

비수기성 항 Histamine 제와 대뇌 Muscarine 수용체와의 상호작용

김영열 · 이정수* · 박인숙#

국립보건원, *대구산업정보대학, #식품의약품안전청, 국립독성연구소

(Received August 31, 1999)

Interaction of Nonsedating Antihistamines with Cerebral Muscarinic Receptors

Young-youl Kim, Jeung-soo Lee* and In-sook Park#

National Institute of Health, Seoul 122-704, Korea

*Taegu Polytechnic College Department of Food Science & Nutrition, Daegu 706-711, Korea

#Department of Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704, Korea

Abstract — Nonsedating antihistamines do not cause sedation in therapeutic doses because these drugs hardly cross the blood-brain barrier. Since most of the peripheral side effects of conventional antihistamines are related to their muscarinic receptor blocking action, the present study was performed to investigate whether nonsedating antihistamines interact with the muscarinic receptors and discriminate the muscarinic receptor subtypes in the rat cerebral microsomal fraction which contains both M_1 , M_2 , M_3 and M_4 receptors. Five nonsedating antihistamines at high concentrations inhibited [3 H]QNB binding to the muscarinic receptor in a dose-dependent manner. The inhibition curves of these drugs except loratadine which showed positive cooperativity ($nH=1.55$) were steep ($nH=1$), indicating interaction with a single homogenous population of the binding sites. Astemizole, clemizole and mequitazine increased the K_D value for [3 H]QNB without affecting the binding site concentrations, and this increase in the K_D value resulted from the ability of these drugs to slow [3 H]QNB-receptor association. The K_i values of astemizole, clemizole and mequitazine for the inhibition of [3 H]QNB binding to muscarinic receptor were 0.58, 5.99 and 0.007 μ M, respectively. However, loratadine and terfenadine inhibited noncompetitively [3 H]QNB binding with the normalized IC_{50} value of about 2 μ M. These results demonstrate that; 1) astemizole, clemizole and mequitazine interact directly with the muscarinic receptor at high concentrations; 2) muscarinic receptor blocking potency of these drugs varies widely among drugs; 3) these drugs do not discriminate between muscarinic receptor subtypes.

Keywords □ Antihistamines, muscarinic receptor, cerebrum.

항 histamine제는 histamine H_1 -수용체에 histamine 과 경쟁적으로 결합하여 histamine에 의한 평활근 수축이나 혈관투과성 증가와 같은 반응을 억제하는 약물로서 담마진, 피부염, allergy성 비염 등에 널리 이용되고 있다.¹⁻³⁾ 그러나 이들은 항히스타민작용 이외에도 부교감신경 차단작용, 국소마취작용, 항 serotonin작용, 진정작용, 진토작용 등 다양한 작용이 있으며 특히 이들 작용 중 부교감신경 차단작용은 멀미, Parkinson

증후군 및 약물에 의한 추체외로 증상에 사용될 때는 그 치료 효과와 관계가 있는 것으로 생각되고 있으나 allergy 환자에게는 부작용이 된다.³⁻⁶⁾

근래 기존의 항 histamine제가 가지는 주 부작용인 진정작용을 감소시키기 위하여 새로운 항 histamine제들이 개발 소개되었으며, 이들 약물들은 지금까지 사용되어온 항 histamine제들 보다 일반적으로 극성이 크다는 물리화학적 성질의 차이로 인하여 혈액뇌 관문(blood-brain barrier)을 잘 통과하지 못하므로 상용량에서는 거의 진정작용을 나타내지 않는 것으로 알려져 있고 있다.⁷⁻¹¹⁾ 뿐만 아니라, 이들 비수기성 항

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-380-1808-9 (팩스) 02-380-1806

histamine제들은 H₁ 수용체에 대한 affinity 측면에서도 중추 H₁ 수용체보다 말초 H₁ 수용체에 대한 affinity가 크다는 보고¹²⁾가 있으나 현재까지 기능적 실험이나 방사성 표지약물 결합실험을 통하여 중추와 말초에 있는 H₁ 수용체의 성질이 다르다는 증거, 즉 H₁ 수용체 subtype의 존재 가능성을 시사한 어떤 자료도 찾아 볼 수 없다.

H₁ 수용체와는 달리 muscarine 수용체는 각 subtype에 대한 선택적인 길항제에 의하여 M₁, M₂, M₃, M₄ 및 M₅ subtype로 분류되며, M₁ 수용체는 주로 중추의 대뇌피질, 선조체, 해마 및 말초신경계의 교감신경절 등, M₂ 수용체는 심장, M₃ 수용체는 외분비선 및 평활근에 주로 분포되어 있으며 M₄ 수용체는 M₂ 수용체와 유사하게 분포되어 있으며 M₅ 수용체는 M₁ 수용체와 유사하게 대뇌에 주로 분포하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁸⁾ 전술한 기존 항 histamine제의 부교감신경차단 작용은 acetylcholine의 유리억제나 대사, 배설 같은 외적요소 보다 주로 muscarine 수용체에 대한 직접적인 작용에 기인하는 것으로서 항 histamine제의 종류에 따른 차이는 있지만 지금까지 분류되어온 muscarine 수용체 subtype에 대한 선택성이 없어^{19,20)} 상용량에서 상당한 중추성 및 말초성 부작용을 나타낸다. 한편, 기존 제 1세대 항 histamine제와 구조적으로 상이한 비수기성 항 histamine제의 경우 대뇌 muscarine 수용체에 대한 affinity가 기존의 약물보다 낮다는 보고는 있으나 이들 약물과 muscarine 수용체와의 상호기전 및 이들 약물이 muscarine 수용체 subtype에 대하여 선택성을 가지는 지 특히 M₁ 수용체에 대한 affinity가 작은 지에 관한 상세한 검토가 없다. 따라서 본 연구에서는 muscarine 수용체에 대한 작용면에서 비수기성 항 histamine제가 기존 항 histamine제와 차이가 있는 지를 알아보려고 muscarine 수용체 subtype들이 공존하고 있는 대뇌 microsomal fraction에서 수종 비수기성 항 histamine제의 muscarine 수용체에 대한 작용을 비교검토하고자 하였다.

