

자궁 무스카린수용체의 확인 및 분류

이신웅# · 이정수 · 박영주*

영남대학교 약학대학, *국립보건안전연구원

(Received May 12, 1992)

Identification and Classification of the Muscarinic Receptors in the Uterus

Shin-Woong Lee#, Jeung-Soo Lee and Young-Joo Park*
College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea
*National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

Abstract—The muscarinic acetylcholine receptors of the dog unpregnant uterus were characterized using [³H]quinuclidinyl benzilate(QNB) as a radioligand and the binding of muscarinic receptor agonists and antagonists in the uterus was compared to that in the urinary bladder which contains almost exclusively the M₂ receptors in order to determine the receptor subtypes in the uterus. [³H]QNB binding to uterus and bladder was rapid, saturable and reversible. Scatchard analysis of the saturation data gave linear plots and the Hill coefficients were close to unit, which indicated that each preparation contained a single population of specific binding sites for [³H]QNB. The K_D values(120 pM) for QNB were almost identical in both organs, whereas the B_{max} value of 256 fmol/mg protein in the uterus was significantly different from that of 563 fmol/mg protein in the bladder. Muscarinic agonists and antagonists inhibited in a competitive manner the [³H]QNB binding to the same extent in both organs. The competition binding studies using antagonists(atropine and pirenzepine) exhibited a single binding site and this site had a low affinity for pirenzepine with the K_i value of about 330 nM. However, high and low affinity binding sites were observed with carbachol, methacholine and oxotremorine. These binding studies with agonists and antagonists did not show any differences in drug affinities between uterus and bladder. These results indicate that the muscarinic receptors in the uterus are M₂ receptors which have a low affinity for pirenzepine.

Keywords □ Muscarinic receptor subtypes, uterus, urinary bladder.

Acetylcholine은 중추신경계와 말초신경계의 중요한 신경전달물질중의 하나로서 muscarinic receptor 및 nicotinic receptor에 작용하여 여러가지 생리반응을 일으키며^{1,2)}이 생리반응을 매개하는 이들 receptor의 성질은 방사성 표지약물의 결합실험을 통하여 더욱 용이하게 구명되어 질 수 있다.³⁻⁶⁾

근래 muscarinic receptor에 대한 agonist^{7,8)}와 antagonist⁹⁾들의 반응성의 차이를 관찰한 논문에서 mu-

scarinic receptor에는 성질이 서로 다른 여러가지의 subtype이 존재할 것으로 추정하였으며, 선택적인 muscarinic receptor길항제인 pirenzepine의 소개로¹⁰⁾ 이러한 muscarinic receptor의 subtype 개념이 확실하게 되어 지금에 와서는 muscarinic receptor를 pirenzepine에 affinity가 큰 M₁-receptor와 affinity가 작은 M₂-receptor로 대별하고 있을 뿐만아니라^{11,12)} 이들 receptor subtype의 분포경도와 분포비가 조직에 따라 현저한 차이가 있음도 밝혀졌다. 즉 대뇌, 자율신경절, 폐에는 주로 M₁-receptor가 분포되어있고¹³⁻¹⁵⁾

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

심장, 장평활근, 방광, 외분비선에는 주로 M_2 -receptor가 분포되어 있는 것으로 보고되어 있다.^{12,16,17)}

자궁은 부교감신경인 골반신경(pelvic nerve)과 교감신경인 하장간막(inferior mesentery) 및 하위신경절(hypogastric ganglia)의 절후섬유의 지배(inner-ervation)를 받고 있으므로 그 운동도 자율신경계의 영향을 받으며, 일반적으로 부교감 신경의 흥분이나 muscarinic receptor에 agonist로 작용하는 약물들은 자궁운동을 촉진시킨다.¹⁸⁾ 그러나 생체내에서 자궁운동은 자율신경계보다 내분비계의 영향을 더욱 크게 받으므로 자궁에 있는 자율신경 receptor 특히 muscarinic receptor에 관해서는 기능적실험을 통한 receptor의 존재만이 확인되어 있을 뿐 그 특성이나 분포되어있는 muscarinic receptor subtype의 종류도 알려지지 않고 있다.

본 실험에서는 자궁에 존재하는 muscarinic receptor의 성질과 subtype의 종류를 알아보기 위하여 비임신 개 자궁 muscarinic receptor에 대한 [3H]quinuclidinyl benzilate(QNB)와 수종 효능제 및 길항제의 결합특성을 조사, 분석하였다.

실험방법

실험재료 및 시약— 실험재료는 외관상 건강한 성숙 비임신 개 자궁과 방광을 시중에서 도살 즉시 빙냉의 10 mM Tris·Cl(pH 7.4)용액중에 넣어 급송, 사용하였다. [3H]Quinuclidinyl benzilate([3H]QNB, 42.3 Ci/mmol)는 New England Nuclear사로부터, atropine sulfate, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), carbachol chloride, methacholine bromide, oxotremorine sesquifumarate 및 pirenzepine dihydrochloride는 Sigma사로부터 구입하였고, 이외 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

자궁 및 방광 Homogenate의 제조— 개 자궁 또는 방광을 빙냉의 10 mM Tris·Cl(pH 7.4)용액중에서 깨끗이 씻은 후 무게의 10배가 되는 10 mM Tris·Cl 용액중에 넣어 가위로 세절하고 blender로 15초동안 4번 균질화 하였다. 균질액을 두겹의 cheese cloth로 여과, 45,000×g에서 20분동안 원심분리한 다음 pellet를 10 mM Tris·Cl에 부유시켜 $-70^{\circ}C$ 에 저장, 필요시 실험에 사용하였다.

