

## 칼슘 길항제가 심장 $\beta$ -Adrenergic Receptors에 미치는 영향

이신웅\* · 김정구

영남대학교 약학대학

### Effect of Calcium Antagonists on the Cardiac $\beta$ -Adrenergic Receptors

Shin-Woong LEE\* and Jeung-Gu KIM

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received January 28, 1993; accepted February 18, 1993)

**Abstract**—It has been known that calcium antagonists also inhibit the radioligand binding to muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic receptors and, in case of verapamil, these inhibitions may play a role in the effects of verapamil on the heart. In this study, the effects of nifedipine, nifedipine, nimodipine, diltiazem and verapamil on the binding of [ $^3$ H]dihydroalprenolol (DHA) to dog cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors were examined. A single uniform [ $^3$ H]DHA binding site ( $K_D=5$  nM and  $B_{max}=2600$  fmol/mg protein) was identified in dog cardiac sarcolemma. [ $^3$ H]DHA binding was not affected by the usual therapeutic concentrations of these calcium antagonists (nanomolar range) but in the “nonspecific” concentration ranges (28~180  $\mu$ M) these drugs inhibited [ $^3$ H]DHA binding to  $\beta$ -adrenergic receptors. Nifedipine, nifedipine, nimodipine and diltiazem competed for [ $^3$ H]DHA binding to  $\beta$ -adrenergic receptors with dissociation constants ( $K_i$ ) of 28  $\mu$ M, 74  $\mu$ M, 39  $\mu$ M and 35  $\mu$ M, respectively. Verapamil ( $K_i=176.5$   $\mu$ M) was less potent inhibitor than other drugs and this inhibition was noncompetitive; the maximal binding capacity ( $B_{max}$ ) was decreased by 300  $\mu$ M verapamil without change in the apparent dissociation constant ( $K_D$ ) for DHA. These results indicate that the inhibitory action of calcium antagonists at high concentrations on  $\beta$ -adrenergic receptors is not involved in the therapeutic effects of these drugs by the calcium channel blocking action.

**Keywords** □ calcium antagonist,  $\beta$ -adrenoceptor, cardiac sarcolemma.

칼슘길항제는 voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channels을 통한 세포내로의  $Ca^{2+}$  유입을 억제하는 약물로서(Fleckenstein, 1983a, b) 조직선택성이 있어 임상에서는 협심증, 부정맥, 고혈압 등 주로 순환기질환의 예방 및 치료에 효과적으로 응용되고 있다(Hopf 등, 1983; Stone, 1987; Deeg 등, 1987; Singh와 Nademanee, 1987; Escudero 등, 1986; Elmfeldt 등, 1987).

근래 수종 칼슘길항제가  $Ca^{2+}$ -channels을 통한  $Ca^{2+}$  유입억제작용 이외에도 muscarinic receptors(Jim 등, 1981; Thayer 등, 1985),  $\alpha$ -adrenergic receptors(Thayer 등, 1985; Nayler 등, 1982), serotonin receptors(Adachi와 Shoji, 1986), histamine receptors(Taylor와 DeFeudis, 1986) 등 여러가지 receptors에 대한 방사능 표지약물의 결합을 억제하는 것으로 알려졌다. 그러나

일반적으로 칼슘길항제의 이들 receptors에 대한 작용이 칼슘유입억제농도보다 훨씬 높은 농도에서 나타날 뿐 아니라 칼슘유입억제작용에는 입체특이성이 있는 반면 이들 receptors에 대한 작용은 입체특이성이 없다는 점(Fairhurst 등, 1980; Thayer 등, 1985)에서 칼슘길항제의 칼슘유입억제부위는 이들 receptors 차단부위와 다르며, 칼슘유입억제효과와 이들 receptors 차단효과간에는 상관성이 없는 것으로 추정되고 있다.

칼슘길항제의 자율신경receptors에 대한 작용은 주로 muscarinic receptors와  $\alpha$ -adrenergic receptors를 대상으로 연구되어 왔으며(Thayer 등, 1985; Barnathan 등, 1982; Motulsky 등, 1983), 대부분의 칼슘길항제의 경우 이들 receptors에 대한 작용이 임상적 치료농도에서는 나타나지 않으나 verapamil의  $\alpha$ -receptors에 대한 작용과 같이 치료농도에서도 나타날 가능성이 있는 것도 있으므로 경우에 따라서는 칼슘길항제의 효과를 설명하는데

\* To whom correspondence should be addressed.

있어 칼슘유입억제 작용 이외의 이들 receptors에 대한 작용을 고려하여야 한다는 보고(Atlas와 Adler, 1981; Karliner 등, 1982)도 있다. 심장의  $\beta$ -adrenergic receptors 역시 고농도의 verapamil에 의하여 영향을 받는다고 알려져 있으나(Jim 등, 1981) 이 성적만으로 구조적으로 서로 상이한 칼슘길항제들의  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한 작용을 유추하기가 어렵다.

본 실험에서는 개심실로부터 형질막을 분리하고 형질막의 [ $^3\text{H}$ ]dihydroalprenolol(DHA) 결합에 미치는 수중 칼슘길항제의 영향을 검토하여 이들의 칼슘유입억제작용과의 관계에 관한 지견을 얻고자 하였다.

