

Mequitazine의 Muscarine수용체에 대한 작용

이신웅* · 장태수
영남대학교 약학대학

Effect of Mequitazine on the Muscarinic Receptors

Shin-Woong LEE* and Tae-Soo JANG

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

(Received June 16, 1995; accepted August 29, 1995)

Abstract—The affinity of mequitazine, a non-sedating antihistamine, for muscarinic receptors was evaluated in the guinea-pig ventricle and ileum by *in vitro* binding techniques and functional studies. In binding studies, [³H]quinuclidinyl benzilate (QNB) identified a single class of muscarinic receptors with similar apparent K_D value of about 100 pM in two tissues. Mequitazine inhibited [³H]QNB binding to muscarinic receptors competitively. Analysis of the mequitazine inhibition curve of [³H]QNB binding to ventricular microsome and ileal homogenate indicated the presence of a single homogeneous binding site with K_i value of 25 nM and 18 nM, respectively. In functional studies, mequitazine caused parallel rightward shifts of concentration-response curves for carbachol and histamine in the isolated guinea-pig ileum. The slope values obtained from Schild plot analysis for the antagonistic action of mequitazine on muscarinic and histamine H_1 -receptors were not significantly different from unity. The pA_2 values of mequitazine for muscarinic and histamine H_1 -receptors were about 7.6 ($K_M=25.1$ nM) and 8.88 ($K_H=1.32$ nM), respectively. These results indicate that the muscarinic receptor blocking action of mequitazine is 15 times less potent than the H_1 receptor blocking action, but high concentration of this drug may cause the peripheral muscarinic receptor blocking effect.

Keywords □ mequitazine, muscarinic receptor, H_1 -receptor, [³H]QNB binding

Histamine은 생체내에서 대부분 heparin 및 단백질과 결합한 복합체를 형성하여 비만 세포(mast cell)나 호염기성 백혈구(basophil)내에 저장되어 있다가 항원-항체 반응이나 여러가지 물질 또는 물리적 자극에 의하여 유리되며, 유리된 histamine은 세포막에 있는 histamine 특이 수용체에 결합한다. Histamine수용체는 H_1 , H_2 및 H_3 수용체로 구분되고 특정조직의 histamine에 대한 반응은 세포자체의 기능과 이들 수용체의 분포비에 따라 다르다(Arrang 등, 1987; Hill, 1990; Watson과 Arkin-stall, 1994). 특히 H_1 수용체의 흥분은 inositol phospholipid의 가수분해 촉진과 세포내 cyclic GMP농도를 증가 시킴으로써 기관지, 위장관 등 평활근의 수축 및 모세혈관 확장과 투과성 증가와 같은 allergy반응에 관여하는 반면, H_2 수용체의 흥분은 cyclic AMP농도 증가와 cyclic GMP농도 감소를 유도함으로써 강력하게 위액분비를 항진시킨다(Friedel과 Schanberg, 1975; Johnson, 1984;

Schwartz 등, 1991). 따라서 cimetidine 등 H_2 수용체 차단제는 소화성궤양에 위액분비억제의 목적으로 널리 이용되고 있으며, H_1 수용체 차단제는 H_1 수용체에 대하여 histamine과 경쟁적으로 결합하므로 담마진(urticaria), allergy성 비염, 피부염과 같은 allergy증상의 발현을 억제할 목적으로 흔히 사용되고 있다(Adelman과 Terr, 1994; Black 등, 1972; Garrison, 1992).

한편, H_1 수용체 차단제는 H_1 수용체 차단작용 이외에도 국소마취작용, 진정작용, 부교감 신경차단작용 등의 다양한 작용이 있고, 특히 진정작용이나 부교감신경차단 작용은 이들 약물사용시 흔히 나타나는 진정, 졸음, 오심, 구토, 구갈, 기도분비억제, 축뇨 등 여러가지 부작용의 원인이 된다(Ambre 등, 1991; Carruthers 등, 1978; Lee 등, 1993). 근래 항 histamine제의 부작용 중 가장 흔히 나타나는 진정작용을 감소시키기 위한 많은 연구의 결과, astemizole(Laduron 등, 1981; Richards, 1984), loratadine(Dockhorn, 1987; Hilbert, 1987), mequitazine(Martinez-Mir 등, 1988; Nicholson과 Stone, 1983), terfena-

* To whom correspondence should be addressed.

dine(Carr와 Meyer, 1982; Sorkin과 Heel, 1985)등 진정작용이 거의 없는 새로운 비수기성 항histamine제 (non-sedating antihistamine)들이 개발 소개되기에 이르렀으며 이들 약물이 진정작용을 나타내지 않는 것은 상용량에서는 혈액-뇌 관문(blood-brain barrier)을 거의 통과하지 않기 때문인 것으로 알려지고 있다(Brandon, 1985; Cacy, 1991; Herman과 Bernhard, 1991; Soter, 1991). 그러나 이들 약물도 말초에서는 전술한 바의 기존 항histamine제와 같이 muscarine수용체 차단에 의한 구갈, 기도분비억제, 축노와 같은 부작용을 일으킬 수도 있다. 따라서 이들 약물과 muscarine수용체와의 상호작용에 관한 지견을 얻고자 하는 실험의 일환으로 phenothiazine계의 비수기성 항histamine제로 알려지고 있는 mequitazine의 muscarine수용체에 대한 작용을 [^3H]QNB 결합실험과 기능적 실험을 통하여 조사하고, 그 결과를 H_1 수용체 차단작용과 비교 검토하고자 하였다.