Homogenate중의 단백질 농도는 bovine serum al-

bumin용액을 표준용액으로하여 Lowry등¹⁹⁾의 방법으로 측정하였다.

[3H]Quinuclidinyl benzilate(QNB)결합실험— [3H]QNB결합실험은 여과법²⁰⁾에 의하였다. 즉 자궁 homogenate를 50 mM Tris·Cl(pH 7.4)와 10 mM $MgCl_2$ 를 함유하는 medium중에서 일정농도의 [3H]QNB와 $37^{\circ}C$ 에서 180분간 반응시킨 다음 즉시 GF/B filter 상에서 여과하고, filter를 50 mM Tris·Cl(pH 7.4) 및 10 mM $MgCl_2$ 를 함유하는 빙냉의 세척액 5 ml로 3회 세척하였다. 세척한 filter를 scintillation vial에 넣고 8 ml의 scintillation fluid를 가한 다음 상온에서 12 시간 이상 방치하였다가 liquid scintillation counter로 그 방사능을 측정하였다.

비특이방사능은 상기 반응액중에 $10^{-5}M$ atropine을 가하여 동일한 조건으로 반응시켰을 때 측정되는 방사능으로 하였으며, [3H]QNB의 muscarinic receptor결합에 의한 특이방사능은 $10^{-5}M$ atropine을 가하지 않았을 때의 전체방사능에서 비특이방사능을 뺀 값으로 하였다.

Muscarinic receptor에 대한 [3H]QNB의 K_D 치 측정— 자궁 muscarinic receptor의 QNB에 대한 affinity와 결합부위농도는 포화결합실험으로 측정하였다. 즉 50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$ 및 여러 농도의 [3H]QNB를 함유하는 medium중에 homogenate를 가하고 최종용적이 5 ml가 되게 한후 $37^{\circ}C$ 에서 180분간 반응시켰다. 반응액을 전술의 방법으로 여과, 세척하여 방사능을 측정한 다음 [3H]QNB 각 농도(F)에서의 [3H]QNB결합(B)를 산출하고 이를 Scatchard plot하여 $B = -K_D \cdot B/F + B_{max}$ 의 식에 의거, K_D 와 B_{max} 를 구하였다.

[3H]QNB결합의 Hill coefficient— Muscarinic receptor에 대한 [3H]QNB결합의 Hill coefficient는 포화결합실험에서 얻은 자료를 $\log Y/1-Y = n \log [F] - \log K_D$ 의 식에 적용하며 Hill plot하여 구하였다 ($Y = B/B_{max}$, $F = [^3H]QNB$ 의 농도, $n = Hill coefficient$).

Muscarinic receptor에 대한 길항제 및 효능제의 K_i 치 측정— 일정농도의 [3H]QNB와 여러농도의 길항제 또는 효능제 존재하에서 homogenate의 [3H]QNB결합을 이들 약물이 없을 때의 [3H]QNB결합의 백분율로 환산하여 [3H]QNB결합의 50%를 억제하는 이들 약물의 농도(IC_{50})를 구한 후, 이를 Cheng등²¹⁾의

Table I— $[^3\text{H}]\text{QNB}$ equilibrium binding to homogenate prepared from dog uterus

| $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding(fmol/mg protein) | |
|---|-------------|
| Total | 112.0 ± 6.8 |
| Nonspecific | 6.4 ± 0.9 |
| Specific | 105.6 ± 5.4 |

Homogenates were incubated with 100 pM $[^3\text{H}]\text{QNB}$ at 37°C for 180 min, and the reactions were stopped by vacuum filtration as described under "METHODS". Nonspecific binding was estimated with the addition of 10^{-5}M atropine to the incubation medium. Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific binding from the total binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ obtained in the absence of 10^{-5}M atropine. Values are the mean ± SEM from three separate preparations.

$K_i = IC_{50}/(1 + F/K_D)$ 에 적용, K_i 치를 산출하였다. ($K_D = [^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 dissociation constant, $F =$ 사용한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 농도).

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합억제에 대한 길항제 및 효능제의 Hill coefficient— $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 길항제 또는 효능제의 경쟁적 결합실험에서 각 농도(D)의 길항제 또는 효능제로 억제되는 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합(I, %)을 $\log(I/100 - I) = n \log[D] - \log[IC_{50}]$ 에 적용시켜 Hill plot하여 Hill coefficient를 구하였다.

실험결과

자궁 homogenate의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 특이결합—자궁 homogenate의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 특이결합과 비특이결합 정도를 알아보기 위하여 100 pM의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 를 함유하는 반응액 중에 homogenate를 가하고 시간경과에 따른 homogenate의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합정도를 측정하였던 바 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 특이결합은 시간경과에 따라 증가되다가 90분에 평형에 도달하였으며 240분간 incubation하여도 평형결합의 변화가 없었다. 그러나 비특이결합은 incubation시간에 영향을 받지 않았으며 전체결합의 10%미만이었다. 즉, 평행상태에서 단백질 mg당 전체결합은 약 100 fmol, 비특이결합은 약 6 fmol로서 측정된 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 약 94%가 muscarinic receptor에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 특이결합인 것으로 추정되었다(Table I).

