

디벤아민에 의한 무스카린 수용체 아형의 불활성화

이신웅* · 장태수

영남대학교 약학대학

(Received August 22, 1995)

Inactivation of the Muscarinic Receptor Subtype by Dibenamine

Shin-Woong Lee* and Tae-Soo Jang

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—Dibenamine inhibited [³H]quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB) binding in both concentration- and incubation time-dependent manners. The IC₅₀ value of dibenamine for the inhibition of the specific binding of 100 pM [³H]QNB following incubation of cerebral microsomes with dibenamine at 37°C for 15 min was 20 μM. Dibenamine irreversibly decreased the binding site concentration for [³H]QNB binding without affecting the affinity of [³H]QNB for the muscarinic receptor. Analysis of the pirenzepine inhibition curve of [³H]QNB binding to cerebral microsomes indicated the presence of two receptor subtypes with high (M₁ receptor, K_i=5 nM) and low (M₂ receptor, K_i=160 nM) affinity for pirenzepine. However, dibenamine(20 μM) treatment under the condition employed in these experiments caused steepening of the pirenzepine competition curve. The K_i value for pirenzepine in dibenamine treated-microsomes was approximately 120 nM, suggesting a selective decrease in the number of M₁ receptor. Although dibenamine also inhibited [³H]QNB binding to ventricular microsomes with the IC₅₀ value of 120 μM, the sensitivity for dibenamine in the ventricle was much lower than that in the cerebrum. These results indicate that dibenamine at low concentrations selectively inactivates the muscarinic M₁ receptor.

Keywords □ Dibenamine, muscarinic receptor subtypes, pirenzepine, [³H]QNB binding, cerebrum.

Acetylcholine은 중추 및 말초신경계의 중요한 신경 전달물질중의 하나로서 그 작용은 nicotine 및 muscarine수용체와의 상호작용을 통하여 나타난다.¹⁾ Acetylcholine의 muscarine수용체는 atropine, scopolamine 등과 같은 길항제에 대해서는 모든 조직에서 동일한 결합성질을 가지나 pirenzepine과의 결합성질 면에서는 조직에 따라 현저한 차이가 있어 pirenzepine에 대한 친화력에 따라 크게 두 종류의 아형으로 구분되고 있다. 즉 pirenzepine에 친화력이 높은 수용체를 M₁ 수용체, 친화력이 낮은 수용체를 M₂ 수용체라

하며, M₁ 수용체는 주로 신경조직에 있는 반면, M₂ 수용체는 주로 심장등의 말초조직에 분포하고 있는 것으로 알려지고 있다.²⁻⁴⁾

Muscarine수용체 아형은 himbacine, methoctramine, AF-DX116(11-[[[2-(diethylamino)-methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepine-6-one)⁵⁻⁸⁾의 약물에 의해서도 구분되어지며 비가역적 길항제인 EEDQ(N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline)⁹⁾나 PBCM(propylbenzylcholine mustard)¹⁰⁾에 대한 감수성에 있어서도 차이가 있어, 이들 아형이 단순히 동일 수용체 단백질의 입체구조적 상태의 차이를 나타내는 것이 아니고 수용체에 있는 이

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-811-3871

들 약물결합부위의 분자구조자체가 다른 별개의 부위인 것으로 추정하고 있다. 그러나 비가역적 muscarine수용체 길항체가 같은 아형에 선택성을 갖는 것이 아니고, EEDQ는 M₁ 수용체에, PBCM은 M₂ 수용체에 선택성이 큰 것으로 보고되고 있어 이들 약물이외의 muscarine수용체 불활성화제를 사용할 때 특정 아형에 대한 선택성 여부를 유추할 수 없다.

Phenoxybenzamine 및 dibenamine과 같은 haloalkylamine계 약물은 교감신경 α₁수용체^{11, 12)}이외에도 serotonin¹³⁾, histamine H₁¹⁴⁾, muscarine수용체¹⁵⁻¹⁷⁾등 여러가지 수용체를 비가역적으로 불활성화하므로 기능적 실험을 통한 효능제의 친화력과 예비 (spare)수용체를 추정하기 위하여 널리 사용되어 왔다.¹⁸⁻²⁰⁾ 본 실험에서는 dibenamine의 muscarine수용체 불활성화 작용이 muscarine수용체 아형에 선택성을 갖는지를 알아보기 위하여 대뇌 및 심장에서 dibenamine처리 전후의 [³H]quinuclidinyl benzilate (QNB)와 pirenzepine의 결합성질을 비교, 검토하였다.

실험방법

실험재료 및 시약 - 재료: 실험동물은 외관상 건강한 체중 250~300 g의 성숙 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 암수 구별없이 사용하였다.

시약: [³H]Quinuclidinyl benzilate(³H)QNB, 41.6 Ci/mmol)는 Amersham사로부터, tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), atropine sulfate, 1,4-bis(2-(5-phenyloxazolyl))benzene(POPOP), 2, 5-diphenyloxazole(PPO), pirenzepine 및 dibenamine은 Sigma사로부터 구입하였고, 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품이었다.

