

뱀장어(*Anguilla japonica*) 장의 상피세포막에 존재하는 새로운 clonidine 결합 수용체에 관한 연구

김홍태 · 서정수 · 박남규* · 이형호* · 정준기†
*부경대학교 생물공학과 · 수산생명의학과

A New Receptor for site Clonidine in the Eel, *Anguilla japonica* Intestine

Hung Tae Kim, Jung-Soo Seo, Nam Gyu Park*, Hyung-Ho Lee* and Joon-Ki Chung†
*Department of Biotechnology and Bioengineering, Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

A novel clonidine binding sites were characterized in the intestinal membrane isolated from seawater eels, *Anguilla japonica*. The specific clonidine binding sites consisted of at least two classes, high affinity ($K_d = 1.4 \pm 0.3$ nM n = 5) and low affinity ($K_d = 175 \pm 34$ nM n = 5) sites. The specific binding of 2 nM [³H]clonidine was most enhanced at 20°C and pH 7.5, and reversed by unlabelled clonidine. Such binding was hardly inhibited by adrenaline, yohimbine or rauwolscine, indicating that most binding sites are distinct from α -adrenoceptor. The specific clonidine binding sites was inhibited by various imidazoline/guanidinium drugs, indicating existence of imidazoline/guanidinium receptive sites (IGRS) or imidazoline receptors in the eel intestine. Competition experiments revealed that rank order to displace 2 nM [³H]clonidine from their binding sites was as follows : guanabenz > cirazoline = naphazoline = UK14,304 = ST587 ≥ clonidine ≥ idazoxan = RX821002 = tolazoline > ST93 = oxymetazoline = amiloride = ST91 > yohimbine = efaroxan = rauwolscine ≥ adrenaline = ST567 = histamine = agmatine. Although physiological role of IGRS is not clear yet even in mammalian cell/tissues, eel intestine may be a good model to elucidate how the IGRS act in the cell and to decide what is the endogenous ligand for the IGRS.

Key words : *Anguilla japonica*, Osmoregulatory receptor, Imidazoline/guanidinium

장(Intestine)에 있어서의 NaCl과 물의 흡수는 해수에 적응된 뱀장어가 담수 속의 뱀장어보다 높고 알려져 있다(Oide and Utida, 1967; Skadhauge, 1969; Ando, 1975; Ando *et al.*, 1992). 해수의 적응에 따른 뱀장어의 장은 adrenaline에 대한 감수성은 증가된다고 알려져 있으며(Ando and Hara, 1994) 또한 adrenaline은 뱀장어의 장에서의 NaCl과 물의 흡수를 증가시키는 것으로 보고되었다(Ando and Kondo, 1993; Ando and Omura, 1993). 그러므로 해수 뱀장어의 장에 있어서 NaCl 및 물의 흡수 촉진은 해수뱀장어의 장조직의 아드레날린에 대한 높은 감수성 때문이라고 생각된다. 또한, 해수뱀장어의 장에 있어서의 adrenaline에 대한 감수성의 증가는 adrenaline에 대한 친화성의 증가 또는 수용체 수의 증가 및 adrenaline에 높은 친화성을 가진 새로운 수용체의 발현등에 기인 할 수

있을 것이다.

이러한 두 가지의 가능성을 확인하기 위하여 본 연구는 뱀장어의 장에서, adrenanline receptor의 agonist로 알려진 clonidine(Ando and Kondo, 1993; Ando and Omura, 1993)을 이용하여 adrena-line receptor를 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

실험동물

약 200 g의 뱀장어, *Anguilla japonica*는 20°C의 인공해수에서 일주일 이상 사료 없이 순치시켜 실험에 사용하였다. 중추신경을 절단한 후 장을 절취하였다. 절취된 장의 점막측 부위는 4°C의 Krebs bicarbonate ringer,s solution (mM : 118.5 NaCl, 4.7 KCl, 3.0 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 24.9

†Corresponding Author

NaHCO₃)으로 세척 후 절개하여 상피세포를 수거하였다. 수거된 상피세포는 -80°C에서 보관하였다.