단백질 농도변화에 따른 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합변화—본 실험에서 결과해석이 용이한 homogenate단백질농도

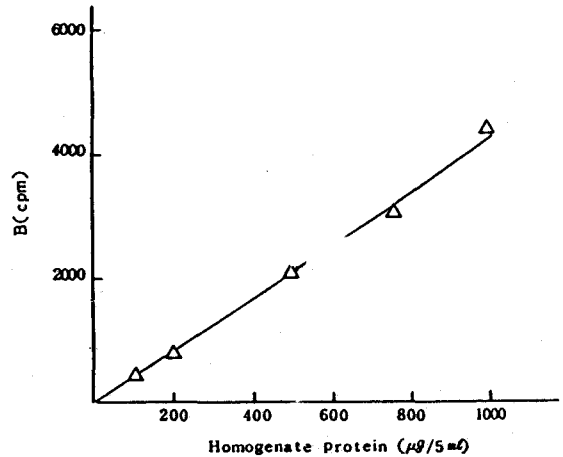


Fig. 1—Tissue linearity of the specific $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding to dog uterus.

Homogenates diluted to various protein concentrations were incubated with 100 pM $[^3\text{H}]\text{QNB}$ for 180 min at 37°C in a final volume of 5 ml. Specific $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding was determined as explained under Table I. All points were determined in triplicate.

를 결정하기 위하여 단백질농도를 달리하면서 단백질농도증가에 따른 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합변화를 조사하여 보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 100 pM $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 존재하에서 homogenate 단백질을 100 μg 에서 1,000 μg 까지 증가시키어도 단백질농도증가에 정비례하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합이 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 결과해석이 용이하면서 homogenate단백질을 절약할 수 있다고 생각되는 800 μg 을 사용하였다.

자궁 muscarinic receptor에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 결합성질—자궁 muscarinic receptor에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합이 포화성인지 또 QNB의 affinity(K_D)와 결합부위 농도(B_{max})가 어느 정도인지를 알아보고 이를 방광 muscarinic receptor 성질과 비교하여 보았다.

Fig. 2는 20~500 pM의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 를 함유하는 반응액중에 자궁 homogenate 800 μg 또는 방광 homogenate 500 μg 을 가하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합실험을 시행한 결과를 나타낸 것으로 두 조직의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합은 다같이 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 농도증가에 따라 증가되다가 500 pM에서 거의 최대에 이르는 포화성결합이었다.

이 포화결합실험자료를 Scatchard plot 했을 때 각 점의 직선상이 인정되었고($r: 0.99$)(Fig. 3), Hill plot

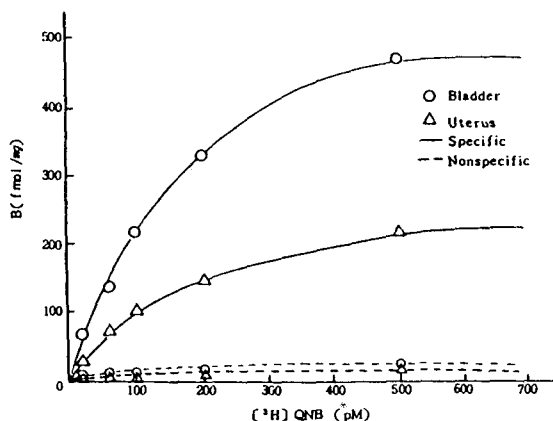


Fig. 2—Saturation binding curve of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding to dog uterus(Δ) and urinary bladder(\circ) homogenates.

Homogenates(uterus: 800 μg , urinary bladder: 500 μg) were incubated with various concentrations of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ in absence or presence of 10^{-5}M atropine for 180 min at 37°C in a final volume of 5 ml. Each point represents the mean of five experiments performed in duplicates.

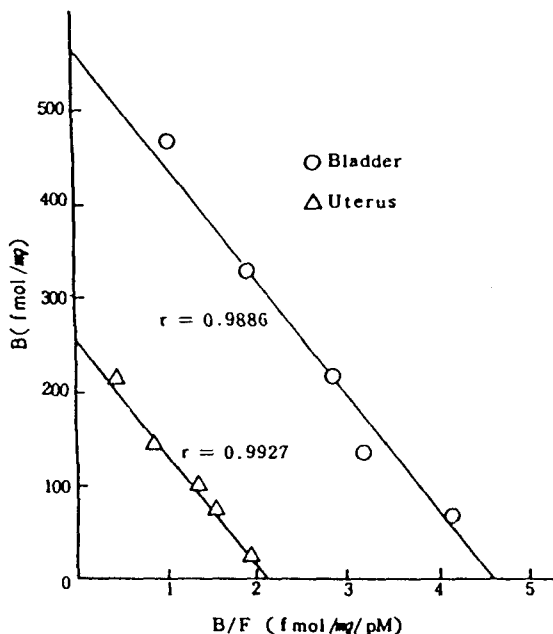


Fig. 3—Scatchard plot of the specific $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding data shown in Fig. 2.

Bound $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (B) was plotted as a function of bound $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (B)/free $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (F).

