

## 항코린에스테라제 활성에 대한 파파베린 및 디펜히드라민의 효과

박은희 · 김정혜 · 박수선

숙명여자대학교 약학대학

(Received September 26, 1991)

### Effect of Papaverine and Diphenhydramine on the Action of Cholinesterase Inhibitors

Eun-Hee Park, Jeong-Hye Kum and Soo-Sun Park

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract**—This study was designed to examine the effects of diphenhydramine and papaverine on the toxic manifestations of cholinesterase inhibitors. It was found that papaverine increase acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of mice. Papaverine pretreatment tended to increase acetylcholinesterase activity against the actions of neostigmine and physostigmine. When diphenhydramine (20~30 mg/kg, s.c.) was treated 20 min before the administration of cholinesterase inhibitor, it significantly extended the onset latency in the signs of toxicosis which were characteristically produced by physostigmine (0.25~1.5 mg/kg, s.c.) or neostigmine (0.125~0.5 mg/kg, s.c.), and it also prevented lethality in all of the animals.

**Keywords** □ Diphenhydramine, papaverine, physostigmine, neostigmine, toxic manifestation, acetylcholinesterase activity.

아세틸콜린에스테라제(AChE, EC 3.1.1.7)는 뉴런이나 신경근접합부 등에 존재하며, ACh이 매개하는 신경전달과정에서 일과성으로 중요한 역할을 하는 효소이다. 한편, AChE의 활성을 저해하는 항코린에스테라제는 코린성신경섬유에 ACh을 축적시켜 코린성신경을 연속적으로 자극한 것과 유사한 효과를 나타낸다. 가역적 항코린에스테라제 약물로서는 피소스티그민, 네오스티그민, 피리도스티그민, 암베노니움, 에드르포니움 등이 있으며, 이들은 중증근무력증, 녹내장 등에 유효하나, 고용량에서는 호흡마비로 인한 사망 등 독작용이 나타난다. 비가역적 항코린에스테라제 약물로서는 파라치온, 마라치온, 디.에프.피(Diisopropylfluorophosphate), 소맨 등의 유기인화합물이 있으며, 주로 화학무기 및 농약 등으로 사용되며, 동물이나 사람의 신경계에 직접적인 독작용을 일으킨다.

파파베린을 마우스에 반복투여하면 디.에프.피 투

여에 의한 소장수축과 무스카린성 수용체 감소를 방지할 수 있으며, 항코린에스테라제와는 반대로 AChE 활성을 증가시킨다고 보고<sup>1)</sup>된 이후 박 등<sup>2)</sup>은 흰쥐에 파파베린 및 그 유도체인 테트라하이드로파파베린, 테트라하이드로파파베로린을 투여하였을 때 뇌의 AChE 활성이 증가한다고 보고한 바 있다. 한편, 몇 가지 항히스타민제가 혈장코린에스테라제(EC 3.1.1.8)의 활성을 억제한다고 보고되었으며,<sup>3) 5)</sup> 그런 약물들은 항코린에스테라제의 독성을 증강시킬 수 있다는 가능성이 제시되기도 하였다.<sup>5)</sup> 이와는 달리 항히스타민제의 하나인 디펜히드라민이 항코린에스테라제에 의한 독성을 오히려 감소시킨다는 보고<sup>6)</sup>도 있으나, 아직까지 그 감소기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 디펜히드라민의 항코린에스테라제 독성에 미치는 영향이 효소활성 변화를 거쳐서 일어난다면, 디펜히드라민에 의한 AChE 활성증가를 예상할 수 있다.

본 연구에서는 파파베린과 디펜히드라민이 항코린에스테라제인 피소스티그민과 네오스티그민에 의해 유발되는 독성증상 및 AChE 활성변화에 미치는 효과를 비교 검토하였다.

### 실험방법

**시약 및 기기**—Papaverine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, physostigmine hemisulfate, neostigmine bromide, electric eel acetylcholinesterase, acetylthiocholine iodide(ATCh), 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin(BSA) Folin-Ciocalteu's phenol reagent 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, 그외 모든 시약은 특급 내지 일급품을 사용하였다.

