

흰쥐 말초혈액 T-림프구에서 Vasoactive Intestinal Polypeptide의 효과에 대한 Propranolol의 억제 기전

연세대학교 의과대학 약리학교실

안영수 · 추성이 · 강동원 · 이상현

= Abstract =

Inhibitory Mechanism of Propranolol on the Effects of VIP in Peripheral Blood T-lymphocytes of Rat

Young Soo Ahn, Sung Yee Choo, Dong Won Kang and Sang Hun Lee

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine

Vasoactive intestinal polypeptide(VIP) and β -adrenergic agonists have immunomodulatory effects on the peripheral blood T-lymphocytes of rat through their own receptors. Both of them utilize the same signal transduction pathway. That is, the stimulatory guanine nucleotide binding protein(G protein) mediates the receptor-adenylyl cyclase coupling, producing intracellular increase of cyclic adenosine monophosphate(cAMP). In the previous experiment, propranolol, a β -adrenergic receptor blocker, inhibited the VIP-induced protein phosphorylation in lymphocytes. However, propranolol could not block the effect induced by forskolin.

Therefore, this study was designed to elucidate the mechanism of the inhibitory action of propranolol on the effects of VIP. Using peripheral blood lymphocytes of rats, the effect of propranolol on the receptor binding characteristics of VIP was observed.

And the effects of propranolol were compared to the effects of timolol on the cAMP increase induced by isoproterenol, VIP or forskolin.

The results obtained are as follows.

- 1) Receptor binding study showed no significant differences in the affinity or density of VIP receptor between the control and propranolol-pretreated groups.
- 2) VIP-induced increase of cAMP was inhibited by propranolol, but not by timolol.
- 3) Both propranolol and timolol suppressed the isoproterenol-induced cAMP increase.
- 4) Propranolol also inhibited the histamine-induced cAMP increase.
- 5) Propranolol did not inhibit the increase of cAMP stimulated by forskolin.
- 6) Lidocaine did not block the VIP-induced cAMP increase.

These results show that the inhibitory mechanism of propranolol is not related to β -adrenergic receptor or its membrane stabilizing effect, and it is suggested that propranolol can block the effects of VIP by inhibiting the intermediate step between the VIP receptor and adenylyl cyclase.

Key Words: VIP receptor, Propranolol, Cyclic AMP, Lymphocytes

서 론

생물체는 홀몬이나 신경전달 인자와 같은 전달 물질을 표적세포에 전달하고, 표적세포에서는 이들을 여러 종류의 특이한 신호변환 기전을 통하여 세포내로 전달함으로써 생명유지에 필요한 대사기능을 조절한다. 이러한 신호변환 기전 중 세포막 수용체를 통한 신호변환 기전은 많은 경우에 guanine nucleotide 결합 단백질(G 단백질)을 중간 매개물로 이용하여 이루어짐이 알려져 있다(Gilman, 1987).

아드레날린성 β 수용체를 통한 신호변환 기전은 이러한 G 단백을 경유한 대표적인 예이다. β 수용체에 효현제가 결합하면 수용체는 흥분성 G 단백을 활성화시키고, 활성화된 흥분성 G 단백질이 효과기(effector)에 해당하는 adenylyl cyclase를 활성화시킨다. 이로써 세포내 제2전령체인 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 생성을 증가시킴으로써 세포내로의 신호변환이 이루어진다. G단백은 이와 같이 세포내로의 신호변환 과정에서 세포막의 내측 표면에 부착된(membrane-bound) 상태로 존재하면서 수용체-효과기 결합(receptor-effector coupling)을 매개한다. 수용체 또는 효과기와의 상호작용은 고정된 형태로서가 아니라 세포막상에서 유동적으로 존재하다가 효현제가 수용체와 결합하면 수용체가 인접한 효과기와 결합(coupling)함으로써 이루어지는 것으로 생각되고 있다(Tolkovsky 및 Levitski, 1978; Casey 및 Gilman, 1988).

말초혈액 T-림프구 역시 신호변환 기전으로서 adenylyl cyclase를 통한 신호변환 체계를 가지고 있음이 알려져 있다. 즉, 세포막 표면에 아드레날린성 β 수용체가 존재하여, 이 수용체가 자극되면 adenylyl cyclase 활성화를 통한 세포내 cAMP 농도가 증가되어, 림프구의 면역조절(immunomodulation)에 관계한다고 한다(Hadden등, 1970; Johnson등, 1981; Khan등, 1986).

Propranolol은 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제로

서, 위의 신호변환 경로상 첫 단계에 해당하는 수용체와의 결합과정에서 효현제와 경쟁함으로써 아드레날린성 β 수용체 효현제의 작용을 억제한다(Frushman, 1988). Propranolol을 포함한 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제들은 말초혈액 림프구에서도 아드레날린성 β 수용체 효현제에 의한 작용을 봉쇄한다(Conolly 및 Greenacre, 1977).

림프구에서 아드레날린성 β 수용체의 경우와 유사하게 세포내 cAMP를 증가시켜 림프구의 기능 조절에 관계하는 또 하나의 예로 vasoactive intestinal polypeptide(VIP)를 들 수 있다(Guerrero등, 1981; Beed등, 1983; Calvo등, 1986).

이들은 모두 림프구 세포막에 고유의 수용체를 가지고 있으나 세포내 신호변환 기전은 동일한 경로를 이용함으로써 G 단백을 경유한 신호변환 기전의 연구에 있어서 서로 다른 수용체에 의한 신호변환 과정의 상호연관성을 규명하는데 좋은 비교연구군이 될 수 있다.

장중현 등(1994)은 흰쥐 말초혈액 림프구에서 isoproterenol과 VIP를 투여한 후의 cAMP의 증가 및 기질단백의 인산화 양상을 관찰한 결과, propranolol은 isoproterenol 뿐만 아니라 VIP의 작용도 억제함을 보고하였다. 그는 propranolol이 VIP의 작용을 봉쇄하는 기전으로서 수용체와 adenylyl cyclase 활성의 중간 단계에 propranolol이 작용할 것으로 추측하였다. Propranolol은 아드레날린성 β 수용체에 경쟁적 봉쇄제로 작용하는 외에도, 국소마취제와 같이 세포막을 안정화시키는 작용(membrane stabilizing activity)도 가지고 있다(Hellenbrecht, 1972; IJerman, 1987). 따라서 이러한 봉쇄 효과가 수용체(receptor)-변환기(transducer)-효과기(effector)로 이어지는 신호변환 경로상의 한 부위에 직접 억제적으로 작용함으로써 나타나는 것인지 또는 propranolol이 가지고 있는 세포막에 대한 비특이적 작용에 의한 간접적인 효과에 의한 것인지는 더 연구해야 할 부분으로 생각된다.