Table II— $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding data to muscarinic receptors for uterus and urinary bladder in the dog

| Organ | K_D (pM) | Receptor density(B_{max}) (fmol/mg protein) | Hill coefficient (nH) |
|-----------------|-----------------|--|-----------------------|
| Urinary bladder | 124.1 ± 0.9 | 563.4 ± 56.2 | 1.03 ± 0.03 |
| Uterus | 117.9 ± 8.5 | $255.7 \pm 16.1^*$ | 1.05 ± 0.03 |

The binding parameters(K_D and B_{max}) were derived by Scatchard analysis. Hill coefficient(nH) was determined from Hill plot. Values are the mean \pm SEM of five experiments.

*: Significantly different from corresponding values of urinary bladder($p < 0.01$).

했을 때 Hill coefficient 역시 1에 가까웠다(Table II). 이는 자궁에는 방광과 같이 QNB에 대하여 affinity가 같은 단일결합부위가 있음을 말하여 주며 이 결합부위에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 K_D 값도 두 조직에서 다같이 약 120 pM로 유사하였다. 그러나 homogenate 단백질 mg당 receptor의 농도는 방광이 자궁에 비해 2배가 많았다(Table II).

Muscarinic receptor길항제에 의한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합 억제—전술의 실험에서 자궁 muscarinic receptor와 방광 muscarinic receptor가 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합성질면에서 유사함을 알았으므로 QNB와 같이 비선택적인 muscarinic receptor길항제인 atropine과 선택적인 muscarinic receptor길항제인 pirenzepine의 결합성질에도 유사성이 있는지를 조사하여 보았다. 본 실험에서는 atropine 또는 pirenzepine과 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 경쟁적 결합실험을 통하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 50%를 억제하는 비표지약물의 농도(IC_{50})를 추정한 후 이 IC_{50} 치를 K_i 치로 환산하여 비교하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 atropine과 pirenzepine은 자궁과 방광에서 농도증가에 따라 효과적으로 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합을 억제하였으며 이들 약물에 대한 최대 억제정도도 100%로서 두 조직에서 같았다. K_i 치 역시 atropine의 경우 1.2~1.4 nM, pirenzepine의 경우 330~400 nM로서 두 조직에서 유사하였으나(Table III), pirenzepine의 high affinity site는 탐지되지 않았다. 또한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합억제에 대한 atropine과 pirenzepine의 Hill coefficient가 1에 가까웠

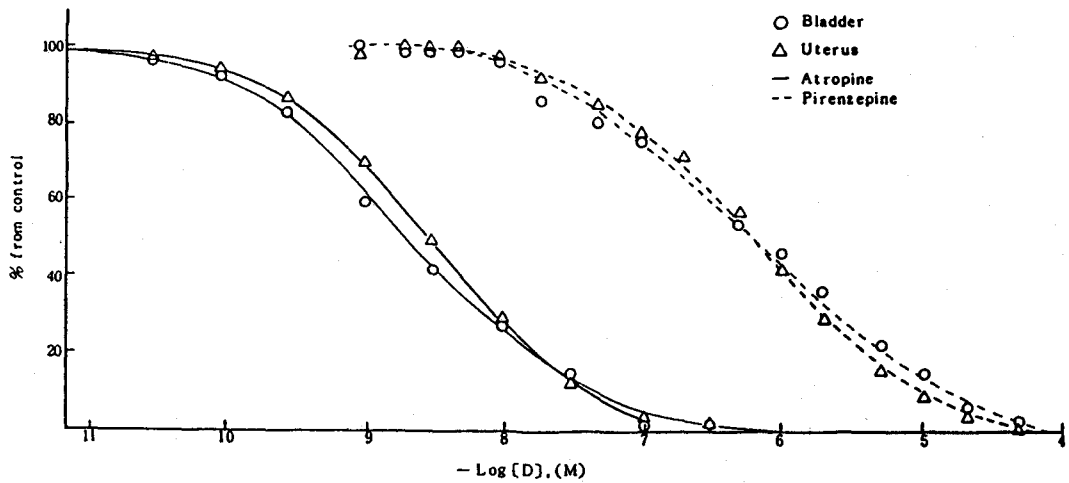


Fig. 4—Inhibition of the specific [^3H]QNB binding to dog uterus(Δ) and urinary bladder(\circ) homogenates by atropine and pirenzepine.

Homogenates(uterus: 800 μg , urinary bladder: 500 μg) were incubated for 180 min at 37°C with 100 pM [^3H]QNB and various concentrations of atropine(—) or pirenzepine(·····) in 5 ml of buffer. Incubations were started by addition of homogenates. Each point represents the mean of three to four determinations.

Table III—The binding behaviors of muscarinic receptor antagonists and agonists in dog uterus and urinary bladder homogenates

| Drug | Organ | IC ₅₀ (nM) | Ki (nM) | nH | n |
|--------------|-------|-----------------------|-------------|-------------|---|
| Antagonist | | | | | |
| Atropine | U | 2.5 ± 0.5 | 1.35 ± 0.27 | 0.92 ± 0.05 | 3 |
| | B | 2.1 ± 0.7 | 1.16 ± 0.41 | 0.93 ± 0.06 | 4 |
| Pirenzepine | U | 600 ± 90 | 325 ± 49 | 0.89 ± 0.06 | 3 |
| | B | 713 ± 61 | 395 ± 34 | 0.87 ± 0.03 | 3 |
| Agonists | | | | | |
| Carbachol | U | 5,060 ± 1,000 | 2,739 ± 541 | 0.59 ± 0.08 | 3 |
| | B | 3,380 ± 900 | 1,872 ± 497 | 0.48 ± 0.06 | 4 |
| Methacholine | U | 2,366 ± 472 | 1,281 ± 255 | 0.60 ± 0.03 | 3 |
| | B | 2,752 ± 831 | 1,524 ± 460 | 0.48 ± 0.02 | 3 |
| Oxotremorine | U | 469 ± 69 | 254 ± 37 | 0.53 ± 0.05 | 3 |
| | B | 353 ± 94 | 196 ± 57 | 0.58 ± 0.02 | 4 |

U: Uterus, B: Urinary bladder.

