약학회지 제30권 제 3 호 157~162 (1986)
Yakhak Hoeji Vol. 30, No. 3

적출한 흰쥐 대동맥에 있어서 postsynaptic α_1-, α_2-아드레날린 수용체에 관한 연구

임광진 · 조윤성 · 고광호 · 김미영*
서울대학교 약학대학 · *중앙대학교 약학대학

(Received June 11, 1986)

Postsynaptic α_1- and α_2-Adrenoceptors in Rat Isolated Aorta

Im Guang Jin, Cho Yun Sung, Ko Kwang Ho and Mie Young Kim*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, and
**College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 151, Korea*

Abstract—α-Adrenoceptor subtypes in the isolated rat aortic strips were examined by using agonists and antagonists which have varying selectivity for α_1- and α_2- adrenoceptors. Norepinephrine and phenylephrine produced a similar magnitude of maximum contractions. pA_2 values for prazosin and yohimbine were not significantly different using norepinephrine or phenylephrine as the agonist, suggesting a single population of alpha-adrenoceptor. Contractile responses produced by alpha-agonists were antagonized more effectively by prazosin (approximately 1000 fold) than by yohimbine.

α-아드레날린 수용체는 α_1과 α_2로 세분되며 일반적으로 postsynaptic 아드레날린 수용체는 α_1형, presynaptic 수용체는 α_2형이라고 구분되어 왔다.[1~4] 그러나 α_2-아드레날린 수용체와 유사한 성질을 갖는 수용체가 혈관 평활근을 포함한 여러 조직의 postsynaptic 부위에도 존재함이 밝혀졌다.[5~8]

흰쥐 대동맥에는 postsynaptic α_2-아드레날린 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있는데 이러한 결론은 α_2 수용체에 선택적으로 작용하는 효능약인 클로니딘이나 길항약인 요힘빈이 흰쥐 대동맥의 α수용체 대하여 비교적 큰 친화성을 나타낸다는 실험결과에 근거를 둔 것이다.[9,10] 그러나 Beckeringh 등[11]은 α_1 수용체에 대하여 높은 선택성이 있는 길항약 프라조신이 여러 가지 효능약들에 의한 흰쥐 대동맥의 수축반응을 요힘빈보다 훨씬 더 강력하게 길항하므로 흰쥐 대동맥의 수용체는 α_1형이라고 보고하였다. 또한 Godfraind 등[12]은 흰쥐 대동맥의 α-아드레날린 수용체에 대한 여러 가지 α-효능제의 친화성의 순서를 비교해 본 결과 이 수용체는 α_1 및 α_2-아드레날린 수용체 모두의 특성을 가진다고 보고하였다.

본 실험에서는 α-아드레날린 수용체에 대하여 비선택성 효능약인 노르에피네프린과 α_1 선택성 효능약인 페닐에프린을 사용하고 길항약으로서 α_1 및 α_2 수용체에 각각 선택성인 프라조신 및 요힘빈을 사용하여 효능약에 의한 농도—반응곡선을 길항약이 이동시키는 정도를 측정하여 흰쥐 대동맥의 postsynaptic 부위에 존재하는 α-아드레날린 수용체의 subtype을 확인하고자 하였다.

실 험 방 법

실험재료—1) 실험동물 및 시약—실험동물로서는 동일 조건에서 사육한 200~300g의 웅성 Wistar 흰쥐를 사용하였다.

시약중 (−)-Norepinephrine bitartrate, (−)-phenylephrine hydrochloride, yohimbine hydrochloride 및 propranolol hydrochloride는 Sigma Chemicals(St. Louis, Mo)에서 구입하였고 pra-

zosin hydrochloride는 Pfizer에서 제공받았으며 기타 시약은 1급 또는 그 이상의 순도를 가진 시약을 사용하였다.

실험방법—1) 흰쥐 대동맥—흰쥐의 머리에 타격을 가하여 실혈 치사시킨 후 흉부 대동맥을 적출하여 95% O_2—5% CO_2 혼합기체로 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액이 들어있는 접시에 놓고 지방과 결합조직을 제거하였다. Furchgott 등[13]의 방법에 의하여 대동맥을 나선형으로 잘라서 두께 약 4mm, 길이 약 20mm의 스트립으로 만들고 이것을 10ml Krebs 용액이 들어있는 organ bath에 넣고 현수하였다.

Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 118; KCl, 4.7; $MgCl_26H_2O$, 0.54; $CaCl_2$, 2.5; NaH_2PO_4, 1.0; $NaHCO_3$, 2.5; Glucose, 11; Ascorbic acid, 0.1 (mM). 조직 스트립의 한쪽 끝은 유리막대에 고정시켰으며 다른 한쪽은 polygraph (Washington 400 MD4R)와 연결되어 있는 isometric transducer (Washington Type D)에 실로 연결하였다. Organ-bath 내의 Krebs 용액은 pH 7.4, 온도는 37°C로 유지하도록 하였으며 95% O_2—5% CO_2 혼합기체를 계속 공급해 주었다. 스트립에 0.8g의 resting tension을 가하고 첫번째 농도—반응 곡선을 구하기 전 약 2시간 동안 새로운 용액으로 자주 씻어 주면서 평형상태에 도달하게 하였다. 2번째 농도—반응 곡선을 구하기 전까지는 적어도 1시간의 간격을 두었다.

2) 농도-반응 곡선—먼저 노르에피네프린에 대한 농도-반응 곡선을 구하고 이때의 최고 수축반응을 다른 효능약에 의한 최고 수축반응을 평가하는 기준으로 삼았다. 1시간 동안 스트립을 세척한 후 다시 효능약으로서 노르에피네프린 혹은 페닐에프린에 대한 농도-반응 곡선을 얻었다. 효능약은 Van Rossum[14]의 방법에 의하여 거의 3배씩 증가시켜 가면서 cumulative하게 넣어 주었다.

효능약의 수축반응에 대한 길항약의 길항정도를 측정하기 위하여 1시간 동안 스트립을 씻어낸 뒤, 효능약을 투여하기 40분 전에 일정 농도의 길항약을 가하고 길항약이 스트립과 반응하도록 하였다. 프라조신은 1nM, 10nM, 100nM, 1μM의 농도를, 요힘빈은 0.1μM, 1μM, 10μM, 100μM의 농도를 사용하였다. 길항약의 존재하에 다시 효능약에 대한 농도-반응 곡선을 구하였다.

실험중 신경에 의한 uptake를 차단하기 위하여 코카인(10^{-5}M)을, β-아드레날린 수용체에 대한 α-아드레날린 수용체 효능약의 작용을 차단하기 위하여 프로프라놀올(10^{-6}M)을, 농도-반응 곡선을 구하기 각각 25분전, 20분전에 가하였다.

농도-반응 곡선은 효능약의 최고 수축반응에 대한 %로 나타내었으며 길항약이 존재하지 않을 때(대조곡선)와 존재할 때의 ED_{50} 값은 그래프 상에서 얻었다.

수용체에 대한 길항약의 친화도를 정량적으로 측정하기 위하여 Arunlakshana 등[15]의 방법에 따라 log(농도비-1)대 log(길항약의 몰농도)의 그래프를 그려서 pA_2 값을 구하였다. 각 농도의 길항약에 대한 농도비는 〔길항약 존재시 효능약의 ED_{50}/길항약 비존재시 효능약의 ED_{50}〕로 계산하였다. 모든 직선은 linear regression에 의하여 구했다.

3) 통계처리—모든 실험치는 평균±S.E.M으로 나타내었으며 통계적인 유의성은 student's t-test ($p<0.05$)에 의하여 평가하였다.

실 험 결 과

노르에피네프린의 수축반응에 대한 프라조신과 요힘빈의 길항작용—적출한 흰쥐 대동맥에 대하여 노르에피네프린은 10^{-9}~10^{-5}M에서 농도 의존성 수축반응을 일으켰다. ED_{50}은 $(1.2\pm0.6)\times10^{-8}$M이었다. 프라조신과 요힘빈의 존재시 노르에피네프린에 의한 농도-반응 곡선은 대조의 농도-반응 곡선의 모양과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 프라조신과 요힘빈은 노르에피네프린의 대조곡선을 오른쪽으로 평행 이동시켰으며 농도가 증가함에 따라 그 이동정도는 점차로 커졌다. 또한 프라조신과 요힘빈은 본 실험에서 사용한 농도 범위에서 노르에피네프린의 최고 수축반응을 억제하지 않았다(Fig. 1, 2).