그러므로, 본 연구에서는 propranolol이 VIP의 작용을 억제하는 기전을 알아보기 위하여 다음과

같은 세가지 가설을 설정하여 검증함으로써, 신호 변환 경로에서의 약물 상호작용을 추구하고자 하였다.

첫째, 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제인 propranolol이 VIP 수용체에 대한 직접적인 봉쇄 효과도 가지고 있을 가능성을 검증한다. 이를 위하여 propranolol 비처리 또는 전처치의 경우로 나누어 VIP에 대한 VIP 수용체 결합 실험(VIP receptor binding assay)을 행하여, 양자 간에 수용체의 밀도 및 결합양상에 변동이 있는가를 알아보았다.

둘째, 아드레날린성 β 수용체 봉쇄약물이 신호 변환 경로상 adenylyl cyclase에 대한 직접적인 억제작용에 의한 것인지를 검증한다. 즉, adenylyl cyclase에 결합하여 활성화시킴으로써 세포내 cAMP를 증가시키는 forskolin(Seamon 및 Daly, 1981)을 단독 또는 propranolol을 전처리한 후 투여하여 propranolol에 의한 억제 여부를 관찰하였다.

셋째, propranolol이 가지고 있는 세포막 안정화 작용에 의한 효과인지를 알아본다. 이를 위하여는 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제로서 세포막 안정화 작용을 가지지 않는 약물을 대조군으로 설정하여 propranolol 투여군과 비교 관찰하였다. 대조군에 투여할 약물로는 세포막 안정화 작용이 없으면서 단독 또는 전처치시에 부분 효현제(partial agonist)로 작용하지 않는 timolol(Lima 등, 1981)을 이용하였다. 또한 세포막 안정화 작용을 지닌 국소마취제를 전처리하였을 때, 이 약물 역시 VIP의 작용을 봉쇄할 수 있는가를 알아보았다. 이를 위하여는 국소마취제 중 lidocaine(Hille, 1966)을 선택하여 실험에 이용하였다.

재료 및 방법

1) 실험 재료

(1) 실험동물 및 실험군: 실험동물로는 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 250 g 안팎의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하였다. VIP 수

용체 결합 실험의 경우, propranolol 비처리군과 전처리군으로 나누어 실험하였으며, 세포내 cAMP 비교를 위하여는 다섯 군으로 나누어 실험하였고, 각 군을 효현제 또는 봉쇄제에 따라 다음과 같이 세분하였다.

VIP 처리군

: 대조군, propranolol 전처리군, timolol 전처리군

Isoproterenol 처리군

: 대조군, propranolol 전처리군, timolol 전처리군

Histamine 처리군

: 대조군, propranolol 전처리군

Forskolin 처리군

: 대조군, propranolol 전처리군

Lidocaine 비교군

: VIP 단독투여군, lidocaine 전처리군

(2) 림프구 채취 및 분리: 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 복대동맥(abdominal aorta)으로부터 전혈(whole blood)을 방부제가 포함되지 않은 heparin으로 처리한 주사기로 채취하여 무균 용기에 옮겼다. 여기에 동량의 RPMI 배양액(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 가하고 잘 섞은 다음, 무균 조작하에서 동량의 Ficoll-Paque(Pharmacia, Uppsala, Sweden) 위에 상층이 되도록 옮겨 이를 상온에서 $400 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 림프구층을 분리하였다. 분리한 림프구를 RPMI 배양액으로 세척하여 nylon wool(Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) 원주에 통과시켜 T-림프구만을 분리하였다. 분리된 T-림프구를 다시 RPMI 배양액으로 세척하여 10분간 원심분리하여 림프구 침전물을 얻어 여기에 RPMI 배양액을 적량 가하여 실험 목적에 따라 일정 농도의 세포 부유액을 만들어 실험에 이용하였다.

2) 실험 방법

(1) 림프구 단백질의 인산화 및 전기영동: Culture flask에 세포 부유액을 넣은 후 0.2 MCi/ml의 carrier-free orthophosphate(^{32}P , Amer sham,

Buckinghamshire, UK)를 가한 다음 37°C에서 2 시간 배양하여 세포내 ATP pool을 표시시켰다. 그 후에 VIP, isoproterenol 또는 forskolin을 가하여 단백질의 인산화 변동을 관찰하였다. 즉 Eppendorf tube(1.5 ml)에 945 ml의 ^{32}P 로 표시된 세포 부유액을 넣은 후 단백분해효소 억제제(0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin inhibitor)를 가하고 이에 VIP, isoproterenol 또는 forskolin을 첨가한 후 37°C에서 5분간 배양하며, 또한 propranolol 10^{-5} M을 5분전에 투여한 후 각각의 약물을 가하여 37°C에서 5분간 배양하였다. 배양을 끝낸 후 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 세포를 파괴하여 균질화시켰다. 세포 균질액에 ethanol을 첨가하여 단백을 침전시킨 후 lysis buffer(9 M urea, 2 % Pharmalyte, pH 3-10, 5% Mercaptoethanol, 2 % Nonidet P-40)에 녹여 O'Farrell등(1977)의 방법에 의한 non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis의 이차원 전기영동법을 시행하였다. 완성된 gel은 Coomassie blue로 염색한 후 건조하여 -70°C에서 X-ray film에 감광시켜 인산화 단백을 확인하였다.

(2) VIP 수용체 결합 실험: Beed등(1983)의 방법을 변형하여 VIP 수용체에 대한 간접 결합 실험(competition binding assay)을 시행하였다. 즉, 50 pM의 [^{125}I] VIP(specific activity $\sim 2,000$ Ci/mmol; Amersham, Buckinghamshire, UK)가 함유된 microfuge tube 내의 림프구 배양액(0.5 ml)에 여러 농도($5 \times 10^{-11} \sim 5 \times 10^{-7}$ M)의 표지되지 않은 VIP(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가시켜 25°C에서 50분간 반응시켰다. 이 때, 배양액은 3×10^6 cells/ml의 농도로 하였으며, 배양액에는 1% bovine serum albumin, 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES)를 넣어 주었으며, pH를 7.5로 유지시켰다. 결합반응 기간 동안에 결합한 VIP가 세포 내부로 함입(internalization)되어 파괴되는 것을 억제하기 위하여 20 mM NH_4Cl

을 첨가(Muller등, 1985)하였다. 반응시간은 림프구에 대한 결합이 최대반응에 이르러 일정해질 때까지의 최단시간으로 정하였다. Propranolol 전처치군의 배양액에는 최종 농도가 10^{-6} M이 되도록 propranolol을 포함시켜 반응을 진행하였다.

