

쥐의 superior cervical ganglion에서  
cirazoline이 calcium current에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 윤 숙

쥐의 superior cervical ganglion에서  
cirazoline이 calcium current에  
미치는 영향

지도교수 남택상

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김윤숙

김윤숙의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002 년 6월 일

## 감사의 글

무엇보다 늘 함께하시는 하나님께 감사드립니다.

힘들 때 항상 힘이 되어주시는 아버지, 어머니께 감사드리며 아울러 부족한 저를 끝까지 지도해 주신 남택상 교수님께 감사드립니다. 지금은 군복무를 하고 계시지만 늦은 시간까지 항상 실험을 같이 해주시고 애써주신 정승수 선생님께도 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 세심한 지도를 해주신 임중우 선생님, 이배환 선생님, 안덕선 선생님께 감사드립니다.

실험실에서 같이 고생한 친구들과 조교 선생님들에게 감사드리며 저의 노력이 열매를 맺을 수 있도록 도와주신 제 주위의 모든 분들, 늘 행복하시길 바랍니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 단일 신경세포 분리 .....	6
2. 전기 생리학적 실험 .....	6
3. 세포외 및 전극내 용액 .....	7
4. 약물 .....	7
5. 데이터 분석 .....	7
III. 결과 .....	8
1. Superior cervical ganglion (SCG) 신경세포에서 cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제 .....	8
2. SCG 신경세포에서 norephneprine에 의한 칼슘 전류의 억제 .....	9
3. NE에 의한 칼슘 전류 억제에 3 $\mu$ M rauwolscine이 미치는 영향 ..	10
4. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 3 $\mu$ M, 30 $\mu$ M rauwolscine이 미치는 영향 .....	12
5. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 G-protein이 미치는 영향 .....	12
6. Omega-conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx) 민감성 칼슘 전류에 대한 cirazoline의 효과 .....	15
7. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 대한 imidazoline receptor antagonist의 효과 .....	16
8. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 pertussis toxin (PTX)이 미치는 영향 .....	17
9. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 second messenger의 관여 여부 .....	18
IV. 고찰 .....	19
V. 결론 .....	22
참고문헌 .....	23
영문요약 .....	27

## 그림 차례

Fig. 1. The effects of 30 $\mu\text{M}$ cirazoline on $\text{Ca}^{2+}$ current of acutely isolated superior cervical ganglion neurons .....	9
Fig. 2. The effects of 1 $\mu\text{M}$ norepinephrine (NE) on $\text{Ca}^{2+}$ current of acutely isolated superior cervical ganglion neurons. ....	10
Fig. 3. The effects of low-dose (3 $\mu\text{M}$ ) rauwolscine on NE-induced $\text{Ca}^{2+}$ current inhibition. ....	11
Fig. 4. The effects of rauwolscine on cirazoline-induced $\text{Ca}^{2+}$ current. ....	13
Fig. 5. The effects of GDP- $\beta$ -S (2 mM) on NE and cirazoline-induced $\text{Ca}^{2+}$ current inhibition. ....	14
Fig. 6. The effects of Omega-conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx) on $\text{Ca}^{2+}$ current amplitude and inhibition induced by 30 $\mu\text{M}$ cirazoline. ....	15
Fig. 7. The effects of various imidazoline receptor antagonists on inhibition of $\text{Ca}^{2+}$ current induced by 30 $\mu\text{M}$ cirazoline. ....	16
Fig. 8. $\text{Ca}^{2+}$ current amplitude and inhibition induced by NE/cirazoline application in neurons recorded from control and pertussis toxin-treated cells. ....	17
Fig. 9. Cell-attached patch recording of $\text{Ba}^{2+}$ currents evoked by a step depolarization to +20 mV from a holding potential of -80 mV in the presence and absence of bath-applied cirazoline (30 $\mu\text{M}$ ). ....	18