실험방법

실험재료 및 시약

실험동물은 체중 350~450 g의 기니피크(guinea-pig, Hartley)을 암수 구별없이 국립 보건원 (Seoul, Korea)으로부터 구입, 사용하였다.

(-)[^3H]Quinuclidinyl benzilate([^3H]QNB, 50 Ci/mmol)는 Amersham International로부터, atropine sulfate, 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene(POPOP), bovine serum albumin(BSA), 2,5-diphenyloxazole(POP), tris(hydroxymethyl)aminomethane(Trizma base), L-histamine hydrochloride, carbamylcholine chloride(carbachol)는 Sigma사로부터, Triton X-100은 Fluka사로부터 구입 사용하였고, mequitazine은 국립 안전연구원으로부터 실험용으로 제공 받았으며, 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

심실 microsome의 분리

심실 microsome의 분리는 Van Alstyne 등(1980)의 방법을 수정한 Lee 등(1983)의 방법에 의하였다. 즉, 외관상 건강한 기니피크의 심장을 도살 즉시 적출, 심방 및 기타 주위조직을 제거하고 무게를 단 후 가위로 세절하였으며, 세절한 심실근을 무게의 5배가 되는 빙냉의 5 mM NaN_3 , 10 mM NaHCO_3 , pH 7.0(medium A)에 넣고 blender로 균질화한 다음 8,700×g에서 20분간 원심분리하였다. Pellet에 5배 용량의 medium A를 다시 가하고 glass homogenizer 중에서 teflon pestle을 1번 통과(80% max, 140 W), 원심분리(8,700×g)한 후 pellet에 6배 용량의 10 mM Tris·Cl, pH 7.4(medium B)를 가하고 teflon pestle을 4번 통과시킨 후 원심분리(8,700×g, 20 min) 하였다. 이 과정을 3회 반복하고 매회 상정액을 모아 35,000×g에서 20분동안 원심분리한 후 microsome을 얻었으며, microsome의 단백질 농도가 약 2

mg/ml 되도록 소량의 medium B를 가하여 hand-driven glass homogenizer로 5회 통과시킨 다음, -70°C 에 저장하였다가 결합실험에 사용하였다.

회장 homogenate의 제조

기니피크 후두부를 강타하여 치사케한 후 복부를 절개, 회장을 적출하고 빙냉의 10 mM Tris·Cl, pH 7.4(medium B)용액중에 넣은 다음 장내용물을 medium B로 충분히 세척, 주위조직을 제거하였다. 장무게를 측정하고 무게의 10배가 되는 medium B를 가하여 가위로 세절, blender로 15초 동안 4번 균질화한 다음 3,600×g에서 10분 동안 2회 원심분리하였다. 상정액을 다시 45,000×g에서 20분간 원심분리한 다음 분리된 pellet에 단백질 농도가 약 10 mg/ml가 되도록 소량의 medium B를 가하여 균질화하였다.

단백질농도 측정

분리한 분획의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의하여 측정하였다.

[^3H]QNB 결합실험

[^3H]QNB 결합실험은 여과법(Wallick과 Schwartz, 1974)에 의하였고, [^3H]QNB의 비특이결합은 10 μM atropine 존재하에서 측정하였다.

Mequitazine에 의한 [^3H]QNB 결합억제

50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl_2 및 단백질을 함유하는 용액중에 일정농도의 [^3H]QNB와 여러 농도의 mequitazine을 가하여 총 용적이 5 ml가 되게 하고, 37°C 에서 평형결합에 도달하는 충분한 시간인 150분간 반응시킨 후, GF/B glass fiber filter상에서 흡입여과하고 50 mM Tris·Cl(pH 7.4) 및 10 mM MgCl_2 를 함유하는 빙냉의 세척액 5 ml로 filter를 3회 세척하였다. 세척한 filter를 scintillation vial에 넣고 광원하에서 2시간 건조한 다음 여기에 8 ml의 scintillation액 (PPO : 6 g, POPOP : 0.225 g, Triton X-100 : 500 g, Toluene : 1 l)을 가하여 12시간 이상 방치한 후 liquid scintillation counter로 그 방사능을 측정하였다.

비표지약물의 dissociation constant(K_i)는 Cheng과 Prusoff(1973)의 방법에 따라 [^3H]QNB결합의 50%를 억제하는 비표지약물의 농도(IC_{50}), 사용한 [^3H]QNB의 농도(F) 및 [^3H]QNB의 dissociation constant(K_D)로부터 유도된 $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + F/K_D)$ 식에 의하여 산출하였다. [^3H]QNB 결합억제에 대한 비표지약물의 Hill coefficient는 여러농도의 비표지약물 존재하에서 구해진 [^3H]QNB결합억제정도를 $\log(I/100-I) = n \log[D] - n \log[\text{IC}_{50}]$ (I : 비표지약물일정농도[D]에서의 [^3H]QNB결합억제%, n : Hill coefficient)식에 적용시켜 Hill plot하여 그 기울기로부터 구하였다.