VIP와 림프구에 존재하는 VIP 수용체와의 결합반응은 동량의 저온(0~4°C) 배양액을 첨가하여 정지시켰다. 반응이 정지된 배양액을 Microfuge로 1분간 $13,000 \times g$ 에서 원심분리하여 상층액을 제거하고 동일한 새 배양액으로 tube를 3회에 걸쳐 세척하여 림프구에 결합되지 않은 VIP를 제거하였다. 다음, tube를 완전히 건조시키고 VIP가 결합된 림프구 침전이 담긴 부분만을 남기고, tube의 상층부를 절개하여 버린 후 림프구 침전이 남아 있는 tube 밑부분의 방사능을 gamma counter(Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

(3) 세포내 cAMP의 추출 및 측정: 세포 부유액(5×10^6 cells/ml)에 phosphodiesterase 억제제인 0.6 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 모든 실험군에 투여하고, 동시에 대조군에는 10 μl 의 RPMI 배양액을, 봉쇄제 처치군에는 10 μl 의 propranolol 또는 timolol을 최종농도가 10^{-6} M이 되도록 투여하였으며, lidocaine 비교군의 경우에는 최종 농도 10^{-3} M로 투여하였다. 봉쇄제 투여 5분 후 해당 실험군에 각각 VIP $10^{-10} \sim 10^{-6}$ M, isoproterenol $10^{-10} \sim 10^{-7}$ M, histamine $10^{-7} \sim 10^{-3}$, 또는 forskolin $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M을 투여하여 25°C에서 3분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 Microfuge로 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물에 10 배량의 저온(0~4°C)의 trichloroacetic acid를 가하여, 2~8°C에서 균질화시켰다. 균질액을 $2,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액에 5배량의 diethylether를 가하여 4회 반복하여 세척하였다. 이 추출액을 동결건조시킨 다음, 0.05 M acetate 완충액에 녹여서 cAMP [^{125}I] assay system(Amersham, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 방사선 면역 측정법(radioimmuno-assay)으로 측정하였

3) 자료 분석

VIP 수용체 결합 실험의 경우, 해리 상수(Kd) 및 최대 특이결합(Bmax)은 결합억제 곡선으로부터 Akera 및 Cheng(1977)의 방법을 이용하여 구하였고, 실험군 사이의 통계학적 비교는 Student's *t*-test를 이용하였으며, 주어진 자료는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

세포내 cAMP 측정실험의 경우, 각 실험군 사이의 통계학적 비교는 Student's *t*-test 또는 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 이용하였고, 유의성이 있을 경우 각 실험군 사이의 차이에 대한 검정은 Dunnett법을 이용하여 시행하였다.

결 과

1) 단백질의 인산화 실험

흰쥐의 말초 혈액 T-림프구 배양액에 VIP 10^{-6} M을 투여하면 21/5.9, 45/6.9, 45/6.7, 45/6.5, 45/6.3, 47/5.8, 66/6.1, 68/5.8, 및 75/6.1(각각 분자량(kDa)/등전점(pI)을 의미) 등 9개 단백질의 인산화가 증가하였다. 이들 9개 단백질은 forskolin에 의하여도 단백질인산화가 증가하였으며, isoproterenol에 의하여는 21/5.9 단백질을 제외한 8개의 동일한 단백질의 인산화가 증가하였다. 한편 propranolol은 isoproterenol에 의한 인산화 증가를

봉쇄할 뿐 아니라 일부 단백질의 VIP에 의한 인산화 증가도 봉쇄하였다. 그러나 propranolol은 forskolin에 의한 이들 단백질의 인산화 증가는 봉쇄하지 못하였다(Table 1).

2) VIP 수용체 결합 실험

(1) 시간에 따른 [125 I] VIP 수용체 결합의 변동: VIP 수용체 결합 실험의 적정 반응시간을 결정하기 위하여 반응 시작 후 30분에서 10분 간격으로 70분째까지의 [125 I] VIP 결합을 측정하였다.

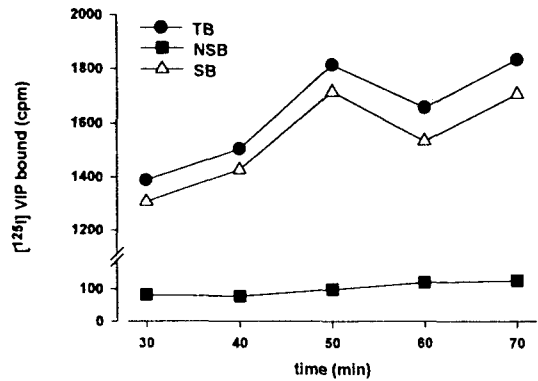


Fig. 1. Time-course of [125 I] VIP binding to peripheral blood T-lymphocytes of rat. Reaction was initiated by adding 50 pM [125 I] VIP and performed at 25°C in the absence or presence of 10 μ M VIP. Specific binding(SB, Δ) was obtained by subtraction of non-specific binding(NSB, \blacksquare) from the total binding(TB, \bullet).

Table 1. Changes of protein phosphorylation after VIP, isoproterenol or forskolin treatment in peripheral blood T-lymphocytes of rat

| drug | (kDa/pI) | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | 21/5.9 | 45/6.9 | 45/6.7 | 45/6.5 | 45/6.3 | 47/5.8 | 66/6.1 | 68/5.8 | 75/6.1 | |
| VIP | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| Propranolol + VIP | ↑ | — | — | ↑ | ↑ | ↑ | — | ↑ | ↑ | |
| Isoproterenol | — | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| Propranolol + isoproterenol | — | ↑ | — | — | — | — | — | ↑ | — | |
| Forskolin | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |
| Propranolol + forskolin | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | |

↑: marked increase, ↑: moderate increase, —: little or no change

반응 30분째의 특이결합은 $1,305.77 \pm 25.38$ cpm이었고, 40분째에 $1,428.88 \pm 2.05$ cpm으로 30분에서보다 특이결합이 증가하였다. 50분째의 경우 $1,716.93 \pm 43.29$ cpm으로 더욱 증가하였다. 60분 및 70분째에는, 각각 $1,538.00 \pm 44.45$ cpm 및 $1,710.27 \pm 45.39$ cpm으로, 반응시작으로부터 50분 경과 정도 후부터 특이결합이 최대에 이르는 것으로 나타났다(Fig. 1).

