

흰쥐 腦에서의 Presynaptic α -Receptor와 MAO 활성의 상관 관계

李京姝 · 金洛斗 · 高光浩

서울대학교 藥學大學

(Received October 25, 1984)

The Relationship between Presynaptic α -Receptor and Monoamine Oxidase Activity in the Rat Brain

Kyoung Joo Lee, Nak Doo Kim and Kwang Ho Ko

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—Relationship between hypertension and monoamine oxidase (MAO) activity in rat brain and the change of this relationship by presynaptic α -receptor agonist were studied. Animals were divided into three groups. Group I was composed of normotensive Sprague-Dawley rats (NR), group II of spontaneously hypertensive rats (SHR) and group III of acquired hypertensive rats induced by deoxycorticosterone acetate (DOCA) and NaCl treatment. Clonidine, a presynaptic α -receptor agonist, was administered to groups II and III. Blood pressures and MAO activities were measured in each group. MAO activities in the brain of SHR were lower than those of NR. Animals in group II received clonidine which lowered blood pressures but did not change MAO activities in the brain. DOCA and NaCl induced hypertension 21 days after these treatments in group III and did not cause any changes in brain MAO activity. Clonidine lowered blood pressures of group III but did not change MAO activities. The data from the present study suggest that abnormally low MAO activities in SHR brain may be one of the underlying factors for the susceptibility to hypertension and that the decrease in noradrenergic neuronal activities through presynaptic α -receptor activation by clonidine may not be related to the changes of brain MAO activities.

血壓의 조절 기전에 있어서 神經係의 역할은 매우 重要하며^{1~4)} 血管係에 대한 직접적인 영향은 주로 말초신경계의 活性에 의해 좌우된다.^{5,6)} 그러나 이들 말초신경계의 活性은 중추신경계의 직접적인 지배하에서 민감하게 조절된다는 報告가 있었으며⁷⁾ 특히 뇌 중의 monoamine성 신경계가 중요한 역할을 한다는 증거들이 있다.^{8~11)}

신경전달물질로서 血壓 변화에 주된 연관성을 지닌 norepinephrine, epinephrine 등은 신경 말단에 存在하는 osmophillic granule에 존재하고 있으며^{12,13)} 신경 말단의 미토콘드리아(mitochondria)에 存在하는 monoamine oxidase(MAO)에 의해 분해된다. 그러므로 노르아드레날린성(noradrenaline성) 신경 활성의 變化와 MAO 활성변화의 상관 관계를 알아보는 것은 흥미로운 일이라 할 수 있다.

노르아드레날린성 신경 말단에 存在하는 presynaptic α -receptor는 수용체에 대한 효능제(agonist)의 자극을 받으면 신경 말단으로부터 유리되는 노르에피네프린(norepinephrine)의 量을 감소시키고 이 結果 신경 말단內的 노르에피네프린의 함량이 증가하면서 노르아드레날린성 신경활성이 감소된다.¹⁴⁾ 이러한 노르아드레날린성 신경 활성은 血壓의 변화에 影響을 미치기 때문에¹⁵⁾ 노

트리아드레나린성 신경 활성의 變化를 측정하는 기준으로 혈압변화를 活用할 수 있다.

따라서 本 實驗에서는 선천성 고혈압쥐(SHR)와 후천적으로 고혈압을 유발시킨 쥐에 clonidine 을 投與하여 presynaptic α -receptor를 活性化시켰을 때 나타나는 도르아드레나린성 신경 활성을 血壓變化를 기준으로 측정하여 이 때의 MAO 활성과 비교함으로써 presynaptic α -receptor와 MAO활성의 상관 관계를 알아보았다.

實驗 方法

實驗動物 및 試藥—實驗動物로는 동일 조건에서 사육한 체중 200~300g의 雄性 Sprague-Dawley (SD)系 rats와 연령이 약 11주 이면서 체중 200~250g의 雄性 SHR을 사용했다.

사용한 試藥 中 clonidine은 베링거 인겔하임에서 제공받았으며 serotonin creatinine sulfate complex와 deoxycorticosterone acetate 및 bovine serum albumin은 Sigma Chemicals (St. Louis, Mo)에서 구입하였고 n-butanol, folin-ciocalteu reagent, cupric sulfate, zinc sulfate, urethane, cotton oil等 기타 시약은 1級 또는 그 이상의 순도를 가진 시약을 使用하였다.