흰쥐 대뇌 microsome의 분리 - 대뇌 microsome은 Mayrand등²¹⁾의 방법을 일부 수정하여 분리하였다. 체중 250~300 g의 흰쥐를 단두도살하고 뇌를 적출, 빙냉의 10 mM Tris · Cl 용액(pH 7.4)(Medium A)중에 넣어 대뇌를 분리, 가위로 세절한 후 여기에 대뇌 무게의 약 5배가 되는 medium A를 가하고 이를 blender로 균질화한 후 1,100×g에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 7,700×g에서 20분간 원심분리하고, 이 상정액을 55,000×g에서 30분간 원심분리하여 microsome분획을 얻었으며 이 분획을 소량의 medium A중

에 부유시켜 -70°C에 저장하였다가 필요시 사용하였다.

단백질농도는 bovine serum albumin용액을 표준액으로 하여 Lowry등²²⁾의 방법으로 측정하였다.

심실 microsome의 분리 - 심실 microsome의 분리는 Lee등²³⁾의 방법에 의하였다. 즉 심방 및 주위조직을 제거한 심실근을 가위로 세절한 다음 무게의 5배가 되는 medium A를 가하고 이를 blender로 균질화한 다음 8,700×g에서 20분간 원심분리하였다. Pellet를 6배 용량의 medium A중에 부유시키고 glass homogenizer중에서 teflon pestle을 4회 통과시킨 후 (80% Max., 140 W) 8,700×g에서 20분동안 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하고 매회 상정액을 모아 원심분리(35,000×g, 20 min)하여 얻은 microsome분획에 소량의 medium A를 가하여 균질화한 후 -70°C에 저장하였다가 결합실험에 사용하였다.

[³H]QNB 결합실험 - [³H]QNB결합실험은 여과법²⁴⁾에 의하였다. 즉 50 mM Tris · Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl₂ 및 일정농도의 [³H]QNB와 비표지약물을 함유하는 medium속에 microsome을 가하여 총용적이 5 ml가 되제한 후 37°C에서 150분간 반응시킨 다음 glass-fiber filter(Whatman GF/B)상에서 흡입여과하였다. Filter를 세척액 5 ml로 3회 세척, scintillation vial에 넣고 광원하에서 2시간 건조한 다음 8 ml의 scintillation액(PPO : 6 g, POPOP : 225 mg, Triton X-100 : 0.5 l, Toluene : 1 l)을 넣고 12시간 방치 후, liquid scintillation counter로 그 radioactivity를 측정하였다. [³H]QNB의 특이결합은 전체결합에서 10⁻⁵ M atropine존재하에서 측정되는 비특이결합을 뺀 값으로 하였다.

[³H]QNB결합의 kinetic parameters - 전술의 [³H]QNB결합실험 medium중에 여러 농도의 [³H]QNB와 단백질을 가한 다음 37°C에서 150분간 반응시켰으며 반응을 종료시킨 후 여과, 세척하고 방사능을 측정하여 [³H]QNB 각 농도에서의 [³H]QNB결합을 측정하였다. [³H]QNB결합의 affinity(K_D)와 결합부위농도(B_{max})는 [³H]QNB 각 농도에서의 [³H]QNB결합(B)을 B = -K_D · B/F + B_{max}에 적용시켜, Scatchard plot하여 구하였고(F : [³H]QNB의 free concentration), Hill coefficient(nH)는 [³H]QNB의 포화결합실험에서 얻은 자료를 log[Y/(1-Y)] = n · log[F] - log(K_D)에 적용시킨 다음 각 점을 잇는 회귀선으로부터

구하였다($Y=B/B_{max}$, n =Hill coefficient).

비표지약물의 dissociation constant(K_i)와 Hill coefficient(nH) - 비표지약물의 dissociation constant(K_i)는 Cheng과 Prusoff²⁵⁾의 방법으로 산출하였다. 즉 [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 비표지약물의 농도(IC₅₀), 사용한 [³H]QNB의 농도(F) 및 [³H]QNB의 dissociation constant(K_D)로부터 유도된 $K_i = IC_{50} / (1 + F/K_D)$ 의 식에 의하여 산출하였다. [³H]QNB결합억제에 대한 비표지약물의 Hill coefficient는 여러 농도의 비표지약물 존재하에서 [³H]QNB결합 억제정도를 측정하여 이를 다음 식에 적용시켜, Hill plot하여 구하였다.

$$\log[I/(100-I)] = n \cdot \log[D] - \log[IC_{50}]$$

I : 비표지약물 일정한 농도[D]에서의 [³H]QNB결합억제 %
n : Hill coefficient

비표지약물에 의한 muscarine수용체 subtype의 분류 - 비표지약물과 [³H]QNB와의 muscarine수용체에 대한 경쟁적 결합실험결과를 Hofstee plot하였을 때 각 점의 직선성이 인정되지 않고, Hill plot하였을 때 Hill coefficient가 1보다 작다고 인정될 때는 이 성적을 Munson등²⁶⁾의 two-site model에 적용, 분석하여 각 부위에 대한 친화력(K_i) 및 각 부위의 분포정도를 추정하였다.