실험방법

재료 및 시약 - 실험동물은 외관상 건강한 체중 250~300 g의 흰쥐(Sprague-Dawley)를, filter는 Whatmann사의 GF/B filter를 사용하였다. [³H]Quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB, 41.6 Ci/mmol)는 Du-

pont (NEN)사로부터, tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), atropine sulfate, 2,5-diphenyloxazole (PPO), 1,4-bis[2-(5-phenyl-oxazolyl)]benzene (POPOP)는 Sigma사로부터 구입 사용하였고, astemizole, clemizole, loratadine, mequitazine 및 terfenadine 등은 국립보건원(현 식품의약품안전청)으로부터 실험용으로 제공 받았으며, 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

흰쥐 대뇌로부터 microsomal fraction의 분리 - 대뇌 microsomal fraction은 Mayrand 등²¹⁾의 방법을 일부 수정하여 분리하였다. 체중 250~300 g의 흰쥐를 단두 도살하고 뇌를 적출, 방냉의 10 mM Tris-Cl 용액(pH 7.4, Medium A) 중에 넣어 대뇌를 분리, 가위로 세절한 후 여기에 대뇌 무게의 약 50배가 되는 medium A를 가하고 이를 blender로 균질화 한 후 1,100 g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 7,700 g에서 25분간 원심분리하고, 이 상층액을 55,000 g에서 30분간 원심분리하여 microsomal fraction을 얻었으며 이 분획을 소량의 medium A중에 부유시켜 -70°C에 저장하였다가 필요시 사용하였다.

단백질농도는 bovine serum albumine 용액을 표준액으로 하여 Lowry 등²²⁾의 방법으로 측정하였다.

[³H]Quinuclidinyl benzilate (QNB) 결합실험 - [³H] QNB 결합실험은 여과법²³⁾에 의하였다. 즉 50 mM Tris-Cl(pH 7.4), 10 mM MgCl₂ 및 일정농도의 [³H]QNB를 함유하는 medium A속에 microsomal fraction을 가하여 총용적이 5 ml가 되게 한 후 37°C에서 180분간 반응시킨 다음 GF/B filter상에서 흡입여과하였다. Filter를 세척액 5 ml로 3회 세척, scintillation vial에 넣고 광원하에서 2시간 건조한 다음 8 ml의 scintillation액(PRO : 6 g, POPOP : 225 mg, Triton X-100 : 0.5 l, Toluene : 1 l)을 넣고 12시간 방치 후 liquid scintillation counter로 그 radioactivity를 측정하였다.

[³H]QNB의 특이결합은 전체결합에서 10 μM atropine 존재하에서 측정되는 비특이결합을 뺀 값으로 하였다.

Muscarinic receptor에 대한 [³H]QNB의 K_D치 측정 - [³H]QNB의 dissociation constant(K_D)는 kinetic 실험과 saturation 실험으로 측정하였다. Kinetic 실험에서는 dissociation rate constant(k₋₁)와 association rate constant(k₁)의 비로 K_D(K_D=k₋₁/k₁)를 산출

하였다. k_1 은 전술한 medium 중에 단백질(50 μg)과 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (100 pM)를 가하고 평형에 도달하는 시간까지 반응시킨 후, atropine(10^{-5}M)을 가한 다음 주어진 시간에서 일정량(5 ml)의 medium을 취하고 여과, 세척, 및 방사능을 측정하여 처음 결합된 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 반이 해리되는 시간($t_{1/2}$)으로부터 산출하였다($k_1=0.693/t_{1/2}$). k_1 은 $k_1=k_{\text{obs}}-k_1/[I]$ 으로부터 구하였으며(k_{obs} =observed first-order rate constant, $[I]$ =사용한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 농도), 여기서 k_{obs} 는 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 평형결합의 반이 결합되는 시간($t_{1/2}$)으로부터 계산하였다($k_{\text{obs}}=0.693/t_{1/2}$).

Saturation 실험은 전술의 medium중에 여러 농도의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 단백질을 가한 다음 37°C에서 180분간 반응시킨 후 여과, 세척 및 방사능 측정하여 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 각 농도에서의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합을 측정하였다. $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (B)을 $B=-K_D \cdot B/F+B_{\text{max}}$ 에 적용시켜, Scatchard plot²⁴⁾하여 구하였다(F : $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 free concentration). Hill coefficient(nH)는 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 포화 결합실험에서 얻은 자료를 $\log(Y/1-Y)=n\log[F] - \log[K_D]$ 에 적용시킨 다음 각 점을 잇는 회귀선으로부터 구하였다($Y=B/B_{\text{max}}$, n =Hill coefficient).

비표지약물의 Hill coefficient(nH) - $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합 억제에 대한 비표지약물의 Hill coefficient는 여러농도의 비표지약물 존재하에서 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합억제정도를 측정하여 이를 다음 식에 적용시켜, Hill plot하여 구하였다.

$$\log(I/100-I) = n \cdot \log[D] - \log[IC_{50}],$$

I: 비표지약물의 일정농도[D]에서의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합 억제 %, n: Hill coefficient

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합억제에 대한 비표지약물의 dissociation constant(K_i) 측정 - 비표지약물의 dissociation constant(K_i)는 Cheng 과 Prusoff의 방법으로 산출하였다. 즉 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 50%를 억제하는 비표지약물의 농도(IC_{50}), 사용한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 농도 [F] 및 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 dissociation constant(K_D)로부터 유도된 $K_i=IC_{50}/(1+F/K_D)$ 의 식에 의하여 산출하였다.