(2) Propranolol 비처치군 및 전처치군에서 VIP 수용체의 결합 특성: 50 pM [¹²⁵I] VIP를

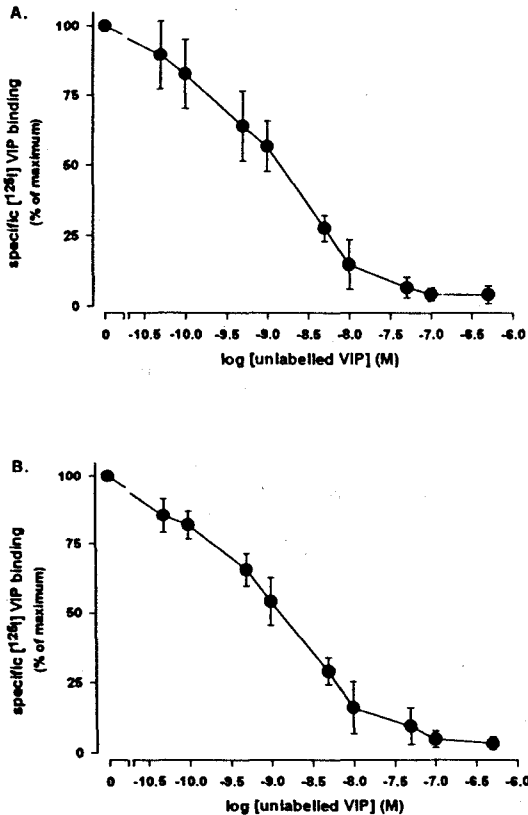


Fig. 2. Displacement of [¹²⁵I] VIP by unlabelled VIP. Cells (3×10^6 /ml) were incubated for 50 min at 25°C with [¹²⁵I] VIP (50 pM) in the absence (A) or presence (B) of propranolol. The concentration of cold VIP ranged from 10^{-11} to 10^{-7} M. Each point represents mean \pm SEM calculated from 4 experiments performed in duplicate.

$5 \times 10^{-11} \sim 5 \times 10^{-7}$ M의 표지되지 않은 VIP로 경쟁적 결합실험을 시행한 결과 [¹²⁵I] VIP의 특이결합이 억제된 정도는 용량-반응 곡선상에서, 총결합($9,281.43 \pm 1,791.92$ cpm)의 $16.03 \pm 8.59\%$ 에서 $97.59 \pm 0.81\%$ 까지 결합억제 곡선을 나타내었다(Fig. 2A).

Propranolol을 전처치한 후 동일 농도의 [¹²⁵I] VIP를 $5 \times 10^{-11} \sim 5 \times 10^{-7}$ M의 표지되지 않은 VIP로 경쟁적 결합실험을 통하여 시행한 결과, [¹²⁵I]VIP의 특이결합은 용량-반응 곡선상에서 총결합($10,283.79 \pm 3633.16$ cpm)의 $14.71 \pm 6.24\%$ 에서 $96.53 \pm 2.28\%$ 까지 결합억제 곡선을 나타내었다(Fig. 2B). 이 억제 곡선을 이용하여 구한 VIP의 VIP 수용체에 대한 K_d는 1.01 ± 0.51 nM이었으며, B_{max}는 0.90 ± 0.42 nM로서 수용체 밀도는 10^6 세포수 당 298.65 ± 139.11 fmol에 해당하였고 propranolol 전처치 후 VIP의 VIP 수용체에 대한 K_d는 1.12 ± 0.34 nM, B_{max}는 0.99 ± 0.20 nM, 수용체 밀도는 10^6 세포수 당 328.81 ± 67.88 fmol로서 별 변동이 없었다(Table 2).

3) 림프구 세포내 cAMP 측정 실험

(1) VIP 투여 후 림프구 세포내 cAMP 증가 변동

① 시간에 따른 cAMP 증가 변동; VIP 투여 후 림프구 세포내 cAMP 증가 변동의 측정을 위

Table 2. Effect of propranolol on the binding characteristics of [¹²⁵I] VIP to peripheral blood T-lymphocytes of rat

| Binding parameters | Propranolol(10^{-6} M) | | p value |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|
| | Not treated ¹ (n=4) | Pretreated ¹ (n=4) | |
| Kd(nM) | 1.01 ± 0.51 | 1.12 ± 0.34 | 0.39 |
| Bmax(nM) | 0.90 ± 0.42 | 0.99 ± 0.20 | 0.37 |
| Density (fmol/ 10^6 cells) | 298.65 ± 139.11 | 328.81 ± 67.88 | 0.37 |

¹Values are mean \pm SEM

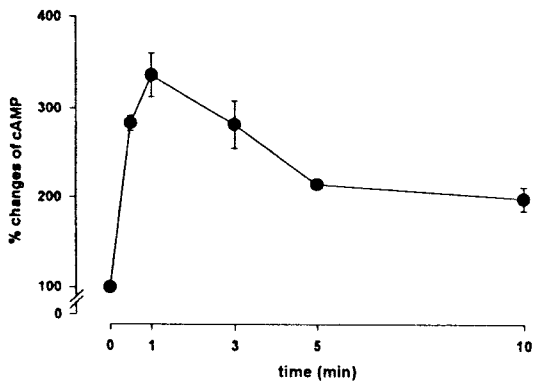


Fig. 3. Time-course of VIP-stimulated cAMP levels by peripheral blood T-lymphocytes of rat. Cells(5×10^6 /ml) were incubated in the presence of 0.6 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine with 10^{-8} M VIP at 25°C. The reaction was stopped at the indicated time. Each point is mean \pm SEM expressed as % changes of cAMP compared with the level of cAMP not stimulated with VIP.

한 적정 반응시간을 알아보기 위하여, 시간 간격에 따른 cAMP 농도를 측정하였다. 시간 간격은 30초, 1분, 3분, 5분, 10분으로 하였으며, VIP는 최종 농도 10^{-8} M로 하여 투여하였다.

실험 결과 VIP 투여에 의한 cAMP 증가는 초기 3분 사이에 급격히 증가하였다가 감소하여 5분 이후에 감소된 수준이 유지되는 양상을 나타내었다(Fig. 3).

② **농도에 따른 cAMP 증가 변동;** VIP 10^{-10} ~ 10^{-6} M을 투여하였을 때, 투여 농도에 의존적으로 cAMP의 증가가 관찰되었다. VIP 단독 투여 시 10^{-10} M에서의 cAMP는 약물을 투여하지 않은 군을 기준으로 하였을 때, $96.25 \pm 9.15\%$ 이었으며, 10^{-7} M에서 $251.32 \pm 52.86\%$ 로 최대 증가치를 보였다. Propranolol을 전처치한 군에서는 10^{-9} ~ 10^{-6} M의 농도범위에서 대조군에 비하여 유의하게 억제되었다. Timolol 전처치군에서 cAMP의 증가는 최저 투여농도에서 $136.07 \pm 16.97\%$ 를 나타내었고, 10^{-9} ~ 10^{-6} M의 농도 범위에서 대조군과의 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4).