[^3H]QNB 포화결합실험

50 mM Tris·Cl(pH 7.4)와 10 mM MgCl_2 를 함유하는 용액중에 단백질 및 여러농도의 [^3H]QNB를 가하여 총

용적이 5 ml가 되게 하고 37°C에서 150분동안 반응시킨 후 흡입여과, 세척 및 방사능을 측정하여 [³H]QNB 각 농도에서의 [³H]QNB 결합을 산출하였다. [³H]QNB 결합의 affinity(K_D)와 결합부위농도(B_{max})는 [³H]QNB 각 농도에서의 [³H]QNB 결합(B)을 $B = -K_D \cdot B/F + B_{max}$ (F : [³H]QNB의 free concentration)에 적용시켜 Scatchard plot(Scatchard, 1949)하여 구하였고, [³H]QNB의 Hill coefficient(nH)는 [³H]QNB 포화결합실험 성적을 $\log(Y/1-Y) = n \log[F] - \log K_D$ ($Y = B/B_{max}$, n = Hill coefficient)에 적용시킨 다음 각 점을 잇는 회귀선의 기울기로부터 구하였다.

적출 회장에 대한 실험

Guinea-pig 후두부를 강타하여 치사케 한 후 복부를 절개, 회장을 적출하고 조직의 손상을 피하면서 장내용물을 Tyrode 영양액(137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.84 mM CaCl₂, 1.05 mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.42 mM NaH₂PO₄, 5 mM glucose, pH 7.8)으로 충분히 세척한 다음 약 2 cm의 절편을 만들고 이를 15 ml의 Tyrode액이 든 bath내에 현수, Grass FT 03 force transducer에 연결하여 1 g tension하에서 그 운동을 polygraph상에 기록하였다. Bath내의 영양액의 온도는 37°C로 유지하고 계속 95% O₂와 5% CO₂의 혼합gas를 공급하였다. Bath내에 회장절편을 현수하고 1시간 이상 기다려 회장운동이 일정함을 관찰한 다음 약 20분 간격으로 carbachol(1×10^{-7} M) 혹은 histamine(1×10^{-6} M)을 가하여 동일반응(10% 이하의 variation)을 일으키는지 관찰한 후 약물의 효과를 측정하였다. 대조실험으로 carbachol 혹은 histamine 농도증가에 따른 반응증가를 두 번 반복 하여 그 용량반응관계가 유사할 때 일정농도의 mequitazine을 가하고 20분 이상 기다린 후 carbachol 혹은 histamine을 cumulative dose로 가하여 그 반응을 관찰하였다.

Mequitazine의 muscarine수용체와 H₁수용체에 대한 pA₂치 추정

Mequitazine의 muscarine수용체에 대한 pA₂($-\log K_M$)와 histamine수용체에 대한 pA₂($-\log K_H$)의 산출은 Arunlakshana와 Schild(1959)의 방법에 의하였다. 즉 carbachol 혹은 histamine에 의한 최대반응의 50%를 나타내는 이들 효능제의 ED₅₀치와 특정농도의 mequitazine 존재하에서의 carbachol 또는 histamine의 ED'₅₀치를 구한 후 이를 $\log(DR-1) = n \log(D) - \log K_H$ ($DR : ED'_{50}/ED_{50}$, D : mequitazine의 농도, $-\log K_H = pA_2$)의 식에 따라 Schild plot하여 각 점을 잇는 회귀선의 X절편으로부터 구하였다.

실험결과분석

모든 성적은 평균치 ± 평균오차로 나타내었으며, 실험 결과의 유의성 검정은 Student's t-test에 의하였고, 유의수준은 p < 0.05로 하였다.

실험결과 및 고찰

Table I. [³H]QNB equilibrium binding to guinea-pig ventricular microsome and ileal homogenate

	Ventricle		Ileum	
	[³ H]QNB binding % (fmol/mg)	%	[³ H]QNB binding % (fmol/mg)	%
Total	1028.1 ± 38.1	100	227.9 ± 9.3	100
Nonspecific	107.7 ± 5.2	10.5	25.5 ± 0.9	11.2
Specific	920.3 ± 43.2	89.5	202.4 ± 8.6	88.8

Ventricular microsome (100 μg) and ileal homogenate (500 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 non-specific 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.