실험결과 처리 - 실험결과의 유의성 검정은 Student's t test에 의하였고 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였으며, 모든 성적은 평균치 \pm 표준오차로 나타내었다.

실험결과

단백질 농도변화 및 시간경과에 따른 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결

합변화 - 본 실험에서 사용할 단백질 농도를 결정하기 위하여 단백질 농도 증가에 따른 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합정도를 조사하여 microsomal fraction 단백질량을 50 μg 으로 고정하였다.

또한 100 pM $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 존재하에서 시간경과에 따른 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합정도를 조사한 결과, 대뇌 muscarine 수용체에 대한 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 의 특이결합은 시간경과에 따라 증가되다가 150분에 거의 평형에 도달하였으며 microsomal fraction을 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 와 평형에 도달하는 충분한 시간인 180분간 반응시킨 후 10^{-5}M atropine을 가했을 때는 수용체에 결합된 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 가 dissociation되었고 이 과정 역시 시간의존적이었다.

대뇌 muscarine 수용체의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합특성 - 대뇌 microsome의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합이 포화성인지 또 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합을 위한 QNB의 affinity(K_D)와 결합부위농도(B_{max})가 어느정도인지를 알아보기 위하여 여러농도의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (25~500 pM) 존재하에서 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합실험을 시행하였다. 대뇌 microsome의 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합은 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 농도를 증가시키에 따라 증가되다가 400 pM에서 최대에 이르는 포화성결합이었다. 이 결과를 Scatchard plot 했을 때 각 점의 직선성이 인정되었을 뿐 아니라, Hill plot했을 때 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점에서 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 는 일정한 단일 결합 부위에 결합하는 것으로 추정되었다. 그리고 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합의 B_{max} 및 K_D 는 각각 약 3000 fmol/mg 및 약 60 pM이었다.

비수기성 항 histamine제가 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합에 미치는 영향 - 비수기성 항 histamine제의 muscarine 수용체에 대한 작용여부를 조사하고자 먼저 각 약물 5 μM 존재하에서 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 평형결합을 시행한 결과, mequitazine은 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 결합을 완전히 억제하였으나 astemizole의 경우 약 80%, loratadine과 terfenadine

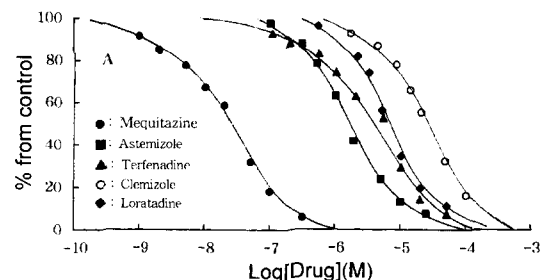


Fig. 1 - Inhibition of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ binding by antihistamines to rat cerebrum.

Table I – Inhibition of [³H]QNB binding by nonsedating antihistamine to rat cerebrum

Drug	n	IC ₅₀ ^a (μ M)	K _i or NIC ₅₀ ^c	nH ^d	Relative potency ^e
Astemizole	4	1.55 \pm 0.32	0.58 \pm 0.07 ^b	1.18 \pm 0.6	1
Clemizole	5	16.01 \pm 1.54	5.99 \pm 0.56 ^b	1.08 \pm 0.08	0.1
Loratadine	5	5.62 \pm 0.31	2.3 \pm 0.15 ^c	1.55 \pm 0.05	0.3
Mequitazine	5	0.02 \pm 0.01	0.007 \pm 0.01 ^b	1.09 \pm 0.05	88
Terfenadine	6	3.14 \pm 0.35	1.17 \pm 0.12 ^c	0.92 \pm 0.03	0.5

^aNumber of the independent determinations.

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

^cCalculated from $K_i = IC_{50} / (1 + F/K_D)$.

^dCalculated from $NIC_{50}(\text{normalized } IC_{50}) = IC_{50} / (1 + F/K_D)$.

^eHill coefficient(nH) calculated from Hill plot of the inhibition data

^fCalculated by dividing the K_i of astemizole by the K_i of each drug.

Values are the mean \pm SEM from the indicated numbers of experiments.

의 경우 40~50%, clemizole의 경우 약 16% 억제하였다. 이와같이 비수기성 항 histamine제의 종류에 따라 [³H]QNB 결합억제 정도의 차이는 있으나 사용한 모든 약물에서 [³H]QNB 결합억제작용이 있음을 알았다.

비수기성 항 histamine제에 의한 [³H]QNB 결합억제
제 – Fig. 1은 각 비수기성 항 histamine제의 농도증가에 따른 [³H]QNB 결합억제 정도를 나타낸 것으로 각 약물에 의한 [³H]QNB 결합억제가 농도 의존적이었고 그 최대억제정도도 100%로 유사하였으나 mequitazine의 경우 2 nM에서부터 유의한 억제를 보인 반면, clemizole은 이보다 1000배 높은 농도인 2 μ M에서부터 [³H]QNB 결합을 억제하였다. 이러한 각 약물에 의한 [³H]QNB 결합억제 성적을 Hill Plot 했을 때 양의 협동성(positive cooperativity)을 갖는 loratadine을 제외한 4가지 약물의 Hill coefficient가 모두 1에 가까웠음은 이들 약물이 단일 결합부위에 결합하여 [³H]QNB 결합을 억제함을 말해주고 있다.

따라서 [³H]QNB 결합억제 곡선에서 [³H]QNB 결합의 50%를 억제하는 각 약물의 농도(IC₅₀)를 구하고 이로부터 경쟁적 억제인 경우 K_i치를, 비경쟁적억제인 경우 IC₅₀를 보정한 NIC₅₀를 각각 산출하였던 바, Table I에서 보는 바와 같이 각 약물의 IC₅₀치는 0.02~16 μ M 이었고, 이로부터 계산된 K_i 또는 NIC₅₀치는 0.007~6 μ M범위로서 약물의 종류에 따라 최대 약 850배의 차이가 있었으며, astemizole의 [³H]QNB 결합억제작용을 1로 하여 다른 약물의 상대적인 작용강도를 평가했을 때 mequitazine의 경우 astemizole보다 88배 강한 반면, clemizole의 경우 10배 약하였다.