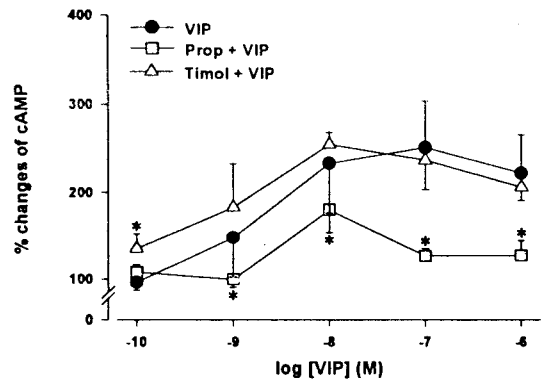


Fig. 4. Effect of propranolol or timolol on cAMP levels stimulated by VIP in peripheral blood T-lymphocytes of rat. Cells(5×10^6 /ml) were incubated for 3 min at 25°C with different concentrations of VIP with or without prior treatment of propranolol or timolol. Results are expressed as % changes of cAMP compared with the level of cAMP not stimulated with VIP. Each point is mean \pm SEM ($N \geq 6$). * indicates $p < 0.05$ compared to control (VIP, ●) by Dunnett method for multiple comparisons, Prop: propranolol, Timol: timolol.

(2) **Isoproterenol 투여 후 림프구 세포내 cAMP 증가 변동:** Isoproterenol을 10^{-10} ~ 10^{-7} M 농도로 투여하였을 때, 농도 의존적으로 림프구 세포내 cAMP 농도가 증가하여 약물을 투여하지 않은 군에 비하여 $103.43 \pm 5.92\%$ 에서 $342.41 \pm 60.94\%$ 까지 증가하였다. Propranolol을 전처치한 군의 경우, $93.19 \pm 6.10\%$ 로부터 최대증가를 보인 10^{-7} M 농도에서 $119.90 \pm 13.60\%$ 로 모든 농도범위에서 대조군에 비하여 cAMP 증가가 현저히 억제되었다. Timolol 전처치군의 경우에도, 전반적인 증가 양상은 보이지 않았으며, 최고 투여농도인 10^{-7} M에서 봉쇄제를 처치하지 않은 대조군과 비교할 때 유의한 cAMP 증가 억제를 나타내었다(Fig. 5).

(3) **Histamine 투여 후 림프구 세포내 cAMP 증가 변동:** Histamine을 10^{-7} ~ 10^{-3} M 농도로 투여한 후, 림프구 세포내 cAMP는 농도

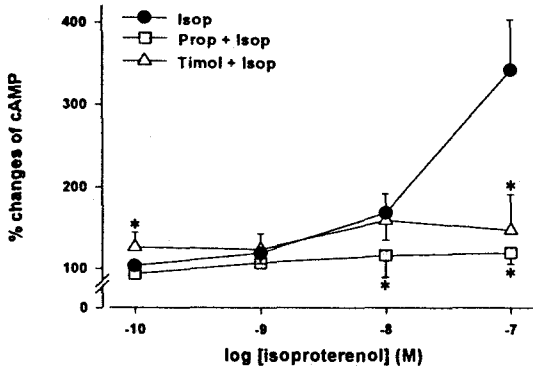


Fig. 5. Effect of propranolol or timolol on cAMP levels stimulated by isoproterenol in peripheral blood T-lymphocytes of rat. Isop: isoproterenol. Other legends are the same as Fig. 4.

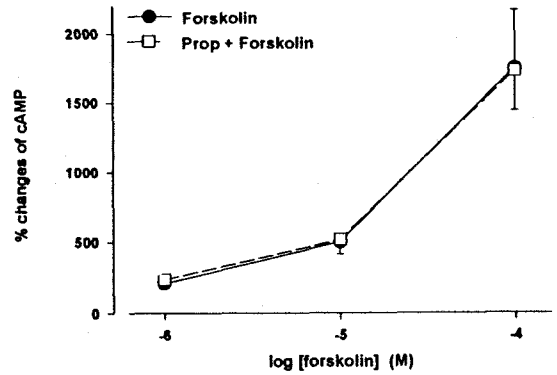


Fig. 7. Effect of propranolol on cAMP levels stimulated by forskolin in peripheral blood T-lymphocytes of rat. Other legends are the same as Fig. 4.

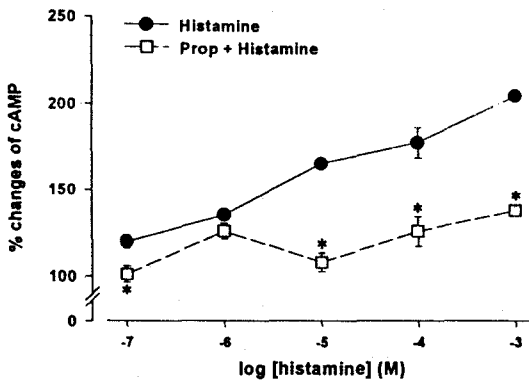


Fig. 6. Effect of propranolol on cAMP levels stimulated by histamine in peripheral blood T-lymphocytes of rat. Other legends are the same as Fig. 4.

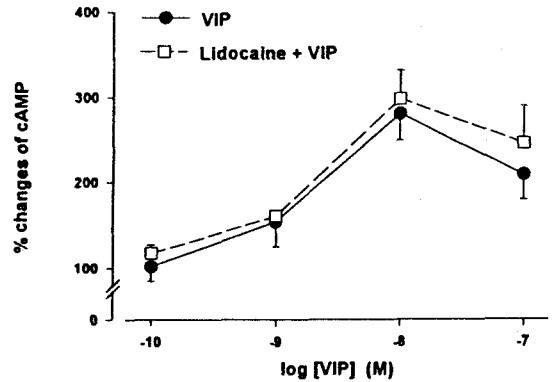


Fig. 8. Effect of lidocaine on cAMP levels stimulated by VIP in peripheral blood T-lymphocytes of rat. Other legends are the same as Fig. 4.

의존적으로 증가하였으며 약물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 $119.54 \pm 3.78\%$ (10^{-7} M)에서 $204.12 \pm 2.87\%$ (10^{-4} M)의 수준을 보였다. Propranolol을 전처치한 경우, $101.05 \pm 4.55\%$ (10^{-7} M)로부터 $137.37 \pm 1.32\%$ (10^{-3} M)로 대조군에 비하여 cAMP 증가가 유의하게 억제되었다(Fig. 6).

(4) Forskolin 투여 후 림프구 세포내 cAMP 증가 변동: Forskolin은 10^{-6} M 투여시

효현제를 투여하지 않은 경우의 세포내 cAMP 농도를 기준으로 하여 $210.89 \pm 20.84\%$ 의 증가를 보였으며 10^{-4} M 투여시에는 $1749.36 \pm 417.16\%$ 까지 농도증가에 따라서 현저한 증가를 보였다. 이러한 증가 양상은 propranolol 전처치에 의하여도 변동되지 않고, 모든 농도 범위에 걸쳐 대조군과 같은 수준의 cAMP 농도 증가를 나타내었다(Fig. 7).