## 실험방법

### 실험재료 및 시약

실험재료로는 개 심장을 도살 즉시 빙냉의 10 mM Tris·Cl(pH 7.4) 용액중에 넣어 급히 실험실로 운반하여 사용하였다. [ $^3\text{H}$ ]Dihydroalprenolol(DHA, 35 Ci/mmol), [ $^3\text{H}$ ]ouabain(19.5 Ci/mmol)은 Amersham사로부터, alprenolol 및 tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris)은 Sigma사로부터 구입하였고, diltiazem은 Marion사, nifedipine은 Yamamouchi사, nifedipine은 Pfizer사, nimodipine은 Miles사, verapamil은 Knoll사로부터 제공받았으며 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

### 개심실 형질막의 분리

심실형질막의 분리는 Van Alstyne 등(1980)의 방법을 일부 수정한 Lee 등(1983)의 방법에 의하였다. 즉 심방 및 주위조직을 제거한 심실근을 가위로 세절한 다음 무게의 5배가 되는 5 mM  $\text{NaN}_3$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  용액(pH 7.0, Medium A) 중에 넣고 blender로 균질화한 후, 8,700  $\times$ g에서 20분 동안 원심분리하였다. Pellet를 6배 용량의 10 mM Tris·Cl 용액(pH 7.4, Medium B) 중에 부유시키고 glass homogenizer 중에서 teflon pestle을 4회 통과시킨 후(80%max, 140 W) 8,700  $\times$ g에서 20분 동안 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하고 매회 상정액을 모아 원심분리(35,000  $\times$ g, 20 min)하여 microsome 분획을 얻었으며, 이 microsome을 소량의 medium B에 부유시켜 24%(w/v) sucrose 용액 표면에 섞이지 않도록 천천히 가하여 microsome층이 되게 한 다음 73,400  $\times$ g에서 30분 동안 원심분리하였다. Sucrose 용액층과 medium B층 사이에 생긴 우유빛의 형질막분획층을 채취하고 여기에 약 10배 용량의 medium B를 가한 후 원심분리(73,400  $\times$ g, 30 min)하여 형질막분획을 얻었다.

분리한 각 분획의 단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

### [ $^3\text{H}$ ]Ouabain 결합실험

[ $^3\text{H}$ ]Ouabain 결합실험은 여과법(Wallick 등, 1978)에 의하였다. 즉 50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5

mM Tris·Pi 및  $5 \times 10^{-8}$  M [ $^3\text{H}$ ]ouabain을 함유하는 용액중에 형질막 단백질을 가하고 최종용적이 2 ml되게 한 다음 37°C에서 90분간 반응시키고 혼합액 0.9 ml를 취하여 0.45  $\mu\text{m}$  methylcellulose filter(Gelman)상에서 흡인여과하였다. Filter를 빙냉의 증류수로 3회 세척하고 8 ml의 scintillation액중에 넣어 12시간 이상 실온에 방치한 후 liquid scintillation counter로 그 방사능을 측정하였다. 비특이방사능은 상술의 반응액중에 비표지 ouabain  $10^{-3}$  M을 공존시켰을 때 측정되는 방사능으로 하였으며  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase에 [ $^3\text{H}$ ]ouabain이 선택적으로 결합하여 나타나는 특이방사능은 전체방사능에서 비특이방사능을 뺀 값으로 하였다.

### [ $^3\text{H}$ ]Dihydroalprenolol(DHA) 결합실험

[ $^3\text{H}$ ]DHA 결합실험은 50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\mu\text{g}$ 의 형질막 단백질 및 일정농도의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 존재하에서 시행하였으며 반응액의 최종용적은 0.25 ml, 반응온도는 30°C로 하였다. 반응액을 일정시간 반응시킨 후 반응액중으로 빙냉의 세척액(50 mM Tris·Cl 및 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) 5 ml를 가하여 반응을 종료시키고 즉시 GF/B glass fiber filter(Whatman)상에서 여과하였으며 filter를 5 ml의 세척액으로 3회 세척하고 60 W 광원하에서 3시간 동안 건조한 다음 전술의 방법으로 그 방사능을 측정하였다.  $\beta$ -Adrenergic receptor에 대한 [ $^3\text{H}$ ]DHA 특이결합은 전체결합에서  $10^{-4}$  M alprenolol 존재하에서 측정되는 비특이결합을 뺀 값으로 하였다.

### [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 Kinetic Parameters

50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 여러농도의 [ $^3\text{H}$ ]DHA(1~20 nM) 및 25  $\mu\text{g}$ 의 형질막 단백질을 가하고 30°C에서 20분간 반응시킨 후 전술한 바와 같은 방법으로 여과, 세척 및 그 방사능을 측정하였다. [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 affinity( $K_D$ )와 결합부위농도( $B_{max}$ )는 [ $^3\text{H}$ ]DHA 각 농도에서의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합을 산출한 다음 이를  $B = -K_D \cdot B/F + B_{max}$  ( $B$ : 일정농도의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 존재하에서의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 평형결합,  $F$ : [ $^3\text{H}$ ]DHA의 free concentration)의 식에 적용, Scatchard plot하여 구하였고, Hill coefficient( $n_H$ )는 [ $^3\text{H}$ ]DHA 포화결합실험에서 얻은 성적을  $\log(Y/1-Y) = n \log[F] - \log[K_D]$  ( $Y$ :  $B/B_{max}$ ,  $n$ : Hill coefficient)의 식에 적용, Hill plot하여 각 점을 잇는 회귀선으로부터 구하였다.

### [ $^3\text{H}$ ]DHA결합억제에 대한 칼슘길항제의 $\text{IC}_{50}$ 치 및 $K_i$ 치

[ $^3\text{H}$ ]DHA 결합실험 반응액중에 10 nM [ $^3\text{H}$ ]DHA와 여러 농도의 각 칼슘길항제를 가하고 30°C에서 20분간 반응시킨 후 각 농도의 칼슘길항제 존재하에서의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합을 칼슘길항제를 가하지 않았을 때의 대조 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 백분율로 환산한 다음 이로부터 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 50%를 억제하는 각 칼슘길항제의 농도( $\text{IC}_{50}$ )를 구하였다. [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합억제에 대한 칼슘길항제의  $K_i$ 치는 Cheng과 Prusoff(1973)의 방법에 의하여 [ $^3\text{H}$ ]

DHA의  $K_D$ 치, 사용한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 의 농도( $F$ ) 및 각 칼슘길항제의  $\text{IC}_{50}$ 를  $K_i = \text{IC}_{50}/(1 + F/K_D)$ 의 식에 적용하여 추정하였다.