[³H]QNB 결합의 affinity(K_D)와 결합부위농도(Bmax)에 미치는 비수기성 항 histamine제의 영향 –

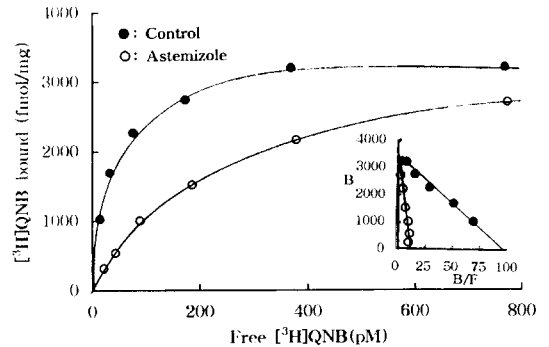


Fig. 2 – Effect of astemizole (1.5 μ M) on [³H]QNB saturation binding to rat cerebral microsome. Inset: Scatchard plot of specific [³H]QNB binding. Bound [³H]QNB(B) was plotted as a function of bound [³H]QNB(B)/free [³H]QNB(F).

전술의 실험에서 관찰된 비수기성 항 histamine제에 의한 [³H] QNB 결합억제가 muscarine 수용체에 대한 이들 약물과 [³H]QNB와의 경쟁적 결합에 의한 것인지를 조사하기 위하여 일정농도의 이들 약물 존재 하에서 [³H]QNB 포화결합실험을 수행하였다. Fig. 2는 1.5 μ M astemizole 존재하에서 시행한 결과를 도시한 것으로 astemizole은 사용한 [³H]QNB 각 농도에서 muscarine 수용체에 대한 [³H] QNB 결합을 억제하였고 그 억제효과가 [³H]QNB 농도증가에 따라 감소되었다. 이러한 [³H]QNB 결합억제 성적을 Scatchard plot 했을 때(Fig. 2, inset) 각 점을 잇는 회귀선의 기울기는 대조군에 비하여 현저히 증가되었으나 Y절편은 대조군과 유사하였다. 즉 1.5 μ M astemizole은 [³H]QNB 결합의 K_D치를 4.4배 증가시켰으나 결합부위농도(Bmax)와 [³H]QNB 결합의 Hill coefficient에는 영향을 미치지 않았다. 이와같은 aste-

Table II – Effect of nonsedating antihistamines on the [³H]QNB binding parameters to rat cerebral microsome

Drug	Dose (μM)	K _D (pM)	Bmax(fmol/mg)	nH
Control		58.2±11.5	2975.1±107.8	0.97±0.07
Astemizole	1.5	264.9±35.7**	2663.1±145.1	1.03±0.02
Clemizole	16	216.2±10.7**	2860.8±57.1	1.04±0.01
Loratadine	5.6	118.2±21.5**	1349.9±75.1**	1.20±0.02
Mequitazine	0.02	268.8±5.6**	2824.3±100.3	1.01±1.01
Terfenadine	3	181.2±1.8**	1370.1±19.2**	1.02±0.01

K_D and Bmax were calculated from Scatchard analysis. Hill coefficient(nH) was calculated from Hill plot of the saturation binding data. Values are mean±SEM of three different assays.

**Statistically different from the corresponding value of control(p<0.01).

mizole의 muscarine 수용체에 대한 [³H]QNB와의 경쟁적결합양상은 clemizole과 mequitazine의 경우에서도 나타났다(Table II). 그러나 loratadine 과 terfenadine의 경우 IC₅₀농도에서 [³H]QNB 결합의 affinity 뿐 아니라 결합부위 농도도 약 반으로 감소시켰다(Table II).

비수기성 항 histamine제가 [³H]QNB 결합의 rate constants에 미치는 영향 – 비수기성 항 histamine제에 의한 [³H]QNB 결합의 K_D치의 증가가 [³H]QNB의 association억제에 기인한 것인지 또는 association과 dissociation에 다같이 영향을 미친 결과인지를 조

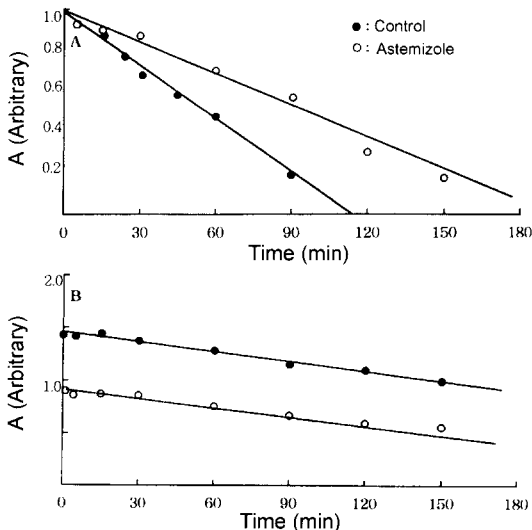


Fig. 3 – Effects of astemizole(1.5 μM) on association of [³H]QNB in cerebral microsome (A) and dissociation of [³H]QNB from cerebral muscarinic receptor-QNB complex(B). A: (Be-B)/Be(log scale) versus time is shown, where Be and B are radioligand bound to cerebral microsome at equilibrium and at time t, respectively. B: The amount of [³H]QNB associated with muscarinic receptor versus time plotted.

사하였다. Fig. 3A는 100 pM의 [³H]QNB 존재하에서 astemizole (1.5 μM)이 대뇌 microsome에 대한 [³H]QNB의 association에 미치는 영향을 도시한 것으로 [³H]QNB 평형결합의 반이 결합되는 시간(t_{1/2})은 대조군에서는 약 40분이었으나 astemizole 존재하에서는 약 100분이었다. 여기서 계산된 [³H]QNB 결합의 observed first-order rate constant(k_{obs})는 각각 0.0173 min⁻¹ 및 0.00693 min⁻¹로서 astemizole에 의하여 대뇌 microsome에 대한 [³H]QNB의 association이 지연됨을 알 수 있었다.

