三種 黃連類의 氣管支 平滑筋 弛緩效果에 關한 硏究

서 영철* · 임 성우* · 신 길조* · 이 원철*

The Effect of Three kinds of Coptis Rhizoma on the Contraction of Isolated Rat Tracheal Smooth Muscle

Young-Chel Suh, Seong-Woo Lim, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong Guk University

This study was carried out to investigate the tracheal muscle relaxation of water extracts of three kinds of Coptis rhizoma and also compare their effects with berberine and palmatine, which are the important alkaloid components of Coptis rhizoma, in isolated rat tracheal smooth muscle.

As a result, *Coptis chinensis* showed significant tracheal muscle relaxation on KCl-induced contraction and more markedly on carbachol-induced contraction in dose-dependent manner. *Coptis japonica* exhibited also tracheal muscle relaxation on both contraction with slightly weaker activities than those of *Coptis chinensis*. The activities of the root hair of *Coptis chinensis* were the most weakest in three rhizomas. Berberine and palmatine had strong tracheal muscle relaxation, especially, on carbachol-induced contraction, however, their activities on KCl-induced contraction were weaker than that of *Coptis chinensis*.

The inhibitory effects of three kinds of Coptis rhizoma on the contraction by KCl and carbachol were investigated to explain the process of their tracheal muscle relaxation. All rhizomas inhibited the contraction by both agents, among them, *Coptis japonica* showed the most significant effect, so indicating that the tracheal muscle relaxation of Coptis rhizoma may be concerned with the blocking of muscarine receptor and Ca^{2+} channel.

【Key Words】 Coptis Rhizoma, Tracheal Muscle Relaxation

Ⅰ. 緖論

黃連은 **毛茛科**(미나리아재비과)에 속한 **多年生 草木**인 **黃連** 및 **同屬 近緣植物**의 **根莖**[7,8,28]으로 한국에서는 **日黃連**, **川黃連**, **毛黃連** 세 종류가 통용되고 있는데, 일반적으로 **日本産**을 **日黃連**, **中國産**을 **川黃連**, **黃連**의 수염뿌리나 **小檗科**(매자나무과)에 속한 **多年生 草木**인 깽깽이풀의 **根莖**을 **毛黃連**이라 칭한다.[7,8]

* 동국대학교 한의과대학

歷代 本草書에 기재된 黃連의 氣味는 苦, 寒, 無毒하며 淸熱燥濕, 淸心除煩, 瀉火解毒시키는 작용이 있는데[7,8,26,28] 그 중에서 淸熱瀉火의 효력이 강하여 胸中之熱結을 瀉한다.[27]

黃連의 약리 작용은 주로 alkaloid 성분에 의한 것으로, 주성분인 berberine외에도 palmatine을 비롯한 몇 종류의 alkaloid 성분이 있는 것으로 알려져 있다.[32]

氣管支 喘息은 氣管支 過敏性을 특징으로 하는 질환으로서 여러 가지 자극에 의해서 氣道의 粘膜에 炎症反應이 일으나고, 氣管支 平滑筋이 수축되어 氣道閉塞을 일으키게 되는데 이러한 기도의 폐색은 자연적으로 또는 치료에 의해서 회복되는 可逆性의 특징을 가지고 있다.[5,6,9,12] 기관지 평활근과 관련된 韓醫學系의 연구로는 華蓋散, 紫蘇飮子, 柴胡枳桔湯, 潤肺除嗽飮, 九寶飮 등이 氣管支 平滑筋에 수축을 일으킨 상태에서 유의성 있는 억제 작용을 한다고 보고된 바 있다.[13,14,18,20,21]

三種 黃連類의 약효를 비교한 연구에는 禹[15]가 抗菌力의 차이점을, 柳[16]가 抗菌力 및 消炎효과를, 李[21]가 眼疾患을 誘發시키는 病源性 微生物에 대한 黃連의 억제 효과를, 李[18]가 혈관 이완 작용 관한 비교연구를 한 바 있으나, 黃連 추출물과 黃連의 유효 성분이 氣管支 平滑筋에 미치는 영향에 관한 비교 연구는 없었다.

이에 저자는 rat의 氣管支 平滑筋에 대하여 三種 黃連類와 단일 성분들의 효능을 비교 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 材料

1-1. 약재

川黃連(*Coptis chinensis* Franch) 과 毛黃連(Root hair of *Coptis japonica*)은 각각 市中에서 구입하여 사용하였으며, 日黃連(*Coptis japonica* Makino)은 일본의 려본천해당사 제품을 구입하여 사용하였다.

1-2. 시약

indomethacin, carbachol hydrochloride 및 EGTA(ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)- N, N, N′, N′- tetraacetic acid)는 Sigma Chemical Co.(MO) 의 제품을 사용하였으며 berberine은 berberine chloride hydrate로서, 그리고 palmatine은 palmatine chloride hydrate로서 Aldrich Chemical Co., Inc.에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 모두 국산 특급을 사용하였다.

1-3. 동물

Sprague-Dawley系 rat (체중 250-300g)를 암수 구분 없이 사용하였다. 각 실험에는 rat 10마리를 사용하여 시료 약물의 효과를 3회 측정한 다음, 평균치 (%)를 산출하였다.

1-4. 기기

생리기록계(ink-writing curvilinear polygraph)는 Grass Physiograph(Model 7D)를, 근수축변

환기(isometric force-displacement transducer)는 Grass FT03C를, 그리고 미세장력조절장치 Micromanipulator(Narishige, M-3)를 사용하였다. 항온bath는 circulating bath(Eyela, NTT-1100)를 사용하였다.

2. 方法

2-1. 黃連추출물의 제조

미세하게 분쇄한 川黃連, 日黃連 및 毛黃連의 분말 30g을 각각 200ml의 증류 플라스크에 넣고 물 80ml를 가한 다음, 수욕상에서 2시간 동안 환류냉각장치 하에 추출하였다. 3종 黃連의 추출액을 溫時 여과하고 여액을 회전증발기(rotary evaporator)를 이용하여 감압시키면서 물을 제거한 후, 냉동건조기(freezer dryer)로 완전 건조시켰다. 각 黃連추출물의 수득량은 川黃連의 경우 3.8g, 日黃連의 경우 3.2g 그리고 毛黃連의 경우 0.8g이었다.

2-2. 기관지 고리 절편의 제작

실험 동물을 실신시켜 혈액을 제거하여 희생시킨 다음, 즉시 기관지를 적출 하였다. 기관지 근에 붙어 있는 지방질 및 연 조직(connective tissue)을 제거하고 길이 3mm의 기관지 고리 절편을 제작하여 실험에 사용하였다. 이 고리 절편을 특수하게 고안된 텅스텐선(tungsten wire)에 걸어 영양액 내에서 일어나는 장력 변화를 기록하였다.

2-3. 영양액의 제조

2-3-1. Krebs-Henseleit 용액 (KHS용액)

이 용액은 기관지 근육이 정상적으로 유지되게 하기 위한 영양액이다. 그 조성은 NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11의 비율로 혼합하여 사용하였다. 이때, 95% O_2-5% CO_2 혼합 가스를 계속 주입시킨 상태에서 제조하였다.