Microsome의 dibenamine처리 - Microsome을 각 농도의 dibenamine으로 37°C에서 15분동안 처리한 후 그 0.1 ml(단백질 50 µg)를 [³H]QNB결합실험에 사용하였으며, dibenamine처리시간에 따른 [³H]QNB결합변화를 조사하는 실험에서는 microsome을 20 µM의 dibenamine으로 37°C에서 일정시간 동안 처리한 후 [³H]QNB결합실험을 시행하였다.

통계처리 - 실험성적은 평균치±평균오차로 나타내었으며 실험결과의 유의성 검정은 Student's *t* test에 의하였다.

결 과

대뇌 및 심실 homogenate와 microsome의 [³H]QNB평형결합 - Table I은 100 pM의 [³H]QNB를 함유하는 medium중에 homogenate와 microsome을 가하고 150분간 반응시킨 다음 homogenate와 microsome의 [³H]QNB결합정도를 요약한 것으로 대뇌

Table I— [³H]QNB binding to homogenate and microsome prepared from rat cerebrum and ventricle

Fraction	[³ H]QNB binding(fmol/mg)	
	Cerebrum	Ventricle
Homogenate	460.3 ± 50.2	82.7 ± 7.8
Microsome	1979.1 ± 141.8	923.5 ± 80.2

Homogenate(50 µg) and microsome(50 µg) were added to the tube containing 50 mM Tris · Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl₂, and 100 pM [³H]QNB in a final volume of 5 ml and the tubes were incubated at 37°C for 150 min. The suspension was then filtered through glass-fiber filter (Whatman GF/B). Specific [³H]QNB binding was calculated by subtracting the nonspecific binding measured in the presence of 10 µM atropine from the total binding measured in the absence of atropine. Values represent the mean±S.E.M. of four separate preparations.

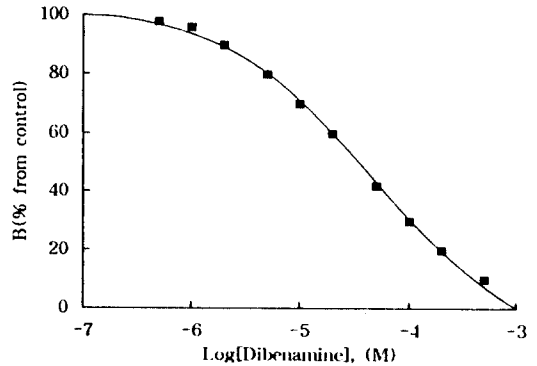


Fig. 1— Inhibition of [³H]QNB binding to cerebral microsome by dibenamine.

Microsomes pretreated with various concentrations of dibenamine at 37°C for 15 min were incubated with 100 pM [³H]QNB for 150 min at 37°C. B: Specific [³H]QNB binding. Each point represents the mean of three experiments.

와 심실에서 단백질 mg당 homogenate는 각각 약 500 fmol, 100 fmol이었으며, microsome은 약 2,000 fmol, 1,000 fmol로서 microsome에서 muscarine수용체결합이 각각 4배, 10배 증가되었음을 나타내고 있다. 따라서 이후 실험에서는 결과측정이 용이한 microsome을 사용하였다.

Dibenamine농도에 따른 [³H]QNB결합억제 - 대뇌 microsome(50 µg)을 dibenamine 각 농도로 37°C에서 15분간 처리한 다음 그 0.1 ml를 100 pM [³H]QNB를 함유하는 반응액 4.9 ml에 가하고 150분동안 반응시켰을 때 dibenamine 10⁻⁶M에서부터 농도의존

Table II— Inhibition of [³H]QNB binding by dibenamine to rat cerebral microsome

Medium	Washes	[³ H]QNB binding(fmol/mg)	%
10 mM Tris · Cl	2	2250±67.2	100
10 mM Tris · Cl+20 μM Diben	2	1284±18.6**	57.1

Microsome(50 μg) was pretreated with 10 mM Tris · Cl alone, or with 20 μM dibenamine(Diben) at 37°C for 15 min and diluted to 60 times by the addition of the ice-cold 10 mM Tris · Cl(pH 7.4). Control and dibenamine treated microsomal suspensions were centrifuged at 32,000×g for 20 min. The pellets were diluted and centrifuged again. The final pellets were for the [³H]QNB binding assays using a single concentration of [³H]QNB(100 pM). Values are the mean±S.E.M. of three experiments. **: Significantly different from the control value at p<0.01.

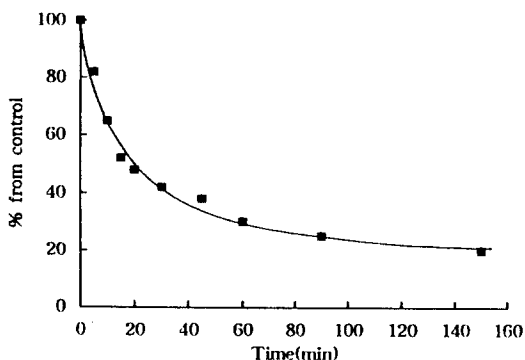


Fig. 2— Time-dependent changes in the ability of dibenamine to inhibit [³H]QNB binding to muscarinic receptors in the rat cerebral microsome. Microsomes were treated with 20 μM dibenamine at 37°C for the indicated time. Dibenamine treated microsomes(50 μg protein/0.1ml) were incubated with 100 pM [³H]QNB in 4.9 ml of the dibenamine free medium for 150 min at 37°C. Each point represents the mean of four separate experiments.