막 표본 준비

동결 보존된 세포표본에 10배의 buffer (40 mM Tris/HCl, 40 mM NaCl, 100 mM sucrose, pH7.5)를 첨가하여 Polytron(T8, setting 6, x10s bursts)으로 균질화시켰다. 분쇄된 세포표본은 4°C, 900×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 회수한 후, 11,000×g에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 10배의 buffer를 첨가하여 25°C 30분간 방치하였다. 이러한 조작으로 내인성 ligand가 수용체로부터 떨어질 것을 기대하고 실시하였다. 이후 4°C, 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 침전물을 회수한 후, 회수된 침전물에 실험액(40 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂)에 부유시킨 상태에서 결합 실험을 하였다. 부유액의 일부는 micro BCA protein reagent kit (Pierce Chemical Company)로 단백질의 양을 측정하였다.

약물

[³H]clonidine HCl(specific activity of 61.9 Ci/mol)은 New England Nuclear로부터 구입하였다. 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 5-hydroxytryptamine creatine sulfate(5-HT), acetyl-β-methylcholine(MCh), adrenaline HCl, clonidine HCl, yohimbine HCl, efaroxan HCl, tolazoline HCl, naphazoline HCl, amiloride HCl는 Sigma에서, RX821002 HCl, agmatine sulfate, idazoxan HCl, cirazoline HCl, rauwolscine HCl, oxymetazoline HCl, guanabenz acetate, UK14.304는 Research Biochemicals Inc.로부터 구입하였다. 대부분의 약물은 물에 녹여 사용하였으며, UK14.304는 DMSO의 영향이 없는 농도에서 녹여 사용하였다. ST91 HCl, ST93 HCl, ST567 HBr, ST587 nitrate는 Boeinger Ingelheim KG로부터 제공받았다.

[³H]clonidine binding assay

Binding assay는 기본적으로 Azumaya와 Tsutsui의 방법(1996)에 따라 행하였다. 포화실험은 200 μl의 실험액(pH 7.5)에 세포막 표본과 각 농도의 [³H]clonidine을 20°C 60분간 반응시켰다. 비특이적

인 결합은 방사선 동위원소로 라벨되지 않은 1 mM clonidine 과 함께 반응시켰을 때의 [³H]clonidine 결합량으로 구하였다. 60분 후 1 ml의 차가운 실험액을 첨가시켜 반응을 정지시킨 후, 11000×g에서 4°C, 4분간 원심분리 후, 4°C의 buffer로 침전물을 2회 세척, 회수하였다. 방사능 양은 crystal scintillation counter(Beckman)로 측정하였다. 결합량은 동결 보존시킨 세포표본과 시키지 않은 것과의 차이는 없었다. buffer의 적정 pH 및 온도를 결정하기 위하여 pH 7.0~10.0 사이는 Tris로, pH 6.8 이하는 phosphate buffer로 맞추어 사용하였다. 온도에 대한 영향을 보기 위하여 0°C, 20°C, 37°C로 온도에서 각각 반응시켰다. 이러한 결과로 최적결합 반응은 37°C에서 확인되었다(Data not shown). Competition experiments(경쟁적저해실험)은 2 nM [³H]clonidine과 각각 농도의 약물을 포화실험과 같은 조건으로 실시하였다. 2 nM [³H]clonidine의 약 70%는 특이적인 결합이었고, 전 결합량의 30% 이하가 비특이적인 결합이었다.

Ussing chamber법

장 상피세포 조직표본을 Ussing chamber에 장치하여 장의 양측을 3 ml의 Krebs bicarbonate ringer, s solution (mM : 118.5 NaCl, 4.7 KCl, 3.0 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 24.9 NaHCO₃)을 넣었다. 액의 pH는 95% O₂/5% CO₂ 혼합가스를 주입하여 7.4로 맞추었다. 해수 뱀장어의 장 상피세포를 위와 같이 장치하면 장막측 음성의 경상피 전위가(PD : potential difference)가 발생한다. PD는 카로멜 전극을 거쳐 recorder(EPR-151A, Toa Tokyo)로 기록하였다. 자극장치(SEN-3301, Nihon Kodan)로 30 μA의 전류를 5분 간격으로 0.5초 흘려 보내어 그때의 전위 변화(ΔPD)를 구하는 것으로 조직저항 (R_t)를 구하였다(R_t = ΔPD/30 μA). 단락전류(ISC : short-circuit current)는 PD와 R_t의 비로 구하였다(I_{sc} = PD/R_t).