## 국문 요약

### 쥐의 superior cervical ganglion에서 cirazoline이 칼슘 전류에 미치는 영향

성숙한 쥐의 superior cervical ganglion (SCG) 세포에서 신경말단으로부터의 norepinephrine (NE) 방출은 주로  $\alpha_2$ -adrenergic autoreceptor를 통한 칼슘 전류 감소에 의해 억제되는 것으로 알려져 왔다. 한편 일부의 imidazoline계 약물 역시 교감신경 말단에서의 NE 방출을 조절하는데, 이때  $\alpha_2$ -autoreceptor가 아닌 다른 수용체를 통하여 그 작용이 발휘되는 것으로 보고되었다. 이들을 imidazoline 수용체라 하는데, 약리적 특성에 기초하여 I<sub>1</sub>-수용체, I<sub>2</sub>-수용체, I<sub>3</sub>-수용체, non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체 등으로 분류된다. 수용체에 대한 리간드의 친화력 연구에 의하면, imidazoline계 약물은 대부분 imidazoline 수용체뿐만 아니라  $\alpha_2$ -autoreceptor에도 친화력을 가지는데 그 중에서 cirazoline은 비교적 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체에 선택적으로 작용하는 약물로 보고되고 있다. 또한 cirazoline이 교감신경말단에서의 NE 방출을 억제한다는 실험보고도 있다. 그러나 이러한 cirazoline에 의한 NE 방출 억제에 관한 구체적인 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서는 cirazoline에 의한 SCG 신경세포말단에서의 NE 방출 억제에 관한 기전을 이해하고자 단일 SCG 세포에서 기록되는 전압 의존적 칼슘전류를 NE 방출에 대한 모델로 이용하여, 1) cirazoline이 SCG 세포의 전압 의존적 칼슘전류에 미치는 영향을 조사하고, 2) cirazoline의 칼슘전류에 대한 효과를 매개하는 수용체의 종류를 밝히고, 3) cirazoline에 의한 수용체 활성화에 따른 칼슘전류 조절에 관한 가능한 세포내 기전을 조사하였다.

효소처리로 분리한 단일 SCG 세포에서의 전압 의존적 칼슘 전류는 whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 기록하였다. Cirazoline은 NE와 유사하게 가역적이고 농도 의존적으로 칼슘전류를 억제하였다. Cirazoline-유도 칼슘전류 억제는  $\alpha_2$ -autoreceptor를 차단한 상황(rauwolscine 3  $\mu$ M 전처리) 하에서도 관찰되었다. 그러나 동일한 상황 하에서 NE-유도 칼슘전류 억제는 일어나지 않았다. 또한 I<sub>1</sub>-, I<sub>2</sub>-, I<sub>3</sub>-수용체 각각의 길항제를 전처리 한 경우에도 cirazoline은 칼슘전류를 억제하였다. 한편 GDP- $\beta$ -S (2 mM)를 파이펫 내에

넣어 G-단백질을 불활성화 시켰을 때 cirazoline-유도 칼슘전류 억제는 관찰되지 않았다. SCG 세포를 pertussis toxin (PTX)으로 전처리(18 시간) 하였을 경우, cirazoline-유도 칼슘전류 억제(23%)는 PTX-둔감성으로 세포에 rauwolscine (3  $\mu$ M) 만을 전처리한 후 관찰된 cirazoline-유도 칼슘전류 억제(33%, PTX-민감성 및 PTX-둔감성)에 비하여 감소하였다. 하지만 PTX 전처리는 NE-유도 칼슘전류 억제를 거의 완전히 반전(reverse)시켰다. 한편 N-형 칼슘통로 차단제인  $\omega$ -conotoxin GVIA를 전처리하였을 때 cirazoline-유도 칼슘전류 억제는 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 1) SCG 세포에서 cirazoline은 전압 의존적인 N-형 칼슘통로를 차단함으로써 칼슘전류를 억제하며, 2) 이러한 칼슘통로 차단 효과는  $\alpha_2$ -autoreceptor나  $I_1$ -,  $I_2$ -,  $I_3$ -수용체가 아닌 non- $I_{1,2,3}$  수용체에 작용하여 이루어지며, 3) 수용체 활성화에 의한 칼슘통로 차단은 PTX-민감성 및 PTX-둔감성 G-단백질을 매개하여 세포질 내 이차전령계의 개입 없이 세포막에 제한된 경로(membrane-delimited pathway)를 통해 직접적으로 칼슘통로에 작용함을 시사한다.