쥐에서의 후천성 高血壓 유발—정상 혈압의 SD系 rats에 cotton oil에 녹인 deoxycorticosterone acetate (DOCA)를 3일에 한번씩 12.5mg/kg의 용량으로 피하주사하여 DOCA-Salt 처리에 의한 후천성 고혈압을 유발시켰다. 이 때 먹이는 자유로이 섭취할 수 있도록 해 주었고 식수로서 1%—NaCl용액을 주었다. 쥐의 약물 투여 8日, 14日, 21日後의 세 그룹으로 나누어 혈압, 맥박, MAO 활성을 측정하였다.

선천성 및 후천성 高血壓 쥐에 대한 Clonidine투여—선천성 및 후천성 고혈압쥐를 urethane (1.5g/kg)으로 마취시킨 後 femoral vein을 통해 clonidine (20 μ g/kg)을 정맥주사하고 나서 약 5 분 경과 후에 혈압, 맥박을 측정하고 즉시 頭部를 절단하여 얻은 뇌조직에서 MAO 활성을 측정 하였다. 선천성 및 후천성 고혈압 쥐의 대조군은 clonidine 대신 동일 용적의 생리식염수를 투여 받았다.

혈압 및 맥박의 測定—實驗動物에 urethane(1.5g/kg)을 복강內로 주사하여 쥐가 완전히 마취되 면 고정대에 묶어 고정시킨後 왼쪽 경동맥에 폴리에틸렌 튜브(23G)를 삽입하여 빠지지 않도록 묶고 나머지 한 쪽 끝을 transducer를 통해 physiograph (Washington 400MD 4R)에 연결하여 혈압

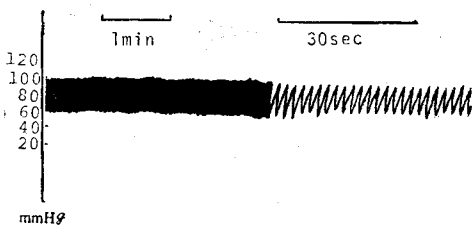


Fig. 1—An example for the measurement of blood pressure and heart rate. Blood pressures were taken at systolic stages and heart rates represent the number of appearance of systolic and diastolic blood pressure as one unit in a minute.

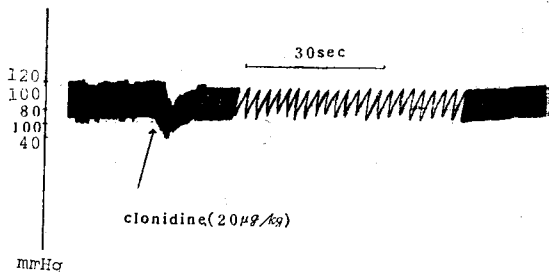


Fig. 2—Effect of clonidine on blood pressure and heart rate.

과맥박을 측정하였다. 이 때 혈액의 응고를 막기 위하여 헤파린 용액(50unit/ml)를 사용했다. 쥐의 혈압 및 맥박과 clonidine투여에 의한 이 값의 변화를 physiograph로 측정하여 기록시킨 예가 Fig. 1과 Fig. 2에 나타나 있다.

MAO 활성의 測定—1) 효소 추출; 쥐의 頭部를 절개한 後 즉시 뇌를 꺼내서 무게를 재고 10배 용량의 0.32M 氷冷한 sucrose 용액을 가한 후 Tissumizer (Teckmar Co.)를 사용해 10초간 3회 10,000r.p.m.으로 조직을 분쇄하여 균질화 하였다. 이 조직균질액(homogenate)을 Whittaker等の 方法에 따라 미토콘드리아 분획을 얻었다. 여기에 0.32M 氷冷한 sucrose 용액을 가하여 단백질이 1mg/ml 前後의 농도가 되도록 희석시켜 효소원으로 使用하였다.