Data 분석

실험결과는 평균 ± 표준오차로 표현하였다. B_{max}와 K_d는 Ishii 등(1983)이 개발한 비선형 회귀분석 program을 이용하여 구하였다. IC₅₀과 slop factor는 경쟁적저해실험의 결과를 Pseudo-Hill plot 하여 구하였다.

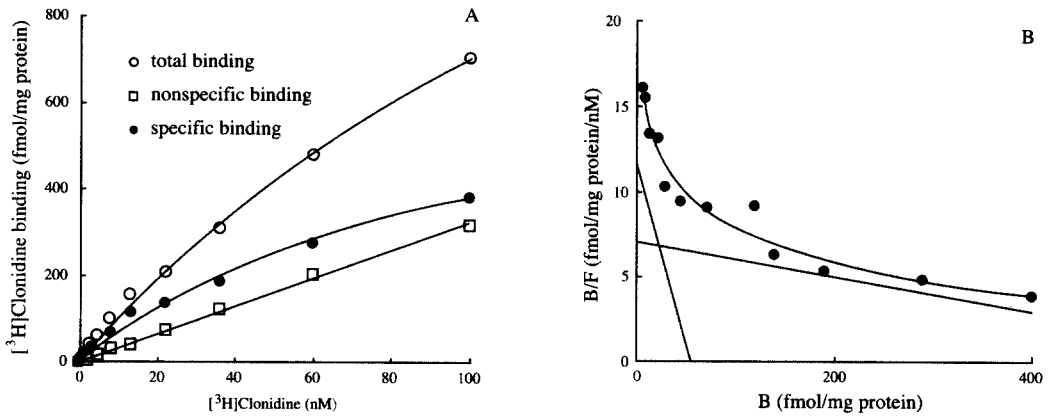


Fig. 1. (A) Saturation analysis of [³H]clonidine binding (60 pM to 100 nM) to intestinal membrane homogenates at 20 °C and pH 7.5 : (○) total [³H]clonidine binding, (●) specific binding, (□) non-specific binding (in the presence of 1 mM unlabelled clonidine). Each point depicts mean value of triplicate determination. (B) The Scatchard plot of [³H]clonidine specific binding indicating two classes of sites. The data from 5 experiments are B_{max} = 16.9 ± 4.0 fmol/mg protein, K_d = 1.4 ± 0.3 nM and B_{max} = 984 ± 132 fmol/mg protein, K_d = 175 ± 34 nM for the high- and low-affinity binding sites, respectively.

결 과

[³H]clonidine 결합부위의 성질

해수 뱀장어의 장 상피세포의 표본에 [³H]clonidine을 결합시키면, 특이적인 결합량(전결합량 - 비특이적인 결합량)은 [³H]clonidine의 농도(60 pM - 100 nM)에 의존하여 증가하였다(Fig. 1A). Fig. 1A의 특이적 결합을 Scatchard plot 하면 B와 같이 된다. 이 그림은 해수 뱀장어의 장 상피세포에는 적어도 2 종류의 clonidine 결합부위가 존재하고 있음을 시사하고 있다. 고친화성 결합부위의 B_{max}는 16.9 ± 4.0 fmol/mg protein 이고, K_d = 1.4 ± 0.3 nM 이었다. 그리고 저친화성 결합부위의 B_{max}는 984 ± 132 fmol/mg protein 이고, K_d = 175 ± 34 nM 이었다(n = 5). 2 nM [³H]clonidine의 특이적 결합 반응은 pH와 온도 의존적으로, 뱀장어의 체온인 20°C에서 높고, 0°C, 37°C에서는 낮은 성질을 가지고 있었다. 그리고 pH 7.5에서 최적 결합능을 가지고 있었다(Data not shown). 2 nM [³H]clonidine의 결합은 다량의 라벨되지 않은 clonidine (1 mM)에 의해 가역적인 반응을 보였다 (Fig. 2).