노르에피네프린에 대한 프라조신과 요힘빈의

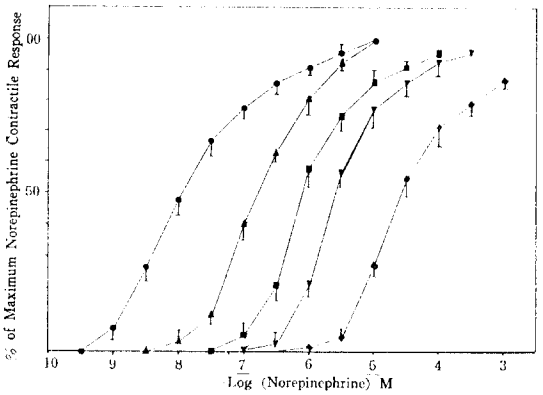

Fig. 1-Antagonism by prazosin of the contractile responses to norepinephrine in the isolated rat aorta. Cumulative dose-response curves were determined in the absence of prazosin (•) or after 40 min of equilibrium with 1nM (▲), 10nM (■), 100nM (▼), or 1μM (◆) prazosin. Each point represents the mean±S.E.M. of three to four determinations on separate preparations.

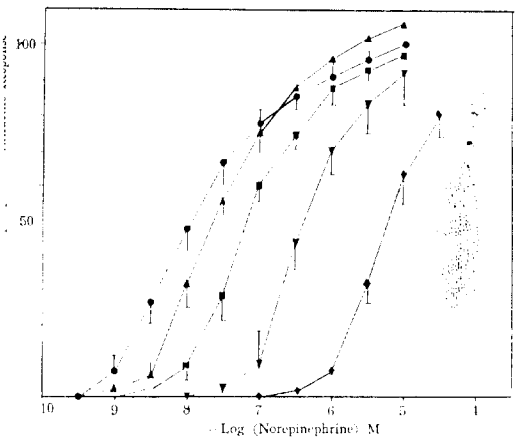

Fig. 2-Antagonism by yohimbine of the contractile responses to norepinephrine in the isolated rat aorta. Cumulative dose-response curves were determined in the absence of yohimbine (•) or after 40 min of equilibrium with 100nM (▲), 1μM (■), 10μM (▼), or 100μM (◆) yohimbine. Each point represents the mean±S.E.M. of three to four determinations on separate preparations.

A_2값은 각각 9.5±0.3, 6.6±0.3으로 프라조신 의한 노르에피네프린의 대조곡선의 이동정도 - 요힘빈에 의한 것보다 약 3log 단위만큼 컸

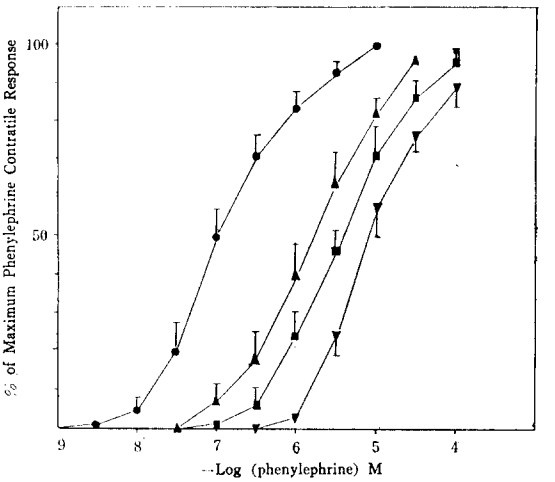

Fig. 3-Antagonism by prazosin of the contractile responses to phenylephrine in the isolated rat aorta. Dose-response curves were determined in the absence of prazosin (•) or after 40 min of equilibrium with 1nM (▲), 10nM(■), or 100nM (▼) prazosin. Each point represents the mean±S.E.M. of three to four determinations on separate preparations.