---

핵심되는 말 : imidazoline, cirazoline, superior cervical ganglion, 칼슘통로



# 쥐의 superior cervical ganglion에서 cirazoline이 칼슘 전류에 미치는 영향

<지도교수 남택상>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김윤숙

## I. 서론

Hartmann과 Isler<sup>1</sup>가 다양한 imidazoline 유도체를 소개한 이래로 naphazoline, tolazoline, phetolamine, clonidine과 같은 imidazoline 유도체는 catecholamine과 유사한 효과를 나타내는 물질로 생각되었다. 이 후 imidazoline 유도체는 더 구체적으로  $\alpha$ -adrenoceptor의 효현제와 길항제로 간주되었으나 1984년 Bousquet<sup>2</sup>가 clonidine-like imidazoline 유도체의 cerebral effect 즉, 저혈압이  $\alpha$ -adrenoceptor에 의해서가 아니라 “imidazoline-preferring” 수용체에 의해 조절된다는 것을 제안하였다. 이러한 imidazoline-preferring binding site는 중추 조직과 말초 조직에서 규명되었고,<sup>3</sup> 이것은 혈압의 조절에 아주 중요한 역할을 한다고 보고되었다.<sup>4</sup>

Imidazoline 수용체는 많은 조직에서 약물이 작용하는 부위나 imidazoline receptor (IRs)의 약리학적 분류에 의해 I<sub>1</sub>-수용체, I<sub>2</sub>-수용체 그리고 I<sub>3</sub>-수용체로 구분된다. I<sub>1</sub>-수용체는 뇌안(brain stem)에 주로 분포하여 혈압을 감소시키는 작용을 하고,<sup>2,5</sup> I<sub>2</sub>-수용체는 섭식행동(eating behavior)나 glial fibrillary acidic protein의 조절에 관계되어 있으며,<sup>4,5</sup> 평활근 및 다양한 조직에 존재한다<sup>6,7</sup>. I<sub>3</sub>-수용체는 pancreatic  $\beta$ -cell에서 K<sub>ATP</sub> channel을 억제함으로써 인슐린을 유리시키는 것으로 알려져 있다.<sup>8,9,10</sup> 최근에 쥐의 sympathetic axon terminal,<sup>11</sup> guinea pig의 심혈관 조직,<sup>12</sup> 사람의 심장<sup>13,14</sup>에서 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체 (presynaptic imidazoline receptor)가 규명되었다.

Imidazoline ligand(BDF 6100, BDF 6143, aganodine)는 1  $\mu$ M 미만의 낮은 농도에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 차단하는 작용이 있어 교감 신경에서 유리되는

endogenous norepinephrine(NE)의 autoinhibitory feedback loop를 방해하여 NE 유리가 증가하나 농도가 어느 정도 이상 증가하게 되면 NE 유리가 감소하게 되어 이른바 벨 모양(bell-shaped)의 농도 반응 곡선이 나타나게 된다.<sup>15</sup> 이러한 고농도에서 imidazoline ligand에 의해 NE 유리가 억제되는 현상은  $\alpha_2$ -adrenoceptor에 비 의존적으로 나타난다. 실제로 순수한  $\alpha_2$ -adrenoceptor 길항제인 rauwolscine이나 yohimbine은 NE 유리를 monophasic하게 증가시키며 벨 모양의 농도 반응 곡선을 나타내지 않는다.<sup>16</sup> 또한 bell-shaped 농도 반응 현상을 나타내는 imidazoline ligand도  $\alpha_2$ -adrenoceptor 길항제를 미리 전처치하면 낮은 농도에서 NE 유리를 증가시키는 현상이 사라지고 낮은 농도에서부터 monophasic하게 농도 의존적으로 NE 유리를 감소시킨다. Molderring 등<sup>17</sup>은 synaptic terminal에서 NE 유리 억제 현상이 non- $I_{1,2,3}$  수용체(presynaptic imidazoline receptor)의 활성화에 의해서 일어난다고 보고하였고  $\alpha_2$ -adrenoceptor의 활성화에 의해 NE 유리 억제 작용하는 것<sup>18,19,20</sup>과 유사하게 토끼의 심혈관 조직에서 non- $I_{1,2,3}$  수용체(presynaptic imidazoline receptor)의 활성화에 의해 NE 분비를 조절하는 것으로 밝혀졌다.<sup>15,16,21</sup>