Dihydropyridine 유도체인 nifedipine, nifedipine 및 nimodipine의 효과를 관찰하는 모든 실험은 암소에서 sodium 광원하에서 시행하였다.

### $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 결합의 Kinetic Parameters에 미치는 칼슘길항제의 영향

본 실험에서는 일정농도의 각 칼슘길항제 존재하에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 의 포화결합실험을 시행하고 각 칼슘길항제 존재하에서 측정된  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합의 affinity, 결합부위 농도 및 Hill coefficient를 구하여 대조군과 비교하였다.

## 실험결과

### 실험성적 분석

모든 성적은 평균치± 표준편차로 나타내었으며 유의성 검정은 two tailed Student's  $t$  test에 의하였다.

### 심실형질막 분획의 정제도

형질막 효소인  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase에 대한  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  결합(Schwartz 등, 1975; Akera, 1977)을 형질막의 marker로 하여 homogenate와 형질막분획의  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  평형결합정도를 비교하였던 바 형질막분획의  $[^3\text{H}]\text{ouabain}$  결합이 homogenate보다 약 44배나 많았다(Table I). 따라서 본 실험에서 분리한 형질막분획을 이용하여 형질막에 존재하는  $\beta$ -adrenergic receptors의 성질과 이 receptors에 대한 칼슘길항제의 영향을 효과적으로 검토할 수 있을 것으로 생각되었다.

### $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 평형결합

형질막 분획에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합이 평형에 도달하는 시간을 알아보기 위하여  $10\text{ nM}$   $[^3\text{H}]\text{DHA}$  존재하에서 시간경과에 따른  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합정도를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합에 의한 전체방사능은 시간경과에 따라 증가되다가 약 5분에 평형에 도달하였으나  $10^{-4}\text{ M}$  alprenolol 존재하에서 측정된 비특이방사능은 반응시간에 영향을 받지 않았을 뿐 아니라 평형상태에서 측정된 전체방사능의 약 10%에 불과하였

**Table I.**  $[^3\text{H}]\text{Ouabain}$  equilibrium binding to homogenate and sarcolemmal fraction prepared from dog ventricle

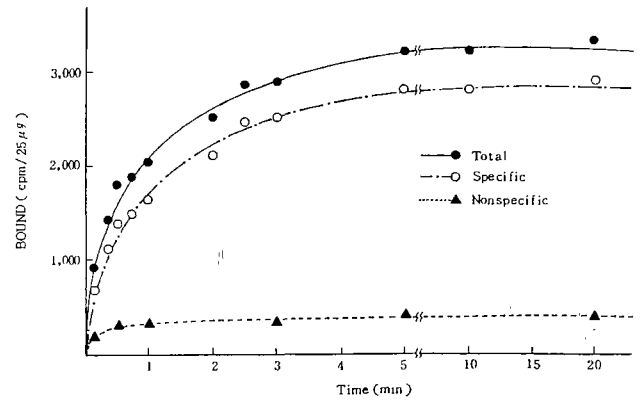
	$[^3\text{H}]\text{Ouabain}$ binding (pmol/mg)
Homogenate	$4.2 \pm 0.2$
Sarcolemma	$185.0 \pm 22.1$
Purification(fold)	$44.1 \pm 7.4$

$[^3\text{H}]\text{Ouabain}$  equilibrium binding was carried out in medium containing  $50\text{ mM}$  Tris·Cl(pH 7.4),  $5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $5\text{ mM}$  Tris·Pi,  $5 \times 10^{-8}\text{ M}$   $[^3\text{H}]\text{ouabain}$ , and  $100\text{ }\mu\text{g}$  of homogenate or  $20\text{ }\mu\text{g}$  of sarcolemmal protein for 90 min at  $37^\circ\text{C}$ . The data represent the mean± SEM of four different preparations.

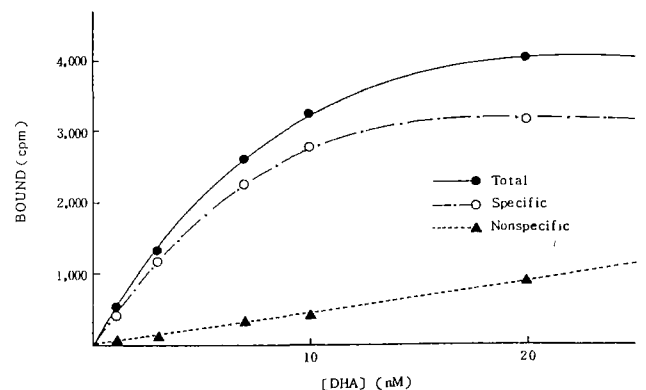
다. 또한 본 실험의 평형상태에서 단백질 mg당 약  $1.4\text{ pmol}$ 의  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 가  $\beta$ -adrenergic receptors에 결합하는 것으로 계산되었고 이 결합한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 양을 사용한 단백질량( $25\text{ }\mu\text{g}$ )과 반응액의 최종용적( $0.25\text{ ml}$ )을 기준으로  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 의 농도로 환산하면 약  $0.14\text{ nM}$ 이 된다. 이는 사용한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  농도인  $10\text{ nM}$ 보다 훨씬 낮은 농도로서 이 결합반응은 pseudo first-order kinetics에 해당되며 여기서 구한 평형결합의 반이 결합되는 시간은 약 30 초였다. 이와같이  $10\text{ nM}$   $[^3\text{H}]\text{DHA}$  존재하에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 는 형질막에 빠른 속도로 결합하여 약 5분에 평형결합에 도달하였으므로 이후 실험에서는 반응시간을 평형에 도달하는 충분한 시간인 20분으로 하였다.