(5) Lidocaine 비교군에서 림프구 세포내 cAMP 증가 변동: VIP 투여에 의한 cAMP 농도 증가에 대하여, lidocaine을 전처치한 군의 cAMP 농도 증가 양상을 비교하였을 때, 두 군의 증가양상 및 변동 수준에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 즉, VIP 단독투여군과 lidocaine 전처치군 모두 최소 투여농도인 10^{-10} M에서 각각 $101.89 \pm 16.87\%$ 및 $117.39 \pm 9.67\%$ 의 증가치를 보였으며, 효현제 농도를 증가시킴에 따라 증가하여 10^{-8} M에서 최대로 증가하였다(각각 $280.39 \pm 31.64\%$, $297.72 \pm 33.12\%$), 감소하는 양상을 나타내었고 모든 농도 범위에서 서로 유사한 수준의 cAMP 농도 증가를 보였다(Fig. 8).

고 찰

다세포성 유기 생물체에 있어서 기관이나 조직, 또는 세포 단위에서의 상호 연락(communication)은 궁극적으로는 개체의 생명유지 및 항상성 유지를 위해서 뿐만 아니라 개체의 운동의 조화(coordination), 대사 및 생장의 조절을 위해 필수적인 현상이다. 생체는 이를 위하여 홀몬, 신경전달 물질, 국소성 매개인자(local Mediator)와 같은 일차 전달물질(first Messenger)을 분비하여 신호를 표적세포에 전달한다. 일차 전달물질은 많은 경우에 직접 표적세포 내부로 신호를 전달할 수 없으므로, 전달물질에 특이한 수용체가 표적세포에 존재하여 일차 전달물질과 결합함으로써 수용체에 연관되어 있는 세포의 신호변환 기전을 이용하여 세포 내부로 일차 전달물질에 의한 신호를 전달한다(Hardie, 1991).

VIP와 아드레날린성 β 수용체 효현제인 isoproterenol은 말초혈액 T-림프구에서 각각 VIP 수용체와 아드레날린성 β 수용체와 결합하여 면역조절에 관여하는데(Hadden 등, 1970; Calvo 등, 1986), 이들은 흥분성 G 단백을 경유하여 adenylyl cyclase를 활성화시켜 작용을 나타낸다(Rodbell 등, 1971; Cassel 및 Selinger, 1976; Ross 및 Gilman, 1977; O'Dorisio 등, 1981).

동일한 기전을 이용하는 서로 다른 수용체를 통한 신호변환의 경우, 상호간에 어떤 연관성을 가질 가능성을 배제할 수 없다. 장중현 등(1994)의 보고에서와 같이 아드레날린성 β 수용체 효현제의 작용을 경쟁적으로 봉쇄하는 propranolol이 VIP의 작용을 봉쇄하였다는 보고는 이러한 신호변환 경로상의 상호연관성을 시사해 주는 한 예이다. 그러나, propranolol은 경쟁적 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제로서의 작용 뿐 아니라, 세포막 안정화 작용 또는 국소마취제 유사작용 등 세포막에 대하여 부수적인 작용을 가지고 있음이 알려져 있다(Hellenbrecht, 1972; IJerman, 1987). 그러므로 propranolol의 VIP 효과 봉쇄작용이 신호변환 경로상 수용체, G 단백 또는 adenylyl cyclase와의 직접적인 상호작용에 의한 것으로서 다른 경쟁적 봉쇄제로도 일반화될 수 있는 현상인지, 또는 propranolol이 특이하게 가지고 있는 고유 작용에 의한 것인지를 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

Propranolol이 직접적으로 VIP 수용체에 영향을 주는지를 보기 위하여 수용체 결합 실험을 시행하였다. 그 결과 VIP의 VIP 수용체에 대한 친화도(Kd)에 차이가 없었으므로 propranolol이 VIP 수용체의 결합특성 또는 수용체 자체의 기능을 변동시키지 못함을 알 수 있었다. 또한 VIP 수용체에 대한 VIP의 최대 특이결합(Bmax) 또는 VIP 수용체의 밀도에 있어서 두 군 사이에 유의한 차이가 보이지 않은 것은 VIP와 VIP 수용체와의 결합 반응시 propranolol이 경쟁적 봉쇄제로 작용했을 가능성에 대해서 뿐만 아니라, propranolol이 VIP 수용체와의 상호작용을 통하여 VIP 수용체를 잠식(sequestration) 또는 하향 조절(down regulation)시켰을 가능성도 아울러 배제시켜 준다. 이와 같은 사실로부터 propranolol은 VIP 수용체에 대한 직접 작용으로 VIP에 대한 억제 작용을 나타낸 것은 아닌 것으로 생각된다.

VIP와 isoproterenol 투여에 의한 세포내 cAMP 증가작용에 대한 propranolol 및 timolol의 억제 여부를 관찰한 실험에서 isoproterenol에 의한 작용은 propranolol 및 timolol이 모두 억제하

였으나, VIP에 의한 작용은 timolol의 경우 억제시키지 못함을 관찰할 수 있었다. 또한 propranolol은 histamine에 의한 cAMP 증가도 억제하였다.

이 결과는 propranolol의 억제 작용은 아드레날린성 β 수용체 봉쇄제가 가지고 있는 공통의 성질에 의한 것이라기 보다는 propranolol이 특이하게 가지고 있는 작용에 의한 현상이라는 점을 시사한다.

VIP에 의한 신호변환 경로 중 propranolol이 adenylyl cyclase 단백질에 작용하였을 가능성을 검증하기 위하여 G 단백을 경유하지 않고 직접 adenylyl cyclase를 활성화시키는 forskolin을 투여한 실험에서는 propranolol이 forskolin의 세포내 cAMP 증가효과에 대하여 아무런 억제작용을 나타내지 못하였다. 이는 propranolol이 adenylyl cyclase 및 adenylyl cyclase의 활성화에 수반된 이후의 단계에는 작용을 미치지 못함을 의미한다. 그러므로 propranolol이 억제 작용을 나타내는 기전은 수용체 이후부터 adenylyl cyclase 이전 단계, 또는 adenylyl cyclase의 기능에는 변동을 일으키지 않는 세포막에 대한 억제적 영향에 의한 것으로 생각할 수 있다.