Fig. 3B는 100 pM [³H]QNB와 microsome(50 μg)을 1.5 μM의 astemizole을 함유하거나 함유하지 않은 medium중에서 240분동안 반응시켜 평형결합에 도달하게 한 다음 10 μM atropine을 가하고 시간경과에 따른 [³H]QNB의 dissociation정도를 나타낸 것으로 각 점이 직선상에 있는것으로 보아 이 반응이 first-order kinetics에 해당됨을 추정할 수 있으며 atropine에 의하여 평형결합의 반이 해리되는 시간(t_{1/2})은 대조군과 astemizole군에서 다같이 약 240분이었고 이로부터 계산된 k₋₁은 약 0.0029 min⁻¹로서 [³H]QNB의 해리정도는 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

Table III – Effect of nonsedating antihistamines on the kinetic constants of [³H]QNB binding to rat cerebral microsome

Drug	Dose (μM)	k ₊₁ ^a (min ⁻¹ × 10 ⁶)	k ₊₁ ^b (min ⁻¹ × 10 ⁶)	K _D ^c (pM)
Control		96.2±4.0	3.2±0.3	32.2±2.9
Astemizole	1.5	42.1±2.3	2.9±0.1	69.1±3.8
Clemizole	16.0	70.1±7.3	3.7±0.2	53.2±2.1
Mequitazine	0.02	41.3±5.9	3.2±0.1	79.4±9.5

^aCalculated from k₊₁=(k_{obs}-k₋₁)/[I], where k_{obs} is the observed first-order approach to equilibrium derived from studies shown in Fig. 3-A

^bDerived from dissociation of [³H]QNB shown in Fig. 3-B

^cCalculated from K_D= k₋₁/k₊₁

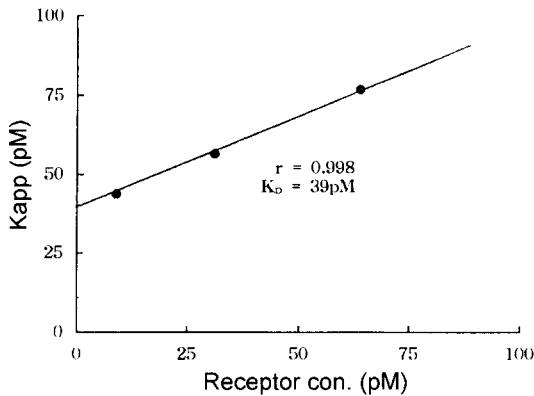


Fig. 4 - Effect of receptor concentration on the apparent dissociation constant (K_{app}). Saturation binding of [3H]QNB were performed at various concentrations of cerebral protein. K_{app} value of [3H]QNB were plotted as a function of receptor concentration.

Table III은 각 약물존재하에서 추정된 [3H]QNB의 dissociation constant(K_D)를 정리한 것으로 각 약물은 [3H]QNB 결합의 k_{+1} 을 2~3배 감소 시켰으나 k_{-1} 에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 이들 rate constant로부터 계산된 muscarine 수용체에 대한 [3H]QNB의 K_D 치가 대조군에서 약 30 pM이던 것이 각 약물의 IC_{50} 존재하에서는 50~80 pM로 2-3배 증가되었으며 이러한 K_D 치의 증가정도는 포화결합실험의 결과와도 유사하였다.

Receptor농도에 따른 [3H]QNB의 K_D 치 변화 - 전술한 실험결과, [3H]QNB 포화결합실험에서 구한 [3H]QNB의 K_D 치와 rate constant로 구한 [3H]QNB의 K_D 치 사이에는 상당한 차이가 있었다. 본 실험에서 포화결합실험으로 측정한 [3H]QNB의 높은 K_D 치가 사용한 receptor농도가 높는데 기인한 것인가를 알아보기 위하여 receptor 농도를 달리하면서 포화결합실험을 시행하고 각 receptor농도에서 측정된 [3H]QNB의 K_D 치와 receptor농도와의 상관성을 조사하였다. Fig. 4는 receptor농도에 따른 K_D 치의 변화를 나타낸 것으로 receptor 농도가 증가함에 따라 [3H]QNB K_D 치도 증가함을 나타내고 있다. 여기서 muscarine 수용체에 대한 [3H]QNB의 실제 K_D 치는 receptor농도가 무한히 낮을때의 K_D 치, 즉 39 pM인 것으로 추정할 수 있었으며, 이 K_D 치는 rate constant로 구한 [3H]QNB의 K_D 치(32 pM)와 유사하였다.

고 찰

본 실험 결과 5종의 비수기성 항 histamine제는 muscarine 수용체 subtype에 대한 선택성은 없는 것으로 추정되었으나 고농도에서 [3H]QNB 결합억제작용을 나타내었으며 그 작용 강도에 있어서도 약물간에 상당한 차이가 있음을 알았다.