이용된 spectrophotometer는 Hitachi Co. Model 200~20이었고, homogenizer는 Omni International Co. Model 17105였다.

**실험동물**—체중 25~30g의 ICR계 웅성 마우스를 사용하였다. 실험동물은 1주일 이상 동일한 조건하에서 사육하여 동물실험환경에 적응시켰으며, 이때 동물 실온도는  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 고형사료와 상수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

**약물투여**—파파베린은 1주 또는 2주간, 1일 1회 복강내 주사하였고 디펜히드라민, 피소스티그민, 네오스티그민은 피하주사하였으며, 대조군에는 생리식염수를 투여하였다.

**독성증상 및 LD<sub>50</sub> 측정**—디펜히드라민 등을 전처리한 후, 피소스티그민 또는 네오스티그민 등의 항코린에스테라제 투여에 의한 경련, 근경축, 타액분비, 누액분비, 정향반사소실, 호흡곤란 등의 독성증상, 치사시간까지의 잠복기간 및 LD<sub>50</sub>를 측정하였다. 치사시간은 축진에 의하여 심장박동이 상실되는 시간으로 결정하였다. LD<sub>50</sub>는 약물투여 24시간 후의 치사동물수에서 Litchfield & Wilcoxon법<sup>7)</sup>에 의해 산출하였다.

**마우스로부터 대뇌피질 및 정관조직의 분리**—약물투여가 완료된 마우스를 단두하여 뇌와 정관을 적출시킨 후, 미리 조제한 빙냉의 Na, K-phosphate buffer (pH 7.5)로 세척하였다. 세척 후 뇌조직 중 대뇌피질을 취하고, 전립선과 부고환 사이의 결합조직, 혈관을 제거한 정관을 취하여 각 조직의 습중량을 측

정하였다. 1% homogenate를 제조하기 위하여 빙냉의 Na, K-phosphate buffer(10 mg/ml)를 가한 후, 대뇌피질은 25초씩 2번, 정관은 25초씩 4번 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 이상의 방법으로 준비한 1% homogenate를 AChE 활성 측정시료로 하였다.

**AChE 활성 측정**—Ellman 등<sup>8)</sup>에 의하여 개발된 분광학적 측정법을 이용하였다. 기질로써 아세틸치오코린(ATCh)이 사용되고 표준효소로써는 뱀장이 AChE가 사용되었다. 대뇌피질 및 정관의 1% 조직분쇄액 및 측정시 필요한 0.01% DTNB, 0.1 M ATCh도 0~4°C로 유지하였다. 균질화된 1% 조직분쇄액 0.2 ml을 취하여 시험관에 넣고 즉시 0.8 ml Na, K-phosphate buffer를 가해 총량 1 ml로 한 다음, 상온에서 2분간 반응시켰다. 반응하는 동안 10 mM Tris 2 ml와 0.01% DTNB 100  $\mu\text{l}$ 를 큐벳에 넣고, 2분간 반응이 완료된 효소혼합액을 즉시 큐벳에 가하여 흔들어서 섞고, 파장 410 nm에서 흡광도의 변화를 기록하였다. 흡광도가 더 이상 변화되지 않을 때 0.1 M ATCh 20  $\mu\text{l}$ 를 큐벳에 가하고, 가능한 빨리 잘 혼합한 후, 410 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다.

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등<sup>9)</sup>의 방법으로 측정하였다.

한편 실험결과와 통계처리는 Student t-test를 이용하였다.

### 실험결과 및 고찰

**Papaverine에 의한 acetylcholinesterase 활성변화**—Papaverine을 1주 또는 2주간 마우스에 주사하여 투여기간 변화에 따른 acetylcholinesterase 활성을 측정한 결과 Table I에서 나타난 것과 같이 대뇌피질의 경우 1주 투여군은 7%, 2주 투여군은 37% 정도 대조군에 비해 증가하였다. 그러나, 정관의 경우에는 papaverine 투여에 의해 유의한 효소활성변화를 보이지 않았다. 이 실험결과 acetylcholinesterase 활성에 미치는 papaverine의 작용은 뇌와 정관에서 동일하지 않으며, 또한 뇌에서 1주 투여군보다 2주 투여군에서 유의한 활성증가를 나타낸 것으로 보아, 투여기간 변화에 따른 차이가 있음을 시사하고 있다.