심실 및 회장에서 [³H]QNB의 평형결합

분리한 심실 microsome과 회장 homogenate에서 [³H]QNB 결합실험이 가능한지를 알아보기 위하여 100 pM [³H]QNB 존재하에서 [³H]QNB 평형결합실험을 시행하였다. 예비실험 결과 이 조건에서 약 90분에 평형에 도달하였으므로 본 실험에서는 평형에 도달하는 충분한 시간인 150분을 반응시간으로 하였다. Table I에서 보는 바와 같이 심실 microsome에서는 전체결합의 약 90%가 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB의 특이결합이었고 10 μM atropine 존재하에서 측정된 비특이결합은 전체결합의 약 10%이었으며, 회장 homogenate에서는 전체결합의 약 89%가 특이결합, 약 11%가 비특이결합이었다. 따라서 본 실험에서 분리한 분획을 이용하여 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB 결합실험을 원만히 수행할 수 있을 것으로 생각되었다.

Mequitazine이 [³H]QNB 평형결합에 미치는 영향

비수기성 항histamine제로 알려지고 있는 mequitazine이 심실 및 회장 muscarine수용체에 대한 [³H]QNB결합을 억제하는지를 조사하기 위하여 여러 농도의 mequitazine 존재하에서 [³H]QNB(100 pM) 평형결합실험을 시행한 결과 mequitazine은 두 장기에서 다같이 2 nM이상에서부터 농도의존적으로 [³H]QNB결합을 억제하였고 1 μM에서는 95%이상 억제하였으며(Fig. 1), [³H]QNB결합의 50%를 억제하는 농도가 심실에서는 약 50 nM, 회장에서는 약 40 nM로서 두 장기에서 유사하였다. 이러한 mequitazine에 의한 [³H]QNB 결합억제 결과를 Hofstee plot(Fig. 1. Inset)했을 때 각 점의 직선성이 인정되고, Hill plot했을 때 Hill coefficient 역시 1에 가까운 것으로 보아 mequitazine은 일정한 단일결합부위에 결합하여 [³H]QNB결합을 억제하는 것으로 생각된다.

[³H]QNB결합의 affinity와 결합부위농도

Mequitazine에 의한 [^3H]QNB 결합억제가 muscarine수용체에 대한 [^3H]QNB와 mequitazine의 경쟁적 결합에 의한 것인지, 또 경쟁적이라면 muscarine수용체에 대한 mequitazine의 affinity가 어느 정도인지를 추정하기 위해서는 먼저 본 실험조건에서의 muscarine수용체에 대한 QNB의 결합성질을 알아야 한다. 따라서 본 실험에서는 [^3H]QNB 포화결합실험을 시행하고 이 성적을 Scatchard plot하여 [^3H]QNB결합의 affinity와 결합부위농도를 구하였다.

심장 microsome과 회장 homogenate의 [^3H]QNB결합은 [^3H]QNB농도 증가에 따라 증가되다가 약 400 pM의 [^3H]QNB 존재하에서 포화되는 포화성 결합이었으며, [^3H]QNB 각 농도에서의 [^3H]QNB결합을 Scatchard plot했을 때 각 점을 잇는 회귀선의 직선성이 인정되었을 뿐 아니라 회귀선의 기울기가 두 장기에서 유사하였다(Fig. 2). 즉 두 장기에는 [^3H]QNB에 대해서는 affinity가 같은 단일 muscarine수용체가 존재함을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과에서 단백질 mg당 결합부위농도는 심실 microsome이 회장 homogenate보다 약 5배

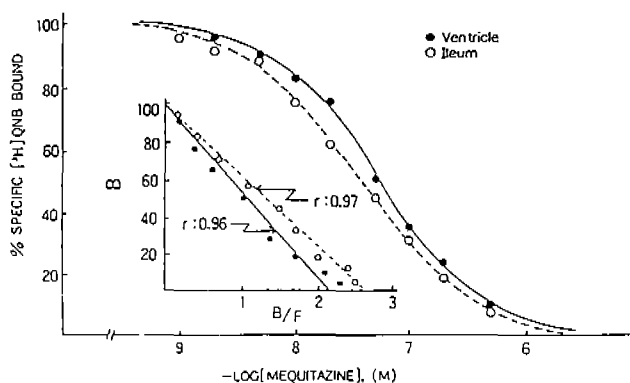


Fig. 1. Inhibition of [^3H]QNB binding by mequitazine in guinea-pig ventricular microsome and ileal homogenate. Microsome(●) and homogenate(○) were incubated with 100 pM of [^3H]QNB and various concentrations of mequitazine for 150 min at 37°C. Other legends were as described in Table I. Each point represents the mean % specific [^3H]QNB binding from four independent experiments performed in duplicate. Inset: Hofstee plot of the inhibition data. B represents the percentage inhibition of [^3H]QNB binding and F the free mequitazine concentration. γ is the regression coefficient of the Hofstee plots.

많은 것으로 나타났으나 두 분획의 정제 정도가 다르기 때문에 본 실험성적만으로는 직접비교가 불가능하다. 다만 이 결과는 mequitazine이 결합부위농도에 영향을 미치는지를 알아보기 위한 대조치로서 필요하다.