비수기성 항 histamine제는 histamine과의 구조적 상관성이 없고, 지용성인 기존 항 histamine제 보다 극성이 커서 혈액뇌 관문(blood-brain barrier)을 잘 통과하지 못하므로 상용량에서는 기존 항 histamine제의 가장 일반적인 부작용인 진정작용을 거의 나타내지 않을 뿐아니라^{3,7,10}) 기존 항 histamine제 보다 유효혈 중농도의 지속시간도 훨씬 긴 것으로 보고되어 있다.^{7,26}) 이와같이 제2세대 항 histamine제로 불리는 비수기성 항 histamine제는 기존 항 histamine제에서 볼 수 있는 중추성 부작용을 감소시킬 수 있다는데 가장 큰 장점이 있으며, 말초성 부작용인 구갈, 배뇨관, 축뇨, 시야장애, 안압증가등과 같은 부교감신경차단에 의한 부작용도 적은 것으로 평가되고 있다.^{8,9}) Gengo²⁷) 역시 비수기성 항 histamine제가 기존 항 histamine제 보다 뇌 muscarine 수용체에 전혀 결합하지 못할 정도의 affinity 차이가 있는 지에 관한 자료가 배제할 수 없다. 뿐만 아니라, muscarine 수용체는 M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , 및 M_5 수용체로 대별되며, M_1 수용체는 대뇌와 자율신경절에, M_2 수용체는 심장, M_3 수용체는 평활근 및 외분비선, M_4 는 심장 그리고 M_5 수용체는 대뇌와 자율신경절에 주로 분포되어 있으며 대뇌에는 M_1 , M_2 , M_3 및 M_4 수용체가 공존하고 있는 것으로 알려지고 있다.¹³⁻¹⁸) 따라서 이들 약물의 대뇌 muscarine 수용체와의 상호작용을 알아보기 위해서는 그 subtype에 대한 작용이 충분히 검토되어야 하며 특히, 이들 약물은 중추로 잘 들어가지 못하므로 M_1 수용체 보다는 말초성 부작용의 주 원인이 될 수 있는 M_3 수용체 차단작용여부를 비교검토하는 것이 더욱 중요하다.

본 실험에서 사용한 [3H]QNB는 muscarine 수용체에 대한 친화성이 높을 뿐 아니라 atropine, scopolamine과 같이 그 subtype에 대한 선택성이 없는 muscarine 수용체 길항제로서 특정 약물의 muscarine 수용체에 대한 작용을 연구하는데 널리 이용되고 있다.^{28,29}) 본 실험의 대뇌 microsome에서도 [3H]QNB 결합이

가역적이고, 포화성이었으며, [^3H]QNB 결합의 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점은 [^3H]QNB가 muscarine 수용체 subtype에 대한 선택성이 없는 약물임을 더욱 뒷받침해 주고 있다. 그러나 본 실험결과에서 [^3H] QNB 포화결합실험으로 측정된 [^3H]QNB의 K_D 치(60 pM)와 rate constant로 추정된 K_D 치(32 pM) 사이에는 약 2배의 차이가 있었다. 일반적으로 포화결합실험으로 특정 약물의 수용체에 대한 affinity를 측정하고자 할 때는 가해주는 수용체의 농도를 K_D 치의 10%이하로 하는 것이 바람직하나 [^3H]QNB와 같이 affinity가 큰 약물의 경우 결과해석이 용이한 범위내에서 가능한 낮은 수용체농도를 사용한다 하더라도 그 농도가 K_D 치에 가까워 질 수 있으므로 측정되는 K_D 치는 수용체 농도에 영향을 받게된다. 본 실험에서 microsome(수용체)농도를 달리하면서 [^3H]QNB 포화결합실험을 수행하였을 때 수용체농도와 측정되는 [^3H]QNB의 K_D 치간에는 유의한 상관관계가 있었으며 이로부터 수용체농도가 무한이 낮을 경우 K_D 치를 추정하였을 때 약 39 pM로서 rate constant로 측정된 K_D 치(32 pM)와 매우 유사하였다는 점은 포화결합실험에서 측정된 [^3H]QNB의 높은 K_D 치가 사용한 수용체의 농도가 높음에 기인한 것임을 말해주고 있다.

Poizot 등³⁰⁾은 비수기성 항 histamine제가 고농도에서 muscarine 수용체에 대한 [^3H]-N-methylscopolamine 결합을 억제한다고 하였으며, Laduron 등³¹⁾은 astemizole 1 μM 에서도 [^3H]dextetimide 결합에 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 보고하였다. 이와 같이 연구자에 따라 사용한 radioligand가 다르고 그 결과도 일치하지 않을 뿐 아니라 실험의 목적을 주로 H_1 수용체에 대한 작용에 중점을 두었으므로 이들 약물의 muscarine 수용체에 대한 작용은 상세히 검토되지 않았다. 본 실험에 사용한 5종의 비수기성 항 histamine제 중 astemizole, clemizole 및 mequitazine의 경우 [^3H]QNB 결합의 affinity를 감소시켰으나 [^3H]QNB의 결합부위농도 및 [^3H]QNB의 dissociation에 전혀 영향을 미치지 않았다. 일반적으로 muscarine 수용체에 직접 작용하는 약물은 muscarine 수용체에 결합한 radioligand의 dissociation에는 영향을 주지 않는데 비하여³²⁾ allosteric site에 작용하는 bisquaternary oximes,³³⁾ gallamine,³⁴⁾ verapamil³⁵⁾ 등과 같은 약물은 radioligand의 dissociation rate를 변화시킨다는 보고와

이들 약물이 [^3H]QNB 결합의 cooperativity에는 영향을 주지 않았다는 점으로 미루어 이들 약물은 [^3H]QNB가 결합하는 muscarine 수용체 부위에 QNB와 경쟁적으로 결합하는 것으로 생각된다. 한편 loratadine과 terfenadine의 경우 [^3H]QNB 결합의 affinity 뿐만 아니라 결합부위농도도 함께 감소시켰다는 점에 이들 약물은 muscarine 수용체에 대한 [^3H]QNB 결합의 비경쟁적억제제로 작용하는 것으로 추정되나 그 이전에 관해서는 추후 더욱 연구하여야 할 과제라고 생각한다.

