

## 흰쥐의 무시물투여에 의한 배뇨반사억제효과에 대한 벤조디아제핀수용체의 영향

허인회# · 오호정

#중앙대학교 약학대학

(Received September 21, 1992)

### Central Involvement of Benzodiazepine Receptor on the Muscimol-induced Inhibition of Micturition Reflex in Rats

In Hoi Huh# and Ho Jung Oh

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract**—The correlation between GABA receptors(GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor) and benzodiazepine receptor on the saline infusion-induced micturition reflex contraction was studied in the female rat.

To investigate the effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA) on the micturition reflex, exogenous GABA(10 mg/kg) and GABA transaminase inhibitor(aminoxyacetic acid; AOAA 1  $\mu$ g) were administered intravenously(*i.v.*) and intracerebroventricularly(*i.c.v.*), respectively. In result, both GABA and AOAA inhibited the saline induced micturition reflex contraction. This AOAA induced inhibition of micturition reflex was blocked by both bicuculline, GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, and Ro 15-1788, benzodiazepine receptor antagonist.

Muscimol, GABA<sub>A</sub> receptor antagonist(1  $\mu$ g *i.c.v.*, 3  $\mu$ g intrathecal; *i.t.*, 1 mg/kg *i.v.*) and baclofen, GABA<sub>B</sub> receptor agonist(0.1  $\mu$ g *i.c.v.*, 3  $\mu$ g *i.t.*, 1 mg/kg *i.v.*) also inhibited the bladder contraction. Pretreatment of bicuculline(1  $\mu$ g *i.c.v.*), but not of 5-aminovaleic acid(AVA, 1  $\mu$ g *i.c.v.*), GABA<sub>B</sub> receptor antagonist blocked the central inhibition of muscimol. These inhibitory effects were reversed by Ro15-1788 but were potentiated by flurazepam, benzodiazepine receptor antagonist. On the other hand, the inhibitory effects of baclofen were not affected by Ro 15-1788. Diazepam and flurazepam also inhibited the micturition reflex contraction when they were administered 3  $\mu$ g *i.c.v.*, 10  $\mu$ g *i.t.*, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M transurethrally, respectively.

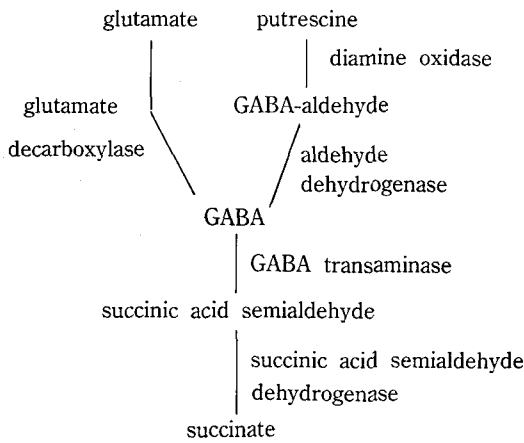
In conclusion, these results suggest that the micturition reflex is mediated by GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> receptor and benzodiazepine receptor. The benzodiazepines increase the receptor binding of GABA to the GABA<sub>A</sub> receptor, so that the benzodiazepines show the synergistic effect on the inhibition of the micturition reflex contraction, but not to the GABA<sub>B</sub> receptor.

**Keywords** □ Muscimol, benzodiazepine, GABA, bicuculline, micturition reflex.

$\gamma$ -Aminobutyric acid(GABA)는 포유동물의 뇌와 척수에 다량으로 존재하는 중추신경계의 억제성 신경전달물질<sup>1)</sup>로 고위중추에서는 과분극에 수반하는 synapse 후 억제, 척수에서는 탈분극을 수반하는 synapse 전 억제를 일으킨다. 뇌조직에서 GABA는 L-

glutamic acid가 glutamate decarboxylase에 의해 decarboxylation되어 생합성되는데, GABA의 전구체인 glutamate는 주로 TCA cycle에서 유래한  $\alpha$ -ketoglutarate가 transamination되어 생성된다. 또한 간, 신장, 비장, 폐 등의 말초조직에서는 putrescine으로부터도 생합성된다. 이렇게 생성된 GABA는 GABA transaminase에 의해 분해된다(Scheme 1)<sup>2)</sup>

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.



**Scheme 1**—Biosynthetic and metabolic pathway of GABA

GABA의 결합실험은 주로 rat의 뇌막분획을 이용해 행해지는데 <sup>3</sup>H-GABA를 이용한 결합실험에서 두 종류의 GABA 결합이 존재하는 것이 확인되었고, 1981년에 Bowery 등이 GABA antagonist인 bicuculline에 대해 감수성을 갖지 않는 새로운 type의 GABA receptor의 존재를 발견해, bicuculline에 감수성을 갖고 <sup>3</sup>H-muscimol로 표식되는 종전까지 알려진 receptor를 GABA<sub>A</sub> receptor, 그에 반해 새로이 발견된 receptor를 GABA<sub>B</sub> receptor로 분류하였다.