IC₅₀: Concentration of drug which inhibited 50% of the specific [^3H]QNB binding in the presence of 100pM [^3H]QNB.

Ki: Calculated from $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + F/K_D)$

n: Number of experiments.

다는 점에서(Fig. 5, Table III) 두 조직에는 이들 길항제에 대해서도 단일 부위가 있는 것으로 추정되었다.

Muscarinic receptor 효능제에 의한 [^3H]QNB 결합 억제—자궁 muscarinic receptor에 대한 효능제의

결합 성질을 방광과 비교하기 위하여 이들 약물의 각 조직에 대한 Ki치와 Hill coefficient를 조사하였다.

Carbachol, methacholine 및 oxotremorine은 전술의 길항제보다 높은 농도에서 [^3H]QNB 결합을 억제하였으며 농도증가에 따라 최대 100% 억제하였다.

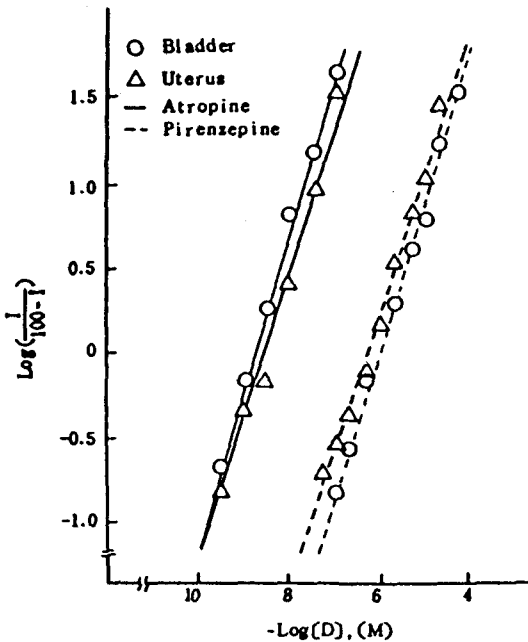


Fig. 5—Hill plot of the inhibition data shown in Fig. 4. I represents the percentage inhibition of [³H]QNB binding.

그러나, 효능제에 의한 [³H]QNB결합억제는 넓은 농도범위내에서 나타났고(Fig. 6), 각 농도에서의 억제 정도를 Hofstee plot 했을 때 각 점의 직선상이 인

정되지 않았을 뿐 아니라 Hill plot했을 때 Hill coefficient 역시 1보다 작았다(Table III). 즉 자궁 muscarinic receptor에는 효능제에 대한 affinity가 다른 두 종류의 subtypes이 존재하며, 효능제로 분류될 수 있는 subtype의 성질도 방광과 유사하였다.

자궁 및 방광에서 high affinity site와 low affinity site에 대한 효능제의 K_i치 및 이들 site의 분포비—효능제의 [³H]QNB결합억제곡선을 Munson 등²²⁾의 “Ligand” program에 적용시켰던 바 two-site model에 적합하였으므로 여기서 추정된 효능제들의 K_H와 K_L치를 두 조직에서 비교하였다. Table IV는 이를 요약한 것으로 high affinity site에 대한 각 효능제의 K_H가 두 조직에서 같았고 low affinity site에 대한 K_L치도 유사하였으며 이들 site의 분포비 역시 약 50 : 50으로 차이가 없었다.

자궁과 방광에서 muscarinic receptor에 대한 각 약물의 K_i치간의 상관성—본 실험에 사용한 효능제와 길항제의 muscarinic receptor에 대한 affinity 즉 K_i치는 1~8,000 nM범위에 있었으며 조직간에 이들 약물의 potency의 차이를 관찰할 수 없었다. Fig. 7은 자궁과 방광에서 측정된 K_i치간의 상관성을 도시한 것으로 각 점을 잇는 회귀직선의 기울기가 0.998이었고, 상관계수도 0.998이었다.

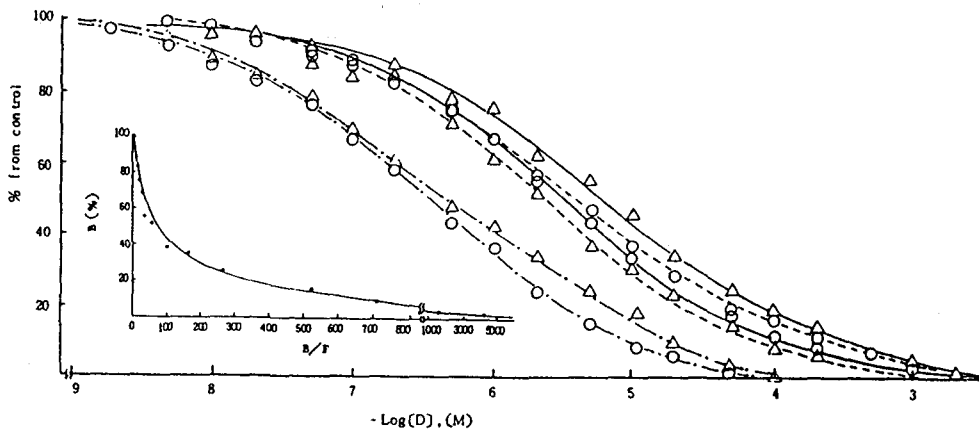


Fig. 6—Inhibition of the specific [³H]QNB binding to dog uterus(Δ) and urinary bladder(○) homogenates by muscarinic agonists.