**항코린에스테라제에 의한 효소활성변화에 미치는 papaverine의 효과**—중추 및 말초에서 코린에스테라제를 억제하는 physostigmine<sup>10)</sup>에 대한 효소활성측

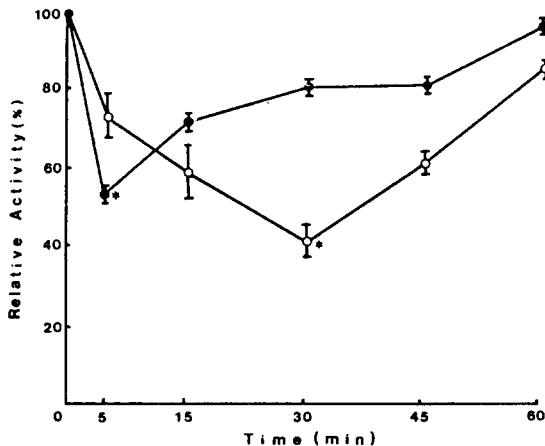
**Table I**—Effect of papaverine administration on acetylcholinesterase activity in mouse cerebral cortex and vas deferens.

Dose (mg/kg/day, i.p.)		N <sup>a</sup>	AChE Activity <sup>b</sup> ( $\Delta OD_{410}$ /min/mg protein)	Relative Activity (%)
cerebral cortex				
1 week	control	6	0.372 ± 0.030	100
	papaverine 50.0	6	0.400 ± 0.023	107
2 weeks	control	6	0.384 ± 0.033	100
	papaverine 50.0	6	0.527 ± 0.037*	137
vas deferens				
1 week	control	7	0.091 ± 0.013	100
	papaverine 50.0	7	0.094 ± 0.009	103
2 week	control	7	0.081 ± 0.006	100
	papaverine 50.0	7	0.092 ± 0.008	114

<sup>a</sup>Number of mice used.<sup>b</sup>Values of AChE activity are expressed as mean ± S.E.M.

\*p &lt; 0.001

정은 마우스 대뇌피질에서 이루어졌다. 즉, physostigmine을 투여한 후 대뇌피질에서의 acetylcholinesterase 활성은 5분에서 최대로(39%) 억제되었다가, 60분에서 대조치의 약 91%까지 회복되어, physostigmine 투여 직후 가장 억제되었던 acetylcholinesterase



**Fig. 1**—Time course of acetylcholinesterase activity in cerebral cortex after administration of physostigmine (0.3 mg/kg, s.c. ●—●) and in vas deferens after administration of neostigmine (0, 15 mg/kg, s.c. ○—○) of mouse.

Each point represents the mean of 4 experiments with vertical bars indicating the S.E.M.

\*p &lt; 0.05

ase 활성이 시간경과에 따라 점차 회복되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 실험결과에 따라서 papaverine 및 diphenhydramine의 효과 측정실험에 있어서 physostigmine 투여 15분 후에 조직을 취하였다.

한편, 선택적인 말초 코린에스테라제 억제제인 neostigmine<sup>11)</sup>에 대한 효소활성측정은 마우스 정관에서 이루어졌다. 즉 neostigmine을 피하주사한 후, 정관에서의 acetylcholinesterase 활성은 30분에서 최대로(59%) 억제되었으며, 60분에서 대조치의 약 85%까지 회복되어 시간경과에 따라 점차 활성이 회복되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이 실험결과에 따라서, papaverine 및 diphenhydramine의 효과 측정 실험에 있어서 neostigmine 투여 15분 후에 조직을 취하였다.

Table II는 physostigmine의 acetylcholinesterase 활성억제에 미치는 papaverine의 효과를 나타낸 것으로서 papaverine 12.5, 25 및 50 mg/kg 투여군에서 각각 그 효소활성을 증가시키는 경향을 나타내었다.