2-3-2. Ca^{2+}-free 용액

KHS용액에서 $CaCl_2$대신 2mM의 EGTA를 첨가하여 제조하였다.

2-4. Carbachol 및 KCl 수축에 대한 기관지 이완 효과 측정

37℃로 유지되는 항온bath에 Krebs-Henseleit 용액 10ml를 넣고 95% O_2-5% CO_2혼합 가스를 연속적으로 공급하였다. 위에서 만든 기관지 고리 절편을 수직으로 懸垂하여 모세유리 막대를 통해 한쪽 끝은 bath의 저부에 고정시키고 다른 쪽 끝은 근 수축 변환기에 연결하였다. 미세 장력 조절 장치를 이용하여 초기 장력을 1g 부하하고 최소한 1시간 이상 평형을 유지시켰다. 이 기간동안 영양액은 3회 교환하였으며 이 때 부하 장력을 재 조절하였다. 평형 상태가 유지된 다음, cyclooxygenase에 의한 생성물을 억제하기 위하여 조직을 indomethacin(10 μM)으로 처리하였다. indomethacin은 각 실험 동안 계속 조직 중에 존재하도록 하였다.

실험 전에 65.4mM의 KCl로 3회 이상 수축시켰을 때, 일정한 크기의 수축을 일으키는 절편만을 사용하였으며, carbachol (0.1μM) 또는 65.4mM의 KCl로 최고 수축기에 이르렀을 때 각각

0.001 mg/ml, 0.003 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.03 mg/ml 및 0.1 mg/ml의 시료 약물을 첨가하여 나타난 반응을 Van Rossum의 방법 [37]에 따라 생리기록계로 연속 기록하였다.

2-5. KCl 수축 유도에 대한 黃連추출물의 수축 억제력 측정

4)항의 방법에 따라 실험 장치를 한 후, 기관지 절편을 1g의 부하장력 하에 1시간 정도 평형을 유지시켰다. KCl의 농도에 따른 기관지 수축에 대하여 **黃連**추출물의 수축 억제 효과를 확인하기 위하여 高 등[22]의 방법을 사용하였다. 즉, 대조군(control)으로서 KCl을 15mM, 45mM, 135mM 및 180mM 농도로 증가시키면서 수축의 정도를 먼저 측정한 다음, **黃連**추출물은 각각 0.1mg/ml씩 KCl로 처리하기 15분전에 미리 처리한 후, KCl농도에 따른 수축 억제 효과를 분석하였다.

2-6. Carbachol 수축에 대한 시료 약물의 수축 억제력 측정

KCl 대신 carbachol(10^{-8}M - 10^{-4}M)을 사용하여 5)항과 동일한 방법으로 측정하였다. Carbachol의 농도 증가에 따른 수축 반응에 대하여 **黃連**추출물을 carbachol 투여 10분전에 농도별(0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml)로 **前處置**한 후, 수축 억제 효과를 張 등[40]의 방법에 따라 생리 기록계에 연속 기록하였다.

2-7. Calcium-free 용액에서 carbachol에 의한 세포내 Ca^{2+}유리에 대한 黃連추출물의 수축 억제력 측정

Calcium-free 용액에 기관지 절편을 **懸垂**한 후, carbachol 10^{-4}M 첨가에 의한 일시적 수축 현상에 대하여 **黃連**추출물이 어떠한 반응을 보이는지를 검토하기 위하여 시료 약물(0.03mg/ml - 0.1mg/ml)을 carbachol 투여 10분전에 미리 처리한 후, 그 수축 억제 효과를 **張** 등[40]의 방법에 따라 생리기록계에 연속 기록하였다.

2-8. Data의 분석

시료 약물의 50% 억제 농도(IC_{50})는 Computer Program[38](Pharmacological Calculation Version 4.1)을 이용하여 산출하였으며 통계 처리는 Student's T-test를 이용하여 P값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. Ccl 수축에 대한 川黃連의 기관지 이완 효과

川黃連의 추출물은 KCl이 일으키는 세포막 탈분극에 의한 기관지 수축을 용량 의존적으로 이완시켰다. 즉, KCl에 의한 최대 수축(65.4 mM)에 대하여 **川黃連** 추출물 0.001mg/ml에서 5.6±1.5%, 0.003mg/ml에서 21.3±2.1%, 0.01 mg/ml에서 67.0±3.4%, 0.03mg/ml에서 92.0±2.4%의 이완 효과를 나타내었다(Fig. 1). 특히, 0.01mg/ml의 이완 효과는 **黃連**의 주성분으로 알려진 berberine이 동일한 용량에서 나타내는 이완 작용(52.0±3.4%)보다 더 강하였다(Fig. 2). **川黃連**의 최대 이완의 50%를 나타내는 억제 농도(IC_{50}) 는 0.0063mg/ml이었다.

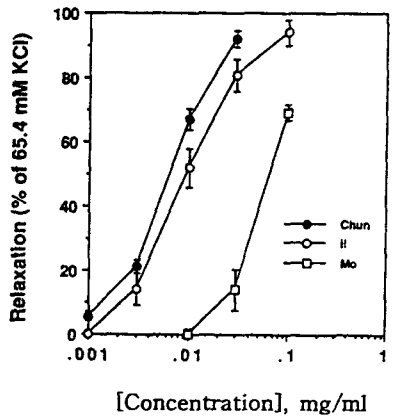

Fig. 1. Concentration-response curves of *Coptis chinensis* (Chun), *Coptis japonica* (Il), and Root hair of *Coptis japonica* on KCl-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of K^+. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments.

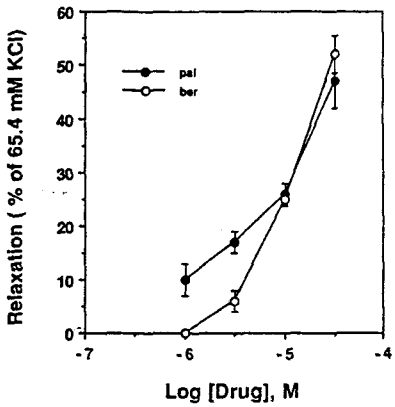

Fig. 2. Concentration-response curves of berberine(ber) and palmatine(pal) on KCl-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of K^+. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments.

2. KCl 수축에 대한 日黃連의 기관지 이완 효과

日黃連 추출물의 기관지 이완 효과는 川黃連 추출물의 경우와 유사한 양상 (용량 의존적)으로 나타났으나 川黃連 추출물보다 다소 약한 이완 효과를 보여주었다(Fig. 1). 즉, 日黃連은

0.001mg/ml에서는 이완 반응이 없었으며 0.003mg/ml에서 14.0±5.0%, 0.01mg/ml에서 52.0±6.0%, 0.03mg/ml에서 81.0±5.0%의 이완을 나타내었다. 그리고 0.1mg/ml에서는 94.0±4.0%의 이완 효과를 보여주었는데 이는 **川黃連** 0.03mg/ml에서의 이완(92.0±2.4%)과 비슷한 효과이다. **日黃連**의 기관지 이완 효과는 **川黃連**보다는 약하지만 0.01mg/ml의 동일한 농도에서는 **黃連**의 주성분인 berberine의 효과(52.0±3.4%)와 동일하게 나타났으며 **黃連**의 또 다른 성분인 palmatine보다는 더 강한 효과를 보여주었다 (Fig. 2). **日黃連**의 최대 이완의 50%를 나타내는 억제 농도(IC_{50})는 0.011mg/ml이었다.

