K. and Rattan, S.: Neurohumoral, hormonal and drug receptors for the lower esophageal spincter. *Gastroenterology*, **74**, 598 (1978).
 - 39) Barlow, R.B., Berry, K.J., Glenton, P.A.M., Nikolaou, N.M. and Soh, K.S.: A comparison of affinity constants for muscarinesensitive acetylcholine receptors in guinea pig atrial pacemaker cells at 29 °C and in ileum at 29 °C and 37 °C. *Br. J. Pharmacol.*, **58**, 613 (1976).
 - 40) Barlow, R.B., Burston, K.N. and Vis, A.: Three types of muscarinic receptors? *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 141 (1980).