Competition experiments

뱀장어의 장 상피세포 표본의 clonidine 결합부위가 adrenaline 수용체인가를 조사하였다. Adrenaline

은 저해반응이 약하였고, adrenaline의 antagonist로 알려진 yohimbine 및 rauwolscine도 adrenaline과 같은 정도의 저해반응을 보였다. Clonidine은 histamine 수용체에 작용한다는 보고가 있어(Karppanen *et al.*, 1976) 사용하였지만 같은 정도의 효과였고, 소의 뇌에서 clonidine의 결합을 저해하는 물질로서 agmatine이 알려져 있어(Li *et al.*, 1994) 경쟁시켜 보았지만 친화성은 낮았다(Fig. 3).

포유류에서 clonidine은 α₂-adrenaline 수용체 효현제로 알려져 있고 많은 유도체가 개발 되어있다. 이들 유도체를 가지고 clonidine 결합부위의 성질을 조사하였다(Fig. 4). 사용한 약품들 중에서 guanabenz가 제일 강하게 2 nM [³H]clonidine의 결합을 저해하였다. Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 Pseudo-Hill plot 하여 IC₅₀을 구하여, 각 약물의 친화성 순서를 알 수 있었다. 그 친화성순서는 다음과 같았다.

Guanabenz > cirazoline = naphazoline = UK14,304 = ST587 ≥ clonidine ≥ idazoxan = RX821002 = tolazoline > ST93 = oxymetazoline = amiloride = ST91 > yohimbine = efaroxan = rauwolscine ≥ adrenaline = ST567 = histamine = agmatine.

Ussing chamber법

Ussing chamber에 장치된 해수 뱀장어 장 상피

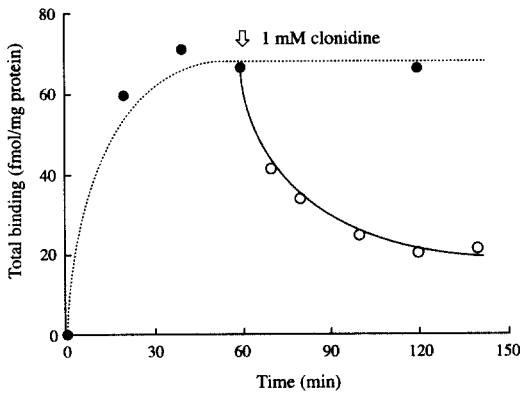


Fig. 2. Reversibility of 2 nM [³H]clonidine binding to intestinal membrane. After incubation membrane fractions with 2 nM [³H]clonidine for 60 min, unlabelled clonidine (1 mM) was added (arrow). Each point represents mean value in triplicate at 20 °C and pH 7.5.

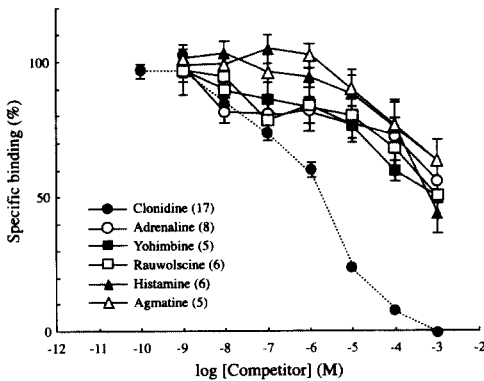


Fig. 3. Competition of specific binding of 2 nM [³H]clonidine by various adrenoceptor reagents or endogenous ligands. Values are mean ± S.E.M. of 5 to 17 independent experiments performed in duplicate. Intestinal membrane were incubated at 20°C for 60 min (pH 7.5) with 2 nM [³H]clonidine. Nonspecific binding was defined as the binding in the presence of 1 mM unlabelled clonidine. Number of experiments are shown in parentheses.