Assays were conducted as described in the legend of Fig. 4. and Methods. Insert: Hofstee plot of the QNB-carbachol competition binding data. B represents the percentage inhibition of [³H]QNB binding and F the free carbachol concentration.

— : Carbachol, - - - : Methacholine, - · - · - : Oxotremorine

Table IV—Comparisons of estimates from a two-site binding model for the inhibition of [³H]QNB binding to dog uterus and urinary homogenates by muscarinic agonists

| Agonist | K_H (nM) | | K_L (nM) | | R_H (%) | | R_L (%) | |
|--------------|------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | U | B | U | B | U | B | U | B |
| Carbachol | 247±120 | 214±87.5 | 8,377±438 | 7,700±255 | 41.7±4.9 | 47.0±5.9 | 58.3±6.3 | 53.0±5.9 |
| Methacholine | 157±53 | 163±27.4 | 8,176±611 | 7,386±172 | 52.5±7.2 | 42.0±9.3 | 47.5±5.2 | 58.0±11.1 |
| Oxotremorine | 42.4±4.7 | 39.6±2.5 | 2,085±250 | 1,681±202 | 55.8±8.7 | 63.0±12.7 | 44.2±6.2 | 37.0±8.1 |

The agonist competition curve shown in Fig. 6. were analyzed with the computer program "ligand" as described by Munson *et al.* K_H and K_L represent the estimated dissociation constants for the high and low affinity binding sites, respectively. R_H and R_L represent the percentages of high and low affinity sites, respectively.

U: Uterus, B: Urinary bladder.

Values are the mean±SEM of three experiments.

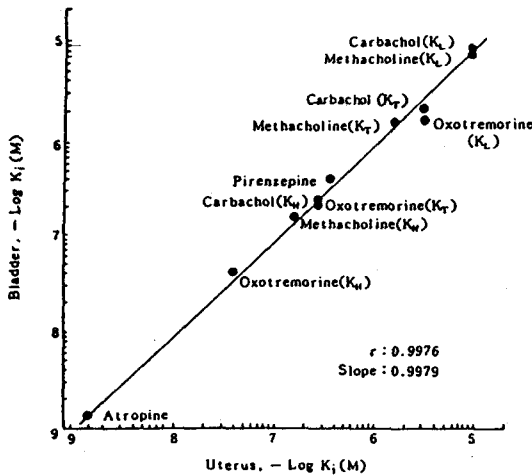


Fig. 7—Relationship between the estimated affinities of muscarinic agonists and antagonists in the dog uterus and urinary bladder.

Affinities are expressed as dissociation constants, K_i . K_T : affinity for total sites, K_H : affinity for high affinity sites, K_L : affinity for low affinity sites.

고 찰

본 실험결과 자궁에는 [³H]QNB에 대하여 포화성이고 가역적이며 선택성이 큰 muscarinic receptor가 존재할 뿐 아니라 효능제와 길항제에 대한 이 receptor의 결합특성이 방광 muscarinic receptor와 유사함을 알 수 있었다.

약물-receptor결합실험은 특정 약물의 receptor에 대한 affinity를 알 수 있는 가장 효과적인 방법이다. 본 실험에 사용된 [³H]QNB는 비선택적인 muscarinic

receptor길항제로 뇌²³⁾, 심장²⁴⁾, 회장²⁵⁾, 방광¹⁷⁾, 폐¹⁵⁾, 기관지²⁶⁾등의 muscarinic receptor의 성질을 규명하는데 널리 이용되어 왔다. 본 실험에서 비임신 자궁과 방광의 [³H]QNB포화결합실험자료를 Scatchard plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되고 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점은 이들 조직에 [³H]QNB에 대한 일정한 단일 결합부위가 있음을 시사하고 있으며 여기에서 측정된 K_D 치와 guinea pig²⁵⁾, 토끼²⁷⁾, 사람²⁸⁾의 방광에서 보고된 QNB의 K_D 치와 잘 일치하므로 비임신 개 자궁 muscarinic receptor는 [³H]QNB 결합면에서 방광과 유사한 성질을 가진것으로 생각된다.