한편, [^3H]QNB(100 pM)결합의 50%를 억제하는 mequitazine(심실; 50 nM, 회장; 40 nM) 존재하에서 시행한 [^3H]QNB 포화결합실험 성적을 Scatchard plot했을 때 각 점을 잇는 회귀선의 기울기가 대조군에 비해 증가되고

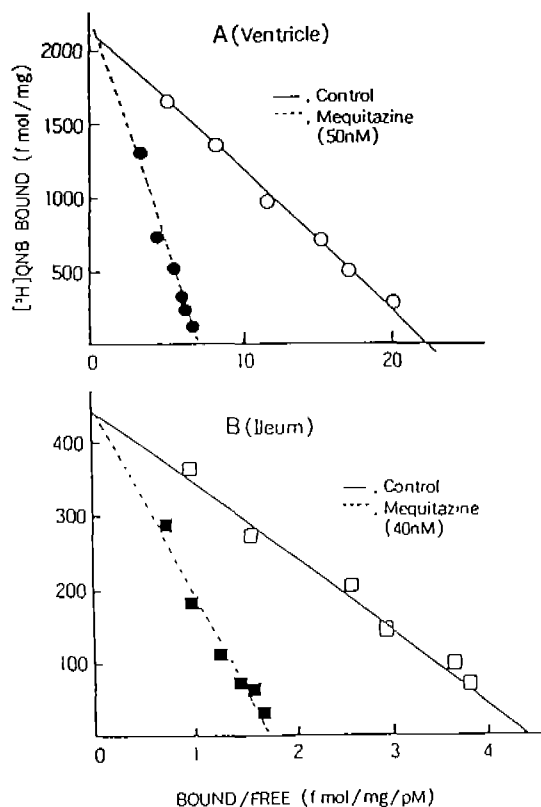


Fig. 2. Scatchard plot of specific [^3H]QNB saturation binding data in ventricular microsome and ileal homogenate. Tissue preparations were incubated with increasing concentrations of [^3H]QNB for 150 min at 37°C and the assay was terminated as described under "Methods". Data shown are the Scatchard transformation of the results from four different preparations performed in duplicate. Bound [^3H]QNB at a given [^3H]QNB concentration was plotted as a function of bound [^3H]QNB / free [^3H]QNB.

Table II. Effect of mequitazine on [^3H]QNB binding in ventricular microsome and ileal homogenate

	Ventricule			Ileum		
	K_D (pM)	B_{max} (fmol/mg)	nH	K_D (pM)	B_{max} (fmol/mg)	nH
Control	91.3 ± 9.98	2044.7 ± 100.8	1.03 ± 0.02	99.4 ± 16.3	438.0 ± 25.6	1.05 ± 0.02
Mequitazine	313.2 ± 27.2*	2235.7 ± 251.1	1.03 ± 0.01	253.9 ± 21.7*	444.3 ± 21.1	1.04 ± 0.02

K_D and B_{max} were calculated from Scatchard analysis. Hill coefficient (nH) was taken as the slope of the repression line of the Hill plots. Values represent the mean ± S.E.M. of four separate preparations. *: Statistically significant from corresponding value of control ($p < 0.01$).

(Fig. 2), Hill plot했을 때는 각 점을 잇는 회귀선이 두 장기간에서 다같이 오른쪽으로 평행이동함을 보여주고 있다(Fig. 3). Table II는 이들 결과를 정리한 것으로 심실과 회장 muscarine수용체는 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 에 대한 affinity가 각각 약 90 nM 및 100 nM로서 유사하였고, mequitazine (40~50 nM) 존재하에서는 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 affinity가 두 배 이상 감소되었으나 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 결합부위농도나 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 cooperativity는 전혀 변화가 없었다.

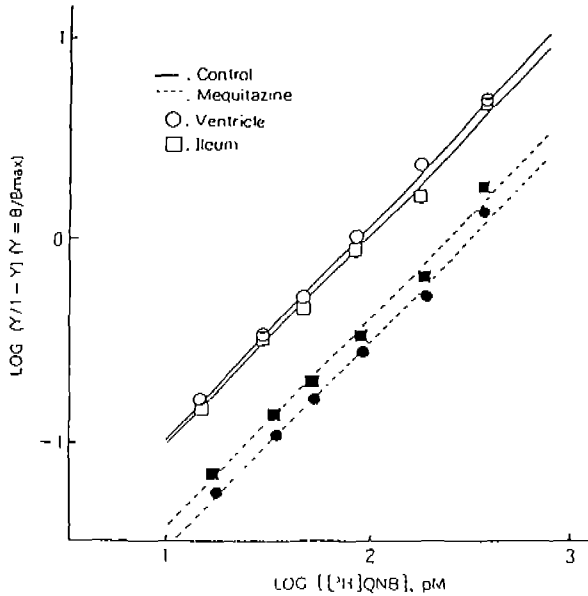


Fig. 3. Hill plot of the data shown in Fig. 2. Binding assay was carried out in the presence or absence of mequitazine(50 nM for ventricle, 40 nM for ileum). Data were plotted according to Equation described under "Methods".

Muscarine수용체에 대한 mequitazine의 affinity

전술의 실험을 통하여 mequitazine이 muscarine수용체에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 경쟁적 억제제로 작용함을 알았으므로 muscarine수용체에 대한 mequitazine의 K_i 치를 두 장기간에서의 IC_{50} 치로부터 산출하였던 바 심실에서는 약 25 nM, 회장에서는 약 18 nM로서 muscarine수용체에 대한 affinity가 상당히 큰 것으로 나타났으나 두 장기간에는 유의한 차이가 없었다(Table III).