신경세포에서 칼슘 통로는 세포 내로의 칼슘 유입을 조절하여 세포막의 흥분성 조절, 신경전달물질의 유리 및 유전자 발현과 같은 다양한 생리적 기능을 담당한다.<sup>22</sup> 이러한 칼슘 통로는 약리학적, 생리학적 특성에 따라 여러 가지 아형 (N, L, P, Q, R 그리고 T-형)으로 나누어진다. 쥐의 위 목절 신경절(superior cervical ganglion; 이하 SCG)에서 분리한 교감 신경에서는 dihydropyridine에 억제되는 L-형,  $\omega$ -conotoxin GVIA에 의해 억제되는 N-형, 알려진 칼슘 통로 길항제에 반응하지 않는 R-형이 나타난다. 이 중에서 대부분(70-90%)은 N-형 칼슘 통로이고, 나머지 L-형(7%), R-형(3%)순으로 존재한다고 알려져 있다.<sup>23</sup> 신경세포에 존재하는  $\omega$ -conotoxin GVIA 민감성 N-형 칼슘 통로는 중추 및 말초 신경계의 절전신경의 말단(presynaptic terminal)에서 신경전달물질 유리에 중요한 역할을 담당하며,<sup>24,25</sup> N-형 칼슘 통로를 통한 칼슘의 유입은  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  및  $Cl^-$  통로를 활성화하여 막전압을 변화시켜 신경세포의 흥분성을 조절하는데 중요한 역할을 한다.<sup>25,26</sup>

턱밑침샘(submandibular salivary gland)과 심장 모두 교감 신경계의 신경지배를 받으며 SCG는 교감 신경절로 중요한 역할을 한다. 심장의 항상성(cardiac homeostasis)의 유지는 교감 신경계와 부교감 신경계로부터 심장으로

들어오는 신경의 균형에 달려있는데,<sup>27</sup> 특히 심박동수의 변화는 심장에 있는 sympathetic nerve terminal에서의 NE 유리에 의해 조절된다.<sup>28</sup> 이렇게 심혈관계 기능 조절에 중요한 역할을 하는 교감 신경에서 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체에 의해 NE 유리가 억제된다는 보고는 있지만,<sup>15,16,21</sup> 아직 어떤 기전으로 억제되는지 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서 본 실험에서는 non-I<sub>1,2,3</sub>수용체에 의한 신경전달 물질 유리조절이 N-형 칼슘 통로를 통해 일어날 가능성을 확인하기 위해 비교적 non-I<sub>1,2,3</sub>수용체에 선택적으로 작용한다고 보고된<sup>29</sup> cirazoline에 의한 N-형 칼슘 전류 변화를 조사하고 그 기전을 밝히고자 한다.