3. KCl 수축에 대한 毛黃連의 기관지 이완 효과

毛黃連 추출물의 기관지 이완 효과는 **川黃連**과 **日黃連**의 효과에 비하여 훨씬 약하였다 (Fig. 1). 즉, 0.01mg/ml의 낮은 농도에서는 전혀 반응이 없었으며 0.03mg/ml에서도 14.0±6.3%로서 약한 이완 반응을 나타내었다. 그러나 0.1mg/ml의 높은 농도에서는 69.0±2.5%의 효과를 보여주어 **川黃連** 0.01mg/ml에서의 효과(67.0±3.4%)와 비슷하였다.

毛黃連의 최대 이완의 50%를 나타내는 억제 농도(IC_{50})는 0.068mg/ml로서 이 값은 **川黃連**의 IC_{50} 보다 약 10.8배 가량 높은 농도이다.

4. KCl 수축에 대한 黃連 成分의 기관지 이완 효과

4-1. Berberine의 효과

黃連의 주성분으로 알려진 berberine의 농도를 1μM, 3μM, 10μM 및 30μM로 용량을 증가시키면서 기관지 이완 작용을 검토하였다. Berberine은 KCl에 의한 수축에 대하여 용량 의존적으로 이완 작용이 증가하였다(Fig. 2). 즉, berberine 1μM(약 0.0004mg)에서는 이완을 나타내지 않았으나 농도를 점차적으로 증가시키면 이완 효과도 증가하였으며 30μM(약 0.01 mg) 에서는 52.0±3.4%의 이완 효과를 나타내었다. berberine의 기관지에 대한 이완 작용은 **川黃連** 추출물보다는 약하였으며 **日黃連** 추출물과는 비슷한 것으로 나타났다. Berberine의 IC_{50}은 2.78 x 10^{-5}M이었다.

4-2. Palmatine의 효과

黃連의 주 약효 성분인 berberine외에 또 다른 성분인 palmatine이 기관지 이완 작용에서 어떠한 효능 차이를 보이는지를 실험하였다. 그 결과, palmatine은 낮은 농도(1μM 및 3μM)에서는 berberine보다 더 강한 이완 효과를 보인데 반해 30μM의 농도에서는 오히려 berberine보다 효과가 약하게 나타났다 (Fig. 2). 그러나 palmatine은 매우 낮은 농도인 1μM(약 0.0004mg)에서도 10.0±3.0%의 이완 효과를 보임으로써 낮은 농도에서는 berberine 및 다른 **黃連**추출물에 비해 이완 효과가 강한 것을 알 수 있다. palmatine의 IC_{50}은 3.17 x 10^{-5}M로 berberine과 비슷하여 이들 群사이에 유의한 차이는 없었다($p>0.05$).

5. Carbachol 수축에 대한 川黃連의 기관지 이완 효과

川黃連의 추출물이 carbachol(0.1 μM)에 의한 기관지 수축에 대하여 어느 정도의 이완 효과를 보이는지를 측정해 본 결과, 수축을 용량 의존적으로 이완시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 즉, 川黃連 0.001mg/ml와 0.003mg/ml의 농도에서 각각 17.0±4.3%와 60.0±6.5%의 이완 효과를 나타내었으며 0.01mg/ml에서는 100% 이완시킨 것으로 나타났다. 이로써 川黃連이 KCl에 의한 수축보다도 carbachol에 의한 수축을 더 강력하게 억제함을 알 수 있다. 川黃連의 IC_{50}은 0.0018mg/ml로서 KCl 수축에 대한 IC_{50}보다 약 3.5배 가량 강한 것으로 나타났다.

三種 黃連類의 기관지 이완 반응의 tracing graph는 Fig. 4에 비교해서 나타내었다.

6. Carbachol수축에 대한 日黃連의 기관지 이완 효과

日黃連 추출물의 carbachol수축에 대한 기관지 이완 효과도 용량 의존적이었으며, 川黃連과 마찬가지로 0.01mg/ml의 농도에서 100% 이완 효과를 나타내었다(Fig. 3). 그러나 이 보다 낮은 농도인 0.001mg/ml와 0.003mg/ml에서는 각각 9.5±5.0% 및 42.0±7.0%를 나타내어 川黃連보다 이완 효과가 다소 약하였다. 日黃連도 川黃連과 마찬가지로 KCl에 의한 수축보다 carbachol에 의한 수축에 대해 보다 효과적이었다. 日黃連의 IC_{50}은 0.0027mg/ml로서 KCl 수축에 대한 IC_{50}보다 약 4.1배 가량 강한 것으로 나타났다.

日黃連의 기관지 이완 반응의 tracing graph는 Fig. 4에 비교해서 나타내었다.

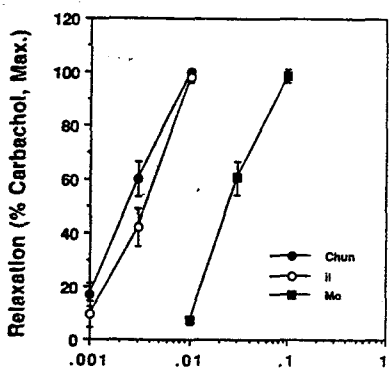

Fig. 3. Concentration-response curves of *Coptis chinensis* (Chun), *Coptis japonica* (II), and Root hair of *Coptis japonica*(Mo) on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments. Muscle contraction was induced by 0.1μM of carbachol.

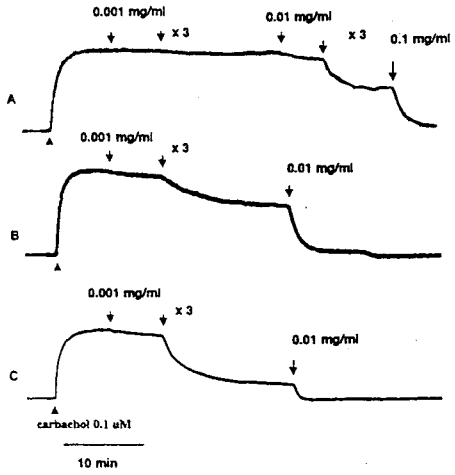

Fig. 4. Tracing of relaxation by three kinds of Coptis rhizomas in rat tracheal smooth muscle treated with carbachol (0.1 μM).

A : Root hair of *Coptis japonica* B : *Coptis japonica* C : *Coptis chinensis*

7. Carbachol 수축에 대한 毛黃連의 기관지 이완 효과

毛黃連의 경우, 0.01mg/ml이상의 농도에서만 이완 효과를 보였는데 0.03mg/ ml와 0.1mg/ml에서의 이완 효과가 각각 **川黃連** 0.003mg/ml와 0.01mg/ml에서의 효과와 동일하게 나타남으로써 **川黃連**의 약 1/10 정도의 효과밖에 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

毛黃連의 기관지 이완 반응의 tracing graph는 Fig. 4에 비교해서 나타내었다.