전술한 바와 같이 대뇌 microsome에는 M_1 , M_2 , M_3 및 M_4 수용체가 공존하므로 만약 비수기성 항 histamine제가 이들 subtype 중 어떤 한 종류의 subtype에 선택성을 갖는다면 이들 약물에 의한 [^3H]QNB 결합억제곡선의 slope가 완만해지고, 경쟁적결합성적을 분석했을 때 Hill coefficient가 1보다 유의하게 작아지면서 affinity가 서로 다른 두 종류의 결합부위에 결합하는 것으로 나타나야 할 것이나 본 실험에서 [^3H]QNB 결합억제에 대한 이들 약물의 Hill coefficient가 1에 가까웠다는 점은 이들 약물도 대부분 기존 항 histamine제와 같이³⁶⁾ muscarine 수용체에 대한 선택성이 없음을 말해주고 있다. 결국, 이들 약물은 고농도에서 muscarine 수용체 차단작용을 나타내나 중추로 잘 들어가지 못하므로 중추성작용보다는 오히려 투여량에 따라서는 말초에서 muscarine 수용체 차단에 의한 부작용이 나타날 수도 있을 것이며 수용체 측면에서 부작용의 발현여부 및 그 정도는 이들 약물의 H_1 수용체와 muscarine 수용체에 대한 affinity 차이로부터 예측할 수 있다.

본 실험에서 [^3H]QNB 결합의 경쟁적억제제로 작용하는 3종의 비수기성 항 histamine제의 muscarine 수용체에 대한 K_i 치가 약물에 따라 달랐으며(0.007~6 μM), 이러한 muscarine 수용체에 대한 각 약물간의 affinity 차이가 이미 보고된³⁰⁾ H_1 수용체에 대한 affinity 차이와 상관성이 없었다. 이는 H_1 수용체 차단작용이 강한 약물이라고 하여 muscarine 수용체 차단작용도 강한 것이 아님을 말해주고 있으므로 이들 약물의 muscarine 수용체 차단작용정도를 평가하기 위하여 H_1 수용체의 50%를 차단할 수 있는 각 약물농도(K_H)에서 어느정도의 muscarine 수용체를 점유할 것인지를 $B/B_{\text{max}}=F/(K_D+F)$ 에 적용, 계산하였던 바 clemizole은 K_H 농도에서 거의 muscarine 수용체에

결합하지 않고 astemizole은 1~12%, mequitazine은 2~40% 결합하는 것으로 나타났다. 더욱이 임상에서 항 histamine제를 사용할 때 H₁ 수용체를 거의 완전히 차단할 수 있는 용량으로 사용한다는 점을 고려하면 mequitazine의 경우 임상적 유효혈중농도에서 말초 muscarine 수용체 차단에 의한 부작용을 상당히 나타낼 것으로 예상된다. 그러나 H₁ 수용체에 대한 이들 약물의 affinity가 발표된 논문이나 실험조건에 따라 차이가 있어 이에 대한 보다 일관성 있는 정도를 얻기 위해서는 앞으로 H₁ 수용체에 대한 이들 각 약물의 affinity를 직접 비교 검토하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

비수기성 항 histamine제와 muscarine 수용체와의 상호작용기전을 추구하고, 이들 약물의 muscarine 수용체에 대한 작용강도를 비교검토하고자 5종의 비수기성 항 histamine제가 흰쥐 대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 대뇌 microsome의 [³H]QNB 결합은 가역적이고 포화성이었으며 [³H]QNB 결합의 Hill coefficient는 1에 가까웠다.

2. Microsome 단백질 50 µg 존재하에서 포화결합실험으로 측정된 [³H]QNB의 K_D치는 약 60 pM이었으나 단백질농도와 K_D치와의 상관관계로부터 추정한 K_{app}는 39pM로서 rate constant로부터 추정한 K_D치 32pM과 유사하였다.

3. 비수기성 항 histamine제는 농도의존적으로 [³H]QNB 결합을 억제하였고 [³H]QNB 결합억제에 대한 이들 약물의 Hill coefficient는 loratadine(nH=1.55)을 제외하고는 1에 가까웠다.

4. Astemizole, clemizole 및 mequitazine은 [³H]QNB 결합의 affinity를 감소시켰으나 [³H]QNB의 dissociation rate constant, 결합부위 농도 및 [³H]QNB 결합의 Hill coefficient에는 영향을 미치지 않았다. 반면에 loratadine, terfenadine은 muscarine 수용체에 대한 [³H]QNB 결합을 비경쟁적으로 억제하였다.

5. Astemizole, clemizole, 및 mequitazine의 muscarine 수용체에 대한 Ki치는 각각 0.58, 5.99 및 0.007 µM이었고 loratadine, terfenadine의 [³H]QNB

결합억제에 대한 보정 IC₅₀치는 약 2 µM 이었다.

6. 이상 결과 astemizole, clemizole 및 mequitazine은 고농도에서 muscarine 수용체를 차단하며 약물의 종류에 따라 그 작용강도의 차이는 있으나 muscarine 수용체 subtype에 대한 선택성은 없는 것으로 추정된다.

감사의 말씀

지도교수님이신 고 이 신웅박사님의 영전에 이 논문을 바칩니다.

문 헌

- 1) Adelman, D. C. and Terr, A. Allergic and immunologic disorders. In Current medical diagnosis and treatment (L. M. Tierney, S.J. McPhee and M. A. Apadakis, Eds.). Appleton & Lange, Norwalk Connecticut., p. 663 (1994).
- 2) Black, J. W., Dunca, W. A. M., Durant, C. J., Ganellin, C. R. and Parsons, E. M. : Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature (Lond.)*, **236**, 385 (1972).
- 3) Peggs, J. F., Shimp, L. A. and Opdycke, R. A. : Antihistamines : The old and the new. *Am. Fam. Physician*, **52(2)**, 593 (1995).
- 4) Ambre, J. J., Bennet, D. R., Cranston, J. W., Dickinson, B. D., Mark, E. R., Glade, M. J., Kosman, M. E., Lampe, K. F., McCann, M. A., Pang, S. J., and Weaver, R. H. : Histamine and antihistamines : In Drug Evaluations Annual, American Medical Association, p. 1604. (1991).
- 5) Perlman, D. S. : Antihistamine : Pharmacology and clinical use. *Drugs*, **12**, 258 (1976).
- 6) Wood, C. D. : Antimotion sickness and antiemetic drugs. *Drugs*, **17**, 471 (1979).
- 7) Brandon, M. L. : Newer non-sedating antihistamines, will they replace order agent ? *Drugs*, **30**, 377 (1985).
- 8) Soter, N. A. : Treatment of urticaria and angioedema : Low-sedating H1-type antihistamines. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **24**, 1084 (1991).
- 9) Kaiser, H. B. : H₁-receptor antagonist treatment of seasonal allergic rhinitis. *J. Allergy clin. immunol.*,