### 심실형질막의 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 포화결합실험

$\beta$ -Adrenergic receptors에 대한 칼슘길항제의 영향을



**Fig. 1.** Time course of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  binding to dog ventricular sarcolemma. Sarcolemmal protein ( $25\text{ }\mu\text{g}$ ) was incubated with  $1 \times 10^{-8}\text{ M}$   $[^3\text{H}]\text{DHA}$  at  $30^\circ\text{C}$  in the presence of  $50\text{ mM}$  Tris·Cl and  $10\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  in a final volume of  $0.25\text{ ml}$  and the reaction terminated at the given time intervals by rapid vacuum filtration.



**Fig. 2.** A saturation isotherm of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  binding to dog ventricular sarcolemma. Sarcolemmal protein ( $25\text{ }\mu\text{g}$ ) was incubated with various concentrations of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  for 20 min at  $30^\circ\text{C}$ . Specific binding ( $\circ$ ) was calculated as the difference in counts bound in the presence and absence of  $10^{-4}\text{ M}$  alprenolol.

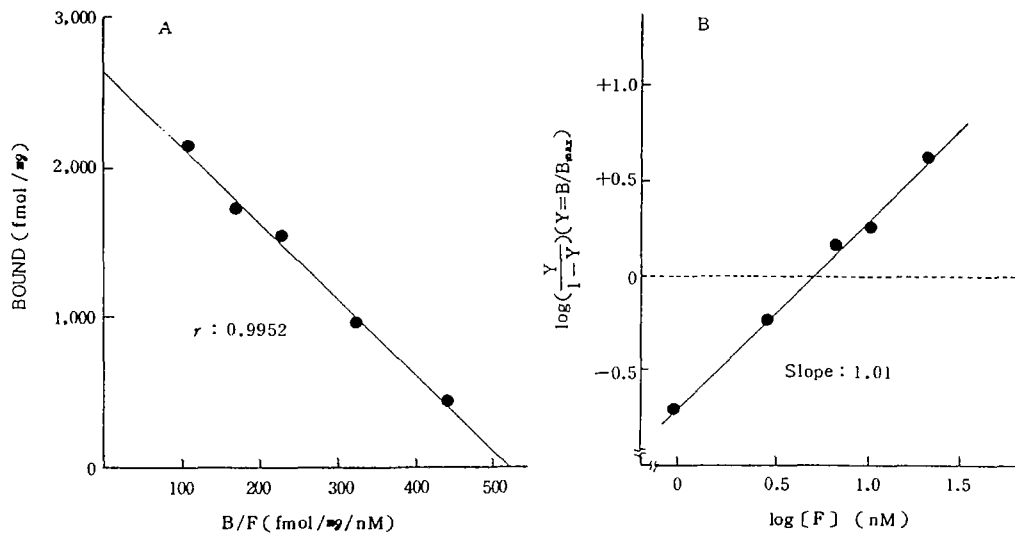


Fig. 3. Scatchard(A) and Hill plots(B) of specific [ $^3\text{H}$ ]DHA binding. B: equilibrium [ $^3\text{H}$ ]DHA binding at a given concentration of [ $^3\text{H}$ ]DHA.  $B_{max}$ : binding site concentration. F: free [ $^3\text{H}$ ]DHA concentration.

Table II. The binding parameters of [ $^3\text{H}$ ]DHA to dog ventricular sarcolemma

$K_D$ (nM)	$B_{max}$ (fmol/mg)	nH
$5.14 \pm 0.39$	$2,633 \pm 138.1$	$1.05 \pm 0.02$

$K_D$  and  $B_{max}$  were calculated from Scatchard analysis and Hill coefficient (nH) was from Hill plot. Values are the mean  $\pm$  SEM of four separate preparations.

검토하기 위해서는 먼저 심실형질막의  $\beta$ -adrenergic receptors의 성질을 알아야함으로 본 실험에서는 [ $^3\text{H}$ ]DHA의 포화결합실험을 시행하고 그 결과를 분석하였다. Fig. 2는 [ $^3\text{H}$ ]DHA 농도증가에 따른 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합정도를 도시한 것으로 전체결합의 경우 [ $^3\text{H}$ ]DHA 10 nM까지는 농도증가에 따라 급속히 증가되다가 10 nM 이상에서는 그 증가정도가 줄어들었으나 비특이결합의 경우 [ $^3\text{H}$ ]DHA 농도에 비례하여 증가되었고, 전체결합에서 비특이결합을 뺀  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한 [ $^3\text{H}$ ]DHA의 특이결합은 [ $^3\text{H}$ ]DHA 농도증가에 따라 증가되다가 약 20 nM에서 거의 포화되는 포화성 결합이었다.

#### [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 Kinetic Parameters

Fig. 3은 Fig. 2의 포화결합실험 성적을 Scatchard(A) 및 Hill plot(B)한 것으로 Scatchard plot했을 때 각 점을 잇는 회귀선의 직선성이 인정되었고( $r : 0.995$ ), 여기서 구한 [ $^3\text{H}$ ]DHA의  $K_D$ 치는 약 5 nM, 결합부위농도( $B_{max}$ )는 단백질 mg당 약 2,600 fmol이었으며, Hill coefficient가 1에 가까웠다(Table II).

#### 칼슘길항제에 의한 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합억제

본 실험에서는 10 nM [ $^3\text{H}$ ]DHA와 여러 농도의 칼슘길항제 존재하에서 형질막의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합실험을 시행하여 각 칼슘길항제에 의한 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합억제정도를