Acetylcholine의 muscarinic receptor subtype개념은 효능제와 길항제의 반응성을 기초로 추정되어 왔으나⁷⁻⁹⁾ 선택적 길항제인 pirenzepine이 소개되기까지 거의 무시되어 있었다. Atropine과 같은 비선택적 길항제와는 달리 pirenzepine의 조직에 따른 affinity의 차이¹⁰⁾는 muscarinic receptor subtype를 분류하는 결정적 자료가 되었으며 이에 따라 이 약물의 선택적작용을 이 약물에 대하여 affinity가 큰 M_1 -receptor와 affinity가 적은 M_2 -receptor에 대한 작용으로 구분, 설명하기에 이르렀다.¹⁰⁻¹²⁾ 일반적으로 M_1 -receptor는 대뇌피질, 해마, 신경절, 폐에 주로 분포되어있고 M_2 -receptor는 심장, 회장, 방광, 외분비선에 주로 분포되어 있는것으로 알려지고 있다.^{11,12,23-26)} 이와 같이 조직에 따라 muscarinic receptor subtype의 분포가 다르므로 본 연구에서는 자궁에 있는 muscarinic receptor subtype의 성질을 구명하고자 하였다.

본 실험에서 atropine과 pirenzepine에 의한 [³H]QNB 결합억제가 농도의존적이고 고농도에서 [³H]

QNB결합을 100% 억제하였다는 점은 이들 약물의 muscarinic receptor결합이 가역적이고 포화성이며 [³H]QNB와 같은 결합부위에 QNB와 경쟁적으로 결합함을 시사한다. 또한 자궁에서 측정된 atropine의 Ki치가 방광 뿐 아니라 이미 보고된 다른 조직에서의 Ki치와 잘 일치하고^{24,26,29,30} Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점에서 자궁 muscarinic receptor는 atropine의 결합 성질면에서도 대뇌를 비롯한 다른 조직과 유사한 것으로 생각된다. 뿐만아니라, 자궁에서 [³H]QNB결합억제에 대한 pirenzepine의 Hill coefficient는 1로서 pirenzepine의 M₁ 및 M₂-receptor가 공존하는 대뇌와는 달리 이들 조직에는 pirenzepine에 대한 단일 receptor가 있을 것으로 생각되며, 각 실험에서 측정된 pirenzepine의 Ki치(330 nM)가 대뇌의 M₁-receptor에 대한 Ki치(4~20 nM)^{12,23,31,32} 보다는 오히려 M₂-receptor에 대한 Ki치(200~1,000 nM)³¹⁻³³에 가깝고, 이미 보고된 방광 및 회장²⁵에서의 Ki치(300~1,500 nM)와 유사하다는 점에서 이 receptor는 M₂-receptor일 것으로 추정되었다.

한편, 자궁 muscarinic receptor에 대한 효능제의 결합성질을 분석한 결과 [³H]QNB결합억제에 대한 효능제의 Hill coefficient(0.5~0.6)가 1보다 유의의하게 적어 자궁 muscarinic receptor에도 대뇌, 심장, 기관지, 방광과 같이^{10-17,23-33} 효능제에 대하여 affinity가 다른 두 종류의 sites가 있음을 알 수 있었고, affinity가 큰 site와 작은 sites에 대한 각 효능제의 K_H 및 K_L치 역시 본 실험의 방광에서 추정된 값과 유사하여 효능제의 결합성질에 있어서도 자궁과 방광 muscarinic receptor간에 차이가 없는 것으로 사료된다.

결 론

비임신 개 자궁 muscarinic receptor의 성질에 관한 지견을 얻기위하여, 비임신개 자궁 muscarinic receptor에 대한 [³H]quinuclidinyl benzilate(QNB)결합성질과 수중 효능제 및 길항제의 결합성질을 조사하고, 이를 M₂-receptor가 주로 분포되어 있는 방광 muscarinic receptor와 비교검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자궁에서 [³H]QNB결합은 가역적이고 포화성이었다.

2. [³H]QNB포화결합실험결과를 Scatchard plot했을 때 각 점의 직선성이 인정되었고 Hill coefficient가 1에 가까웠다.

3. 자궁과 방광에서 [³H]QNB의 K_D치는 다같이 약 120 pM로서 유사하였으나 단백질 mg당 결합부위농도는 자궁이 256 fmol, 방광이 563 fmol이었다.

4. 자궁에는 atropine과 pirenzepine에 대한 단일 결합부위가 있었고, 이 결합부위는 pirenzepine에 affinity가 적은 부위로서 pirenzepine의 Ki치가 약 330 nM 이었다.

5. 자궁과 방광에는 다같이 효능제인 carbachol, methacholine 및 oxotremorine에 대하여 affinity가 서로 다른 두종류의 결합부위가 있었다.

6. 자궁 muscarinic receptor에 대한 각 효능제와 길항제의 Ki치는 방광에서와 유사하였다.

7. 이상 실험결과 비임신자궁에는 pirenzepine에 affinity가 적은 M₂-receptor가 존재하는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

“이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 지방대학육성과제 학술연구구성비에 의하여 연구되었음”을 감사드립니다.