세포의 양측에 전처리되지 않은 상태에서 장막의 단백질로 binding assay시에 guanabenz의 IC₅₀ 값이 가장 낮으므로 먼저 이것을 사용하여 ussing chamber assay를 하였으나 효과가 나타나지 않았다. Adrenaline의 경우와 같이 (Ando & Omura, 1993) isobutyl-methylxanthine (IBMX, 10⁻⁵ M), 5-HT (10⁻⁶ M) 및 methacholine (MCh, 10⁻⁶ M)으로 전처리 하여 guanabenz를 작용시켰다. 그 결과, 10⁻⁷ M guanabenz를 해수 뱀장어의 장 상피세포 장막

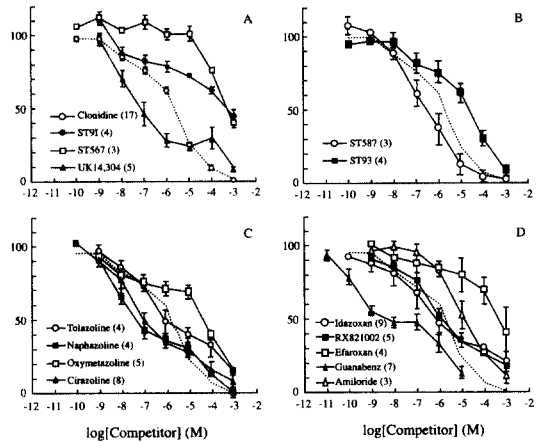


Fig. 4. Competition curves between [³H]clonidine and various clonidine derivatives. Procedures are the same as shown in Fig. 3 except for competitors. Number of experiments are shown in parentheses. Competition curve of clonidine is indicated as a dotted line for comparison in each figure.

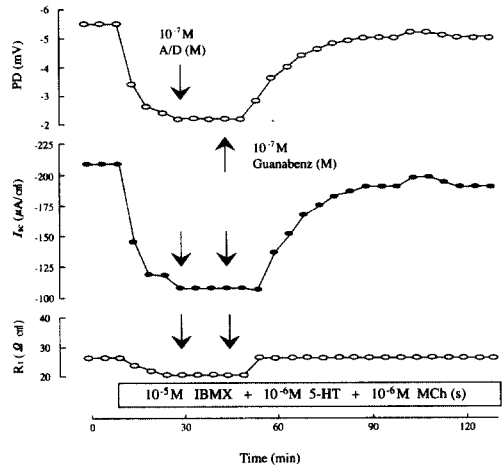


Fig. 5. Effect of guanabenz on the transepithelial potential difference (PD), short-circuit current (*I*_{sc}) and tissue resistance (*R*_t) across the posterior part of the intestine. After pretreatment with isobutyl-methylxanthine (IBMX, 10⁻⁵ mol/l), serotonin (5-HT, 10⁻⁶ mol/l), methacholine (MCh, 10⁻⁶ mol/l) and (-)-adrenaline (AD, 10⁻⁷ mol/l) was added to the mucosal fluid (first arrows). At the second arrows, guanabenz (GB, 10⁻⁷ mol/l) was applied to the same side.

측에 적용하면, 점막측에서 장막측으로의 Cl⁻의 능동적 수송을 의미하는 (Ando et al., 1975) PD, *I*_{sc}가 상승하였으며, 10⁻⁶ M yohimbine으로 adrenaline 수송체를 차단하면 guanabenz의 효과는 억제되었다