- 86, 1000 (1990).
- 10) Herman, L. E. and Bernhard, J. D. Antihistamine update. *Dermatol. Clin.*, **9**, 603 (1991)
 - 11) Simons, F. E. R. : Recent advances in H₁-receptor antagonist treatment. *Allergy and clinical immunology*, **86**, 995 (1990).
 - 12) Monroe, E. W. : Chronic urticaria : Review of nonse- dating H1 antihistamines in treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **19**, 842 (1988).
 - 13) Doods, H. N., Mathy, M. J., Davidesko, D., van charldorp, K. J., de Jonge, A. and van zwieten, P. A. : Selectivity of muscarinic antagonist in radioli- gand and in vivo experiment for the putative M₁, M₂ and M₃ receptors *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**, 257 (1987).
 - 14) Clague, R. V., Eglen, R. M., Strachan, A. C. and Whiting, R. L. : Action of agonist and antagonists at muscarinic receptors present on ileum and atria in vitro. : *Br. J. Pharmacol.*, **86**, 163 (1985).
 - 15) Eglen, R. M. and Whiting, R. L. : Competitive and noncompetitive antagonism exhibited by 'selective' antagonist at atrial and ileal muscarinic receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 701 (1987).
 - 16) Watson, S. and Arkininstall, S. : The G-protein linked receptor. Facts Book, Academic press, San Diego, p. 8, (1994).
 - 17) Mechioore, C., Minarini, A., Budriesi, R., Chiarini A., Spampinato S. and Tumiatti V. : The design of novel methoctramine-related tetraamines as muscarinic re- ceptor subtype selective antagonists : *Life sci.*, **56**(s11/12), 837 (1995).
 - 18) Reeve C. M., Ferrari-DiLeo G. and Flynn D. D. : The M₅(m5) receptor subtype : fact or fiction ? : *Life sci.*, 60(13-14), 1105 (1997).
 - 19) Lee, S. W., Park, Y. J., Lee, J. S., Ha, K. W., and Jin, K. D. : Interaction of antihistamines with muscarinic receptor (I) : Action on the cardiac muscarinic recep- tor. *Yakhak Haegi*, **32**, 101 (1988).
 - 20) Lee, S. W., Park, Y. H., and Lee, J. S. : Relative po- tency of antihistaminics for H1- and muscarinic receptor. "*Yakhak Hoeji*", **37**, 397 (1993).
 - 21) Mayrand, R. R., Fullerton, D. S. and Ahemd, K. : A simple method for the purification of rat brain Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase(ATPase). *J. Pharma- col. Methods*, **7**, 279 (1982).
 - 22) 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 (1951).
 - 23) Wallick, E. T. and Schwartz, A. : Nature of the transport ATPase-digitalis complex. X. Thermodyna- mics of the rate of ouabain binding. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5141 (1974).
 - 24) Scatchard, G. : The attraction of proteins for small molecules and ions *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **5**, 660 (1949).
 - 25) Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H. : Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibition which cause 50 percent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099 (1973).
 - 26) Hilber, J. : Pharmacokinetics and dose proportion- ality of loratadine. *J. Clin. pharmacol.*, **27**, 694 (1987).
 - 27) Gengo, F. M. : How antihistamines act on the central nervous system. Present at allergy council of america symposium, New York, February 21 (1990).
 - 28) Yamamura, H. I. and Snyder, S. H. : Muscarinic cholinergic binding rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**(5), 1725 (1974).
 - 29) 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**(3), 648 (1983).
 - 30) Poizot, A., Dumez, D., Ferrandon, P., Lefournier, C., Michel, A. and Armstrong, J. M. : Animal phar- macology of the selective histamine H₁-receptor antagonist tazifylline. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **36**, 695 (1986).
 - 31) Laduron, P. M., Janssen, P. F. M., Gommeren, W. and Leysen, J. E. : In vitro and in vivo binding chara- teristics of a new long-acting histamine H₁ anta- gonist, astemizole. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 294 (1982).
 - 32) Luthin, G. R. and Wolfe, B. B., [³H]Pirenzepine and [³H]QNB binding to brain muscarinic receptors. Differences in measured receptor density are not explained by difference in receptor isomerization. *Mol. Pharmacol.*, **26**, 164 (1984).
 - 33) Kloog, Y. and Sokolovsky, M. : Bisquaternary pyri- dium oximes as allosteric inhibitors of rat brain mu- scarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **27**, 418 (1985).

- 34) Nedoma, J., Tucek, S., Danilov, A. F and Shelkovnikov, S. A. : Stabilization of antagonist binding to cardiac muscarinic acetylcholine receptor by gallamine and other neuromuscular blocking drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 219 (1986).
- 35) Waelbroeck M., DeNeef, P., Roberecht, P and Christophe J. : Effects of verapamil on the binding properties of rat heart muscarinic receptors. : Evidence for an allosteric site. *Biochem. Biophys. Commun.*, **121**, 340 (1984).
- 36) Lee, S. H., Park, Y. J., Park, I. S. and Lee, J. S. : Interaction of antihistaminics with muscarinic receptor(II) : Action on the cerebral muscarinic M₁ receptor. *Yakhak Hoeji*, **34**(4), 224 (1990).