## II. 연구 방법 및 재료

### 1. 단일 신경세포 분리

성숙한 Sprague-Dawley 계 수컷 쥐(200~250g)를 실험용 guillotine으로 두부를 절단하였다. Carotid bifurcation 사이에 위치하고 있는 SCG를 찾아 4°C로 유지된 PBS용액으로 옮겼다. Sheath와 connective tissue를 제거한 뒤 작은 조각을 낸 후, 이를 0.7ml/mg collagenase(type D), 0.25ml/mg trypsin(Boehringer Mannheim Biochemical Co., St. Louis, MO, USA)이 들어 있는 5ml의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)에서 45분 동안 교반(35°C, shaking water bath)하였다. 배양 후 신경세포들을 강하게 흔들어 분리한 후, 1000rpm으로 원심분리하여 DMEM 배지에 재부유(resuspend)시켰다. 신경세포들은 poly-L-lysine으로 코팅되어있는 cover glasses(12mm)에 옮긴 뒤, 37°C 습식배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 모든 세포들은 분리 후 12시간 내 사용하였다.

### 2. 전기 생리학적 실험

이온전류는 patch clamp amplifier(Axopatch 200, Axon Instrument Inc., CA, USA)를 사용하여 전형적인 whole-cell patch clamp 방법으로 기록하였다.<sup>30</sup> 측정 전극은 borosilicate glass capillary(외경; 1.65mm, 내경; 1.2mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 vertical puller(Narishige, Tokyo, Japan)로 뽑아 제작하였고, 전극 내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5M $\Omega$ -2.5M $\Omega$ 되는 것을 사용하였으며, 신경세포가 들어있는 plate를 도립현미경(inverted microscope)위에 올려 놓고 세포외액을 중력에 의해 1-2ml/min 속도로 관류시켰다. Patch membrane 내외의 전압차를 일정하게 고정시킨 상태에서 나타나는 channel 활성도의 변화를 computer program(pClamp V 5.5, Axon Instrument Inc., CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21~24°C)에서 시행하였다.

### 3. 세포외 및 전극내 용액

칼슘전류 측정을 위한 전극내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 120 N-methyle-D-glucamine(NMG), 20 TEA-OH35%, 11 ethyleneglycol-bis-( $\beta$  aminoethyl ether)N,N,N', N'-tetraacetic acid(EGTA), 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgATP, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP, 14 Tris-phosphocreatine(pH 7.4, 298mosm/kg H<sub>2</sub>O) 으로 하였다. 세포외 관류액(external solution)의 조성(mM)은 140 CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, 145 TEA-OH35%, 10 HEPES, 15 glucose, 10 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4 with TEA-OH, 328 mosm/kg H<sub>2</sub>O) 으로 하여 실험하였다. Polyethylene관과 연결된 gas chromatography용 모세관(capillary tube) 끝을 신경세포의 100 $\mu$ m 이내에 위치시켜 약물이 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

Cell-attached patch를 위한 전극내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 110 BaCl<sub>2</sub>, 10HEPES(pH 7.4 with tetraethylamonium hydroxide)으로 하였고, 세포외 관류액(external solution)의 조성(mM)은 140 potassium gluconate, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 ethylene glycol-bis-( $\beta$  aminoethyl ether)N,N,N', N'-tetraacetic acid(EGTA), 10 HEPES, 5 glucose(pH 7.4 with KOH)으로 하였다.

### 4. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochdmicals (Indianapolis, IN, USA)에서 cirazoline은 Tocris(Tocris Cookson Inc., Ballwin, MO, USA)에서 구입하였다. Norepinephrine과 GDP- $\beta$ -S [Trilithium guanosine-5'-O-(2-thiodiphosphate)]는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), UK14R [5-Bromo-6-(2-imidazoline-2-ylamino)guinoxaline]과 efaroxan, BU224 hydrochloride [2-(4,5-Dihydroimidazol-2-yl)guinoline]는 Tocris(Tocris Cookson Inc., Ballwin, MO, USA)로부터 각각 구입하였다.  $\omega$ -conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx GVIA)과 PTX는 Alexis (Alexis Co., USA)에서 구입하였다.