GABA<sub>A</sub> receptor는 muscimol, isoguvacine과 같은 약물에 의해서 흥분되어지고, bicuculline에 의해서는 상경적으로, picrotoxin에 의해서는 비상경적으로 길항된다.<sup>3-6</sup> GABA<sub>A</sub> receptor가 활성화되면 chloride ion conductance가 증가하고, benzodiazepine receptor와 coupling하여 거대분자를 형성해 존재하며, benzodiazepine receptor agonist는 GABA<sub>A</sub> receptor에 대한 GABA의 결합력을 증강시킨다.<sup>6-10</sup> 한편 GABA<sub>B</sub> receptor는 muscimol에 의해 활성화되지 않고 bicuculline에 의해서 길항되지 않는 receptor로 baclofen에 의해 활성화되며, chloride channel과는 연관성이 없으나 potassium ion conductance의 상승을 수반한 과분극에 연관이 있는 것으로 알려져 있고, adenylate cyclase나 calcium channel과의 관련성도 제기되고 있다.<sup>5,6,11-13</sup>

배뇨는 뇌의 저류로 인하여 방광이 팽만되어 일어나는 척추의 반사현상으로 배뇨반사는 배뇨영역에 흥분적으로 작용하는 부교감성 신경 유출의 증가,

억제적으로 작용하는 교감성신경 유출의 감소, 그리고 외부요도 괄약근에 대한 체성원심성 신경 유입의 감소 등에 의하여 촉진된다.<sup>14-16</sup> 외인성 GABA가 골반신경절이나 뇌내의 배뇨중추에 작용하여, 반사적으로 나타나는 방광의 운동성을 저해하고,<sup>17,18</sup> 전기자극에 의한 흰쥐나 토끼의 방광 배뇨근의 수축력이 baclofen에 의해서 억제되고,<sup>19,20</sup> 또한 Kontani 등<sup>21</sup>이 마취된 rat에서 방광내로 Tyrode's solution을 주입하여 야기되는 방광수축에 GABA<sub>A</sub> receptor agonist인 muscimol과 benzodiazepine receptor agonist인 diazepam이 억제효과를 나타낸다고 보고하고 있어 배뇨반사 억제작용에 GABA receptor가 관여할 가능성이 매우 높다.

한편 benzodiazepines는 항불안, 항경련, 근육이완 작용을 갖고 있는 약물로서 GABA-mediated synapse 억제를 용이하게 해준다는 보고<sup>22,23</sup>가 있으며, 특히 diazepam은 GABA를 포함해 여러 중추신경계 영역에서 synapse 억제효과를 나타내고,<sup>24,25</sup> GABA<sub>A</sub> receptor antagonist인 bicuculline과 picrotoxin의 경련효과를 차단한다<sup>26</sup>고 보고되었고, flurazepam은 수면효과가 강한 benzodiazepines로서 rat의 medullary neurone에서 bicuculline-sensitive inhibitory action을 나타낸다<sup>27</sup>고 보고되었다.

본 연구에서는 rat의 복막을 절개하지 않고 요도를 통해 생리식염수를 주입하여 야기되는 반사적인 방광수축<sup>18,20</sup>에 대하여 GABAergic 약물을 중추적으로 투여하여 배뇨반사에 대한 효과를 관찰하여 이에 대한 GABA receptor antagonist의 영향을 검토하고, GABA의 대사억제와 합성억제제를 사용해 내인성 GABA에 대해서도 그 효과를 검토하였으며, 배뇨반사의 억제효과에 GABA receptor와 관련이 깊은 benzodiazepine receptor가 어떤 관련이 있는지를 알아 보기 위하여 benzodiazepine receptor agonist 및 antagonist를 사용해 실험하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 실험방법

**시약**—시약은  $\gamma$ -Aminobutyric acid(Sigma Chemical Co., USA), muscimol(Sigma Chemical Co., USA), 1-bicuculline methiodide(Sigma Chemical Co., USA), 5-aminovaleic acid(Sigma Chemical Co., USA),

aminooxyacetic acid(Sigma Chemical Co., USA), L-glutamic acid  $\gamma$ -hydrazide(Sigma Chemical Co., USA), glycine(Junsei chemical Co., Japan), baclofen (Ciba-Geigy Co., Swiss), Ro 15-1788(Roche Co., Swiss), diazepam(Chong Kun Dang Corp., Korea), flurazepam(Chong Kun Dang Corp., Korea), 기타 시약들은 특급 및 일급 시약들을 사용하였고, 모든 약물은 생리식염수에 녹여서 사용하였다.

기기-기기는 Polygraph(Grass Instr. Co., Model 7E, USA), pressure transducer(Narco Biosystems Inc., P-1000A, USA), stereotaxic instrument(David Co., USA), infusion pump(Sage Instr. Co., Syringe pump model 352, USA) 등을 사용하였다.

**실험동물**-동일 조건에서 사육한 체중 200~220g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 실험에 사용하였으며, 사료 및 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### 실험방법

**1) 수술 및 방광수축 측정요소**-흰쥐를 urethane으로 마취시키고(1.0g/kg 복강내 주사) 동물고정대에 배위로 고정시킨 다음, 요도를 통하여 방광내에까지 Polyethylene tube를 삽입한다. 37°C의 생리식염수를 infusion pump를 사용하여 시간당 2.0 ml의 속도로 방광내로 주입하여 용량증가에 따라 반사적인 수축을 야기시키고, 방광수축이 일어나면 생리식염수 주입을 중단하고, 이 방광내압을 pressure transducer를 통하여 측정하고, polygraph상에 기록하였다.

수축이 일어나기까지의 생리식염수 용량을 용량역치(volume threshold)로 하였고, 수축 측정요소는 피크압력과 기저압력과의 차이인 수축크기(amplitude; cmH<sub>2</sub>O), 분당 빈도수(frequency; min), 그리고 수축 억제시의 시간(duration of cessation; min)을 구하여 비교하였다.

**2) 약물투여방법**-(1) 정맥주사(Intravenous injection; *i.v.*): 정맥액을 cannulation하여 투여하였다.

(2) 국소적용(Topical application; *top.*): 방광표면에 Hamilton syringe(Hamilton Co., Microliter #702, USA)를 이용하여 점적하였다.

(3) 측뇌실내주사(Intracerebroventricular injection; *i.c.v.*): 먼저 체위를 복위로 하고 머리를 stereotaxic instrument에 고정시킨 다음 두피를 정중상으로 절개하고 두정골을 노출시킨다. 측뇌실(진정으로부터 측방 1 mm, 후방 1 mm, 깊이 4.5 mm) 부위에 구멍을

내고, 이 구멍에 polyethylene tube를 수직으로 살며시 밀어넣고 vertex(Dentimex Co., USA)액으로 시멘트하여 고정시켜 약물을 투여하였다. 실험이 끝난 후 methylene blue액을 주사하여 그 위치를 확인하였다.