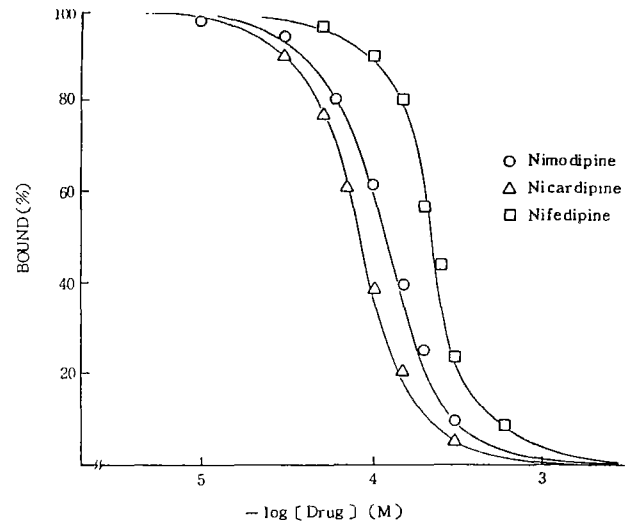


Fig. 4. Inhibition of [ $^3\text{H}$ ]DHA binding to dog ventricular sarcolemma by dihydropyridines. Sarcolemma were incubated with 10nM [ $^3\text{H}$ ]DHA and various concentrations of dihydropyridines for 20 min at  $30^\circ\text{C}$  and the specific [ $^3\text{H}$ ]DHA binding determined as described in "Methods".  $\Delta$ : nicardipine.  $\square$ : nifedipine.  $\circ$ : nimodipine. Each point shown denotes mean of the data obtained in three separate experiments.

비교하였다. 먼저 dihydropyridine 유도체인 nicardipine, nifedipine 및 nimodipine의 영향을 조사하였던 바 nicardipine과 nimodipine은  $30 \mu\text{M}$ , nifedipine은  $100 \mu\text{M}$ 에서부터 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합을 억제하기 시작하여 각각  $300 \mu\text{M}$ ,  $600 \mu\text{M}$ 에서 90% 이상 억제하였으며(Fig. 4) DHA 결합의 50%를 억제하는  $\text{IC}_{50}$ 치는 nicardipine은 약  $80 \mu\text{M}$ , nifedipine은 약  $200 \mu\text{M}$ , nimodipine은  $100 \mu\text{M}$ 이었다.

Fig. 5는 diltiazem과 verapamil의 영향을 조사한 것으로 diltiazem은  $10 \mu\text{M}$ 에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합을 억제하기 시작하였으나 verapamil은 이보다 20배 높은  $200 \mu\text{M}$ 에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합을 유의하게 억제하였다. 그러나 DHA 결합을 100% 억제하는 농도는 두 약물에서 다같이 약  $2 \text{mM}$ 로서 유사하였다.

#### 칼슘길항제가 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 결합의 Kinetic Parameters에 미치는 영향

전술의 실험으로부터 칼슘길항제가  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합을 억제함을 알았으므로 본 실험에서는 이러한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  결합억제가  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 와 칼슘길항제의 경쟁적 결합에 기인한 것인지를 조사하기 위하여  $\text{IC}_{50}$ 치에 가까운 칼슘길항제 존재하에서  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 의 포화결합실험

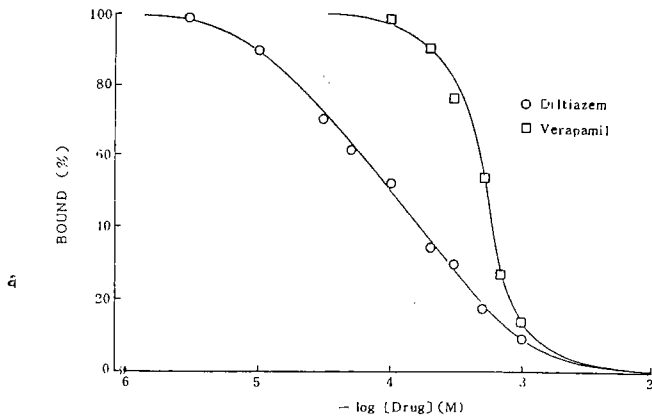


Fig. 5. Inhibition of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  binding to dog ventricular sarcolemma by diltiazem (○) and verapamil (□). Legends are the same as described in Fig. 4.

을 시행하였다.

Fig. 6은 nifedipine( $60 \mu\text{M}$ )과 verapamil( $600 \mu\text{M}$ )의 영향을 도기한 것으로 nifedipine의 경우  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  농도가 증가함에 따라 그 결합억제작용이 점차 줄어들어 최대결합에 있어서는 대조군과 유사하였으나 verapamil의 경우 최대결합정도가 감소되는 양상을 나타내었다. 이 결과를 Scatchard plot하고(Fig. 7-A) 이를 분석하였던바 nifedipine은  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 의  $K_D$ 치를 약 2배 증가시켰으나 결합부위농도에는 영향을 미치지 않는 한편, verapamil은  $K_D$ 치의 증가와 아울러 결합부위농도도 감소시켰다. Nifedipine 또는

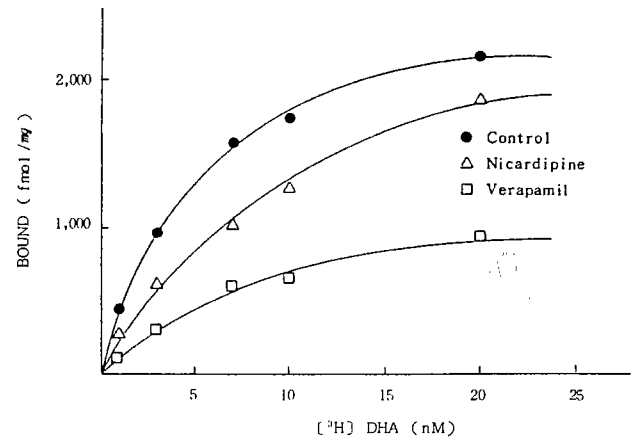


Fig. 6. Saturation experiments of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  binding in the absence or presence of  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonist. Sarcolemmal protein was incubated with various concentrations of  $[^3\text{H}]\text{DHA}$  for 20 min at  $30^\circ\text{C}$ . The incubations were performed in parallel in the absence (●) or presence of nifedipine ( $60 \mu\text{M}$ , △) or verapamil ( $600 \mu\text{M}$ , □). Each point denotes mean of four separate experiments.