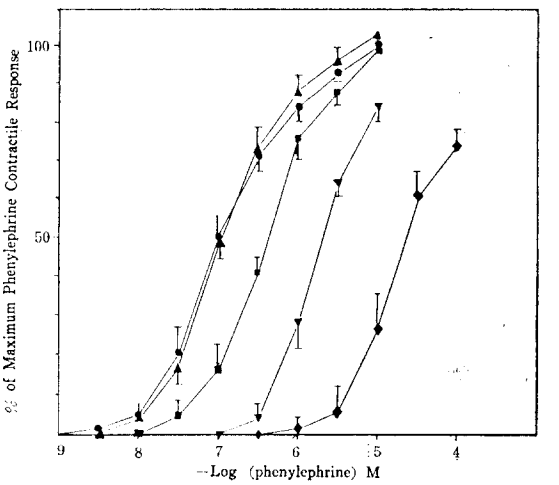

Fig. 4-Antagonism by yohimbine of the contractile responses to phenylephrine in the isolated rat aorta. Dose-response curves were determined in the absence of yohimbine (•) or after 40 min of equilibrium with 10μM (▲), 1μM (■), 10μM (▼), or 100μM (◆) yohimbine. Each point represents the mean±S.E.M. of three determinations on separate preparations.

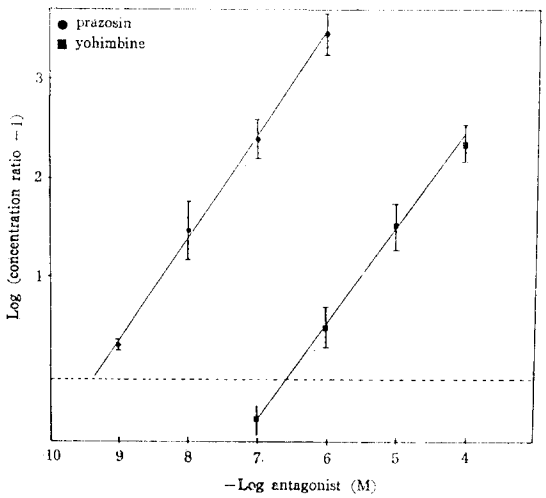

Fig. 5-Schild plots for prazosin and yohimbine against norepinephrine in the isolated rat aorta.

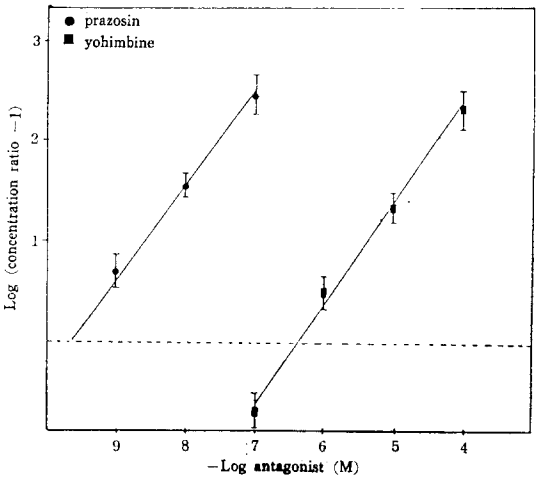

Fig. 6-Schild plots for prazosin and yohimbine against phenylephrine in the isolated rat aorta.

다. Schild plot의 기울기는 각각 1.03, 0.94로 이론값인 1과 유의성있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

페닐에프린의 수축반응에 대한 프라조신과 요힘빈의 길항작용—페닐에프린은 10^{-9}M~10^{-5}M에서 농도 의존성 수축반응을 일으켰다. ED_{50}는 $(1.4\pm0.8)\times10^{-7}$M이었으며, 페닐에프린에 의한 최고 수축반응은 노르에피네프린에 의한 최고 수축반응과 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

프라조신과 요힘빈의 존재시 페닐에프린에 의한 농도-반응 곡선은 대조의 농도-반응곡선의 모양과 차이를 나타내지 않았다. 프라조신과 요힘빈은 각각 페닐에프린의 대조곡선을 오른쪽으로 평행 이동시켰으며 이들 길항약의 농도를 증가시켜감에 따라 이동정도도 점점 커졌다. 또한 이 두 길항약에 의하여 페닐에프린의 최고 수축반응은 억제되지 않았다(Fig. 3, 4).