2) MAO 활성 측정; MAO 활성의 測定은 Sjoerdsma¹⁸⁾等の 方法에 따라 실시하였다. 이때 MAO에 대한 기질로서 세로토닌(serotonin)을 사용하였으며 MAO 활성은 효소에 의해 대사된 세로토닌의 量을 기준으로 $\mu\text{mole/mg protein/hr}$ 로써 나타내었다. MAO에 의해 대사된 세로토닌의 量은 반응액 속에 存在하는 반응前後의 세로토닌 量의 차이로서 정했으며 이때 세로토닌의 정량은 Udenfriend等¹⁹⁾의 方法에 의하였다.

3) 단백질 정량; 효소원으로 준비한 뇌 미토콘드리아 분획內의 단백질 함량은 Lowry等²⁰⁾의 方法에 따라 測定하였다.

實驗結果 및 考察

선천성 및 후천성 高血壓 쥐에서의 뇌 MAO 활성과 혈압, 맥박—본 실험에서 취급한 각 동물군의 혈압, 맥박 및 MAO 활성은 Table I에 표시되어 있다. 정상 혈압 쥐의 혈압(mmHg), 맥박(beats/min), MAO 활성($\mu\text{mole/mg protein/hr}$)은 각각 81.0 ± 2.6 , 301.4 ± 7.9 , 0.117 ± 0.006 이었다.

선천성 고혈압 쥐에서는 혈압($p < 0.05$)과 맥박($p < 0.01$)이 정상 혈압 쥐에 비해 각각 증가된 상태였으며 뇌 MAO 활성의 경우 유의성 있게 감소된 상태($p < 0.05$)로 관찰되었다.

후천성 고혈압 쥐의 경우에는 DOCA와 NaCl 투여後 21日군에서는 고혈압 발생($p < 0.05$)과 맥박 증가 현상($p < 0.05$)이 관찰되었으나 8日군, 14日군에서는 혈압과 맥박에서 변화를 찾을 수 없었다. 그러나 MAO 활성의 경우에는 고혈압 유발 後에 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

선천성 고혈압 쥐에서 고혈압 유발 요인의 하나로서 MAO 활성의 비정상성이 그 가능성을 나타낸 것은 Kumagi等²¹⁾에 의해 밝혀진 바 있다. 이 연구자들은 선천성 고혈압 쥐의 경우, 정상쥐와 비교했을 때 Kynuramine을 기질로 하는 MAO 활성이 심장에서는 유의성 있게 높았고 반대로 뇌에서는 저하되는 경향을 보였다고 보고한 바 있다.

MAO는 MAO-A와 MAO-B의 두 종류로 분류되며²²⁻²⁸⁾ 그 기능과 분포가 뇌를 포함한 신체 조직에 따라 다르다. 이 분류의 주된 기준이 기질의 종류에 의한다^{23,27)}는 것은 이미 밝혀진 사실이다. Kynuramine은 MAO-A와 MAO-B에 대한 공통적인 기질인 반면 세로토닌(serotonin)은 MAO-A에 대한 선택적인 기질로 알려져 있다.

Kynuramine을 기질로 사용한 Kumagi等の 실험 결과는 MAO-A 및 MAO-B 두 가지 활성을 비선택적으로 동시에 나타내기 때문에 이 두 가지 중의 어느 효소가 선택적으로 고혈압 발생 요인이 될 가능성이 있는지에 대한 답은 제공하지 않았다.

세로토닌을 기질로 사용한 本實驗의 결과는 선천성 고혈압 쥐의 뇌에 존재하는 MAO-A의 활성결핍이 고혈압 유발에 선택적인 유전성 요인의 한 가지로 作用할 가능성이 있음을 나타내고 있

Table I—Blood pressures, heart rates and brain MAO activities of SHR and acquired hypertensive rats.