8. Carbachol 수축에 대한 黃連成分의 기관지 이완 효과

8-1. Berberine의 효과

berberine이 carbachol 수축에 대하여 어느 정도의 이완 효과를 보이는지를 실험한 결과, 1 μM(약 0.0004mg)의 농도에서는 거의 이완 효과를 나타내지 않았으며 3 μM (약 0.001mg)에서도 12.0±2.8%의 비교적 약한 이완을 보인데 반해 10 μM (약 0.004mg)에서는 효과가 급격히 증가하여 94.0±1.1%의 이완 작용을 나타내었다 (Fig. 5). **黃連**중에서 가장 효과가 강한 **川黃連**이 0.003mg / ml에서 60.0±6.5%의 이완 효과를 보인 결과와 비교해 볼 때, 순수 성분인 berberine이 **黃連**의 추출물보다 강한 효과를 나타낸다는 사실을 말해 준다(Fig. 3). 그러나 berberine, **川黃連** 및 **日黃連** 모두 0.01mg/ml에서는 100%의 이완 반응을 보여주었다. Berberine은 낮은 농도에서는 KCl이나 carbachol에 의한 수축에 대해 비슷한 이완 효과를 보이고 있으나 이보다 높은 농도 (10^{-5}M)에서는 carbachol에 의한 수축을 훨씬 강하게 억제하였다.

Carbachol 수축에 대한 berberine의 IC_{50}은 4.51 x 10^{-6}M 이었다.

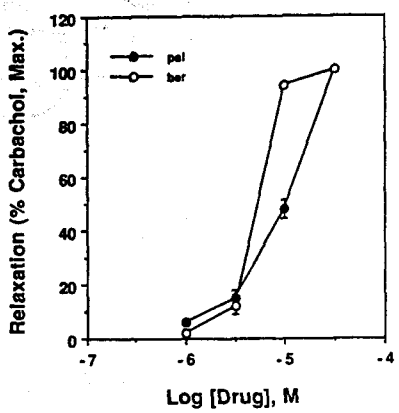

Fig. 5. Concentration-response curves of berberine and palmatine on carbachol- induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values± SE(standard error) of three experiments.

8-2. Palmatine의 효과

黃連의 또 다른 성분인 palmatine은 3μM (약 0.001mg)의 낮은 농도에서는 15.0±3.1%로서 berberine과 유사한 이완 효과를 나타내었으나(Fig. 5), 10 μM (약 0.004mg)에서는 효과가 48.0 ±3.4%로서 berberine보다는 훨씬 약하였으며 川黃連보다도 다소 약한 이완 효과를 보여주었다. 그러나 높은 농도인 30 μM (약 0.01mg)에서는 berberine, 川黃連, 日黃連등과 마찬가지로 100% 의 이완 작용을 나타내었다. Palmatine도 berberine과 마찬가지로 10^{-5}M 이상의 농도에서는 KCl에 의한 수축보다 carbachol에 의한 수축에 대해 더 강한 반응을 보여주었다. palmatine의 IC_{50}은 4.67 x 10^{-6}M로 berberine과 유사하였다.

9. 黃連類의 KCl과 Carbachol 수축에 대한 수축 억제 작용

이상의 실험에서 본 바와 같이 黃連추출물들이 탈분극 (KCl)과 수용체를 통한 수축 (Carbachol)에 대하여 농도 의존적으로 이완을 시켜 이들 이완 작용의 약리 기전을 밝히기 위하여 아래의 실험을 실시하였다.

9-1. KCl 수축에 대한 黃連類의 반응

三種 黃連類 투여시 기관지 평활근이 KCl의 농도를 15mM에서 180mM로 증가시킴에 따라 농도 의존적으로 수축되었다(Fig. 6). 이 때, 최대 수축의 50%를 나타내는 농도 (EC_{50})는 58.7mM이었다. 그러나 이 값은 川黃連, 日黃連 및 毛黃連의 최대 이완을 일으키는 농도 (0.1mg/ml)를 KCl을 투여하기 10분전에 미리 처리하였을 때, 각각 166.8mM, 154.7mM 및 68.1mM로 증가하였으며 최대 수축의 크기 (E_{max})도 감소하였다.

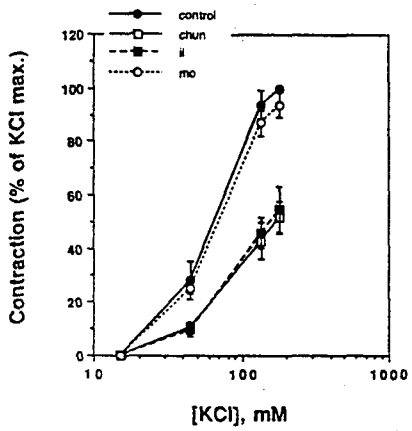

Fig. 6. Effects of three kinds of Coptis rhizomas on KCl-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. mo : Root hair of *Coptis japonica,* il *: Coptis japonica,* chun : *Coptis chinensis*

9-2. 川黃連의 Carbachol 수축 억제 작용

川黃連은 carbachol이 일으키는 수축에 대하여 용량 의존적으로 수축을 억제하였다 (Fig. 7). 즉, 0.001mg/ml 前處置時 최대 수축의 91%, 0.01mg/ml 前處置時 85%, 그리고 0.1mg/ml 前處置時에는 35%로 최대 수축 (E_{max})이 변하였으며 동시에 EC_{50}값도 변하였다 (Table Ⅰ). 특히, 0.1mg/ml의 농도에서는 최대 수축의 35%를 보임으로써 그 억제 양상은 非相競的 拮抗作用을 나타내었으며 이 때, EC_{50}은 대조군보다 867.8배나 높게 나타났다.

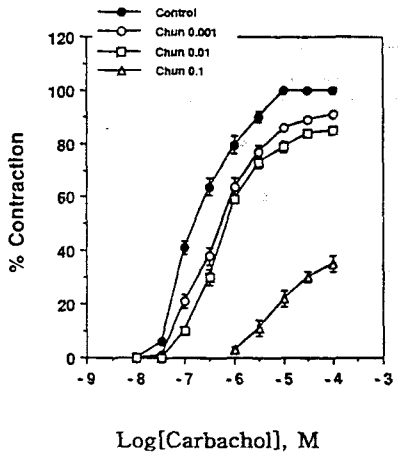

Fig. 7. Effects of *Coptis chinensis*(Chun) in doses of 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments.