Guttman(1940)은 potassium, veratrine과 같은 탈분극성 약물에 의한 신경세포막의 탈분극으로부터 Ca^{2+} 이나 Mg^{2+} 이 세포막의 휴지기 막전위(resting Membrane potential)를 안정화시킴을 발견하고 세포막 안정화(membrane stabilization)라는 용어를 처음 사용하였으며, 그 후 Shanes(1958)는 이러한 작용을 일으키는 모든 약물을 세포막 안정화 약물(membrane stabilizer)로 일반화하였다. 이에 따라 초기에는 세포막 안정화 작용을 Na^+ 통로에 대한 봉쇄에 의하여 활동전위(action potential)의 유발률을 감소시키는 작용에 국한하여 사용하였다(Weidmann, 1955; Thesleff, 1956). 그러나 그 이후 세포막 안정화 작용은 세포막 전위에 대한 작용 뿐 아니라 친지성 약물의 세포막 보호작용(membrane protective action)까지도 포괄하는 의미로 사용하게 되었다(Seeman,

1966).

세포막 보호작용으로 나타나는 현상들로는 세포막을 물리적으로 안정화시키고(Seeman, 1966), 세포막을 확장시키며(Seeman 등, 1969), 세포막의 삼투압성 용해(osmotic lysis)를 방지하고(Fortier 등, 1977), 세포막의 지질성분에 작용하여 세포막의 상전이 온도(phase transition temperature)에 영향을 주는 등(Lee, 1977; Herbertte 등, 1983)의 세포막 지질 성분을 교란(perturbation)시키는 작용(Ondriaš 등, 1986) 등을 들 수 있다.

Propranolol도 Na^+ 통로에 대한 세포막 안정화 작용 뿐 아니라 세포막 보호 작용을 가지고 있으며, 적혈구가 저장액(hypotonic solution)에서 용해를 일으키는 작용을 propranolol이 방지할 수 있음이 보고되어 있다(Godin 등, 1976; Fortier 등, 1977; Surewicz 등, 1981). 그러나 이러한 작용이 나타나는 propranolol의 투여농도를 살펴볼 때, 적혈구에 대한 항용혈(antihemolytic) 효과는 대략 $10^{-4} M \sim 10^{-3} M$ 에서 나타나는 등(Surewicz 등, 1981) 대부분의 경우 propranolol의 아드레날린성 β 수용체 봉쇄 효과를 나타내는 농도인 $10^{-7} M$ 범위보다 상당히 고농도인 $10^{-5} M$ 과 $10^{-3} M$ 사이에서 나타난다(Seeman, 1972). 본 실험의 경우, propranolol이 VIP의 세포내 cAMP 증가작용에 대하여 $10^{-9} M \sim 10^{-6} M$ 의 농도범위에서 유의한 억제를 나타내었으며, 이는 propranolol의 VIP 억제 효과가 아드레날린성 β 수용체 봉쇄를 일으키는 농도에서 작용을 나타내었음을 의미한다.

Propranolol의 세포막 안정화 작용 또는 국소마취제 유사작용이 VIP 효과에 대한 억제 기전으로 작용하는가를 알아보기 위하여 국소마취제인 lidocaine을 사용한 실험에서 lidocaine은 VIP의 세포내 cAMP 증가 작용을 억제하지 못하였으며, 이는 propranolol의 봉쇄 작용이 국소 마취제 약물들이 가지고 있는 세포막 안정화 작용에 기인된 것은 아님을 말해 준다.

그러나, propranolol은 다른 대부분의 아드레날린성 β 수용체 봉쇄 약물보다 지용성이 큰 약물이므로(Frushman, 1988), 저농도에서도 쉽게 세포

막과 결합하여 세포막의 여러 구성 성분들과 상호 작용을 일으킬 가능성이 있다. 즉, 약물이 세포막 구성 단백질로 직접 녹아 들어가 단백질의 구조를 변형시킴으로써 단백질의 기능을 억제한다든지 (Richards등, 1978), 또는 생체 세포막의 지질층에 위치하면서 지질막의 운동성이나 지질막의 구성성분을 바꿈으로써 간접적으로 세포막 단백질에 작용을 나타내었을 가능성을 배제할 수 없다(Lee, 1977).

본 실험 결과 propranolol의 VIP에 대한 억제 작용은 세포막 단백질 중, 표면에 위치한 수용체와 세포막 내측에 위치한 adenylyl cyclase 및 그 이후의 단계에 대한 영향은 아닌 것으로 생각되므로, 이 두 세포막 구성 단백질의 중간 과정에 propranolol이 억제 작용을 나타낼 가능성이 크다. 중간 단계에 해당하는 세포막 구성 성분으로는 G 단백질이 있으므로, propranolol이 림프구 세포막에 들어감으로써 직접적으로 G 단백질에 영향을 주든지, 혹은 간접적으로 세포막 지질에 영향을 주어 G 단백질의 기능을 변동시킬 가능성이 있다.

그러나, 이번 실험으로 propranolol과 G 단백질의 상호관계를 직접적으로 관찰하지 못하였으며, 아직까지도 G 단백질과 수용체, G 단백질과 adenylyl cyclase와의 상호작용에 대한 구체적인 연구가 부족한 상태이므로, 이 부분에 대한 연구가 앞으로 수행되어야 할 과제로 생각된다.

본 연구를 통하여 propranolol이 아드레날린성 β 수용체 봉쇄 효과를 나타내는 치료농도에서 세포막 안정화 작용이 아닌 추가적인 작용을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 이는 propranolol의 임상 응용과 관련지어 생각할 때, 추가적인 치료 기전으로 고려해 볼 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

흰쥐 말초혈액 T-림프구에서 VIP의 효과에 대한 propranolol의 억제 기전을 연구하기 위하여 propranolol 비처리시와 전처리시의 VIP 수용체 결합실험과, isoproterenol, VIP, histamine, for-

skolin 투여군에서 propranolol, timolol 전처리 유무에 따른 cAMP 농도 증가 변동 및 VIP의 cAMP 농도 증가 효과에 대한 lidocaine의 영향 등을 관찰하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) VIP 수용체 결합 실험에서 propranolol은 VIP 수용체의 친화도나 밀도에 영향을 주지 않았다.

2) VIP에 의한 림프구 세포내 cAMP 증가는 propranolol에 의해 유의하게 억제되었으나, timolol에 의하여는 억제되지 않았다.

3) Isoproterenol은 림프구 세포내 cAMP를 증가시켰으며, 이러한 증가는 propranolol 및 timolol에 의하여 모두 유의하게 억제되었다.

4) Propranolol은 histamine에 의한 cAMP 증가를 억제하였다.

5) Forskolin에 의한 림프구 세포내 cAMP 증가를 propranolol은 억제하지 못하였다.

6) Lidocaine은 VIP에 의한 림프구 세포내 cAMP 증가를 봉쇄하지 못하였다.