Carbachol의 회장 수축반응에 미치는 mequitazine의 영향

본 실험에서는 수용체결합 실험과 기능적 실험과의 상관성을 검토하기 위하여 적혈구 회장에서 muscarine수용체 효능제인 carbachol의 반응과 이에 미치는 mequitazine의 영향을 조사하였다. Fig. 4-A에서 보는 바와 같이 carbachol의 회장수축력 증가작용은 농도의 존적이었으며 이 용량-반응곡선으로부터 구한 carbachol의 ED_{50} 치는 약 400 nM이었다. Mequitazine(3×10^{-8} M)은 carbachol의 용량-반응곡선을 오른쪽으로 평행이동시켰으며, mequitazine의 농도증가에 따라 그 이동

Table III. Binding parameters of mequitazine for muscarinic receptors

	K_i (nM)	nH
Ventricle	25.68 ± 4.56	0.98 ± 0.08
Ileum	18.20 ± 2.24	0.91 ± 0.05

K_i value was calculated using Equation of $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + F/K_D)$ as described under "Methods". Hill coefficient (nH) for inhibition of specific $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding was taken as the slope of the regression line of the Hill plots of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ /mequitazine competition binding shown in Fig. 1. Values are the mean \pm S.E.M. of four separate experiments.

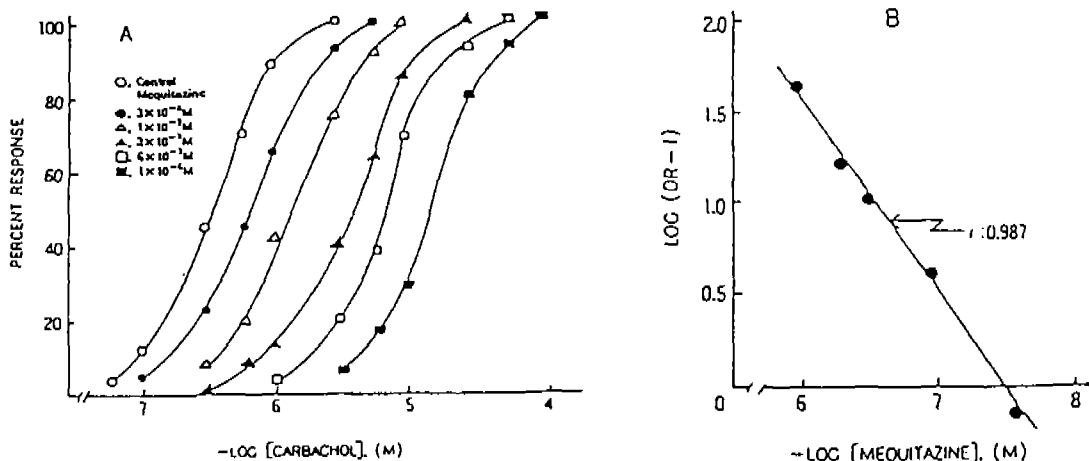


Fig. 4. Effect of mequitazine on carbachol-induced contractile response of isolated guinea-pig ileum(A) and Schild plot for the antagonistic effect of mequitazine(B).

Responses are expressed as a percentage of the maximum contraction elicited by carbachol. Each point is the mean response of five experiments. DR : ratio of ED_{50} for carbachol in the absence of mequitazine to that in the presence of mequitazine. The slope of the regression line is close to unity.

정도가 더욱 커졌을 뿐 아니라 10^{-6} M mequitazine 존재하에서도 carbachol에 의한 최대반응에는 변화가 없었다. 이러한 mequitazine의 길항작용을 Schild plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되고($r: 0.987$), 회귀선의 기울기가 1에 가까웠다는 점(Fig. 4-B)은 mequitazine이 muscarine수용체에 대하여 약리학적 길항제로 작용함을 시사하고 있다. 따라서 muscarine수용체에 대한 mequitazine의 pA_2 치를 추정하였던 바 약 $7.6(K_M: 25.1 \text{ nM})$ 이었다(Table IV).

Mequitazine이 acetylcholine의 최장수축력 증가작용을 억제하며 mequitazine 10^{-7} M 존재하에서 acetylcholine의 ED_{50} 치가 약 4.5배 증가되었다는 보고(Martinez-Mir 등, 1988)가 있고, 이 보고에서는 비록 mequitazine의 muscarine수용체에 대한 affinity를 추정하지 않았지만 이 결과를 $K_i = [I]/(ED^{50}/ED_{50} - 1)$ ($[I]$: mequitazine농도)에 적용하면 약 28.8 nM 로서 본 실험결과와 매우 유사하다. 본 실험에서 기능적으로 측정된 muscarine수용체에 대한 mequitazine의 K_M 치가 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합실험으로 추정된 mequitazine의 K_i 치($\sim 20 \text{ nM}$)와 유사한 점으로 보아 mequitazine이 생리적 기능과 관련되는 mus-

carine수용체에 결합하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합을 억제하는 것으로 생각되며, 이는 곧 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합실험을 통하여 추정되는 mequitazine의 muscarine수용체에 대한 결합성질을 약리학적으로 분류되는 muscarine수용체에 대한 결합성질로 직접 활용할 수 있음을 말해주고 있다.