Group			BP(mmHg)	HR (beats/min)	MAO Activity
NR			81.0±2.6(29)	301.4±7.9(29)	0.117±0.006(12)
SHR			116.3±6.7(16)*	337.2±11.8(16)**	0.094±0.004 (6)*
NR	8th day	Sham	86.7±2.0 (3)	336.0±3.5 (3)	0.120±0.014 (3)
		DOCA·Salt	83.8±1.5 (6)	311.4±21.4 (6)	0.113±0.003 (6)
	14th day	Sham	85.0±2.0 (4)	316.9±22.0 (4)	0.117±0.005 (4)
		DOCA·Salt	86.0±3.0 (6)	315.8±13.1 (6)	0.119±0.006 (6)
	21th day	Sham	73.0±3.8 (4)	318.6±39.3 (4)	0.139±0.018 (4)
		DOCA·Salt	95.0±3.3 (5)***	380.7±17.0 (5)***	0.130±0.011 (5)

Each value represents the mean±S.E.M. of replicates as indicated in each parenthesis.

NR: Normotensive SD rats. SHR: Spontaneously hypertensive rats. DOCA: Deoxycorticosterone acetate (12.5mg/kg) in 2.5ml of cotton oil were injected subcutaneously every third day until measurement of blood pressure. Salt: Salt were added to drinking water as 1% concentration. Unit of MAO activity: μ moles/mg protein/hr.

*Differences statistically significant from NR ($p<0.05$), **Differences statistically significant from NR ($p<0.01$), ***Differences statistically significant from corresponding sham control ($p<0.05$)

다. MAO-A의 결핍에 기인하는 이차적인 현상으로서 內因性 신경전달물질의 비정상 상태가 이들 동물 뇌에 存在하는지 여부는 고혈압 유발 요인의 기전적인 해결을 위해 계속 연구해야 할 과제이며 또한 MAO-B의 선택적인 관련 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 문제점들에 대한 후속 연구가 현재 본 교실에서 진행되고 있다.

선천성 및 후천성 고혈압 쥐의 뇌 MAO 활성에 미치는 Clonidine의 影響—Clonidine의 투여 때에 선천성 및 후천성 고혈압 쥐에서 관찰되는 혈압, 맥박 및 뇌 MAO 활성의 변화가 Table II

Table II—Effects of clonidine on blood pressures, heart rates and brain MAO activities of SHR and acquired hypertensive rats.

Group	BP(mmHg)	HR (beats/min)	MAO Activity ⁴⁾
SHR	102.2±4.9 (4)	359.2±21.2(4)	0.105±0.004(4)
SHR+Clonidine ¹⁾	63.3±6.7 (6)*	265.3±12.1(6)*	0.125±0.013(6)
NN+DOCA·Salt ²⁾	95.0±3.3 (5)	380.7±17.0(5)	0.130±0.011(5)
NR+DOCA·Salt+Clonidine ³⁾	60.0±2.0 (4)*	240.4±17.4(4)**	0.131±0.012(4)

Each value represents the mean±S.E.M. of replicates as indicated in each parenthesis.

SHR: Spontaneously hypertensive rats. NR: Normotensive SD rats. 1) and 3): Clonidine (20 μ g/kg) in 2.5ml of D.W. were intravenously injected. 2) and 3): DOCA·Salt means that deoxycorticosterone acetate (12.5mg/kg) in 1.3ml of cotton oil (s.c. inj.) every third day and salt as 1% of drinking water were given to NR and at 21st day each test was carried out. 4): Unit of MAO activity was μ mol/mg protein/hr.

*Differences statistically significant from correspondig groups without clonidine treatment($p<0.05$).

**($p<0.001$)

에 표시되어 있다. Clonidine의 투여는 선천성 고혈압 쥐에서 혈압($p < 0.05$), 및 맥박($p < 0.05$)을 유의성 있게 저하시켰으나 MAO 활성에는 변화를 초래하지 않았다.

후천성 고혈압 쥐에서는 clonidine이 혈압($p < 0.05$)과 맥박($p < 0.01$)을 유의성 있게 저하시켰으나 MAO활성에는 유의성 있는 변화를 초래하지 않았다.