이상의 실험결과로 보아 흰쥐 말초혈액 T-림프구에서 propranolol의 VIP에 대한 억제 효과는 VIP에 의한 신호변환 과정 중 VIP 수용체 또는 adenylyl cyclase에 대한 직접적인 작용보다는 그 중간 과정에 영향을 준 결과로 생각되며, 이는 propranolol의 세포막에 대한 안정화 작용과는 별개의 효과로 생각된다.

참 고 문 헌

- 장중현, 김성규, 이원영, 강동원, 안영수: Vasoactive intestinal polypeptide에 의한 흰쥐 말초 혈액 T 림프구 단백질의 인산화 변동. 대한내과학회지, 46: 36-48, 1994
- Akera T and Cheng VK: A simple Method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies. *Biochim Biophys Acta* 470: 412-423, 1977
- Beed EA, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM and Gaginella TS: Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt

- 4b T Lymphoblasts. *Regul Pept* 6: 1-12, 1983
- Calvo JR, Molinero P, Jimenez J, Goberna R and Guerrero JM: *Interaction of vasoactive intestinal peptide with rat lymphoid cells. Peptides* 7: 177-181, 1986
- Casey PJ and Gilman AG: *G protein involvement in receptor-effector coupling. J Biol Chem* 263: 2577-2580, 1988
- Cassel D and Selinger Z: *Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. Biochim Biophys Acta* 1452: 538-551, 1976
- Conolly ME and Greenacre JK: *The β -adrenoceptor of the human lymphocyte and human lung parenchyma. Br J Pharmacol* 59: 17-23, 1977
- Fortier NL, Snyder LM, Palek J and Weiss EB: *Effect of propranolol on normal human erythrocytes. J Lab Clin Med* 89: 41-50, 1977
- Frishman WH: *β -Adrenergic blockers. Med Clin North Am* 72: 37-81, 1988
- Gilman AG: *G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem* 56: 615-649, 1987
- Godin DV, Ng TW and Tucek JM: *Studies on the interaction of propranolol with erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta* 436: 757-773, 1976
- Guerrero JM, Prieto JC, Elorza FL, Ramirez R and Goberna R: *Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. Mol Cell Endocrinol* 21: 151-160, 1981
- Guttman R: *Stabilization of spider crab nerve membranes by alkaline earths, as manifested in resting potential measurement. J Gen Physiol* 23: 346-364, 1940
- Hadden JW, Hadden EM and Middleton EJ: *Lymphocyte blast formation: demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. Cell Immunol* 1: 583-595, 1970
- Hardie DG: *Biochemical messengers. 1st ed. London, Chapman & Hall, 1991, pp 1-43*
- Hellenbrecht D, Lemmer B, Wiethold G and Grobeck-er H: *Measurement of hydrophobicity, surface activity, local anesthesia, and myocardial conduction velocity as quantitative parameters of the non-specific membrane affinity of nine β -adrenergic blocking agents. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 277: 211-226, 1972
- Herbette L, Katz AM and Sturtevant JM: *Comparisons of the interaction of propranolol and timolol with model and biological membrane systems. Mol Pharmacol* 24: 259-269, 1983
- Hille B: *Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerve. Nature(London)* 210: 1220-1222, 1966
- Ijzerman AP, Nagesser A and Garritsen A: *The membrane stabilizing activity of β -adrenoceptor ligands: quantitative evaluation of the interaction of phenoxypropanolamines with the [3 H]batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding site on voltage-sensitive sodium channels in rat brain. Biochem Pharmacol* 36: 4239-4244, 1987
- Johnson DL, Ashmore RC and Gordon MA: *Effects of β -adrenergic agents of the murine lymphocyte response to mitogen stimulation. J Immunopharmacol* 3: 205-219, 1981
- Khan MM, Sansoni P, Silverman ED, Engleman EG and Melmon KL: *Beta adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. Biochem Pharmacol* 35: 1137-1142, 1986
- Lee AG: *Local anesthesia: the interaction between phospholipids and chlorpromazine, propranolol and practolol. Mol Pharmacol* 13: 474-487, 1977
- Lima DRA, Kilfeather S, Hedges A and Turner P: *Comparison of four different β -adrenoceptor blocking drugs on lymphocyte isoprenaline-stimulated cyclic AMP production. Br J Clin Pharmacol* 11: 555-559, 1981
- Muller JM, el Battari A, Ah-Kye E, Luis J, Ducret F, Pichon J and Marvaldi J: *Internalization of the vasoactive intestinal peptide(VIP) in a human adenocarcinoma cell line(HF29). Eur J Biochem* 152: 107-114, 1985
- O'Dorisio MS, Hermina NS, O'Dorisio TM and

- Balcerzak SP: *Vasoactive intestinal polypeptide modulation of lymphocyte adenylate cyclase. J Immunol* 127: 2551-2554, 1981
- O'Farrell PZ, Goodman HM and O'Farrell PH: *High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell* 12: 1133-1142, 1977
- Ondriaš K, Staško A, Jančinov V and Balgavy P: *Comparison of the effect of eleven β -adrenoceptor blocking drugs in perturbing lipid membrane: An ESR spectroscopy study. Mol Pharmacol* 31: 97-102, 1986
- Richards CD, Martin K, Gregory S, Keightley CA, Hesketh TR, Smith GA, Warren GB and Metcalfe JC: *Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action. Nature(London)* 276: 775-779, 1978
- Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL and Krans HM: *The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. J Biol Chem* 246: 1877-1882, 1971
- Ross EM and Gilman AG: *Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interaction of solubilized components with receptor-replete membranes. Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3715-3719, 1977
- Seamon KB and Daly JW: *Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the nucleotide regulatory protein. J Biol Chem* 256: 9799-9801, 1981
- Seeman P: *Membrane stabilization by drugs: tranquilizers, steroids and anesthetics. Int Rev Neurobiol* 9: 145-221, 1966
- Seeman P: *The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol Rev* 24: 583-655, 1972
- Seeman P, Kwant WO, Sauks T and Argent W: *Membrane expansion of intact erythrocytes by anesthetics. Biochim Biophys Acta* 183: 490-498, 1969
- Shanes AM: *Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. Pharmacol Rev* 10: 59-164, 1958
- Surewicz KW, Fijalkowska I and Leyko W: *The effect of propranolol on the osmotic fragility of red cells and liposomes and the influence of the drug on glycerol transport across the membrane of red cells. Biochem Pharmacol* 30: 839-842, 1981
- Thesleff S: *The effect of anesthetic agents on skeletal membrane. Acta Physiol Scand* 137: 335-349, 1956
- Tolkovsky AM and Levitski A: *Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. Biochemistry* 17: 3795-3810, 1978
- Weidmann S: *Effects of calcium ions and local anesthetics on Purkinje fibers. J Physiol(London)* 129: 568-582, 1955