(4) 척추강내주사(Intrathecal injection; *i.t.*): 요추(L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 사이)의 지주막하내로 투여하였다.

**3) 실험방법**-(1) 배뇨반사 및 수축에 대한 muscimol의 효과: 일정하게 방광수축이 야기된 실험동물에 muscimol을 방광표면에 3  $\mu$ g, 10  $\mu$ g을 점적투여하고, 3  $\mu$ g을 *i.t.*, 1  $\mu$ g을 *i.c.v.* 주사하여 각각에 대해 배뇨반사 수축에 대한 효과를 관찰하였다.

(2) 배뇨반사에 대한 GABA, muscimol, baclofen의 정맥투여 효과: 방광수축이 야기된 실험동물에 GABA는 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg을 *i.v.* 주사하고, muscimol과 baclofen은 0.3 mg/kg, 1 mg/kg을 각각 *i.v.* 주사하여 배뇨반사 수축의 크기, 빈도수 및 수축 억제시의 시간을 관찰하였다.

(3) Muscimol과 baclofen의 중추적인 투여효과와 GABA antagonist의 영향: Muscimol과 baclofen의 측뇌실내 및 척추강내 투여효과를 알아보기 위하여 방광수축이 야기된 실험동물에 muscimol은 1  $\mu$ g을 *i.c.v.*, 3  $\mu$ g을 *i.t.* 주사하고, baclofen은 0.1  $\mu$ g을 *i.c.v.*, 3  $\mu$ g을 *i.v.* 주사하였으며, 척수에서의 억제성 신경전달물질의 하나인 glycine은 30  $\mu$ g을 *i.c.v.*, 10  $\mu$ g을 *i.t.* 주사하여 배뇨반사 수축 억제시의 시간을 측정하였다.

Muscimol의 배뇨반사 억제효과에 대한 GABA antagonist의 영향을 알아보기 위하여 방광수축이 야기된 실험동물에 GABA<sub>A</sub> receptor antagonist인 bicuculline 및 GABA<sub>B</sub> receptor antagonist인 5-aminovale-ric acid(AVA)를 각각 1  $\mu$ g을 *i.c.v.* 주사하고, 10분후에 muscimol을 1  $\mu$ g *i.c.v.* 주사하여 배뇨반사 수축 억제시의 시간을 측정하였다.

(4) 배뇨반사 용량역치에 대한 내인성 GABA의 영향: 배뇨반사에 대한 내인성 GABA의 영향을 알아보기 위하여 GABA의 대사억제제인 AOAA와 GABA의 합성억제제인 L-glutamic acid  $\gamma$ -hydrazide(LGGH)를 각각 1  $\mu$ g을 *i.c.v.* 주사하고 30분간 후에 생리식염수를 주입하여 배뇨반사 수축의 용량역치를 구하였다.

또한 AOAA를 1  $\mu$ g을 *i.c.v.* 주사하고, 25분 후에 GABA<sub>A</sub> receptor antagonist인 bicuculline 및 benzo-

diazepine receptor antagonist인 Ro 15-1788을 각각 1 µg을 *i.c.v.* 주사하고 5분 후에 생리식염수를 주입하여 용량역치를 구하여, AOAA로 야기되는 배뇨반사의 용량역치 증가에 미치는 이들 antagonist의 영향을 관찰하였다.

(5) GABA<sub>A</sub> receptor 매개에 의한 배뇨반사 억제 효과에 대한 중추성 benzodiazepine receptor의 역할: 배뇨반사에 대한 benzodiazepines의 효과를 알아보기 위하여 diazepam과 flurazepam을 생리식염수 주입방법과 같이 요도를 통해 방광내로 10 µM, 30 µM을 각각 주입하여 배뇨반사 수축의 용량역치, 수축크기 및 빈도수를 관찰하였다. 또한 방광수축이 야기된 실험동물에 이들 약물을 각각 3 µg을 *i.c.v.* 10 µg을 *i.t.* 주사하여 배뇨반사 수축 억제시의 시간을 측정하였다.

GABA<sub>A</sub> receptor 매개에 의한 배뇨반사 억제 효과에 대해 benzodiazepine receptor의 영향을 알아보기 위하여, 방광수축이 야기된 실험동물에 benzodiazepine receptor antagonist인 Ro 15~1788은 1 µg을 *i.c.v.* 주사하고, benzodiazepine receptor agonist인 flurazepam은 0.3 µg을 *i.c.v.* 주사하고, 각각 10분 후에 muscimol을 1 µg을 *i.c.v.* 주사하여 배뇨반사 수축 억제시의 시간을 측정하였다.

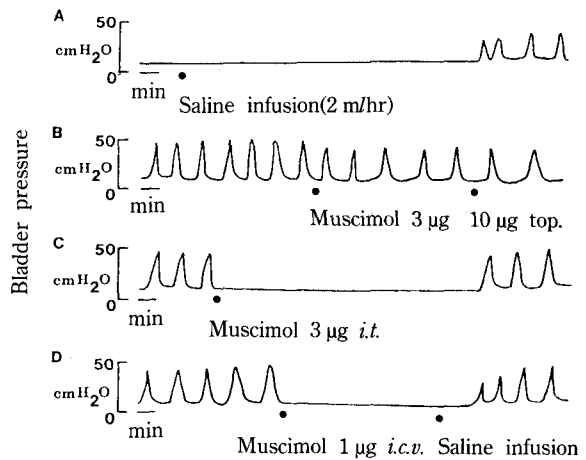
4) 통계학적 분석—모든 data는 Mean ± S.E.M. (Standard Error of the Mean)으로 나타내었으며, unpaired Student's t-test를 사용하여 p값이 0.05보다 작을 때 유의성이 있다고 판정하였다.