Table I. Inhibitory potency of Coptis chinensis on carbachol-induced contraction in isolated rat tracheal smooth muscle

Sample		EC_{50} (M)	E_{max} (%)
Control		2.27×10^{-7}	100
Coptis chinensis	0.001mg/ml	1.17×10^{-6}	91
	0.01 mg/ml	1.39×10^{-6}	85
	0.1 mg/ml	1.97×10^{-4}	35

9-3. 日黃連의 Carbachol 수축 억제 작용

日黃連의 경우, 川黃連에 비해 전반적으로 수축 억제 작용이 다소 강하게 나타났다 (Fig. 8). Carbachol 10^{-6}M에서는 川黃連과 마찬가지로 0.1mg/ml의 농도에서 수축을 완전히 억제하였으나 carbachol 10^{-4}M에 대해서는 대조군에 비해 27.0±7.0%의 수축만 일으켜 川黃連 (35.0±3.0%)보다 약간 더 강한 수축 억제 작용을 나타내었다. 그리고 0.01mg/ml에서도 川黃連보다 억제작용이 더 강하였으며 0.001mg/ml의 낮은 농도에서는 수축 억제효과를 거의 보이지 않아 川黃連보다 억제작용이 다소 약하였다.

日黃連의 경우도 억제양상은 **非相競的 拮抗作用**을 나타내었으며 0.001mg/ml **前處置時** EC_{50}은 2.60×10^{-7}M, 0.01mg/ml **前處置時** 1.50×10^{-6}M, 0.1mg/ml **前處置時** 1.06×10^{-3}M로서 대조군보다 각각 1.2배, 6.9배, 4884배 높은 값을 나타내었다 (Table II).

日黃連은 0.1mg/ml의 농도에서 최대 수축의 27%를 보임으로써 川黃連보다는 효과가 좀더 강한 것으로 나타났다.

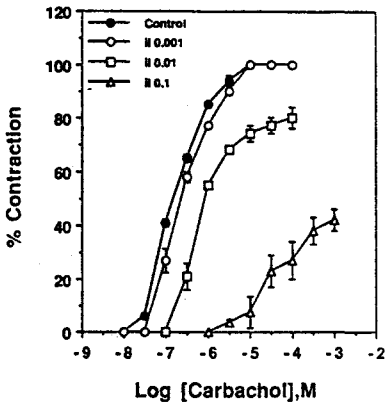

Fig. 8. Effects of *Coptis japonica*(il) in doses of 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments.

Table II. Inhibitory potency of Coptis japonica on carbachol-induced contraction in isolated rat tracheal smooth muscle

Sample		EC_{50} (M)	E_{max} (%)
Control		2.17×10^{-7}	100
Coptis japonica	0.001mg/ml	2.60×10^{-7}	100
	0.01 mg/ml	1.50×10^{-6}	80
	0.1 mg/ml	1.06×10^{-3}	27

9-4. 毛黃連의 Carbachol 수축 억제 작용

毛黃連의 경우에는 carbachol이 일으키는 수축에 대한 억제 작용이 대조군과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 9). **川黃連** 및 **日黃連**이 0.1mg/ml의 높은 농도에서는 강한 수축 억제 작용을 보인것과 비교하면 **毛黃連**은 같은 농도에서도 억제 효과를 보이지 않았다. **毛黃連** 0.01mg/ml 및 0.1mg/ml **前處置時** carbachol에 의해 최대 수축도 줄어들지 않았다. 이 두 농도에서의 EC_{50}을 비교하면 3.92×10^{-7}M 및 8.43×10^{-7}M으로서 대조군에 비해 각각 1.6배와 3.4배 정도의 차이만을 보여주었다.

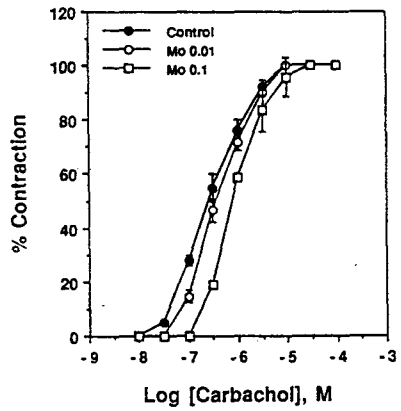

Fig. 9. Effects of Root hair of *Coptis japonica*(Mo) in doses of 0.01mg/ml and 0.1mg/ml on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values±SE(standard error) of three experiments.

10. 黃連成分의 carbachol 수축 억제 작용

10-1. Berberine의 수축 억제 작용

berberine의 농도가 증가함에 따라 수축 억제 작용도 비례하여 증가하였다 (Fig. 10). 3μM

(약 0.001mg) 前處置時에는 최대 수축의 약 80%, 10μM 前處置時에는 최대 수축의 약 60% 수축을 일으켰다. 川黃連과의 효과 비교에서는 川黃連이 0.001mg에서 최대 수축의 91%를 보인데 비하여 berberine이 좀더 강한 수축 억제를 나타내었다.

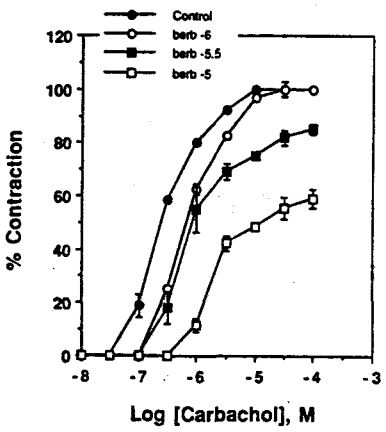

Fig. 10. Effects of berberine(berb) in doses of 1μM, 3μM, and 10μM on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values± SE(standard error) of three experiments.

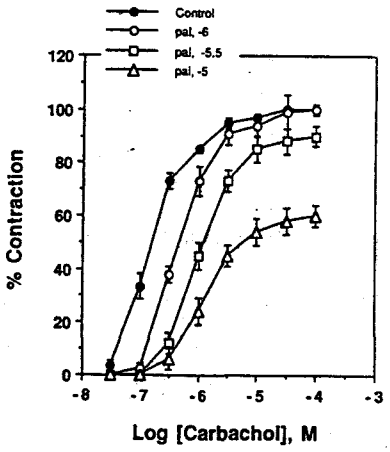

Fig. 11. Effects of palmatine(pal) in doses of 1μM, 3μM, and 10μM on carbachol-induced contraction in rat tracheal smooth muscle. Results are expressed as percentages of relaxation to maximum contraction of carbachol. Each point represents the mean values± SE(standard error) of three experiments.

10-2. Palmatine의 수축 억제 작용

Palmatine의 경우도 berberine과 유사한 양상을 나타내었다 (Fig. 11). 3μM 前處置時 최대 수축의 91%, 10μM 前處置時에는 최대 수축의 60%정도 수축을 일으켰다.

Palmatine의 carbachol 수축 억제 작용을 tracing graph로 Fig. 12에 나타내었다.

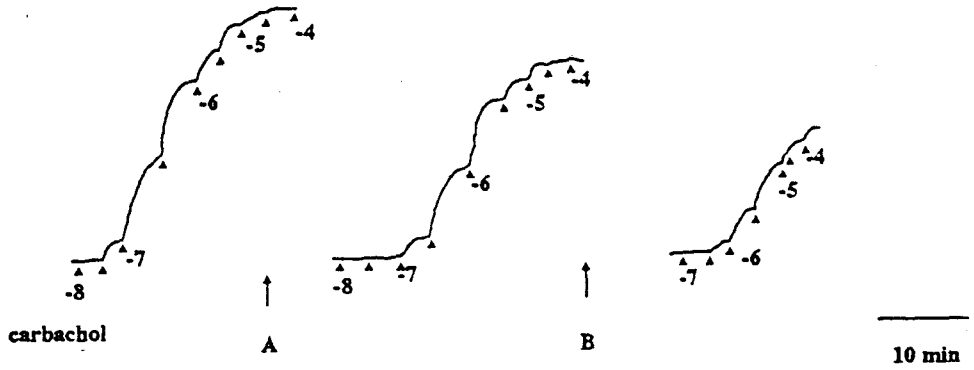

Fig. 12. Tracings of muscle contraction by carbachol, 3 x 10^{-6}M- (A) and 10^{-5}M (B) of palmatine in rat tracheal smooth muscle.