적으로 [³H]QNB결합을 억제하기 시작하여 10⁻³M에서는 거의 100% 억제하였고, 본 실험에 주어진 조건에서 [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 dibenamine의 농도는 약 20 μM이었다(Fig. 1). 한편 [³H]QNB의 비특이결합은 dibenamine에 의하여 거의 영향을 받지 않았다.

Dibenamine처리 후 세척에 의한 [³H]QNB결합변화

— Dibenamine에 의한 [³H]QNB결합억제제가 가역적인지 또는 비가역적인지를 조사하기 위하여 대뇌 microsome을 20 μM dibenamine으로 15분간 처리, 60배의 빙냉의 10 mM Tris · Cl로 희석한 후 원심분리하고 이 세척과정을 한번 더 반복한 다음 침전물을 소량의 10 mM Tris · Cl 반응액에 부유시켜 [³H]QNB결합실험을 시행하였다. Table II에서 보는 바와 같이 100 pM [³H]QNB존재하에서 대조군의 [³H]

QNB평형결합은 단백질 mg당 약 2,300 fmol이었으나 20 μM dibenamine처리군에서는 약 1,300 fmol로 그 결합이 거의 50% 감소되어 dibenamine에 의한 [³H]QNB결합억제제가 비가역적인 것임을 시사하고 있다.

Dibenamine 처리시간에 따른 [³H]QNB결합억제

Fig. 2는 대뇌 microsome을 dibenamine 20 μM로 5~150분동안 처리한 다음 dibenamine을 함유하지 않은 반응액중에 가하여 microsome의 [³H]QNB결합을 조사한 것으로 dibenamine에 의한 대뇌 microsome의 [³H]QNB결합감소는 dibenamine처리시간이 길어짐에 따라 증가되었으며 150분간 처리했을 때는 약 75% 감소되었다.

Dibenamine이 [³H]QNB결합의 kinetic parameters

에 미치는 영향 — 전술한 바와 같이 dibenamine에 의한 [³H]QNB결합억제제가 비가역적이라면 dibenamine은 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB결합의 친화성에는 영향을 주지 않고 결합부위농도를 감소시킬 것으로 추측되므로 이를 확인하고자 [³H]QNB포화결합실험을 시행하여 보았다. 대뇌 microsome의 [³H]QNB결합은 400 pM [³H]QNB존재하에서 거의 최대에 이르는 포화성결합이었으며, 20 μM dibenamine처리로 [³H]QNB 각 농도에서의 [³H]QNB결합이 현저히 억제되었다(Fig. 3-A). Fig. 3-A의 포화결합성적용 Scatchard plot하였을 때(Fig. 3-B) 대조 microsome과 dibenamine처리 microsome에서 각 점의 직선성이 인정되었음은(r=0.9922) 대뇌 microsome에 [³H]QNB에 대한 일정한 단일결합부위가 있으며 dibenamine은 [³H]QNB결합의 cooperativity에는 영향을 주지 않았음을 시사해주고 있다. Table III은 [³H]QNB포화결합실험결과를 요약한 것으로 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB의 K_D치는 약 50 pM 이었고, dibenamine은 QNB결합의 친화성에는 영향

Table III—Effect of dibenamine on the kinetic parameters of [³H]QNB binding to rat cerebral microsome

	K _D (pM)	B _{max} (fmol/mg)	nH
Control	51.9±0.7	3646.5±211.6	1.14±0.15
20 μM Dibenamine	50.1±3.78	1891.0±292.0**	0.99±0.04

K_D and B_{max} were calculated from Scatchard analysis of the saturation binding data. Hill coefficient(nH) was calculated from Hill plot. Values are the mean±S.E.M. of four experiments. **: Significantly different from the control value at p<0.01.