**실험결과**

**배뇨반사 및 수축에 대한 muscimol의 효과**—Fig. 1에 나타난 바와 같이 infusion pump로 일정하게 생리식염수를 주입하면(시간당 2.0 ml) 규칙적인 방광수축이 야기되었는데(Fig. 1-A), 이러한 수축반응은 muscimol을 방광표면에 투여한 경우 별 변화가 없었으나(Fig. 1-B; 3 µg, 10 µg top.), 척추강내(Fig. 1-C; 3 µg *i.t.*) 혹은 측뇌실내(Fig. 1-D; 1 µg *i.c.v.*)로 투여시 완전히 억제효과를 나타내었다.

이러한 muscimol의 방광수축 억제효과는 생리식염수 소량(0.2 ml 이하)을 추가로 투여하였을때 수축이 회복되었다(Fig. 1-D).

**배뇨반사에 대한 GABA, muscimol, baclofen의**



**Fig. 1**—Effect of muscimol on the micturition reflex in urethane-anesthetized rats.

**정맥투여 효과**—GABA, muscimol, baclofen을 정맥 주사시 배뇨반사 수축의 크기, 빈도수는 용량의존적으로 억제되었으며, GABA는 10 mg/kg 용량에서, muscimol과 baclofen은 1 mg/kg 용량에서 배뇨반사를 완전히 억제하였다(Table I).

**Muscimol과 baclofen의 중추적인 투여효과와 GABA antagonist의 영향**—Muscimol 1 µg을 측뇌실내로 투여했을 때 배뇨반사 수축의 억제시간이 이를 척추강내로 3 µg을 투여했을 때보다 길었고, 이러한 억제효과는 baclofen을 0.1 µg을 측뇌실내로, 3 µg을 척추강내로 투여했을 때에는 나타났으며, glycine을 30 µg을 측뇌실내로, 10 µg을 척추강내로 투여했을 때는 그 효과가 muscimol이나 baclofen에 미치지 못하였다(Table II). 그리고 생리식염수를 추가로 투여했을 때 수축의 회복양상을 보면 muscimol은 소량(0.2 ml 이하)에서 즉시 회복이 되었으나(Fig. 1-D), baclofen의 경우에는 회복시간이 매우 길었다.

Muscimol의 배뇨반사 억제효과는 GABA<sub>A</sub> receptor antagonist인 bicuculline을 전처치(1 µg *i.c.v.*, 10분 전)했을 때 길항되었고, GABA<sub>B</sub> receptor antagonist인 AVA 전처치(1 µg *i.c.v.*, 10분 전)로는 길항되지 않았다(Table III).

**배뇨반사 용량역치에 대한 내인성 GABA의 영향**—배뇨반사에 대한 내인성 GABA의 영향을 알아보기 위해서 GABA의 대사억제제인 AOAA(GABA transaminase inhibitor)와 합성억제제인 LGGH(glutamic acid decarboxylase inhibitor)를 생리식염수를 주입

**Table I**—Effect of intravenously administered GABA, muscimol and baclofen on the reflexly-mediated bladder contraction

Drug	Dose(mg/kg <i>i.v.</i> )	Amplitude(cmH <sub>2</sub> O)	Frequency per min	Duration of cessation(min)
Control	0	42.3±2.6 <sup>b)</sup>	0.66±0.04	
GABA	1	27.2±5.4**	0.48±0.04**	
(n=6) <sup>a)</sup>	3	22.2±4.2**	0.38±0.03**	
	10	NE <sup>c)</sup>	NE	16.1±2.2
Control	0	41.4±2.6	0.71±0.03	
Muscimol	0.3	26.4±2.2**	0.46±0.02*	
(n=5)	1	NE	NE	15.8±2.5
Control	0	39.3±3.4	0.68±0.05	
Baclofen	0.3	30.3±1.5**	0.41±0.02**	
(n=6)	1	NE	NE	21.2±1.7

<sup>a)</sup>n; number of rats

<sup>b)</sup>Each value represents Mean±S.E.M.

<sup>c)</sup>NE; not estimated due to the cessation of micturition reflex

\*, \*\*, Significantly different from the control(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01)

**Table II**—Effect of muscimol, baclofen and glycine on the duration of cessation of micturition reflex contraction followed by intracerebroventricular and intrathecal administration in rats

Drug	No. of rats	Dose	Duration of cessation(min)
Muscimol	5	1 µg <i>i.c.v.</i>	29.4±5.1 <sup>a)</sup>
	4	3 µg <i>i.t.</i>	13.1±3.3
Baclofen	4	0.1 µg <i>i.c.v.</i>	108.4±27.9
	5	3 µg <i>i.t.</i>	24.5±8.2
Glycine	4	30 µg <i>i.c.v.</i>	6.4±4.2
	5	10 µg <i>i.t.</i>	5.4±3.1

<sup>a)</sup>Each value represents Mean±S.E.M.