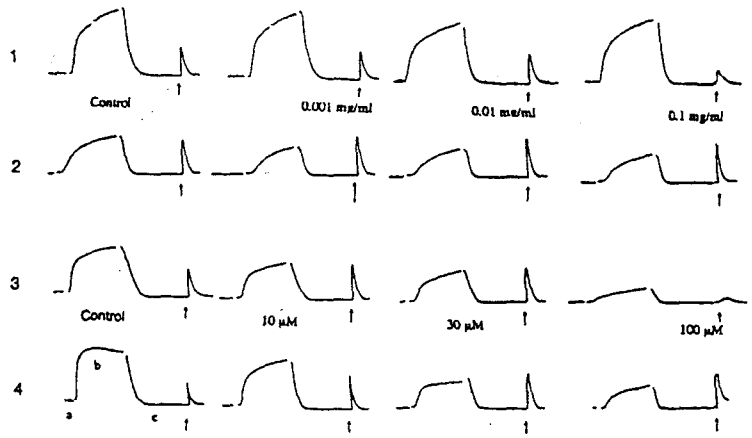

Fig. 13. Tracings of carbachol-induced phasic contraction in rat treacheal smooth muscle.

1. Effect of *Coptis chinensis* on carbachol-induced contraction
2. Effect of Hair root of *Coptis japonica* on carbachol-induced contraction
3. Effect of berberine on carbachol-induced contraction
4. Effect of palmatine on carbachol-induced contraction

Arrow indicates carbachol administration.

a : High K^+-Ca^{2+}-free solution, b : High K^+-Ca^{2+}-containing solution, c : High K^+-Ca^{2+}-free solution

11. 黃連추출물 및 黃連성분의 세포내 Ca^{2+}유리에 대한 작용

이상의 일련의 실험 결과, 黃連의 추출물 및 黃連의 유효 성분이 기관지 이완 작용뿐만 아니라 수축 억제 작용도 있음을 확인하였다. 따라서 이들의 작용이 직접 세포내 칼슘 이동에 영향을 주어 나타나는 결과인지를 확인하기 위하여 張 등[40]의 방법에 따라 세포내 Ca^{2+}유리에 대한 실험을 실시하였다. 川黃連의 경우, 낮은 농도 (0.001mg/ml)에서는 거의 영향이 없으나 높은 농도 (0.1mg/ml)에서는 약 55%의 억제 효과를 나타내었다(Fig.13). 한편, 毛黃連의 경우는 0.1mg/ml에서도 변화가 없는 것으로 나타났다. 黃連 성분의 경우, berberine 100μM에서 약 70%의 억제 효과가 있었고 palmatine도 berberine보다 약하기는 하나 억제 효과가 있었다.

Ⅳ. 考察

現代人들은 吸煙 등의 生活習慣과 高度의 文明發達과 經濟成長에 의한 대기오염, 실내 공기 오염 등 주거 환경의 오염에 따른 氣道刺戟物質의 증가로 인하여 각종 呼吸器系疾患에 시달리고 있다. 특히 咳嗽와 喘息은 호흡기 질환에서 나타나는 主要症候로써 인간의 질병 증상 중 가장 흔한 증상의 하나가 되고 있다.[25]

咳嗽와 喘證은 《素問·調經論篇》[23]에 "氣有餘則喘咳上氣 不足則息利少氣"라 하였고 《素問·臟氣法時論篇》[23]에 "肺病者 喘咳逆氣"라 하였으며 《靈樞·五閱五使篇》[24]에 "肺病者 喘息鼻張"이라 하여 肺는 氣를 主管하는데 氣가 逆上하면 喘한다 하고 咳嗽와 喘證에 對하여 처음으로 言及하였다.

肺의 병변은 宣發機能이 상실되어 氣가 內部로 鬱滯되면 胸脇滿悶, 鼻塞, 咳逆, 喘息, 痰多의 증상이 나타나며, 邪氣가 肺에 머물러서 肅降機能이 상실되면 肺氣가 上逆하여 喘證을 發하게 된다.[2]

서양 의학에서의 咳嗽는 기관지 내에 過度한 粘液生産量으로 過量의 喀痰이 배출되는 것으로 기관지 점액선의 증가와 소기관지내의 만성 염증성 변화에 의한 氣道狹窄으로 발생하며[10] 喘息은 發作性 呼吸困難, 喘鳴, 肺의 過吸氣, 咳嗽, 水泡音을 특징으로 하며 氣管支 平滑筋의 收縮, 氣管支 벽의 肥厚, 氣管支 粘膜의 浮腫, 氣管支 腔內 分泌物의 貯溜 등에 의하여 일어나는 광범한 기관지내 기도 폐색으로 발생한다.[5,6,9,12] 따라서 기관지 平滑筋의 이완이 咳嗽, 喘息을 치료하는 중요한 요인이 된다.

黃連은 미나리아재비과에 속한 多年生 草木인 黃連 및 同屬 近緣植物의 根莖으로 性味는 苦寒하며 淸熱瀉火의 효력이 강하고[7,8,26,28] 胸中之熱結을 寫한다.[27] 산지에 따라 丹波黃連, 越前黃連, 因州黃連, 加賀黃連 등의 日本産과 味連, 峨眉連, 雅連, 峨眉野連, 鳳尾連, 雲連, 土黃連 등의 中國産이 있는데, 우리 나라에서는 일반적으로 日本産을 日黃連, 中國産을 川黃連으로 통칭하여 사용하고 있다. 또 우리 나라에서 사용되는 毛黃連은 黃連의 수염뿌리나 매자나무과에 속한 깽깽이풀의 根莖이 代用되고 있다.[7,8]

지금까지 黃連의 약리 작용은 주로 alkaloid성분에 의한 것으로 알려져 있는데[32], 그 가운데서도 berberine의 함량이 가장 많아 그 동안 berberine에 대한 연구가 黃連 연구의 중심이 되어 왔다. Chun 등[41]이 berberine의 혈압 강화 작용을 보고한 이래 berberine이 심근을 수축시키고[36]

혈관 확장에도 영향을 미치는 것으로 보고되었으며[29], 최근에는 S. Bova 등[39] 이 혈관 이완 작용의 약리 기전을 보고한 바 있다. 그러나 **黃連**에는 berberine외에도 palmatine, coptisine, worenine, jatrorrhizine 및 magnoflorine 등의 alkaloid도 소량 함유되어 있으므로[30,31] 앞으로는 이들 성분도 중요한 연구 대상이 되어야 할 것으로 생각된다.