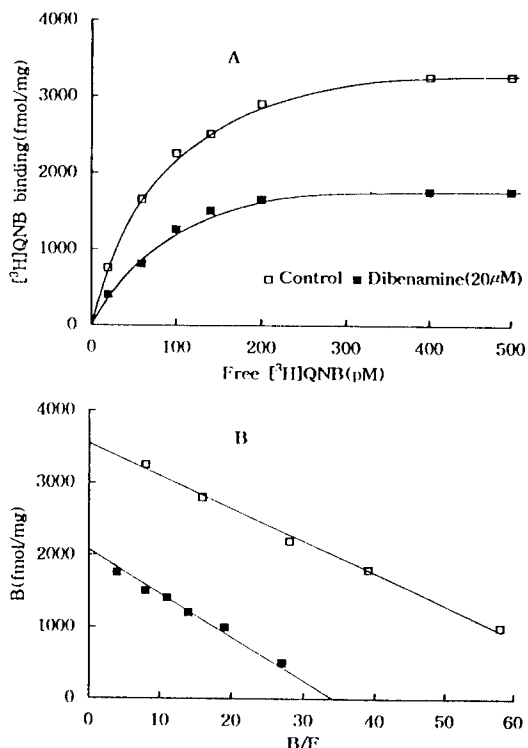


Fig. 3—Saturation binding of [³H]QNB to control and dibenamine treated microsome. Cerebral microsomes (□ : control, ■ : Pre-treated With 20 μM dibenamine) were incubated with various concentrations of [³H]QNB for 150 min at 37°C. A: Saturation isotherm of [³H]QNB binding. B: Scatchard plot of [³H]QNB binding data obtained from A. Bound [³H]QNB(B) was plotted as a function of bound [³H]QNB(B)/free [³H]QNB(F).

을 미치지 않았으나 결합부위농도(B_{max})는 약 50% 감소시켰다.

대뇌 microsome에서 pirenzepine과 [³H]QNB의 경쟁적 결합실험—대뇌 microsome에서 muscarine수용체 아형의 분포정도와 특정 아형에 대한 dibenamine의 선택성 여부를 알아보기 위하여 pirenzepine과 [³H]QNB의 경쟁적결합실험을 시행하였다. 100 pM의 [³H]QNB존재하에서 pirenzepine은 3 nM에서

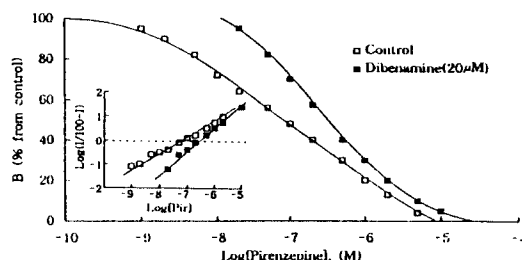


Fig. 4—Inhibition of [³H]QNB binding to dibenamine treated cerebral microsome by pirenzepine. Microsomes were divided into two aliquots and incubated at 37°C for 15 min in the presence and absence of 20 μM dibenamine, and then washed two times by centrifugation and resuspended into 10 mM Tris · Cl buffer. Assay conditions were as described under "Methods". The inset shows Hill plot of the inhibition data. Hill coefficient is taken as the slope of the regression line. I represents the percentage inhibition of [³H]QNB binding at a given pirenzepine concentration. Each point represents the mean of four separate experiments.

부터 [³H]QNB결합을 억제하기 시작하여 10 μM에서는 거의 [³H]QNB결합을 일으키지 않았다(Fig. 4). 이와 같이 pirenzepine의 [³H]QNB결합억제곡선은 아주 완만하여 이를 Hofstee plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되지 않았을 뿐 아니라 Hill plot했을 때 Hill coefficient 역시 0.64로 1보다 유의하게 작았다(Fig. 4, inset). 따라서 [³H]QNB와 pirenzepine의 경쟁적 결합곡선을 Munson등²⁶⁾의 two-site model에 적용하여 분석한 결과 대뇌에는 pirenzepine에 친화성이 큰 M₁ 수용체가 약 60%, 친화성이 낮은 M₂ 수용체가 40% 분포되어 있는 것으로 나타났으며 pirenzepine의 M₁과 M₂ 수용체에 대한 Ki치는 각각 약 5 nM과 160 nM이었다(Table IV). 한편 20 μM의 dibenamine으로 처리한 microsome에서 [³H]QNB결합을 억제하기 시작하는 pirenzepine의 농도는 대뇌 microsome에서 보다 약 10배 높았으나 [³H]QNB결합을 100% 억제하는 농도는 약 10 μM로서 대조군과 유사하였다. 즉 dibenamine처리하는 주로 낮은 농도의 pirenzepine에 의

Table IV—Ki values of pirenzepine for the total receptor populations, the M₁-receptors and M₂-receptors to control and dibenamine treated rat cerebral microsome

		nH	Ki(nM)	%
Control	M ₁ +M ₂	0.64±0.02	28.5± 5.80	100
	M ₁		5.3± 0.58	57.8±2.3
	M ₂		159.6±31.4	42.2±2.3
After Diben (20 μM)	M ₁ +M ₂	0.88±0.04	124.3±19.2	100

The M₁ and M₂ represent high and low affinity sites for pirenzepine, respectively. Diben: Dibenamine. Values are the mean±S.E.M. of four experiments.

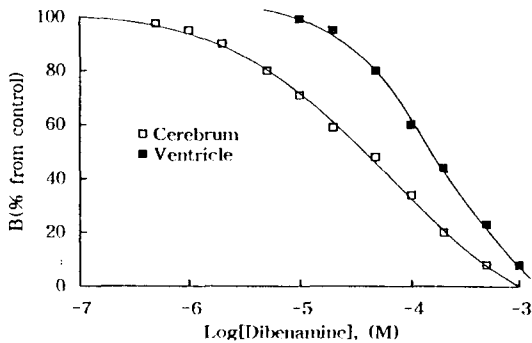


Fig. 5—Inhibition of [³H]QNB binding to cerebral and ventricular microsome by dibenamine. Microsomes pretreated with various concentrations of dibenamine for 15 min at 37°C were incubated with 100 pM [³H]QNB for 150 min at 37°C. Each point represents the mean of three experiments.