(Data not shown). 경쟁적 실험결과에서도 친화성이 제일 높게 나타난 guanabenz를 장의 점막층에 작용시킨 결과, PD와 I_{sc} 를 상승시켰고, 이러한 효과는 adrenaline을 점막층에 작용시켜도 PD와 I_{sc} 는 변화하지 않았다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 해수 뱀장어의 장에 특이적인 [3 H]clonidine 결합부위가 존재한다는 것을 최초로 밝힌 것이다. 그러나 이 결합은 adrenaline, dopamine, yohimbine, rauwolscine과 같은 adrenaline receptor에 특이적으로 결합하는 약물에 의해 경쟁적으로 저해를 받지 않는 것으로 보아 최초로 목적으로 한 adrenaline 수용체는 아니라고 할 수 있다. 이러한 결과는, 본 실험에서 준비된 뱀장어의 장 상피세포에는 adrenaline 수용체가 측정 불가능할 정도의 소량 밖에는 존재하지 않거나, [3 H]clonidine에 의해서는 인식되지 않는다고 사료된다. 그러나 clonidine과 adrenaline은 실제로 Cl^- 의 능동적 흡수를 가리키는 short-circuit current (I_{sc})를 증가시켰고, yohimbine에 의해 완전히 차단되었다(Ando and Kondo, 1993; Ando and Omura, 1993). 대부분의 [3 H]clonidine은 다양한 imidazoline/guanidinium 약물에 의해 치환되었다. 이러한 clonidine binding sites는 이미 보고되어진 여러 세포와 조직의 imidazoline/guanidinium receptive sites (IGRS)와 imidazoline receptors와 비슷하였다. 포유류에서 IGRS는 약물에 대한 치환능력의 차이와 방사능 표식 ligand들의 친화성의 차이로 imidazoline 1 subtype(I_1)과 imidazoline 2 subtype(I_2)로 분류되어 있다(Regunathan & Reis, 1996). I_1 type은 guanabenz보다 clonidine에 대하여 높은 친화성을 가지고 있고, I_2 는 clonidine보다 cirazoline과 idazoxan에 대하여 높은 친화성을 가진 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서, 결합부위가 [3 H]clonidine을 인식한다는 사실은 I_1 와 비슷하다. 그러나 [3 H]clonidine에 대한 치환 순서는 I_1 type과는 상이하다. I_1 type은 G protein과 coupling되어있어 GTP 존재 하에서 친화성이 변한다고 보고되어 있지만(Ernberger *et al.*, 1995; Regunathan & Reis, 1996), 뱀장어 장의 [3 H]clonidine 결합은 GTP의 존재 하에서도 친화성의 변화는 관찰되지 않았다

(Data not shown).

비록 뱀장어 장에 대한 clonidine 결합부위는 clonidine보다 guanabenz에 대하여 친화성이 높다는 성질은 포유류의 신장, 뇌, 간장에 대한 I_2 type 결과와 비슷하다. 그러나 뱀장어 장의 경우 cirazoline과 idazoxan에 대한 친화성이 clonidine보다 높지는 않은 성질을 가지고 있어 포유류의 I_2 type과는 또 다른 성질을 가지고 있다. 이러한 뱀장어 장의 IGRS는 약리학적 성질의 결과로 보아 포유류에서 분류된 I_1 과 I_2 sites와는 틀리다. 이러한 차이는 종의 차이에 의하거나 새로운 IGRS 즉 I_3 sites, 또는 다른 새로운 수용체일 가능성이 높다고 사료되어 진다.

요 약

해수에 적응된 뱀장어, *Anguilla japonica*의 장 세포막으로부터 새로운 clonidine의 결합부위가 있음이 밝혀졌다. Clonidine의 특이적인 결합부위는 적어도 2개의 부위 (high affinity $K_d = 1.4 \pm 0.3$ nM $n = 5$, low affinity $K_d = 175 \pm 34$ nM)를 가지고 있었다. 2 nM [3 H]clonidine의 특이적인 결합은 20 °C, pH 7.5에서 최적 결합능을 가지고 있었고, 라벨되지 않은 clonidine에 의해 가역적인 반응을 보였다. 이러한 결합은 adrenaline, yohimbine과 rauwolscine에 의한 저해능은 약하였다. 그리고 대부분의 결합부위는 α_2 -adrenoceptor와는 상이하였다. Clonidine의 특이적인 결합은 다양한 imidazoline/guanidinium 약물에 의해 억제되었다. Competition 실험의 결과, 2 nM [3 H]clonidine의 치환 rank order는 다음과 같다. guanabenz > cirazoline = naphazoline = UK14,304 = ST587 \geq clonidine \geq idazoxan = RX821002 = tolazoline > ST93 = oxymetazoline = amiloride = ST91 > yohimbine = efaroxan = rauwolscine \geq adrenaline = ST567 = histamine = agmatine. 이러한 순서는 포유류에 분류된 imidazoline receptor 1(I_1), imidazoline receptor 2(I_2) 및 imidazoline/guanidinium receptive sites(IGRS)형태와는 틀리기 때문에 새로운 imidazoline receptor라고 생각된다. 지금까지 보고된 포유류의 세포와 조직에서 IGRS의 생리화학적 역할은 명확하지 않지만, 해수뱀장어 장은 IGRS의 세포에 있어서의 역할 그리고 IGRS의 內因性 ligand가 무엇인가에 대한

좋은 모델이 될 수 있다고 생각되어진다.