아울러 **黃連** 추출물 및 **黃連**의 유효 성분이 기관지 평활근에 미치는 영향에 대하여 아직 검토된 바가 없다. 다만 **三種 黃連類**의 약리 효능을 비교한 연구로 **禹**[15]는 **抗菌力**의 차이에 관한 보고를 한 바 있으며, **柳**[16]는 **消炎** 및 **抗菌**작용을 부분적으로 검토하였고, **李**[21]는 **眼疾患 誘發 病源性 微生物**에 대한 억제 효과를 상호 비교하였으며, **李**[18]는 혈관 이완 작용에 관한 비교연구를 발표한 바 있다.

본 실험의 목적은 **三種 黃連類**가 **氣管支筋** 이완에 미치는 영향을 검토하여 **黃連類**의 효능 차이를 분석하고, 나아가 **黃連**의 주성분인 berberine, palmatine과 **黃連** 추출물의 효능을 비교해 봄으로써 한의학적으로 **咳嗽, 喘息** 등의 **呼吸器系疾患**에 응용할 수 있는지를 검증하고자 한 연구이다.

기관지 평활근의 이완 작용이 교감 신경계의 β수용체에 대한 작용으로 나타남은 이미 알려진 사실이다.[33-35] 따라서 본 실험에서는 칼슘 통로를 통해서 Ca^{2+} 유입에 의한 수축과 부교감신경계의 muscarine 수용체를 통한 수축에 대하여 시료 약물의 이완 효과와 함께 이들의 작용이 비특이성인지 특이성인지를 확인하기 위하여 수축에 대한 억제 효과 실험도 병행해 본 것이다.

기관지 평활근 수축제로 KCl과 carbachol을 사용하였는데 KCl은 세포막 탈분극과 관계가 있다. 즉 세포막 탈분극에 의하여 세포외액의 Ca^{2+}을 유입시킴으로써 궁극적으로 세포내 Ca^{2+}이 증가되어 근육의 수축이 일어난다. Carbachol에 의한 수축 기전은 muscarine 수용체와 결합하여 세포내 칼슘 저장소의 Ca^{2+}을 세포질내로 유리하여 세포질의 Ca^{2+} 증가로 근육의 수축이 나타난다.[1,4,11]

본 실험에서 **三種 黃連類**는 rat의 **氣管支 平滑筋**에 대하여 KCl과 carbachol에 의한 수축을 모두 용량 의존적으로 이완시켰다. 그러나 **毛黃連**의 추출물은 **川黃連, 日黃連**에 비하여 그 작용이 매우 약하게 나타났다. 즉, KCl과 carbachol에 의한 수축에서 0.003㎎/㎖인 경우에는 전혀 이완 작용이 없었으며 0.03㎎/㎖, 0.01㎎/㎖이상에서만 약한 이완 작용을 나타내었다.

三種 黃連類의 **氣管支 平滑筋** 이완 작용을 상호 비교한 결과, 두 가지 공통점이 있었다. 첫째는 KCl에 의한 수축보다는 carbachol에 의한 수축에 대하여 더욱 강력한 이완 작용을 가졌는데 이는 나중에 언급하게 될 muscarine 수용체 차단제로서의 가능성을 시사하는 것이다. 둘째는 두 가지의 서로 다른 **氣管支 平滑筋** 수축에 대하여 **川黃連, 日黃連, 毛黃連**의 순서로 이완 작용이 강한 것으로 나타났는데, 그중에서 **毛黃連**은 다른 두 **黃連**에 비해 현저히 그 효과가 낮았다.

黃連의 주성분으로 알려진 berberine과 palmatine의 이완 작용을 살펴보면, KCl에 의한 수축에 대하여 용량 의존적 이완을 나타내었으나 30μM(약0.01mg) 투여한 경우 **川黃連** 추출물 0.01mg/㎖ 투여 시보다 효능이 약하게 나타났다. carbachol에 의한 수축에는 berberine이 매우 강한 이완 작용을 보였다. 즉, berberine이 10μM(약0.004㎎/㎖)에서 94.0±1.1%의 이완 효과를 보인데 반하여 **三種 黃連**중에서 가장 효과가 강한 **川黃連**은 0.003mg에서 60.0±6.5%의 이완 효과를 보여 순수 성분인 berberine이 **黃連**의 추출물보다 강한 이완 작용이 있음을 알 수 있었다. 이러한

사실로 보아 **黃連**의 기관지 이완 작용은 berberine과 palmatine 이외에도 다른 성분이 복합적으로 관여하는 것으로 추정된다.

한편 **黃連** 추출물 및 유효 성분이 carbachol에 의한 수축에 강한 이완 작용을 보인 것은 muscarine수용체 차단 작용이 강함을 시사한다고 할 수 있는데, 그 가능성을 알아보기 위하여 **三種 黃連** 추출물 및 단일 성분(berberine, palmatine)을 먼저 투여하고 carbachol에 의한 **氣管支筋** 수축 변화를 살펴본 결과 기관지 수축을 용량 의존적으로 억제하였으며, 그 작용은 **日黃連**이 **川黃連**보다 약간 더 강했으나 **毛黃連**은 다른 두 **黃連**에 비해 효과가 현저히 낮았다.

세포내 Ca^{2+} 유리 억제에 대한 작용을 보다 확실히 확인하기 위하여 Ca^{2+}-free 용액에서 mescaline 수용체를 자극시 세포내 Ca^{2+}을 유리시키는 것으로 알려진 carbachol을 사용하였다. 그 결과, berberine, palmatine 등의 **黃連** 유효 성분은 물론 **川黃連** 추출물도 세포내 칼슘 유리 억제 효과가 있었다. 그러나 **毛黃連** 추출물은 고농도 (0.1mg/ml)에서도 거의 영향이 없었다. 이러한 사실로 미루어 볼 때, **黃連類**는 세포내 Ca^{2+} 유리 억제 작용이 있으며 이것은 적어도 carbachol 수축에 의한 이완 작용과 수축 억제 작용에 기인된 것으로 생각된다.

KCl 수축에 대한 최대 수축 (E_{max})이 감소하는 것과 같이 carbachol에 의한 수축에서도 E_{max}가 감소함으로써 적어도 이들 시료가 muscarine 수용체에 경쟁적으로 억제하지는 않는 것으로 생각된다. 즉, 이것은 수용체와 약물 (carbachol)이 결합된 뒤, 이어서 일어나는 일련의 cascade반응 중 일부에 이들 시료가 관여함으로써 기관지 이완 효과가 일어나는 가능성을 시사하고 있다.