**Table III**—Inhibitory effect of GABA receptor antagonists on the muscimol-induced micturition reflex

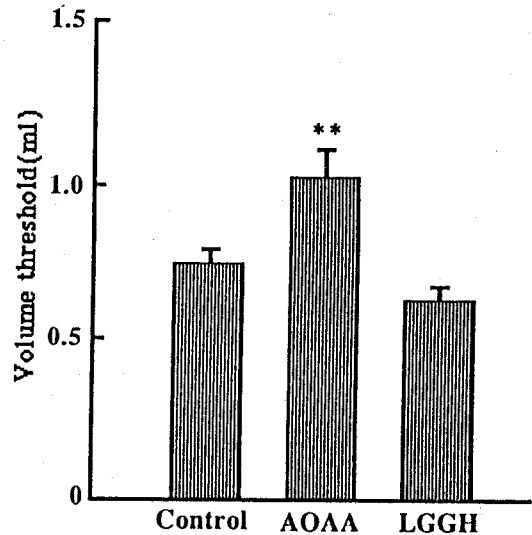
Drug <sup>a)</sup>	No. of rats	Duration of cessation(min)
Muscimol	5	29.4±5.1 <sup>c)</sup>
Bicuculline + muscimol	5	5.4±3.5**
AVA <sup>b)</sup> + muscimol	5	13.3±7.7

<sup>a)</sup>Bicuculline and AVA(1 µg *i.c.v.*, respectively) were injected 10 minutes before muscimol administration(1 µg *i.c.v.*)

<sup>b)</sup>AVA; 5-aminovaleic acid

<sup>c)</sup>Each value represents Mean±S.E.M.

\*\*, Significantly different from the muscimol group(p<0.01)



**Fig. 2**—Influence of endogenous GABA on the volume threshold of micturition reflex contraction. AOAA(aminooxyacetic acid) and LGGH(L-glutamic acid  $\gamma$ -hydrazide) were administered 1 µg *i.c.v.*, respectively 30 minutes before saline infusion. Each bar indicates Mean and S.E.M. (n=5). \*\*, Significantly different from the control(p<0.01).

하기 30분 전에 측뇌실내로 투여한 결과 배뇨반사 수축의 용량역치가 AOAA에 의해서는 유의성있게 증가하였으나 LGGH로는 영향이 없었다(Fig. 2).

또한 AOAA 투여로 인한 배뇨반사의 용량역치는

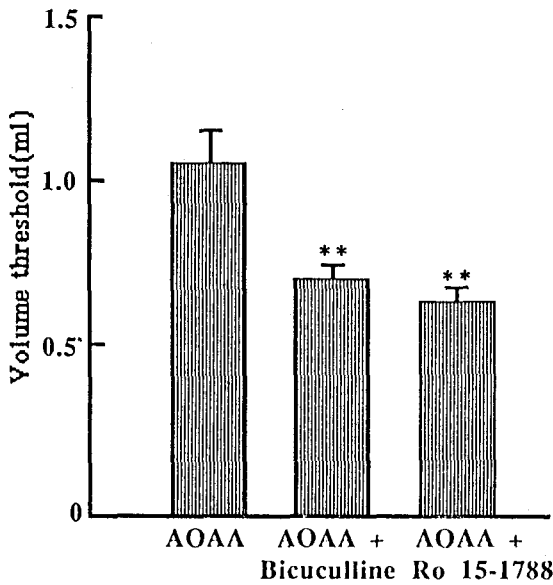


Fig. 3.—Effect of bicuculline and Ro 15-1788 on the AOAA-induced volume threshold augmentation.

AOAA(aminooxyacetic acid) was administered 1  $\mu\text{g}$  *i.v.* 30 minutes before, and bicuculline and Ro 15-1788 were injected 1  $\mu\text{g}$  *i.v.*, respectively 5 minutes before saline infusion. Each bar indicates Mean and S.E.M.(n=5).  
 \*\*; Significantly different from the AOAA treated group(p<0.01).

bicuculline이나 Ro 15-1788(benzodiazepine receptor antagonist)을 1  $\mu\text{g}$ 을 측뇌실내로 투여했을 때 유의성있게 감소하였다(Fig. 3).

**GABA<sub>A</sub> receptor 매개에 의한 배뇨반사 억제효과에**

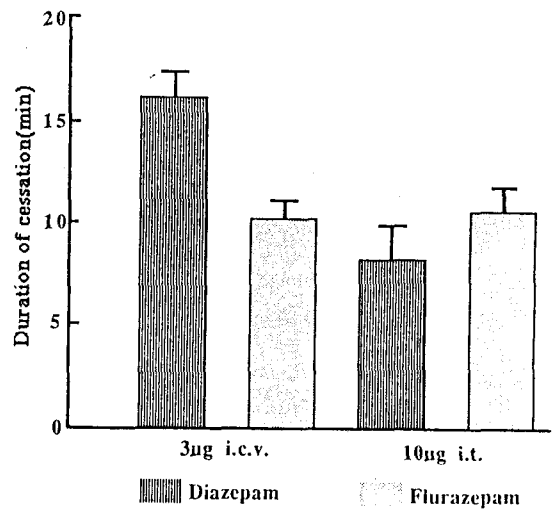


Fig. 4.—Comparison of the duration of cessation in micturition reflex contraction induced by diazepam and flurazepam.

The contraction was initiated by saline infusion. Diazepam and flurazepam were injected 3  $\mu\text{g}$  *i.c.v.*, 10  $\mu\text{g}$  *i.t.*, respectively. Each bar indicates Mean and S.E.M.(n=6).

**대한 중추성 benzodiazepine receptor의 영향**—생리 식염수 주입방법과 같이 요도를 통해 방광내로 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ 의 diazepam이나 flurazepam을 주입하면 생리 식염수 주입으로 야기되는 배뇨반사 수축의 용량역치가 증가되었고, 수축크기와 빈도수는 감소되었다(Table IV). 또한 이들 약물을 측뇌실내나 척추강내로 투여한 경우에는 배뇨반사 수축이 완전히 억제되었다(Fig. 4). 이 억제효과는 Ro 15-1788을 전처치했을 때 완전히 길항되었다.