페닐에프린에 대한 프라조신과 요힘빈의 pA_2 값은 각각 9.5±0.3, 6.6±0.3이었으며 프라조신에 의한 이동의 정도는 요힘빈에 의한 것보다 약 3log 단위만큼 컸다. Schild plot의 기울기는 각각 0.97 및 1.08로 이론값인 1과 유의성있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6).

고 찰

수용체에 대한 효능약 혹은 길항약의 상대적 친화도를 비교함으로써 수용체 혹은 수용체 subtype를 분류할 수 있으며 이 방법은 신뢰도가 높은 방법의 하나로서 평가되고 있다.[16] 길항약의 수용체에 대한 친화도는 흔히 pA_2 값으로 나타내고 있다. 일정 농도의 상경적 길항약의 존재시 효능약의 농도-반응 곡선의 이동은, 효능약들이 동일한 수용체에 작용한다면, 모두 같은 정도로 이동한다. 또한 길항약에 의한 효능약의 농도-반응 곡선의 이동의 정도는 효능약에 관계없이 길항약의 농도 및 친화도에 의해서만 결정된다고 한다.[16]

흰쥐 대동맥에 있어서 노르에프네프린과 페닐에프린은 모두 높은 친화성을 가졌으며 길항약의 친화도에 있어서도 역시 α_1에 선택적인 프라조신이 높은 친화성을 나타내어 α_1형의 아드레날린 수용체가 존재하고 있음을 나타내고 있다(Fig. 1, 3). 노르에피네프린 혹은 페닐에프린의 농도-반응 곡선을 이동시키는 정도는 프라조신이 α_2 선택성 길항약인 요힘빈보다 약 1,000배 가량 강한 것으로 나타났다.

또한 프라조신과 요힘빈에 의한 효능약의 농도-반응 곡선 이동의 정도는 효능약으로서 노르에프네프린이나 페닐에프린을 사용했을 때 모두 같은 정도로 이동시켰다. 즉 노르에피네프린과

페닐에프린에 대한 프라조신의 pA_2 값은 모두 9.5였으며, 노르에피네프린과 페닐에프린에 대한 요힘빈의 pA_2 값은 각각 6.6 및 6.5로 모두 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 흰쥐 대동맥의 아드레날린 수용체는 α_1 형이며 단일형의 수용체가 존재함을 시사한다고 보겠다.

본 실험에 얻어진, 적출한 흰쥐 대동맥에서의 페닐에프린에 대한 프라조신의 pA_2 값 9.5는 Randriantosa 등[17]에 의한 9.7과 거의 같았으며 요힘빈의 pA_2 값 6.5는 Randriantosa[17] 등에 의한 7.8이나 Ruffolo 등[10]에 의한 7.7과 비교적 큰 차이를 보였다. 이러한 차이는 실험조건, 조직탈감작(tissue desensitization) 등에 의한 영향 등에 의한 것이라고 간주할 수 있겠지만 본 실험에서 조직 탈감작에 의한 영향은 고려되었기 때문에 정확한 설명을 하기는 어렵겠다.

노르에피네프린과 페닐에프린에 대한 프라조신및 요힘빈의 Schild plot의 기울기는 1에 가까웠는데(Fig. 5, 6) 이는 흰쥐 대동맥에는 단일형의 수용체가 존재하고 있음을 나타낸다고 보겠다.