한 [³H]QNB결합억제곡선을 오른쪽으로 이동시켰다. 이 결과를 Hill plot했을 때 각 점을 잇는 회귀선의 기울기가 대조군보다 유의하게 큰 0.88로서 1에 가까웠다 (Fig. 4, inset, Table IV). 또한 dibenamine으로 처리한 microsome에서 muscarine수용체에 대한 pirenzepine의 Ki치는 약 120 nM로서 대조 microsome에서 추정된 M₂ 수용체에 대한 pirenzepine의 Ki치와 유사하였다.

심실 microsome의 [³H]QNB결합에 미치는 dibenamine의 영향—전술의 실험결과 본 실험에서 분리한 대뇌 microsome에는 M₁ 및 M₂ 수용체가 공존하고, 20 μM의 dibenamine처리에 의하여 M₁ 수용체가 비가역적으로 억제된 것으로 추정되었으므로 이 점을 확인하고자 주로 M₂ 수용체가 존재하는 심실에서 [³H]QNB결합에 미치는 dibenamine의 영향을 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 심실에서도 di-

benamine은 대뇌에서와 같이 농도의존적으로 [³H]QNB(100 pM)결합을 억제하였고 [³H]QNB결합을 완전히 억제하는 농도가 약 1 mM로서 유사하였으나, [³H]QNB결합을 억제하기 시작하는 농도는 대뇌에서보다 약 20배 높은 20 μM이었다. 따라서 37°C에서 15분간 처리한 본 실험조건에서 [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 dibenamine의 농도는 대뇌에서는 20 μM인데 비하여 심실에서는 이보다 약 6배 높은 120 μM이었다.

고 찰

본 실험결과 dibenamine은 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB결합을 비가역적으로 억제하고 특정농도(20 μM)의 dibenamine처리에 의하여 pirenzepine의 고친화성부위가 거의 소실되었을 뿐 아니라 대뇌의 dibenamine에 대한 감수성이 심실에서보다 훨씬 큼을 알 수 있었다.

Phenoxybenzamine과 dibenamine이 교감신경α₁, histamine H₁, serotonin 및 muscarine 수용체에 비가역적 길항제로 작용한다는 것은 이미 오래 전부터 알려져 있다.¹¹⁻¹⁷ 본 실험에서도 dibenamine이 농도의존적으로 [³H]QNB결합을 억제하였고 이러한 dibenamine에 의한 억제작용은 dibenamine처리후 여러번 세척하여도 회복되지 않는 비가역적인 것이었다. 더욱이 dibenamine으로 처리한 대뇌 microsome에서 [³H]QNB의 포화결합실험성적을 분석했을 때 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB의 친화성에는 전혀 변화없이 결합부위농도만이 감소되었다는 점은 dibenamine에 의하여 muscarine수용체가 비가역적으로 불활성화되었음을 더욱 확실하게 해주는 결과라고 할 수 있다.

Pirenzepine은 muscarine수용체 아형을 분류하는 가장 대표적인 약물로 pirenzepine에 대한 친화력에 따라 친화력이 높은 부위를 M₁ 수용체, 친화력이 낮은 부위를 M₂ 수용체로 정의하고 있다.^{2,3)} 본 실험의 대뇌 microsome에서 pirenzepine의 [³H]QNB결합억제곡선을 분석했을 때 분리한 microsome에는 pirenzepine에 대한 해리항수가 약 5 nM인 M₁ 수용체와 약 100 nM인 M₂ 수용체가 각각 58%와 42% 혼재하고 있는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 흰쥐 대뇌에서 추정된 기존의 결과와도 매우 유사하다.²⁷⁻²⁹⁾

전술한 dibenamine의 muscarine수용체 불활성화 작용이 M₁ 또는 M₂ 수용체에 선택성을 갖는다면 그 선택성은 M₁과 M₂ 수용체가 공존하는 대뇌에서 dibenamine처리후의 muscarine수용체에 대한 pirenzepine과 [³H]QNB와의 경쟁적 결합곡선을 분석함으로써 구명될 수 있다. 즉 dibenamine처리후에는 M₁과 M₂ 수용체중 어느 한 종류의 수용체만이 주로 남게될 것이므로 이 때의 pirenzepine에 의한 [³H]QNB결합억제곡선의 Hill coefficient가 1에 가까워질 것이다. 본 실험조건에서 대뇌 muscarine수용체의 50%를 불활성화하는 dibenamine처리로 pirenzepine에 의한 [³H]QNB결합억제곡선의 Hill coefficient가 1에 가까워졌고 이 때의 muscarine수용체에 대한 pirenzepine의 K_i치가 dibenamine처리전의 M₂ 수용체에 대한 K_i치에 가까운 것으로 보아 dibenamine은 pirenzepine으로 구분되는 M₁과 M₂ 수용체중 M₁ 수용체를 선택적으로 불활성화시키는 것으로 생각된다.