DOCA-Salt 처치에 의한 고혈압 발생쥐에 있어 심장, 창자 및 비장 等 여러 조직에서의 연구中 內因性 노르에피네프린(endogenous norepinephrine)의 turnover rate가 증가하고 노르에피네프린의 조직內 농도가 감소됨이 보고된 바 있다.²⁹⁻³²⁾ 이러한 노르에피네프린 함량의 감소는 그 대사효소인 MAO의 활성 증감과 연결시켜 생각해 볼 수 있으나 本 實驗의 경우 DOCA-Salt 처치後 21日에 고혈압 발생만이 뚜렷했을 뿐 MAO 활성은 정상군과 비교하여 유의성 있는 차이가 없었으므로 노르에피네프린 turnover에 미치는 MAO 활성의 영향은 크지 않은 것으로 思料된다. 그러나 동일한 뇌조직에서의 효소 활성과 amine turnover의 동시 규명의 필요성은 여전히 있다고 하겠다.

선천성 또는 후천성 고혈압 쥐에 clonidine을 투여하면 presynaptic α -receptor가 活性化 되어 노르에피네프린의 유리가 감소되고, 그 결과 노르아드레날린성 신경 활성이 감소한다고 알려져 있다.^{15,17)} Clonidine을 투여하고 그 때의 MAO 활성변화를 관찰한 본 실험에서는 MAO 활성 자체에 아무런 變化를 찾아볼 수 없었다. Clonidine에 의한 신경 활성의 감소 時에 MAO 활성에 변화가 없다는 사실은 첫째로 clonidine 投與에 의한 신경 말단內의 신경전달물질 量의 變化가 MAO에 대한 효소유도 또는 효소억제를 유발시킬수 없을 만큼 작았다고도 생각될수 있고 둘째, clonidine을 투여하였을 때 신경 말단內에서의 신경전달물질 量의 變化는 충분하였지만 MAO 자체의 효소 특성에 의해 효소유도나 효소억제가 유발되지 않았다고도 생각할 수 있다.

本 實驗은 clonidine을 단 1回 投與하여 MAO 활성 변화를 測定하였기 때문에 전자의 해석이 더 타당할 것으로 생각되며 실험 結果로 미루어 보아 presynaptic α -receptor의 活性化와 MAO 활성 사이에는 상관 관계가 없음을 알 수 있었다. 그러나 clonidine의 반복 投與 時의 노르아드레날린성 신경 활성 저하와 MAO 활성의 상관 관계에 대해서는 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

結 論

선천성 고혈압 쥐와 DOCA-Salt 고혈압(후천성 고혈압) 쥐에서 presynaptic α -receptor와 뇌 MAO 활성과의 상관 관계를 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 선천성 고혈압 쥐의 뇌 MAO-A 활성은 정상 혈압 쥐에 비하여 낮았다.
2. 정상 혈압 쥐에 DOCA 投與 21日 後에 고혈압이 유발되었으나 MAO-A 활성에는 變化가 없었다.
3. Clonidine 投與에 의해 선천성 고혈압 쥐의 血壓은 정상 수준으로 저하되었으나 MAO-A 활성에는 變化가 없었다.
4. Clonidine 投與에 의해 DOCA에 의한 후천성 고혈압은 정상 수준으로 저하되었으나 MAO-A 활성은 變化하지 않았다.
5. 선천성 고혈압 쥐의 비정상적인 뇌 MAO-A 활성 저하 상태는 고혈압 유발의 유전성 요인 중의 하나가 될 가능성이 있다.
6. Clonidine에 의한 노르아드레날린성 신경 활성의 저하는 MAO-A 활성 變化와 상관성을 나타내지 않았다.