Histamine의 최장수축반응에 미치는 mequitazine의 영향

Mequitazine의 muscarine수용체 차단작용을 histamine H_1 수용체 차단작용과 비교하기 위하여 H_1 수용체에 대한 mequitazine의 affinity를 측정하였다. Mequitazine은 histamine의 용량-반응곡선을 오른쪽으로 평행이동시켰으며(Fig. 5-A), histamine반응에 대한 mequitazine의 길항작용을 Schild plot하고(Fig. 5-B) 이를 분석했을 때 각 점의 직선성이 인정되고 회귀선의 기울기가 약 1.2로서 1에 가까웠다. 즉, mequitazine은 histamine의 경쟁적 길항제로 작용하였으며 H_1 수용체에 대한 mequitazine의 pA_2 치는 약 $8.88(K_H: 1.32 \text{ nM})$ 이었다.

Table IV에서 보는 바와 같이 mequitazine의 H_1 수용체에 대한 affinity는 muscarine수용체에 대한 affinity보다 약 15배 크다. 따라서 H_1 수용체의 50%를 점령하는 mequitazine의 농도에서는 전체 muscarine수용체 중 약 6%만이 점령될 것으로 추산되므로 이 농도로서는 muscarine수용체 차단효과가 거의 나타나지 않을 것으로 예상된다. 그러나, 임상에서 알레르기를 예방하기 위하여 항histamine제를 사용할 때는 H_1 수용체를 충분히 차단할 수 있는 농도를 유지시켜야 하고 이러한 농도에서는 muscarine수용체 차단에 의한 부작용이 나타날 가능성이 있다. 특히 시험관내에서 항histamine작용을 검토하기 위하여 mequitazine을 사용할 때는 이 약물의 muscarine수용체 차단작용을 충분히 고려하여야 할 것으로 생각된다.

Table IV. Inhibition constant and Schild's slope of mequitazine for muscarinic and H_1 -receptors in isolated guinea-pig ileum

Receptor	n	pA_2	Schild's slope
Muscarinic	5	7.60 ± 0.15	1.11 ± 0.09
Histamine H_1	4	8.88 ± 0.21	1.21 ± 0.15

pA_2 value and Schild's slope were taken as the intercept on the abscissa and the slope of the regression line shown in Fig. 4 and 5, respectively. Values are the mean \pm S.E.M. n: number of experiments.

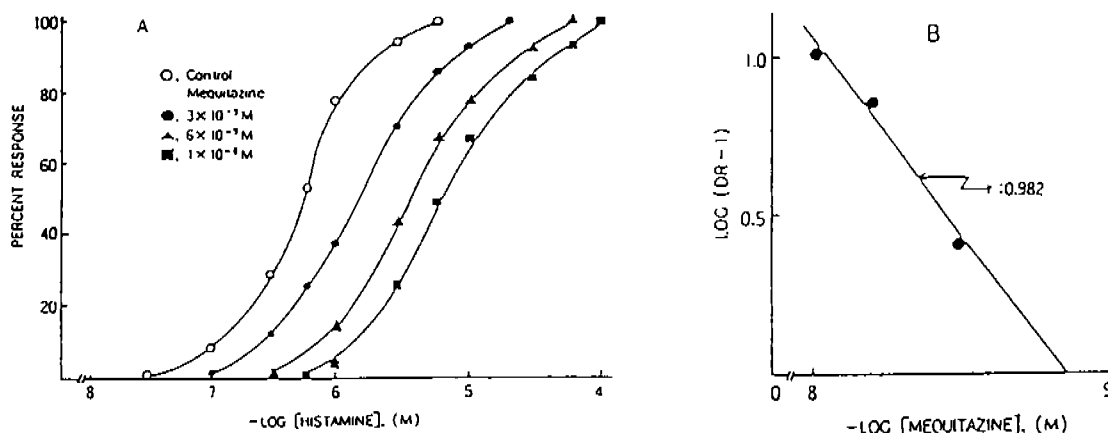


Fig. 5. Effect of mequitazine on histamine-induced contractile response of isolated guinea-pig ileum(A) and Schild plot for the antagonistic effect of mequitazine(B).

Each point is the mean response of four experiments. DR: ratio of ED_{50} for histamine in the absence of mequitazine to that in the presence of mequitazine.