한편, 본 실험에서 dibenamine처리에 의하여 pirenzepine의 Hill coefficient가 0.64에서 0.88로 현저히 증가되었으나 1.0에 미치지 못하였고, dibenamine처리후의 pirenzepine의 K_i치가 처리전의 M₂ 수용체에 대한 pirenzepine의 K_i치보다 작은 경향을 보인 점은 dibenamine처리후에도 일부 M₁ 수용체가 남아있을 가능성을 보여주고 있다. 본 실험에서 분리한 대뇌 microsome의 muscarine수용체중에는 약 58%의 M₁ 수용체가 있으므로 dibenamine에 의하여 [³H]QNB결합부위의 50%가 불활성화될 경우 전체 수용체중 약 8%의 M₁ 수용체와 42%의 M₂ 수용체가 남게 될 것이고 이 상태에서 M₁과 M₂ 수용체는 각각 전체의 16%와 84%를 차지하게 된다. 그러므로 [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 dibenamine처리후에도 대뇌 microsome에는 실제로 pirenzepine에 대하여 친화성이

다른 두 종류의 결합부위가 존재 할 것이나 본 실험에서와 같이 15%정도의 M₁ 수용체는 비표지 pirenzepine과 [³H]QNB의 경쟁적 결합실험으로는 분명하게 나타나지 않고 전체 수용체의 대부분을 차지하는 M₂ 수용체만이 존재하는 것과 유사한 결합성질을 보인 것으로 추측된다.

전술한 dibenamine의 M₁ 수용체 불활성화작용은 M₁ 수용체가 있는 대뇌 microsome과 M₂ 수용체가 주로 존재하는 심실 microsome^{3,4,30,31)}에서의 dibenamine의 영향을 비교함으로써 더욱 분명해질 수 있다. 즉 심실에서 [³H]QNB결합을 억제하기 시작하는 dibenamine의 농도가 대뇌에서보다 약 20배 높고, [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 농도도 대뇌에서보다 약 6배 높았다는 점은 대뇌에서 낮은 농도의 dibenamine으로 비가역적으로 억제되는 muscarine수용체 아형이 M₁ 수용체임을 더욱 뒷받침하는 결과라 하겠다. 한편, 심실에서도 dibenamine은 비록 높은 농도이기는 하나 농도의존적으로 [³H]QNB결합을 억제하고 [³H]QNB결합의 100%를 억제하는 농도가 대뇌에서와 유사한 것으로 보아 M₂ 수용체도 dibenamine에 대한 감수성에 있어서는 M₁ 수용체보다 훨씬 낮지만 dibenamine에 의하여 불활성화되는 것으로 생각된다.

결 론

Dibenamine이 muscarine수용체 아형에 대한 선택성을 가지는 지를 알아보기 위하여 M₁과 M₂ 수용체가 공존하는 대뇌와 M₂ 수용체가 주로 분포하는 심실에서 dibenamine처리후의 [³H]QNB와 pirenzepine의 결합성질을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대뇌와 심실 microsome에서 dibenamine은 농도의존적으로 [³H]QNB결합을 억제하였고 dibenamine처리시간에 따라서도 결합억제정도가 달랐다.
2. 대뇌 microsome에는 [³H]QNB에 대한 일정한 단일결합부위가 있었으며, dibenamine은 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB의 친화력에는 영향을 미치지 않았으나 결합부위농도를 감소시켰다.
3. 대뇌에서 [³H]QNB결합억제에 대한 pirenzepine의 Hill coefficient는 약 0.6으로 1보다 작았으며 pirenzepine에 친화성이 큰 M₁과 친화성

이 낮은 M_2 수용체의 분포비는 58 : 42이었고, M_1 과 M_2 수용체에 대한 pirenzepine의 K_i 치는 각각 약 5 nM 및 160 nM이었다.

4. 대뇌 microsome을 dibenamine 20 μ M로 전처리한 후의 [3 H]QNB결합억제에 대한 pirenzepine의 Hill coefficient는 1에 가까웠다.
5. Dibenamine으로 전처리한 후의 pirenzepine의 K_i 치는 약 120 nM로서 전처리하기 전의 M_2 수용체에 대한 K_i 치에 가까웠다.
6. 심실 microsome에서 [3 H]QNB결합의 50%를 억제하는 dibenamine의 농도는 대뇌에서보다 약 6배 높았다.
7. 이상의 결과, dibenamine은 낮은 농도에서는 M_1 수용체를 선택적으로 불활성화하는 것으로 추정된다.