사 사

본 연구의 일부는 부경대학교 해양 식량자원개발특성화사업 연구원 연수과제 지원에 의해 수행되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Ando, M., Utida, S. and Nagahama, H. : Active transport of chloride in eel intestine with special reference to sea water adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51A : 27-32, 1975.
- Ando, M. : Intestinal water transport and chloride pump in relation to sea-water adaptation of the eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52A : 229-233, 1975.
- Ando, M., Kondo, K. and Takei, Y. : Effect of eel atrial natriuretic peptide on NaCl and water transport across the intestine of the sea water eel. *J. Comp. Physiol.*, B. 162 : 436-439, 1992.
- Ando, M. and Kondo, K. : Noradrenaline antagonizes the effects of serotonin and acetylcholine in the seawater eel intestine. *J. Comp. Physiol.*, B. 163 : 59-63, 1993.
- Ando, M. and Omura, E. : Catecholamine receptor in the sea water eel intestine. *J. Comp. Physiol.*, B. 163 : 64-69, 1993.
- Ando, M. and Hara, I. : Alteration of sensitivity to various regulators in the intestine of the eel following seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A : 447-453, 1994.
- Azumaya, Y. and Tsutsui, K. : Localization of galanin and its binding sites in the quail brain. *Brain Res.*, 727 : 187-195, 1996.
- Coupry, I., Atlas, D., Podevin, R.A., Uzielli, I. and Parini, A. : Imidazoline-guanidinium receptive site in renal proximal tubule : Asymmetric distribution, regulation by cations and interaction with an endogenous clonidine displacing substance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252 : 293-299, 1990.
- Ernsberger, P., Graves, M.P., Graff, L.M., Zakieh, N., Nguyen, P., Collins, L.A., and Johnson G.G. : II imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution and transmembrane signaling. *Proceedings of the II International Symposium on imidazoline receptors*. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 763 : 22-42, 1995.
- Isihii S., Kohno S., Wakabayashi K. and Kubokawa K. : Useful program. In "Personal computer programs for life science. Ser. 4" Baifukan, Toyko, 1983.
- Ivkovic, B., Bakthavachalam, V., Zhang, W., Parini, A., Diz, D., Bosch, S., Neumeyer J. L. and Lanier S.M. : Development of a high-affinity radiolabeled ligand for identification of imidazoline/guanidinium receptive sites(IGRS) : Intratissue distribution of IGRS in liver, forebrain, and kidney. *Mol. Pharmacol.*, 46 : 15-23, 1994.
- Jackson, H.C., Griffin, I.J. and Nutt, D.J. : Endogenous opioids may be involved in idazoxan-induced food intake. *Neuropharmacology*, 31 : 771-776, 1992.
- Karppanen, H., Paakkari, I., Paakkari, P., Huotari, R. and Orma A.L. : Possible involvement of central histamine H2-receptors in the hypotensive effect of clonidine. *Nature*, 259 : 587-588, 1976.
- Lachaud, V., Limon, I., Tesson, F., Coupry, I. and Parini, A. : Characterization of imidazoline-guanidinium receptive sites in renal medulla from human kidney. *Am. J. Hypertens.*, 5 : 69S-71S, 1992.
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, C.J., Eshraghi, J., Cooper, R. and Reis, J. Agmatine : An endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263, 966-969, 1994.
- Neumeyer, J.L. and Lanier, S.M. : Development of a high-affinity radioiodinated ligand for identification of imidazoline/guanidinium receptive sites(IGRS) : Intratissue distribution of IGRS in liver, forebrain, and kidney. *Mol. Pharmacol.*, 46 : 15-23, 1994.
- Oide, M. and Utida, S. : Changes in water and ion transport in isolated intestine of the eel during salt adaptation and migration. *Mar. Biol.*, 1 : 101-106, 1967.
- Regunathan, S. and Reis, D.J. : Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36 : 511-544, 1996.
- Skadhauge, E. : The mechanism of salt and water absorption in the intestine of the eel(*Anguilla anguilla*) adapted to various salinities. *J. Physiol. Lond.*, 204 : 135-158, 1969.
- Westbrooks, K.L. and Johnson, G.G. : I: imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution and transmembrane signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 763 : 405-419, 1995.