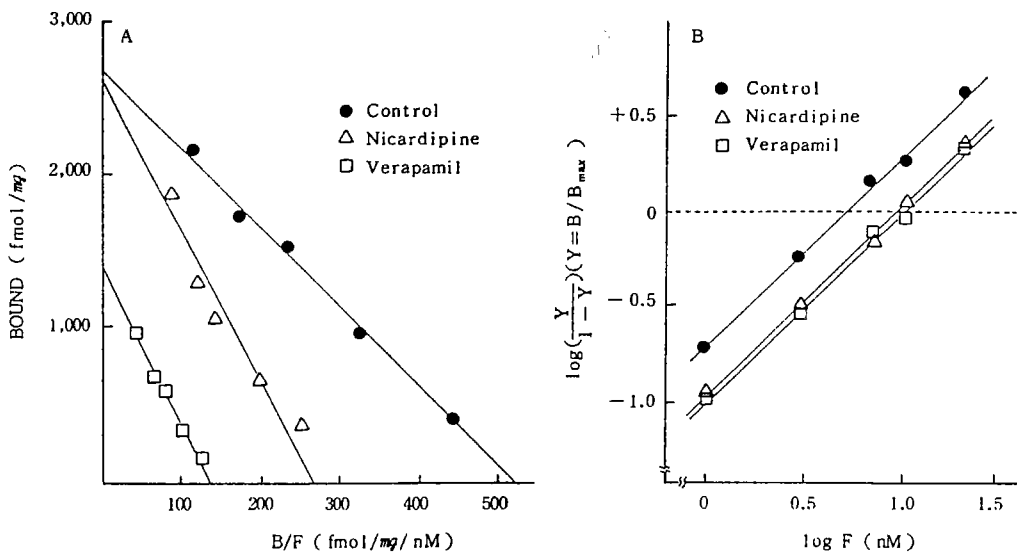


Fig. 7. Scatchard(A) and Hill plots(B) of saturation binding data. ●: control. △: in the presence of  $60 \mu\text{M}$  nifedipine. □: in the presence of  $600 \mu\text{M}$  verapamil. Other legends are the same as described in Fig. 6.

**Table III.** Effect of Ca<sup>2+</sup> antagonists on the binding parameters of [<sup>3</sup>H]DHA to dog ventricular sarcolemma

	Dose ( $\mu$ M)	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (fmol/mg)	nH
Control	—	5.1 ± 0.4	2633 ± 138	1.05 ± 0.02
Nicardipine	60	9.6 ± 0.3*	2854 ± 111	1.05 ± 0.02
Nifedipine	200	10.2 ± 0.8*	2427 ± 154	1.12 ± 0.04
Nimodipine	100	9.5 ± 0.4*	2442 ± 176	1.13 ± 0.03
Diltiazem	100	11.8 ± 0.7*	2433 ± 91	0.95 ± 0.05
Verapamil	300	6.2 ± 0.5	1909 ± 120*	1.07 ± 0.04
	600	10.8 ± 0.5*	1392 ± 91*	1.03 ± 0.02

K<sub>D</sub> and B<sub>max</sub> were calculated from Scatchard analysis. Hill coefficients (nH) were taken as the slope of the regression line obtained from Hill plot of saturation binding data. Values are the mean ± SEM of four separate experiments.

\*: Statistically significant from control (p < 0.01).

**Table IV.** K<sub>i</sub> values of Ca<sup>2+</sup> antagonists for the inhibition of [<sup>3</sup>H]DHA binding to dog ventricular sarcolemma

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M)	K <sub>i</sub> <sup>b</sup> ( $\mu$ M)	n <sup>c</sup>
Nicardipine	82.6 ± 7.0	28.0 ± 2.4	3
Nifedipine	218.3 ± 6.4	74.0 ± 2.2	3
Nimodipine	114.6 ± 14.2	38.7 ± 4.8	4
Diltiazem	103.1 ± 30.7	35.0 ± 10.2	4
Verapamil	520.5 ± 54.6	176.5 ± 18.3	3

<sup>a</sup> Concentration of Ca<sup>2+</sup> antagonists which inhibited 50% of the specific [<sup>3</sup>H]DHA binding in the presence of 10 nM [<sup>3</sup>H]DHA.

<sup>b</sup> Calculated from K<sub>i</sub> = IC<sub>50</sub> / (1 + F/K<sub>D</sub>).

<sup>c</sup> Number of independent determinations.

verapamil 존재하에서 [<sup>3</sup>H]DHA 포화결합실험 성적을 Hill plot했을 때(Fig. 7-B) Hill coefficient가 약 1로서 이들 약물은 [<sup>3</sup>H]DHA결합의 cooperativity에는 영향을 미치지 않았다.

Table III은 칼슘길항제에 의한 [<sup>3</sup>H]DHA의 affinity (K<sub>D</sub>), 결합부위농도(B<sub>max</sub>) 및 Hill coefficient(nH)의 변화를 요약한 것으로 nifedipine, nimodipine, diltiazem도 전술한 nicardipine과 같이 결합부위 농도와 Hill coefficient에는 영향을 주지 않으면서 affinity를 감소시켰다. 그러나 verapamil의 경우 다른 칼슘길항제와는 달리 300  $\mu$ M 존재하에서는 [<sup>3</sup>H]DHA 결합의 affinity에는 영향을 미치지 않고 결합부위농도를 감소시켰으며, 600  $\mu$ M에서는 affinity와 결합부위농도를 모두 감소시켰다.

#### [<sup>3</sup>H]DHA 결합억제에 대한 칼슘길항제의 K<sub>i</sub>치

방사능표지약물결합의 50%를 억제하는 비표지약물의 IC<sub>50</sub>치는 사용하는 방사능표지약물의 농도에 따라 달라짐으로 Cheng과 Prusoff(1973)의 방법에 의하여 추정된 IC<sub>50</sub>치로부터 K<sub>i</sub>치를 산출하였다.