문 헌

- 1) Lefkowitz, R. J., Hoffman, B. B. and Taylor, P.: Neurohumoral transmission: The autonomic and somatic motor nervous systems In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed.* (A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor, Eds.). MacGraw-Hill International, Singapore, p. 84 (1992).
- 2) 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).
- 3) Watson, M., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R.: A unique regulatory profile and regional distribution of [3 H]pirenzepine binding in rat provide evidence for distinct M_1 and M_2 muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.* **32**, 3001-3011(1983).
- 4) Caulfield, M.: Muscarinic receptors: Characterization, function and coupling. *Pharmacol. Ther.* **58**, 319 (1993).
- 5) Anwar-Ul, S., Gilani, H. and Cobbin, L. B.: The cardioselectivity of himbacine: a muscarinic receptor antagonist. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **332**, 16 (1986).
- 6) Melchiorre, C., Angeli, P., Lambrecht, G., Mutschler, E., Picchio, M. T. and Wess, J.: Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *Eur. J. Pharmacol.* **144**, 117 (1987).
- 7) Giachetti, A., Micheletti, R. and Montagna, E.: Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarinic M_2 receptor antagonist. *Life Sci.* **38**, 1663 (1986).
- 8) Watson, S. and Arkininstall, S.: Acetylcholine receptors. In: *The G-protein linked receptor. Facts Book.* Academic Press, San Diego, p. 8 (1994).
- 9) Norman, A. B. and Creese, I.: Effects of *in vivo* and *in vitro* treatments with N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline on putative muscarinic receptor subtypes in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **30**, 96 (1986).
- 10) Burke, R. E.: Gallamine binding to muscarinic M_1 and M_2 receptors studied by inhibition of [3 H]quinuclidinylbenzilate binding to rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **30**, 58 (1986).
- 11) Swamy, V. C. and Triggle, D. J.: 2-Halogenoethylamines and the role of Ca^{2+} in adrenergic α -receptor activation in the rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **19**, 67 (1972).
- 12) Ogino, K.: The irreversible inhibitory effect of phenoxybenzamine on the noradrenaline-, K-, and Ba-induced contractions of rat's isolated vas deferens, particularly in relation to Ca. *Kobe J. Med. Sci.* **22**, 153 (1976).
- 13) Liao, C. S., Lin, S. H., Su, C. W. and Su, C. Y.: External calcium ions and the inhibitory action of dibenamine and phenoxybenzamine. *J. Formosan Med. Assoc.* **78**, 706 (1979).
- 14) Kenakin, T. P. and Cook, D. A.: The effect of desensitization on the antagonism of the histamine response by phenoxybenzamine. *Mol. Pharmacol.* **17**, 309 (1980).
- 15) Moran, J. F. and Triggle, D. J.: Approaches to the quantitation and isolation of pharmacological receptors, in *Fundamental Concepts in Drug-Receptor Interactions* (Eds. Danielli, J. F., Moran, J. F. and Triggle, D. J.). Academic Press, New York and London, p. 133 (1970).
- 16) Kuhman-Clausen, D.: A novel approach to the

- questions of allosteric properties or a receptor reserve' of drug binding sites of intestinal smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **39**, 61 (1974).
- 17) Morgenstern, R. and Winter, R.: The allosteric influence of β -haloalkylamines on the acetylcholine receptor of smooth muscle. *Acta Biol. Med. Germ.* **34**, K1-K5(1975).
 - 18) El-Fakahany, E. and Richelson, E.: Phenoxybenzamine and dibenamine interactions with calcium channel effectors of the muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* **20**, 519 (1981).
 - 19) Ringdahl, B. and Jenden, D. J.: Affinity, efficacy, and stereoselectivity of oxotremorine analogues for muscarinic receptors in the isolated guinea pig ileum. *Mol. Pharmacol.* **23**, 17 (1983).
 - 20) Madison, J. M.: Muscarinic receptor reserve of airway smooth muscle and the response to isoproterenol. *J. Appl. Physiol.* **68**(3), 1017 (1990).
 - 21) Mayrand, R. D., Fullerton, D. S. and Ahmed, K.: A simple method for the purification of rat brain Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase(ATPase). *J. Pharmacol. Methods.* **7**, 279 (1982).
 - 22) 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).
 - 23) Lee, S. W., Schwartz, A., Adams, R. J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L. K. and Wallick, E. T.: Decrease in Na^+ , K^+ -ATPase activity and [^3H] ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **5**, 682 (1983).
 - 24) Wallick, E. T., Anner, B. M., Ray, M. V. and Schwartz, A.: Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide treated Na^+ , K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8778 (1978).
 - 25) Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant(K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition(IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099 (1973).
 - 26) Munson, P. J. and Rodbard, D.: LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand binding system. *Anal. Biochem.* **107**, 220 (1980).
 - 27) Vanderheyden, P., Ebinger, G. and Vauquelin, G.: Different agonist binding properties of M_1 and M_2 muscarinic receptors in calf brain cortex membranes. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 4119 (1987).
 - 28) Luthin, G. R. and Wolfe, B. B.: Comparison of [^3H]pirenzepine and [^3H]quinuclidinylbenzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **228**, 648 (1984).
 - 29) 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).
 - 30) Doods, H. N., Mathy, M-J., Davidesko, D., VAN Charldorp, K. J., DE Jonge, A. and VAN Zwieten, P. A.: Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and *in vivo* experiments for the putative M_1 , M_2 and M_3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 257 (1987).
 - 31) Delmendo, R. E., Michel, A. D. and Whiting, R. L.: Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 457 (1989).