또한 neostigmine의 acetylcholinesterase 활성억제에 미치는 papaverine의 효과는 papaverine 50 mg/kg 투여군에서 20% 정도 효소활성을 증가시켰다. 이 실험을 통하여 papaverine은 항코린에스테라제에 의하여 감소된 acetylcholinesterase 활성도 다소 증가시키는 것을 확인하였다.

**Physostigmine 독성에 대한 diphenhydramine의 효과**—Physostigmine 0.25, 0.50, 0.75 및 1.50 mg/kg을

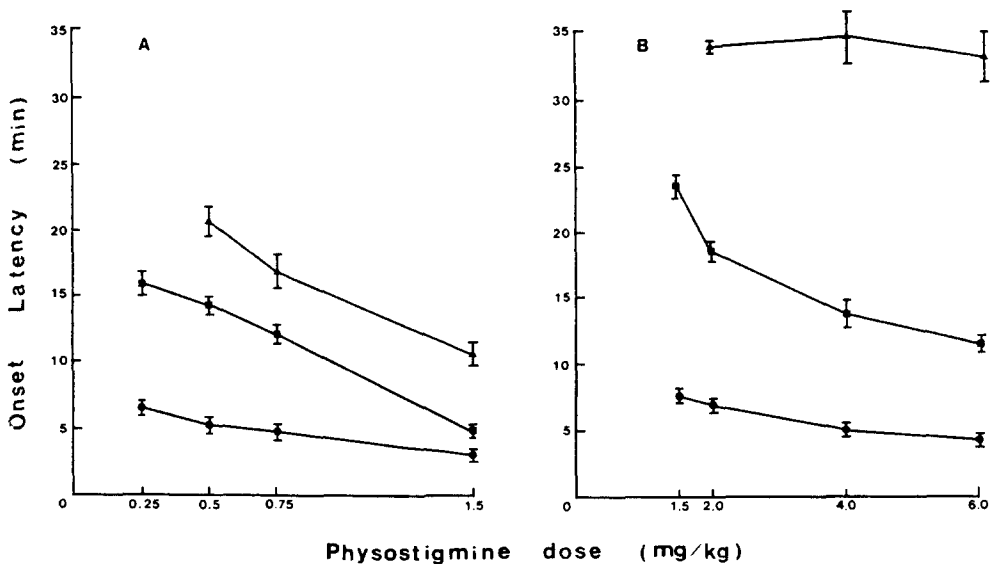
**Table II**—Effect of papaverine on acetylcholinesterase activity after the administration of physostigmine or neostigmine in mice<sup>a</sup>.

Dose (mg/kg/day, i.p.)	N <sup>b</sup>	AChE Activity <sup>c</sup> ( $\Delta OD_{410}$ /min/mg protein)	Relative Activity (%)
Physostigmine			
control	6	0.256 ± 0.013	100
papaverine 12.5	6	0.275 ± 0.008	107
papaverine 25.0	6	0.273 ± 0.008	106
papaverine 50.0	6	0.280 ± 0.011	109
neostigmine			
control	6	0.068 ± 0.005	100
papaverine 12.5	6	0.076 ± 0.012	111
papaverine 25.0	6	0.079 ± 0.007	116
papaverine 50.0	6	0.082 ± 0.005	120

<sup>a</sup>AChE activity was determined in the cerebral cortex after the administration of physostigmine (0.3 mg/kg, s.c.) and in the vas deferens after the administration of neostigmine (0.15 mg/kg, s.c.).

<sup>b</sup>Number of mice used.

<sup>c</sup>Values of AChE activity are expressed as mean ± S.E.M. Papaverine was administered for two weeks. Physostigmine was injected one day after last treatment of papaverine.



**Fig. 2**—The protective effect of diphenhydramine on the toxic manifestation of diphenhydramine in mice. Panel A and panel B were obtained without and with diphenhydramine respectively.

The onset latency for the appearance of tremor (●), muscle fasciculation (■) and time of death (▲) was recorded.

Each point represents the mean of 10 experiments with vertical bars indicating the S.E.M.