Ruffolo 등[9,10]은 흰쥐 대동맥의 postsynaptic 아드레날린 수용체는 α_2형이라고 보고하였다. 이것은 클로니딘과 요힘빈이 흰쥐 대동맥에 있어서는 높은 친화도를 보인 반면 postsynaptic α_1-아드레날린 수용체가 존재한다고 알려진 토끼 대동맥[18,19]에 있어서는 친화도가 낮다는 사실에 근거를 둔 것이다. 그러나 최근에 이르러 클로니딘은 비선택성 α 효능약으로서[11] 흰쥐 대동맥의 α^1-수용체에 작용한다는 보고도 있다. 또한 Ruffolo 등[10]은 효능약으로서 페닐에프린과 길항약으로서 요힘빈만을 사용하여 다른 조직간의 pA_2를 비교하였다. 대동맥이 다른 조직에 비하여 비교적 큰 pA_2 값인 7.7을 보였기 때문에 α_2 형이라고 결론을 내린 것이다. 그러나 Randriantosa 등[17]의 결과에 의하면 요힘빈의 pA_2치는 Ruffolo의 실험치와 비슷한 7.8이었으나 페닐에프린에 대한 프라조신의 pA_2 값은 9.7로서 α_1 길항약 프라조신의 친화도가 100배 강하다고 볼 수 있다.

이와 같은 결과로 미루어 보아 pA_2 값에 의하여 수용체의 subtype를 결정함에 있어서 길항약 혹은 효능약의 선택이 중요한 변수로 작용할 것이라고 보겠다.

감사의 말씀

이 논문은 1985년도 한국과학재단 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

문 헌

1) Langer, S.Z.: Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1793 (1974).

2) Drew, G.M. and Whiting, S.B.: Evidence for two distinct types of postsynaptic α-adrenoceptor in vascular smooth muscle *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **67**, 207 (1979).

3) Docherty, J.R. and McGrath, J.C.: A comparison of pre- and post- junctional potencies of several α-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of the rat: Evidence for two types of post-junctional α-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **312**, 106 (1980).

4) Starke, K.: α-adrenoceptor subclassification. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **88**, 199 (1981).

5) Timmermans, P.B.M.W.M. and Van Zweiten, P.A.: The postsynaptic α_2-adrenoceptor. *J. Auton. Pharmacol.* **1**, 171 (1981).

6) Langer, S.Z. and Shepperson, N.B.: Recent developments in vascular smooth muscle pharmacology: The post-synaptic α_2-adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**, 440 (1982).

7) McGrath, J.C.: Evidence for more than one type of post-junctional α-adrenoceptors. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 467 (1982).

8) McGrath, J.C.: The variety of vascular α-adrenoceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **4**, 14 (1983).

9) Ruffolo, R.R., Yaden, E.L. and Waddell, J.R.: Receptor interactions of imidazolines. V. Clonidine differentiates postsynaptic α adrenergic receptor subtypes in tissues from the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **213**, 557 (1980).

10) Ruffolo, R.R., Waddell, J.R. and Yaden, E.L.: Postsynaptic α adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of α_2 adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217**, 235 (1981).

11) Beckeringh, J.J., De Jonge, A., Thoolen, M.J. M.C., Timmermans, P.B.M.W.M., Wiffert, B. and Van Zwieten, P.A.: α_1-adrenoceptor agonism of cirazoline and ST 587 on rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **80**, 578 (1983).

12) Godfraind, T. and Miller, R.C.: α_1 and α_2 agonist action on concentration and Ca fluxes in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **76**, 175 (1982).

13) Furchgott, R.F. and Bhadrakom, S.: Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isoproterenol, sodium nitrite, and other drugs. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **142**, 39 (1953).

14) Van Rossum, J.M.: Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **143**, 299 (1963).

15) Arunlakshana, O. and Schield, H.O.: Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **14**, 48 (1959).

16) Furchgott, R.F.: The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. *Catecholamines* ed. by H. Blaschko and E. Muscholl, pp. 283-335, Springer-Verlag, Berlin (1972).

17) Randriantosa, H., Heitz, C. and Stoclet, J.C. Functional characterization of postjunctional α-adrenoceptors in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol* **75**, 57 (1981).

18) Sheys, E.M. and Green, R.D.: A quantitative study of α adrenergic receptors in the spleen and aorta of the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **180**, 317 (1972).

19) Docherty, J.R., Constantine, J.W. and Starke, K. Smooth muscle of rabbit aorta contains α_1-but not α_2-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **317**, 5 (1981).