Table IV—Effect of transurethrally administered diazepam and flurazepam on the volume threshold, amplitude and frequency of micturition reflex contraction induced by saline infusion

Drug <sup>a)</sup>	Dose( $\mu\text{M}$ )	Volume threshold(ml)	Amplitude(cmH <sub>2</sub> O)	Frequency per min
Diazepam	0	0.85 ± 0.06 <sup>b)</sup>	44.2 ± 2.6	0.74 ± 0.4
	10	1.21 ± 0.06**	37.1 ± 3.6	0.46 ± 0.08**
	30	1.62 ± 0.14**	25.0 ± 2.4**	0.43 ± 0.06**
Flurazepam	0	0.69 ± 0.06	39.5 ± 3.5	0.65 ± 0.05
	10	1.14 ± 0.22**	27.1 ± 1.2**	0.32 ± 0.11**
	30	1.54 ± 0.11**	15.0 ± 2.2**	0.31 ± 0.08**

<sup>a)</sup>Diazepam and flurazepam were infused into the bladder by transurethral route.

<sup>b)</sup>Each value represents Mean ± S.E.M. (n=6)

\*\*; Significantly different from the control(p<0.01)

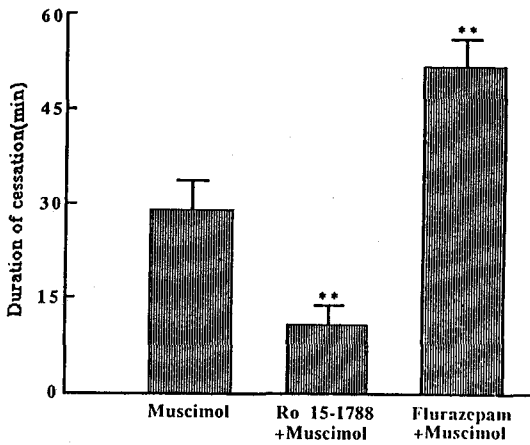


Fig. 5.—Central involvement of benzodiazepine receptor on the muscimol-induced inhibitory effect. Ro 15-1788(1  $\mu$ g *i.c.v.*) and flurazepam(0.3  $\mu$ g *i.c.v.*) were administered 10 minutes before muscimol injection(1  $\mu$ g *i.c.v.*) Each bar indicates Mean and S.E.M.(n=5). \*\*; Significantly different from the muscimol treated group(p<0.01)

Muscimol을 측뇌실내로 투여하여 야기된 배뇨반사 수축의 억제효과는 Ro 15-1788(1  $\mu$ g *i.c.v.*, 10분 전) 전처치에 의해서 길항되었고, flurazepam(0.3  $\mu$ g *i.c.v.*, 10분 전)에 의해서는 더욱 증강되었다(Fig. 5). 그러나 baclofen에 의해 야기된 배뇨반사 수축의 억제효과는 Ro 15-1788을 전처치했을 때 별 영향이 없었다.

## 고 찰

배뇨반사 억제작용에 GABA receptor가 관여한다는 보고로 흥미로운 과제가 되고 있어서 예비실험으로 GABA를 측뇌실내로 투여하였던 바, 생리식염수 주입으로 야기되는 배뇨반사 수축이 억제되었는데 이 결과는 Kontani 등(Tyrode용액을 사용하여 방광내로 주입함)<sup>21)</sup>이 실험한 결과와 일치하였다.

GABA<sub>A</sub> agonist인 muscimol의 중추투여 효과를 검토하기 위하여 측뇌실 및 척추강내로 투여시 배뇨반사 수축 억제효과가 강하였고, 방광표면 투여시에는 효과가 없었던 것으로 나타났다. 또한 muscimol을 측뇌실내로 투여시 나타나는 배뇨반사 억제시간이 GABA<sub>A</sub> antagonist인 bicuculline 전처치에 의해서는 단축되었고, GABA<sub>B</sub> antagonist인 AVA(5-aminovale-

ric acid)<sup>20,29)</sup>를 뇌나 척수부위의 GABA<sub>A</sub> receptor를 자극시켜서 배뇨반사 수축을 억제시켜며, 그 활성부위는 아마도 brain stem의 배뇨중추<sup>30,31)</sup>와 방광기능을 조절하는 천추부위의 부교감성 핵(sacral parasympathetic nucleus),<sup>16)</sup> 그리고 골반신경절 부위<sup>17,32)</sup>나 GABA<sub>A</sub> receptor가 분포되어 있는 척수내의 일차성 구심성 말단<sup>33)</sup>에 작용할 가능성이 있는 것을 시사하고 있다.

GABA<sub>B</sub> agonist인 baclofen은 GABA<sub>B</sub> receptor가 방광평활근을 이완시킨다는 보고<sup>2,12)</sup>로 미루어 보아 배뇨근에 작용할 가능성이 있다. 예비실험에서 baclofen을 방광표면에 투여시 muscimol과는 달리 방광 수축을 저해하는 것으로 나타났고, muscimol에 의한 배뇨반사 억제효과는 소량의 생리식염수(0.2 ml 이하)를 추가로 주입하였을 때 수축이 회복되었으나, baclofen에 의한 효과는 수축회복에 오랜 시간이 걸리고, 또 회복되고 난 후에도 수축크기가 감소되었다. 이러한 결과는 방광수축에 대해서 GABA<sub>A</sub> 및 GABA<sub>B</sub> receptor 작용이 차이가 나타날 수 있음을 시사하고 있는 것이다.

배뇨반사에 대한 내인성 GABA의 역할을 규명하고자 GABA의 대사억제제인 AOAA(aminooxyacetic acid)<sup>34,35)</sup>를 투여한 결과 배뇨반사의 용량역치가 현저히 증가하였고, 이러한 용량역치의 증가효과는 bicuculline이나 benzodiazepine receptor antagonist인 Ro 15-1788<sup>36,37)</sup> 투여로 역전되었다. 한편 GABA의 합성억제제인 LGGH(L-glutamic acid  $\gamma$ -hydrazide)<sup>6)</sup>는 배뇨반사의 용량역치에 아무런 영향이 없었다. 이와같은 사실에서 GABA의 대사억제로 인한 뇌내의 내인성 GABA 농도의 증가에 의해서 배뇨반사가 억제될 수 있다고 볼 수 있으며, 이러한 배뇨반사의 억제효과에 GABA<sub>A</sub> 및 benzodiazepine receptor가 관여하고 있음을 알 수 있다.