마우스에 피하주사하였을 때 각각 0, 40, 70 및 100% 치사시켰으며, 중독된 동물은 경련, 정향반사 소실, 타액분비 과다, 배변, 호흡억제 등의 독성증상이 발현되었다. 이때 physostigmine은 용량이 증가할수록

그 독성증상 발현시간이 감소하는 경향을 나타내었으며, 측정된 LD<sub>50</sub>는 0.68 mg/kg이었다(Fig. 2A). 이 physostigmine 독성에 대한 diphenhydramine의 효과를 검토하기 위하여, diphenhydramine 20 mg/kg을

**Table III**—Effect of diphenhydramine pretreatment on physostigmine-or neostigmine-induced toxicity

Dose (mg/kg)	N <sup>a</sup>	pretreatment <sup>b</sup>	% lethality
physostigmine 1.5	10	None	100
physostigmine 1.5	10	diphenhydramine(20 mg/kg)	0
neostigmine 0.5	10	None	100
neostigmine 0.5	10	diphenhydramine(30 mg/kg)	0

<sup>a</sup>Number of mice used

<sup>b</sup>Diphenhydramine was administered 20 min before physostigmine and neostigmine.

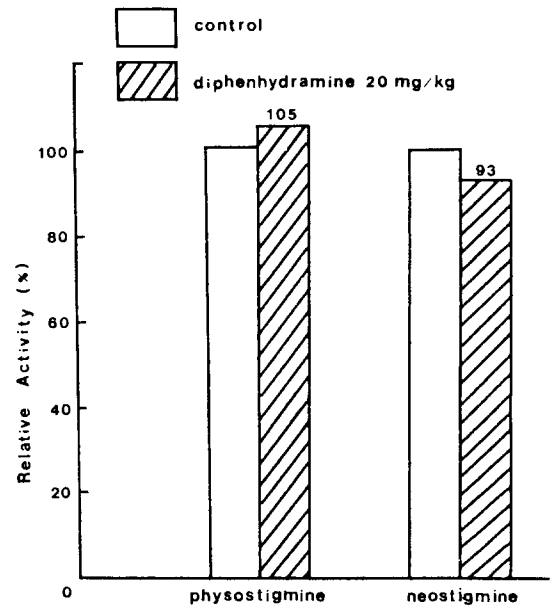
physostigmine 투여 20분 전에 피하주사하였을 때 다소 고용량의 physostigmine에 의한 독성증상 발현 개시까지의 잠복기간이나 치사하기까지의 시간 등을 현저하게 증가시켰다(Fig. 2B). Diphenhydramine 20 mg/kg은 physostigmine 1.5 mg/kg을 처리한 마우스의 사망율을 100% 억제하였으며(Table III) 이때 physostigmine에 대한 LD<sub>50</sub> 0.68 mg/kg은 diphenhydramine에 의해 4.08 mg/kg으로 변화되어 6배나 증가시켰다. 이 실험결과에서 diphenhydramine은 중추 및 말초 cholinesterase 억제제인 physostigmine의 효과로부터 마우스를 보호한 것을 시사한다.

**Neostigmine 독성에 대한 diphenhydramine의 효과**—Neostigmine 0.125, 0.250, 0.375 및 0.500 mg/kg을 마우스에 피하주사하였을 때 각각 0, 40, 60 및 100% 치사시켰으며, 중독된 동물은 physostigmine의 경우와 유사한 독성증상을 나타내었다. 이 실험에서도 neostigmine의 용량증가와 함께 그 독성증상 발현시간이 감소되었으며, 이때 측정된 LD<sub>50</sub>는 0.3 mg/kg이었다.

이 neostigmine 독성에 대한 diphenhydramine의 효과를 검토하기 위해 diphenhydramine 30 mg/kg을 neostigmine 투여 20분 전에 피하주사하였을 때 다소 고용량의 neostigmine에 의한 독성증상 발현개시까지의 잠복기간이나, 치사하기까지의 시간 등을 현저하게 증가시켰다. diphenhydramine 30 mg/kg은 neostigmine 0.5 mg/kg을 처리한 마우스의 사망율을 100% 억제하였으며(Table III) 이때 neostigmine에 대한 LD<sub>50</sub> 0.3 mg/kg은 diphenhydramine에 의해 1.65 mg/kg으로 변화되어 약 5.5배 증가시켰다.