감사의 말씀

본 연구는 영남대학교 부설 약품개발연구소 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Adelman, D. C. and Terr, A. (1994). Allergic and immunologic disorders. In *Current medical diagnosis and treatment*(L. M. Tierney, S. J. McPhee and M. A. Apadakis, Eds.). pp. 640-663. Appleton & Lange, Norwalk Connecticut.
- Ambre, J. J., Bennett, D. R., Cranston, J. W., Dickinson, B. D., Mark Evans, R., Glade, M. J., Kosman, M. E., Lampe, K. F., McCann, M. A., Pang, D. C., Proudfit, C. M., Ropoza, N. P., Ratko, T. A., Seidenfeld, J., Smith, S. J. and Weaver, R. H. (1991). Histamine and antihistamines. In *Drug Evaluations Annual*, American Medical Association, pp.1604.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., Lancelot, J. C., Lecomte, J. M., Pollard, H., Robba, M., Schunack, W. and Schwartz, J. C. (1987). Highly potent and selective ligands for histamine H₃-receptors. *Nature* **327**, 117-123.
- Arunlakshana, D. and Schild, H. O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **14**, 48-58.
- Black, J. W., Duncan, W. A. M., Durant, C. J., Ganellin, C. R. and Parsons, E. M. (1972). Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* (Lond.) **236**, 385-390.
- Brandon, M. L. (1985). Newer non-sedating antihistamines, will they replace older agents? *Drugs* **30**, 377-381.
- Cacy, A. F. (1991). Antagonists of H₁ receptors of histamine: Recent developments. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 97, Histamine and Histamine Antagonists*(B. Uvnas, Ed.). pp. 549-567. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Carr, A. A. and Meyer, D. R. (1982). Synthesis of terfenadine. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* **32**, 1157-1159.
- Carruthers, S. G., Shoeman, D. W., Hignite, C. E. and Azaroff, D. L. (1978). Correlation between plasma diphenhydramine level and sedative and antihistamine effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **23**, 375-382.
- Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant(K_i) and the concentration of inhibitor which cause 50 percent inhibition(IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- Dockhorn, R. J. (1987). Safety and efficacy of loratadine(SCH-29851) : New non-sedating antihistamine in seasonal allergic rhinitis. *Ann. Allergy* **58**, 407-411.
- Friedel, R. O. and Schanberg, S. M. (1975). Effect of histamine on phospholipid metabolism of rat brain *in vivo*. *J. Neurochem.* **24**, 819-820.
- Garrison, J. C. (1992). Histamine, bradykinin, 5-hydroxytryptamine, and their antagonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A.G. Gilman, T.V. Rall, A.S. Nies and P. Taylor, Eds.). pp. 575-588. McGraw-Hill International, Singapore.
- Herman, M. D. and Bernhard, J. D. (1991). Antihistamine update. *Dermatol. Clin.* **9**, 603-610.
- Hilbert, J. (1987). Pharmacokinetics and dose proportionality of loratadine. *J. Clin. Pharmacol.* **27**, 694-698.
- Hill, S. J. (1990). Distribution properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.* **42**, 45-83.
- Johnson, C. L. (1984). Histamine receptors and cyclic nucleotides. In *Pharmacology of histamine receptors*(C.R. Ganellin and M.E. Parsons, Eds.). pp. 146-216. Wright, Bristol.
- Laduron, P. M., Janssen, P. F. M., Gommeren, W. and Leysen, J. E. (1981). *In vitro* and *in vivo* Binding characteristics of a new long-acting histamine H₁ antagonist, astemizole. *Mol. Pharmacol.* **21**, 294-300.
- Lee, S. W., Park, Y. J. and Lee, J. S. (1993). Relative potency of antihistaminics for H₁ and muscarinic receptors. *Yakhak Hoeji* **37**, 397-407.
- Lee, S. W., Schwartz, A., Adams, R. J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L. K. and Wallick, E. T. (1983). Decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity and [³H]ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **5**, 682-688.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Martinez-Mir, I., Estan, L., Rubio, E. and Morales-Olivas, F. J. (1988). Antihistaminic and anticholinergic activities of mequitazine in comparison with clemizole. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 655-656.
- Nicholson, A. N. and Stone, B. M. (1983). H₁-antagonist mequitazine : Studies on performance and visual function. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 563-566.
- Richards, D. M. (1984). Astemizole : Review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **28**, 38-61.
- Scatchard, G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Bouthenet, M. L., Garbarg, M., Pollard, H. and Ruat, M. (1991). Histamine receptor in brain. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 97, Histamine and Histamine Antagonists*(B. Uvnas, Ed.). pp. 191-227. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Sorkin, M. and Heel, R. C. (1985). Terfenadine : Review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **29**, 34-56.
- Soter, N. A. (1991). Treatment of urticaria and angioedema : Low-sedating H₁-type antihistamine. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 1084-1087.
- Van Alstyne, E., Burch, R. M., Knickelbein, R. G., Hungerford, R. T., Gower, E. T., Webb, J. G., Poe, S. L. and Lindenmayer, G. E. (1980). Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle. *Biochem. Biophys. Acta* **602**, 131-143.
- Wallick, E. T. and Schwartz, A. (1974). Thermodynamics of the rate of binding of ouabain to the sodium-potassium adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **249**, 5141-5147.
- Watson, S. and Arkininstall, S. (1994). Histamine. In *The G-protein linked receptor. Facts Book*. pp. 152-158. Academic Press, San Diego.