문 헌

- 1) Taylor, P.: Cholinergic agonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed.* (Eds. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad F.). Macmillan, New York, pp. 100-108 (1985).
- 2) Wastek, G.J. and Yamamura, H.I.: In *Neurotransmitter Receptors* (Eds. Yamamura, H.I. and Enna, S.J.). Part 2, Chapman & Hall, London, pp. 103-123 (1981).
- 3) Hiley, C.R. and Burgen, A.S.V.: The distribution of muscarinic receptor sites in the nervous system of the dog. *J. Neurochem.*, **22**, 159-162 (1974).
- 4) Birdsall, N.J.M. and Hulme, E.C.: Biochemical studies on muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.*, **27**, 7-16 (1976).
- 5) Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Metha, P.: The binding of antagonists to brain

- muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **14**, 737-750 (1978).
- 6) Snyder, S.H.: Drug and neurotransmitter receptors in the brain. *Science* **224**, 22-31 (1984).
 - 7) Goyal, R.K. and Rattam, S.: Neurohumoral, hormonal and drug receptors for the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **74**, 598-618 (1978).
 - 8) Barlow, R.B., Burston, K.N. and Vis, A.: Three types of muscarinic receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **68**, 141-142 (1980).
 - 9) Barlow, R.B., Berry, K.J., Glenton, P.A.M., Nikolaou, N.M. and Soh, K.S.: A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea pig atrial pacemaker cells at 29°C and 37°C. *Br. J. Pharmacol.*, **58**, 613-620 (1976).
 - 10) Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. and Hulme, E.C.: Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **283**, 90-92 (1980).
 - 11) Hammer, R. and Giachetti, A.: Muscarinic receptor subtypes: M₁ and M₂, biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, **31**, 2991-2998 (1982).
 - 12) Watson, M., Yamamura, H.I. and Roeske, W.R.: A unique regulatory profile and regional distribution of [³H]pirenzepine binding in the rat provide evidence for distinct M₁ and M₂ muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.*, **32**, 3001-3011 (1983).
 - 13) Watson, M., Roeske, W.R., Vickroy, T.W., Smith, T.L., Akiyama, K., Gulta, K., Duckles, S.P., Serra, M., Adem, A., Nordberg, A., Gehlert, D.R., Wamsley, J.K. and Yamamura, H.I.: Biochemical and functional basis of putative muscarinic receptor subtypes and its implications. *Trens. Pharmacol. Sci.*, Suppl. **7**, 46-55 (1986).
 - 14) Watson, M., Yamamura, H.I. and Roeske, W.R.: [³H] Pirenzepine and (-) [³H]quinuclidinyl benzilate binding to rat cerebral cortical and cardiac muscarinic cholinergic sites. I. Characterization and regulation of agonist binding to putative muscarinic subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 411-418 (1986).
 - 15) Bloom, J.W., Halonen, M., Lawrence, L.J., Rould, E., Seaver N.A. and Yamamura, H.I.: Characterization of high affinity [³H]pirenzepine and (-)[³H] quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rabbit peripheral lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 51-58 (1987).
 - 16) Brown, D.A., Forward, A. and Marsh, J.: Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **71**, 362-364 (1980).
 - 17) Nilvebrant, L.: On the muscarinic receptors in the urinary bladder and the putative subclassification of muscarinic receptors. *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.* **1**, 1-45 (1986).
 - 18) Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed. Macmillan, New York, pp. 926-927 (1985).
 - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
 - 20) Wallick, E.T., Anner, B.M., Ray, M.V. and Schwartz, A.: Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide treated Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8778-8786 (1978).
 - 21) Cheng, Y.C. and Prusoff, W.H.: Relation between the inhibition constants(K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition(I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099-3108 (1973).
 - 22) Munson, P.J. and Rodbard, D.: LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Anal. Biochem.*, **107**, 220-239 (1980).
 - 23) Luthin, G.R. and Wolfe, B.B.: Comparison of [³H] pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**, 648-655 (1984).
 - 24) Fields, J.Z., Roeske, W.R., Morkin, E., and Yamamura, H.I.: Cardiac muscarinic cholinergic receptors: Biochemical identification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3251-3258 (1978).
 - 25) Nilvebrant, L. and Sparf, B.: Difference between binding affinities of some antimuscarinic drugs in the parotid gland and those in the urinary bladder and ileum. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **53**, 304-313 (1983).

- 26) Rothberg, K.G., Morris, P.L. and Douglas, J.S.: Characterization of cholinergic muscarinic receptors in cow tracheal muscle membranes. Effect of maturation. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1687-1695 (1987).
- 27) Lopor, H. and Kuhar, M.J.: Characterization of muscarinic cholinergic receptor binding in the vas deferens, bladder, prostate and penis of the rabbit. *J. Urol.*, **132**, 392-396 (1984).
- 28) Nilvebrant, L.J., Andersson, K.E. and Mattiasson, A.: Characterization of the muscarinic cholinergic receptors in the human detrusor. *J. Urol.*, **132**, 392-396 (1984).
- 29) Baudiere, B., Manferini, E., Giraldo, E., Ladinsky, H. and Bali, J.P.: Characterization of the muscarinic receptor subtype in isolated gastric fundic cells of the rabbit. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2957-2583 (1987).
- 30) Honkanen, R.E. and Abdel-Latif, A.A.: Characterization of cholinergic muscarinic receptors in the rabbit iris. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2575-2583 (1988).
- 31) Gil, D.W. and Wolfe, B.B.: Pirenzepine distinguishes between muscarinic receptors-mediated phosphoinositide breakdown and inhibition of adenylylate cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 608-616 (1985).
- 32) Fisher, S.K. and Bartus, R.T.: Regional differences in the coupling of muscarinic receptors to inositol phospholipid hydrolysis in guinea pig brain. *J. Neurochem.*, **45**, 1085-1095 (1985).
- 33) Vanderheyden, P., Ebinger, G. and Vauquelin, G.: Different agonist binding properties of M₁ and M₂ muscarinic receptors in calf brain cortex membranes. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 4119-4124 (1987).