보다 정확한 작용 기전을 밝히기 위해서는 분자 수준에서의 추가 연구가 필요하나 본 연구에서 나타난 결과만으로 볼 때, 적어도 **氣管支 平滑筋** 이완 작용의 일부 기전에 칼슘 통로 차단 및 muscarine 수용체가 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

三種 黃連類中에서 **川黃連**은 **氣管支 平滑筋** 이완 효과가, 그리고 **日黃連**은 **氣管支 平滑筋 收縮 抑制**효과가 강하게 나타났다. 아울러 **川黃連**의 경우 KCl에 의한 수축에 대하여 berberine과 palmatine보다 이완 작용이 강한 것으로 나타났는데, 이러한 결과로 보아 단일 성분의 부작용을 고려한다면 **黃連**의 추출물은 기관지 수축으로 인한 **氣管支喘息**이나 **咳嗽 等**의 장기적인 치료에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結論

川黃連, 日黃連, 毛黃連의 추출물과 **黃連**의 약효 성분인 berberine과 palmatine이 쥐의 **氣管支 平滑筋** 이완에 미치는 효능을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KCl에 의한 탈분극 수축에 대하여 **川黃連, 日黃連**의 순서로 이완 작용이 강하였으며 **毛黃連**은 효과가 매우 약하였다.
2. Muscarine 수용체와 결합하는 carbachol에 의한 수축에 대하여 **川黃連, 日黃連, 毛黃連**의 순서로 이완 작용이 강하였으며 그 효과는 KCl에 의한 수축보다 강하였다.
3. KCl에 의한 수축에 대한 **黃連類**의 추출물과 **黃連成分**과의 효능 비교에서는 낮은 농도에서는 **川黃連**이 순수 성분보다 다소 약하였으나 높은 농도에서는 오히려 효능이 더 강하였다.

4. Carbachol에 의한 수축에 대하여 berberine이 10^{-5}M에서는 palmatine보다 이완 작용이 훨씬 강하였으며 三種 黃連중에서 가장 효과가 강한 川黃連보다 강하게 나타났다.
5. Carbachol 수축에 대한 黃連類의 수축억제 효과는 전반적으로 日黃連이 川黃連보다 다소 강하였으며 毛黃連은 효과가 거의 없었다.
6. Carbachol 수축에 대한 berberine과 palmatine의 수축 억제 효과 비교에서는 낮은 농도 (3μM)에서는 berberine이 수축을 더 크게 억제하였으나 높은 농도(10μM)에서는 동일한 억제 효과를 나타내었다.

參 考 文 獻

1. 김기환·성호경 : 생리학, 서울, 의학문화사, 1996, p104
2. 金完熙·崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, 1985, p249
3. 金一赫 : 藥品植物學槪論, 서울, 學窓社, 1987, pp159-160
4. 金正鎭 : 生理學, 서울, 高文社, 1990, pp18-22, 31-49
5. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, 1995, p598
6. 徐舞圭 : 成人病·老人病學, 서울, 고려의학, 1992, p260
7. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, 1988, pp641-647
8. 申民敎 : 原色韓國藥用植物圖鑑, 서울, 아카데미서적, 1986, p591
9. 의학교육연수원 : 家庭醫學, 서울, 서울대학교출판부, 1995, p286
10. 李文鎬 외 : 內科學, 서울, 學林社, 1986, p1554,1555
11. 한국약학대학협의회약물학분과회 : 藥物學, 서울, 文聖社, 1995, pp445-447
12. 韓鏞徹 : 임상호흡기학, 서울, 一潮閣, 1995, p219
13. 金聖炫 : 華蓋散이 GUINEA PIG의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향, 大韓漢方內科學會誌, 1990, 11(1);175
14. 宋鎭吾 : 紫蘇飮子가 GUINEA PIG의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향, 大韓漢方內科學會誌, 1990, 11(1);88
15. 禹元洪 : 三種 黃連의 抗菌力 比較 實驗, 圓光大學校 大學院 碩士學位 論文, 1982
16. 柳炳秀 : 黃連類의 效能과 berberine 含量에 관한 硏究, 慶熙韓醫大論文集 第15卷, 1992, pp47-67
17. 尹浩碩 : 潤肺除嗽飮이 Guinea Pig의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향, 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 1992, p25
18. 李敬愛 : 黃連類의 血管弛緩作用에 關한 比較實驗硏究, 東國大學校 大學院 碩士學位論文, 1996, p36
19. 李敏燮 : 柴胡枳桔湯이 Guinea Pig의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향, 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 1992, p28
20. 李昇祐 : 九寶飮이 Sensitized Rat의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향, 大韓漢方內科學會誌, 1993, 14(2);13

21. 李眞我 : 黃連類의 眼疾患 誘發 病原性 微生物 抑制效果에 관한 硏究, 東國論集 第13輯, 1993, pp471-491
22. 고학준 : 1-(4'-Methoxybenzyl)-6, 7-dimethoxy-3, 4-dihydroisoquinoline (GS386) inhibits Ca^{2+} movement in isolated rat and guinea-pig trachealis, 慶尙大學校 醫科大學 大學院 博士學位論文, 1992
23. 楊維傑編 : 黃帝內經素問譯解, 서울, 成輔社, 1980, p202,457,529
24. 楊維傑編 : 黃帝內經靈樞譯解, 서울, 成輔社, 1980, p301
25. 王淇明 : 中醫內科辨證學, 上海, 人民衛生出版社, 1978, pp122-126
26. 李時珍 : 本草綱目(上), 北京, 人民衛生出版社, 1982, pp771-778
27. 陳維華 외 : 葯對論, 合肥, 安徽科學技術出版社, 1984, p172
28. 崔樹德 : 中藥大全, 하얼삔, 黑龍江科學技術出版社, 1989, pp274-276
29. 村山義溫, 篠崎好三 : 藥誌, 1926, 46;299
30. H.Otsuka, M.Tsukui: Yakugaku Zasshi, 1974, 94;796
31. T.Nagasawa, S.Shibutani: Yakugaku Zasshi, 1978, 98;1642
32. 內炭精一 : 日藥理誌, 1957, 53;63
33. Abbrachio, M.P., I.Daffonchio and C. Omini, Arachidonic acid metabolites and lung β-adrenoceptor desenditization. Pharmacol. Res.Commun, 1986, 18;93
34. Berti, F.L. Daffonchio, G.C. Folco. C. Omini and T. Vigano, Desensitization of β-adrenoceptor in guinea-pig trachea : A prostaglandin mediated phenomenon, J. Aulon. Pharmachol, 1982, 2;247
35. Burka, J.F., Ali, M., Mcdonald, J.W.D. & Paterson, N.A.M., Immunological and non-Immunological synthesis and release of prostaglandins and thromboxanes from isolated guinea-pig traches, Prostaglandins, 1981, 22;683-691
36. J.E. Schaffer : *J. Cardiovasc. Pharmacol,* 1985, 7;307
37. J.M. Van Rossum, Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose response curves in isolated organs and the evaluation of drugparameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1963, 143, 299
38. R.J. Tallarida and R.B. Murray, Manual of pharmacologic calculations with computer programs, Springer-Verlag, 1988.
39. S. Bova, R. Padrini, W.F. Goldman, D.M. Berman, and G. Cargnell : *J.Pharmacol.Exp.* Ther., 1992, 261, 318
40. K.C. Chang, H.J. Ko, S.D. Cho, Y.J. Yoon, and J.H. Kim, Pharmacological characterization of effects of verapamil and GS283 on isolated guinea pig and rat trachealis, *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, 236, 51
41. Y.T. Chun, T.T. Yip, K.L. Lau, Y.C. Kong, and U. Sankawa : *Gen. Pharmacol.* 1979, 10;177