이 실험결과에서 diphenhydramine은 선택적인 말초 cholinesterase 억제제<sup>12)</sup>인 neostigmine의 말초효과로부터 마우스를 보호한 것을 시사한다.

**항코린에스테라제에 의한 효소활성억제에 대한 diphenhydramine의 효과**—Physostigmine 및 neostig-



**Fig. 3**—Effect of diphenhydramine pretreatment on acetylcholinesterase activity in cerebral cortex intoxicates with physostigmine and in vas deferens intoxicates with neostigmine in mice. Each column represents the mean value obtained from six mice.

mine에 의한 acetylcholinesterase 활성억제에 대한 diphenhydramine의 효과를 검토하기 위하여 diphenhydramine을 마우스에 투여한 후 대뇌피질 및 정관의 acetylcholinesterase 활성을 측정하였다. Fig. 3에서 나타내는 것과 같이 diphenhydramine은 physostigmine 및 neostigmine에 의한 효소활성억제에 대하여 의미있는 효과를 나타내지 않았다. 이 실험결과에서 앞에서 확인한(Table III) 항코린에스테라제 독성에 대한 diphenhydramine의 보호효과는 acetylcholinesterase 활성과는 직접적인 관련성이 없을 것을 시사한다.

결 론

1. 마우스에 papaverine을 일정기간 투여했을 경우, 대뇌피질의 acetylcholinesterase 활성이 증가되었다.
2. Papaverine은 항콜린에스테라제에 의하여 감소된 acetylcholinesterase 활성을 회복시키는 경향을 나타내었다.
3. Diphenhydramine은 physostigmine 및 neostigmine 투여에 의한 마우스의 사망율을 감소시키고 생존시간을 연장시켰다.
4. Diphenhydramine 20 mg/kg은 physostigmine의 LD<sub>50</sub>를 6배 증가시켰으며, 또한 diphenhydramine 30 mg/kg은 neostigmine의 LD<sub>50</sub>를 5.5배 증가시켰다.

감사의 말씀

이 논문은 1989년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었습니다.

문 헌

- 1) Uchida, S., Takeyasu, K., Matsuda, T. and Yoshida, H.: Changes in muscarinic acetylcholine receptor of mice by chronic administrations of diisopropylfluorophosphate and papaverine. *Life Sciences*. **24**, 1805(1979).
- 2) Park, E-H. and Eun, C.: Effect of papaverine on acetylcholinesterase in rat brain. *Arch. Pharm. Res.* **12**, 34(1989).
- 3) Diaz Gomez, M.I. and Castro, J.A.: Studies on the interaction between inhibitors of drug metabolism and horse plasma cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 929(1971).
- 4) Fernandez, G., Diaz Gomez, M.I. and Castro, J.A.: Cholinesterase inhibition by phenothiazine and nonphenothiazine antihistamines: analysis of its postulated toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **31**, 179(1975).
- 5) Simon, G. and Winter, M.: The effect of antihistamines on red blood cell acetylcholinesterase activity *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 1843(1970).
- 6) Mohammad, F.K., Abdul-Latif, A.R. and Al-Kassim, N.A.H.: Interaction of diphenhydramine with cholinesterase inhibitors in mice. *Toxicol. Letters* **37**, 235(1987).
- 7) Litchfield, J.J. and Wilcoxon, F.: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, 99(1949).
- 8) Ellman, G.L., Couroney, K.O. and Andress, V.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- 9) Hartree, E.F.: Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422(1972).
- 10) Buccafusco, J.J.: Mechanism of the clonidine-induced protection against acetylcholinesterase inhibitor toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **222**, 595(1982).
- 11) Taylor, P.: Anticholinesterase agents, in A.G. Gilman, L.S. Goodman (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan Publishing Co., New York, p.131(1990).
- 12) Karczmar, A.G., Usdin, E. and Wills, J.H.: Anticholinesterase agent, in G.B. Koelle (Ed.), *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Pergamon Press, New York, p.363(1970).