배뇨반사에 대한 GABA성 억제효과에 항불안, 항경련, 근이완, 진정 및 수면 작용이 있는 benzodiazepine receptor<sup>36,38)</sup>와의 관련여부를 명확히 하기 위하여 diazepam과 flurazepam을 요도를 통해 투여한 결과 용량에 비례하여 배뇨반사의 용량역치, 수축크기 및 빈도수를 감소시켰다. 이 사실은 diazepam이 골반신경에서 나오는 구심성 전달을 감소시키고,<sup>21)</sup> 또한 배뇨반사에 대한 수축크기는 원심성 신경전달의 결과로 나타나고, 용량역치는 구심성 전달에 의존한다<sup>39)</sup>는

보고에서 이들 benzodiazepines가 배뇨에 대한 구심성 및 원심성 신경전달을 감소시켰을 것으로 여겨진다.

Muscimol 측뇌실내 투여로 야기되는 방광수축의 억제효과가 Ro 15-1788 전처치에 의해서 길항되었고, flurazepam에 의해서는 더욱 강화되었다. 이 사실은 GABA<sub>A</sub> receptor 매개에 의한 배뇨반사의 억제작용에 부분적으로 benzodiazepine receptor가 관여할 가능성이 있음을 보여준다. 이와같은 결과는 benzodiazepines가 GABA receptor와 그 복합체의 인식부위(recognition site)에 작용하여 GABA의 synapse 부위의 신경전달을 강화시키고,<sup>40)</sup> 뇌막에 대한 GABA 결합력을 항진시키고,<sup>8)</sup> 또한 이런 반응들이 GABA receptor-chloride channel의 구조적인 변화에 의해서 촉진될 수 있다.<sup>9,41)</sup>는 일련의 보고들에 의해 더욱 뒷받침되고 있다.

그러나 현재의 연구는 간접적인 생화학적 연구가 수반되지 아니하였으므로 GABA receptor와 benzodiazepine receptor가 배뇨반사의 억제에 어떻게 관여하는지는 더욱 추구해 볼 문제점으로 남아있다.

## 결 론

마취시킨 흰쥐의 방광내로 생리식염수를 주입하여 야기되는 배뇨반사 수축에 대하여 GABA receptor와 benzodiazepine receptor와의 상관성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

배뇨반사에 대한 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid)의 영향을 검토하기 위하여 외인성의 GABA(10 mg/kg *i.v.*)를 투여하거나 GABA의 대사억제제인 AOAA(aminoxyacetic acid, 1  $\mu$ g *i.c.v.*)를 전처치시 모두 배뇨반사 수축을 억제하였으며, AOAA에 의한 배뇨반사 수축의 억제효과는 GABA<sub>A</sub> receptor antagonist인 bicuculline과 benzodiazepine receptor antagonist인 Ro 15-1788에 의해 차단되었다.

GABA<sub>A</sub> receptor agonist인 muscimol(1  $\mu$ g *i.c.v.*, 3  $\mu$ g *i.t.*, 1 mg/kg *i.v.*) 및 GABA<sub>B</sub> receptor agonist인 baclofen(0.1  $\mu$ g *i.c.v.*, 3  $\mu$ g *i.t.*, 1 mg/kg *i.v.*)은 모두 배뇨반사 수축을 억제하였으며, muscimol에 의한 배뇨반사 수축의 억제효과는 bicuculline 전처치에 의해서 차단되었고, GABA<sub>B</sub> receptor antagonist인 AVA(5-aminovaleric acid)에 의해서는 영향이 없었다. 또

한 이 억제효과는 Ro 15-1788 전처치에 의해서 차단되었으나, benzodiazepine receptor agonist인 flurazepam 전처치에 의해서는 오히려 증강되었다. 반면에 baclofen에 의한 배뇨반사 수축의 억제효과는 Ro 15-1788을 전처치했을 때 영향이 없었다. 한편 diazepam과 flurazepam은 각각 3  $\mu$ g *i.c.v.*, 10  $\mu$ g *i.t.*, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M transurethral 투여시 모두 배뇨반사 수축을 억제하였다.

이상의 결과는 배뇨반사가 GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> receptor 및 benzodiazepine receptor 모두에 의해 매개되는데, 특히 배뇨반사 억제효과에 대한 benzodiazepines의 작용은 GABA와 GABA<sub>A</sub> receptor와의 결합력을 증진시켜 협동작용을 나타내나, GABA<sub>B</sub> receptor에 대해서는 영향이 없다는 것을 제시한다.

## 감사의 말씀

“이 논문은 1991년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”을 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Krnjevic, K.: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.*, **54**, 418-540(1974).
- 2) Erdő, S. L.: Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, **6**, 205-208(1985).
- 3) Johnston, G.A.R.: Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 269-289(1978).
- 4) Andrews, P. R. and Johnston, G. A. R.: GABA agonists and antagonists. *Biochem. Pharmacol.*, **8**, 269-2702(1979).
- 5) Hill, D.R. and Bowery, N.G.: <sup>3</sup>H-Baclofen and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain. *Nature* **290**, 149-152(1981).
- 6) Cooper, J. R., Bloom, R. E. and Roth, R. H.: Amino Acid Transmitter, In *Biochemical Basis of Neuropharmacology* ed. by Cooper, J. R., et al., Oxford Univ. Press, pp 124-172(1986).
- 7) Choi, D. W., Farb, D. H. and Fischbach, G. D.: Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cell culture. *Nature* **269**, 342-344(1977).