Table IV는 이를 요약한 것으로 본 실험에 사용한 모든 칼슘길항제의 [<sup>3</sup>H]DHA 결합억제에 대한 K<sub>i</sub>치는 20  $\mu$ M 이상이였으며 이들 중 nifedipine과 verapamil의 K<sub>i</sub>치가

nicardipine, nimodipine 및 diltiazem의 K<sub>i</sub>치(28~39  $\mu$ M) 보다 각각 약 2배 및 5배 높았다.

## 고 찰

본 실험에서 고농도의 칼슘길항제는 심장의  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한 [<sup>3</sup>H]dihydroalprenolol(DHA) 결합을 억제하였다.

방사능표지약물 결합실험은 세포막에 있는 여러가지 receptors를 직접 확인할 수 있을 뿐 아니라 비표지약물의 이들 receptors에 대한 작용을 간접적으로 추정할 수 있다. 칼슘길항제의 이들 receptors에 대한 작용도 특정 receptors에 선택적으로 작용하는 방사능표지약물의 결합실험을 통하여 추궁되어온 바 수종의 칼슘길항제가  $\alpha$ -adrenergic receptors 및 muscarinic receptors 차단작용이 있는 것으로 알려졌다(Thayer 등, 1985; Naylor 등, 1982; Fairhurst 등, 1980; Atlas와 Adler, 1981). 특히 verapamil의 경우 dihydropyridine 유도체나 diltiazem과는 달리 심근의  $\alpha_1$ - 및  $\alpha_2$ -receptors에 대한 K<sub>i</sub>치가 0.6~6  $\mu$ M(Naylor 등, 1982; Motulsky 등, 1983; Karliner 등, 1982)이며 이 농도는 임상에서 심근의 혈류장애나 부정맥치료목적으로 사용할 때의 혈장농도(약 0.1  $\mu$ M)보다는 높은 농도이나 심근조직에서의 농도(0.6~1.2  $\mu$ M)(Kates 등, 1981; Keefe와 Kates, 1982)와는 유사한 농도로서 verapamil의 심장에 대한 효과에는 voltage dependent Ca<sup>2+</sup>-channel을 통한 Ca<sup>2+</sup> 유입억제작용 이외에도  $\alpha$ -adrenergic receptors 차단작용이 관여할 것으로 보고되어 있다(Motulsky 등, 1983). 뿐만 아니라 이러한 방사능 표지약물 결합실험으로 탐지된 verapamil의  $\alpha$ -adrenergic receptor 차단작용은 verapamil이  $\alpha$ -receptors효능제인 phenylephrine의 유두근수축을 억제한다는 기능적 실험결과(Endoh 등, 1975)와도 일치한다. 그러나 nifedipine과 diltiazem의  $\alpha$ -adrenergic receptors에 대한 작용은 임상적 유효혈중농도보다 1000 배 이상 높은 농도에서 나타나므로(Naylor 등, 1982) 그 효과설명에 있어 이 receptors에 대한 작용을 고려할 필요가 없다.

Muscarinic receptors에 대한 [<sup>3</sup>H]quinuclidinyl benzilate(QNB) 결합 및  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한 [<sup>3</sup>H]DHA 결합 역시 verapamil로 억제되거나  $\alpha$ -adrenergic receptors에 대한 작용보다 각각 약 10배 및 100배 약한 것으로 보고(Jim 등, 1981; Karliner 등, 1982)되어 있다. 이와같이 칼슘길항제의 종류와 receptors의 종류에 따라 그 작용에 차이가 있으므로 임상적 유효혈중농도보다 100배 이상 높은 농도에서 나타나는 verapamil의  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한 작용만으로는 여러가지 칼슘길항제의 이 receptors에 대한 작용을 예측할 수 없다.

본 실험에서 verapamil을 제외한 다른 약물들이 [<sup>3</sup>H]DHA와 경쟁적으로 결합하였음은 이들 약물과  $\beta$ -adre-

nergic receptors 또는 이 receptors site와 밀접한 연관성을 가지는 부위와의 직접적인 상호작용이 있음을 시사하며 이 site에 대한  $K_i$ 치가 nicardipine, nimodipine 및 diltiazem에서는 28~39  $\mu\text{M}$ 로서 유사하였으나 nifedipine은 이보다 약 2배 높은 74  $\mu\text{M}$ 이었고, 비경쟁적이긴 하나 verapamil은 약 5배 높은 177  $\mu\text{M}$ 이었다. 그러나 고농도의 verapamil에 의해서는 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합의 affinity 뿐만 아니라 결합부위농도도 감소되는 것으로 보아 고농도 verapamil의 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합억제작용은 막의 유동성변화와 같은 구조적 성질변화에 기인할 것으로 추정된다.

본 실험에서 사용된 칼슘길항제의  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한  $K_i$ 치(28  $\mu\text{M}$ ~177  $\mu\text{M}$ )는 심실근에서  $\text{Ca}^{2+}$  유입의 50%를 억제하는 이들 약물의  $\text{IC}_{50}$ 치(5 nM~150 nM) 및 이들 약물의 임상적 치료 혈장농도(1 nM~80 nM)(Nayer, 1988)보다 훨씬 높은 농도이고, dihydropyridine 유도체의  $\text{Ca}^{2+}$  유입억제부위에 대한 nicardipine의  $K_D$ 치(~90 pM)(Thayer 등, 1985)와 nimodipine의  $K_D$ 치(~0.25 nM)(Janis 등, 1982; Janis와 Triggle, 1984)보다는 100,000배 이상 높은 농도일 뿐 아니라, 이들 약물의  $\text{Ca}^{2+}$  유입억제농도나 유효혈장농도에 해당하는 농도로서는 [ $^3\text{H}$ ]DHA 결합에 하등의 영향을 미치지 않았다는 점에서 고농도에서의 이들 칼슘길항제의  $\beta$ -adrenergic receptors에 대한작용은 이들 약물의  $\text{Ca}^{2+}$  유입억제작용과는 상관성이 없는 것으로 추정되며 치료농도에서는 나타나지 않는 비특이작용일 것으로 생각된다.