文 獻

1. H.A.J. Struyker-Boudier, *Catecholamine receptors in nervous tissue*, Studentenpers, Nijmegen, pp.1-164, (1975).
2. D.M. Kuhn, W.A. Wolf and W. Lovenberg, Pressor effects of electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 403 (1980).
3. M.J. Antonaccio, Neuropharmacology of central mechanisms governing the circulation. In *Cardiovascular Pharmacology*, ed. M.J. Antonaccio, New York: Raven, pp.131-65 (1977).
4. P.M. Vanhoutte, R.C. Webb and M.G. Collis, Pre- and post-junctional adrenergic mechanisms and hypertension. *Clin. Sci.* **59**, 211s (1980).
5. P.M. Vanhoutte, T.J. Verbeuren and R.C. Webb, Local modulation of the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* **61**, 151 (1981).
6. M.F. Lokhandwala and D.C. Eikenberg, Presynaptic receptors and alterations in norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **33**, 1527 (1983).
7. K. Nakamura and K. Nakamura, Activation of central noradrenergic and adrenergic neurons in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Jap. Heart J.* **19**, 635 (1978).
8. J.M. Saavedra, H. Grobecker and J. Axelrod, Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Cir. Res.* **42**, 529 (1978).
9. Y. Yamori, W.D. Jong, H. Yamabe, W. Lovenberg and A. Sjoerdsma, Effects of L-dopa and inhibitors of decarboxylase and monoamine oxidase on brain noradrenaline levels and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Pharmac.* **24**, 690 (1972).
10. A. Ito and S.M. Schanberg, Central nervous system mechanisms responsible for blood pressure elevation induced by p-chlorophenylalanine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**, 65 (1972).
11. S.E. Robinson, Noradrenergic central control of blood pressure. *Fed. Pro.* **43**, 16 (1984).
12. F.E. Bloom, Ultrastructural identification of catecholamine-containing central synaptic terminals. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 333 (1973).
13. J.R. Cooper, F.E. Bloom and R.H. Roth, *The biochemical basis of neuropharmacology*. 3rd ed. Oxford University Press, New York, 102 (1978).
14. K. Starke and H.J. Schumann, Zur peripheren sympathikushemmeden wirkung des clonidines. *Experientia* **27**, 70 (1971).
15. *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. (ed. A. Goodman, Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman). Macmillan publishing Co. Inc., 797 (1980).
16. 姜斗熙, 生理學, 연세대학교 의과대학, 84 (1978).
17. V.P. Whittaker and L.A. Barker, *Methods of neurochemistry*. (ed. R. Fried). Marcel Dekker, New York, 1972.
18. A. Sjoerdsma, T.F. Smith, T.D. Stevenson and S. Udenfriend, Metabolism of 5-hydroxytryptamine by monoamine oxidase. *Pro. Soc. Exp. Biolo.* **89**, 36 (1955).
19. S. Udenfriend, H. Weissbach and B.B. Brodie, *Methods of Biochemical Analysis*. (ed. D. Glick), **6**, Interscience publishing Inc., New York, 95 (1958).
20. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.S. Randall, Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
21. H. Kumagi, T. Utagawa, H. Yamada, Y. Yamori and K. Okamoto, Amine oxidase activity in various tissues of the spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Heart J.* **15**, 192 (1974).
22. J.P. Johnston, Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1285 (1968).
23. H.-Y.T. Yang and N.H. Neff, The monoamine oxidases of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J. Pharm. Exp. Ther.* **189**, 733 (1974).
24. H.L. White and A.T. Glassman, Multiple binding sites of human brain and liver monoamine oxidase: substrate specificities, selective inhibitions, and attempts to separate enzyme forms. *J. Neurochem.* **29**, 987 (1977).

25. B. Ekstedt, Substrate specificity of the different forms of monoamine oxidase in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1133 (1976).
27. C.H. Donnelly and D.L. Murphy, Substrate-and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 853 (1977).
27. C.J. Fowler, B.A. Callingham, T.J. Mantle and K.-F. Tipton, Monoamine oxidase A and B: A useful concept? *Biochem. Pharmacol.* **27**, 97 (1978).
28. K. Oguchi, S. Kobayashi, T. Uesato and K. Kamijo, Binding and deamination of various substrates by types A and B monoamine oxidase in bovine brain mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1515 (1982).
29. J. de Champlain, R.A. Mueller and J. Axelord, Turnover and synthesis of norepinephrine in experimental hypertension in rats. *Cir. Res.* **25**, 285 (1969).
30. J. de Champlain, L.R. Krakoff and J. Axelord, A defect in accumulation of tritiated norepinephrine in experimental hypertension. *Life Sci.* **5**, 2283 (1966).
31. J. de Champlain, L.R. Krakoff and J. Axelord, Catecholamine metabolism in experimental hypertension in the rat. *Cir. Res.* **20**, 136 (1967).
32. L.R. Krakoff, J. de Champlain and J. Axelord, Abnormal storage of norepinephrine in experimental hypertension in the rat. *Cir. Res.* **21**, 583 (1967).