- 8) Costa, E. and Guidotti, A.: Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 531-545(1979).
- 9) Simmonds, M. A.: A site for the potentiation of GABA-mediated responses by benzodiazepines. *Nature* **284**, 558-560(1980).
- 10) Sieghart, W.: Multiplicity of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 407-411(1989).
- 11) Bowery, N. G.: Baclofen; 10 years on. *ibid.*, **3**, 400-403(1982).
- 12) Bowery, N. G.: GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology, *ibid.*, **10**, 401-407(1989).
- 13) Mc-Geer, P. L., Eccles, S. J. C. and Mc-Geer, E. G.: Inhibitory amino acid neurotransmitters, In *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain* ed. by Mc-Geer, P. L., *et al.*, Pleum Press, pp. 197-234(1987).
- 14) De Groat, W. C. and Ryall, R. W.: Reflexes to sacral parasympathetic neurones concerned with micturition in the cat. *J. Physiol.*, **200**, 87-108(1969).
- 15) De Groat, W. C. and Lalley, P. M.: Reflexes firing in the lumbar sympathetic outflow to activation of vesical afferent fibers. *ibid.*, **226**, 289-309(1972).
- 16) De Groat, W. C.: Nervous control of the urinary bladder of the cat. *Brain Reseach* **87**, 201-211(1975).
- 17) De Groat, W. C.: The actions of  $\gamma$ -aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **172**, 384-396(1970).
- 18) Maggi, C. A., Furio, M., Santicoli, P., Conte, B. and Meli, A.: Spinal and supraspinal components of GABA ergic inhibition of the micturition reflex in rats. *ibid.*, **240**, 998-1005(1987).
- 19) Maggi, C. A., Santicoli, P. and Meli, A.: GABA<sub>B</sub> receptors mediated inhibition of field stimulation induced contraction of detrusor strips from newborn rats. *J. Auton. Pharmacol.*, **4**, 45-51(1984).
- 20) Santicoli, P., Maggi, C. A. and Meli, A.: GABA<sub>B</sub> receptor mediated inhibition of field stimulation-induced contractions of rabbit bladder muscle in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 378-381(1984).
- 21) Kontani, H., Kawabata, Y. and Koshiura, R.: *In vivo* effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on the urinary bladder contraction accompanying micturition. *Jpn. J. Pharmacol.*, **45**, 45-53(1987).
- 22) Costa, E., Guidotti, A., Mao, C. C. and Suria, A.: New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines. *Life Sci.*, **17**, 167-186(1975).
- 23) Haefely, W., Kulcsar, A., Mohler, H., Pieri, L., Polc, P. and Schaffner, R.: Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **14**, 131-151(1975).
- 24) Polc, P. and Haefely, W.: The effect of diazepam on inhibition in the cuneate nucleus of decerebrate cats. *Experientia* **31**, 731(1975).
- 25) Curtis, D. R., Lodge, D., Johnston, G. A. R. and Brand, S. J.: P Central actions of benzodiazepines. *Brain Research* **118**, 344-347(1976).
- 26) Meldrum, B. S.: Epilepsy and  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev. Neurobiol.*, **17**, 1-36(1975).
- 27) Steiner, F. A. and Felix, D.: Antagonistic effects of GABA and benzodiazepines on vestibular and cerebellar neurones. *Nature* **260**, 346-347(1975).
- 28) Dray, A.: The rat urinary bladder: A novel preparation for the investigation of central opioid activity *in vivo*. *J. Pharmacol. Methods* **13**, 157-165(1985).
- 29) Muhyaddin, M., Roberts, P. J. and Woodruff, G. N.: Presynaptic  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in the rat anococcygeus muscle and their antagonism by 5-aminovaleric acid. *Br. J. Pharmacol.*, **77**, 163-168(1982).
- 30) Satoh, K., Shimizu, N., Tohyama, M. and Maeda, T.: Localization of the micturition reflex center at dorsolateral pontine tegmentum of the rat. *Neurosci. Lett.*, **8**, 27-33(1978).
- 31) Sillén, U., Persson, B. and Rubenson, A.: Involvement of central GABA receptors in the regulation of the urinary bladder function of anesthetized rats. *NNAunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **314**, 195-200(1980).
- 32) Maggi, C. A., Santicoli, P. and Mili, A.: GABA inhibits excitatory neurotransmission in rat pelvic ganglia. *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 349-351(1985).

- 33) Singer, E. and Placheta, P.: Reduction of  $^3\text{H}$ -muscimol binding sites in rat dorsal spinal cord after neonatal capsaicin treatment. *Brain Research* **202**, 484-487(1980).
- 34) Löscher, W.: A comparative study of the pharmacology of inhibitors of GABA metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **315**, 119-128 (1980).
- 35) Löscher, W. and Vetter, M.: Relationship between drug-induced increases of GABA levels in discrete brain areas and different pharmacological effects in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1907-1914(1984).
- 36) Wood, P. L., Loo P., Braunwalder, A., Yokoyama, N. and Cheney, D. L.: *In vitro* characterization of benzodiazepine receptor agonists, antagonists, inverse agonists and agonist/antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 572-576(1984).
- 37) Hunkeler, W., Möhler, H., Pieri, L., Polc, P., Bonetti, E. P., Cumin, R., Schaffner, R. and Haefely, W.: Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* **290**, 514(1981).
- 38) Greenblatt, D. J. and Shader, R. I.: *Benzodiazepines in Clinical Practice*, Raven Press, pp. 1-41(1974).
- 39) Maggi, C. A., Santicoli, P. and Meli, A.: The nonstop transvesical cystometrogram in urethane-anesthetized rats: A simple procedure for quantitative studies on the various phases of urinary bladder voiding cycle. *J. Pharmacol. Methods* **15**, 157-167 (1986).
- 40) Olsen, R. W.: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.*, **37**, 1-13(1981).
- 41) Macdonald, R. L. and Barker, J. L.: Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Nature* **271**, 563-564(1978).