### 감사의 말씀

“이 논문은 1992년도 보건사회부의 신약개발연구비지원에 의하여 연구 되었음”을 감사드립니다.

### 참고문헌

- Adachi, H. and Shoji, T. (1986). Characteristics of the inhibition of ligand binding to serotonin receptors in rat brain membranes by verapamil. *Japanese J. Pharmacol.* **41**, 431-435.
- Akera, T. (1977). Membrane adenosine triphosphatase; A digitalis receptor? *Science* **198**, 569-574.
- Atlas, D. and Adler, M. (1981).  $\alpha$ -Adrenergic receptors as possible calcium channel inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1237-1241.
- Barnathan, E.S., Addonizo, P. and Shattil, S.J. (1982). Interaction of verapamil with human platelet  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* **242**, H19-H23.
- Cheng, Y. and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between inhibition constant( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes a 50 percent inhibition( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- Deeg, P., Weiss, K.H. and Schmitz, H. (1987). Anti-ischemic effect of nisoldipine in patients with stable angina pectoris. In *Nisoldipine* (P.G. Hugenoltz and J. Meyer, Eds), pp. 244-248. Springer-verlag, Berlin.
- Elmfeldt, D., Hedner, T. and Westerling, S. (1987). Felodipine in hypertension-A review. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **10**(Suppl. D), S154-S160.
- Endoh, M., Wagner, J. and Shumann, H.J. (1975). Influence of temperature on the positive inotropic effects mediated by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **287**, 61-72.
- Escudero, J., Hernandez, H. and Martinez, F. (1986). Comparative study of the antihypertensive effect of verapamil and atenolol. *Am. J. Cardiol.* **57**, 54D-58D.
- Fairhurst, A.S., Whittaker, M.L. and Erlert, J. (1980). Interactions of D600(Methoxyverapamil) and local anesthetics with rat brain  $\alpha$ -adrenergic and muscarinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 155-162.
- Fleckenstein, A. (1983a). Calcium antagonism in heart and smooth muscle. In *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, pp. 1-399. Wiley, New York.
- Fleckenstein, A. (1983b). History of calcium antagonists. *Circ. Res.* **52**, I3-I16.
- Hopf, R., Dowinsky, S. and Kaltenbach, M. (1983). Use of calcium channel blocking agents in treatment of classic exertional angina. In *Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders* (P.H. Stone and E.M. Antman, Eds), pp. 241-268. Future, New York.
- Janis, R.A., Maurer, S.C., Sarmiento, J.G., Bolger, G.T. and Triggle, D.J. (1982). Binding of [ $^3\text{H}$ ]nimodipine to cardiac and smooth muscle membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **82**, 191-194.
- Janis, R.A. and Triggle, D.J. (1984). 1,4-Dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists and activator: A comparison of binding characteristics with pharmacology. *Drug Develop. Res.* **4**, 257-274.
- Jim, K., Harris, A., Rosenberger, L.B. and Triggle, D.J. (1981). Stereoselective and non-stereoselective effects of D600 (methoxyverapamil) in smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.* **76**, 67-72.
- Karliner, J.S., Motulsky, H.J., Dunlap, J., Brown, J.H. and Insel, P.A. (1982). Verapamil competitively inhibits  $\alpha_1$ -adrenergic and muscarinic, but not  $\beta$ -adrenergic receptors in rat myocardium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **4**, 515-520.
- Kates, R.E., Keefe, D., Schwartz, J., Harapat, S., Harrison, D., Kirsten, E. and Johnson, S.M. (1981). Disposition kinetics of verapamil and norverapamil(abstr). *Clin. Pharmacol. Ther.* **29**, 257.
- Keefe, D.L. and Kates, R.E. (1982). Myocardial disposition and cardiac pharmacodynamics of verapamil in dog. *J. Pharm. Exp. Ther.* **220**, 91-96.
- Lee, S.W., Schwartz, A., Adams, R.J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L.K. and Wallick, E.T. (1983). Decrease in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. **5**, 682-688.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

- Motulsky, H.J., Snavely, M.D., Hughes, R.J. and Insel, P.A. (1983). Interaction of verapamil and other calcium channel blockers with  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Circ. Res.* **52**, 226-231.
- Nayler, W.G. (1988). *Calcium antagonists*. pp. 84. Academic Press, San Diego.
- Nayler, W.G., Thompson, J.C. and Jarrott, B. (1982). The interaction of calcium antagonists (slow channel blockers) with myocardial  $\alpha$ -adrenoceptors. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **14**, 185-188.
- Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C. (1975). The sodium potassium adenosine triphosphatase. Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* **27**, 1-134.
- Singh, B.N. and Nademanee, K. (1987). Use of calcium antagonists for cardiac arrhythmias. *Am J. Cardiol.* **59**, 153B-162B.
- Stone, P.H. (1987). Calcium antagonists for Prinzmetal's variant angina, unstable angina and silent myocardial ischemia: Therapeutic tool and probe for identification of pathophysiological mechanisms. *Am. J. Cardiol.* **59**, 101B-115B.
- Taylor, J.E. and DeFeudis, F.V. (1986). Interactions of verapamil, D600, flunarizine and nifedipine with cerebral histamine receptors. *Neurochem. International.* **9**, 379-381.
- Thayer, S.A., Welcome, M., Chabra, A. and Fairhurst, A.S. (1985). Effects of dihydropyridine calcium channel blocking drugs on rat brain muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 175-180.
- Van Alstyne, E., Burch, R.M., Knickelbein, R.G., Hungerford, R.T. Gower, E.J., Webb, J.G., Poe, S.L. and Lindenmayer, G.E. (1980). Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle. *Biophys. Acta.* **602**, 131-143.
- Wallick, E.T., Anner, B.M., Ray, M.V. and Schwartz, A. (1978). Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide treated Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8778-8786.