### 5. 데이터 분석

모든 전류의 크기는 동일한 시간대(test pulse 시작 10 ms 후)에서 비교하

였으며, 전류의 크기는 세포의 크기에 따른 차이를 보정하기 위해 세포막의 capacitance로 나누어 전류 밀도(current density)로 표시하였다. 모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 t-검정(paired 혹은 unpaired)으로 확인하였고, 이 모든 경우에 p값이 0.05미만일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

### III. 결 과

#### 1. SCG 신경세포에서 cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제

막전압을 -80mV에 고정된 후 0mV로 탈분극 시키는 자극을 가한 뒤 칼슘 전류를 기록하였다. 동일한 신경세포에서 cirazoline 30  $\mu$ M을 외부에 가하였을 때 칼슘 전류가 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다(그림 1A,  $49.05 \pm 7.75\%$ , n=4). 그림 1B는 cirazoline이 칼슘 전류의 전류-전압 관계에 미치는 영향을 나타낸 것으로 cirazoline에 의해 칼슘 전류가 억제됨을 보였다. 그림 1C의 time-course에서 칼슘전류가 cirazoline에 의해 가역적으로 억제됨을 알 수 있고, cirazoline의 농도-반응 관계에서 칼슘 전류를 50% 억제시키는 cirazoline의 농도가 약 30  $\mu$ M 이었다(그림1D).

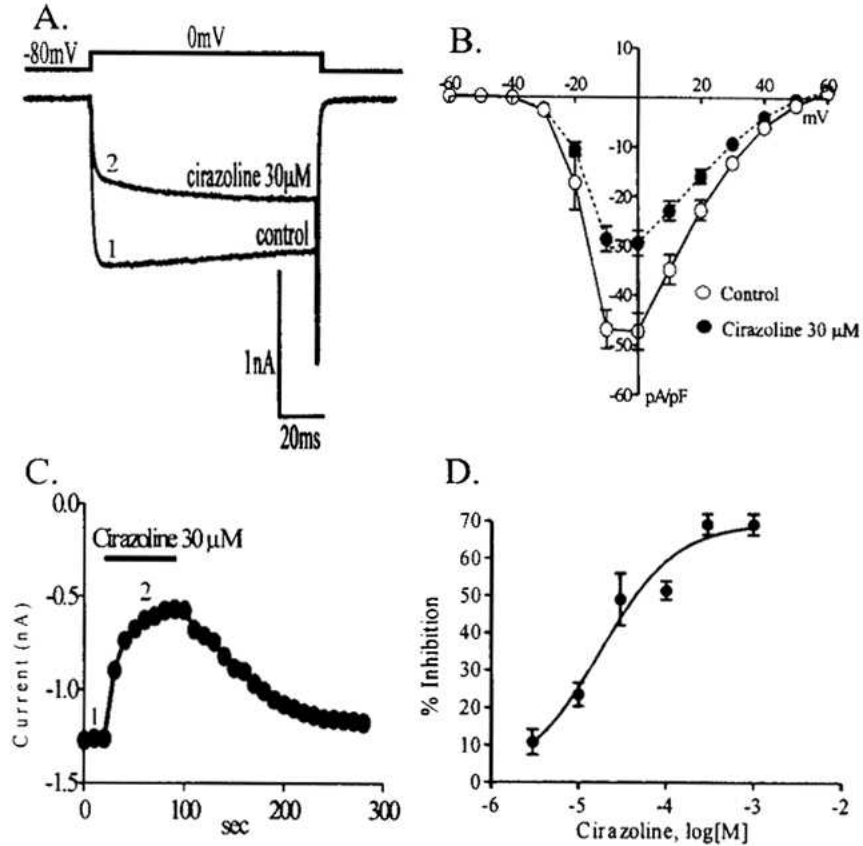


Fig. 1. The effects of 30  $\mu$ M cirazoline on  $\text{Ca}^{2+}$  current of acutely isolated superior cervical ganglion neurons. A: Current traces in the absence (1) and presence (2) of 30  $\mu$ M cirazoline. B: I-V relationship of the  $\text{Ca}^{2+}$  current measured at 10 ms after the onset of the depolarizing pulses in control (○) and presence (●) of 30  $\mu$ M cirazoline. C: Time course of cirazoline-induced blockade of the  $\text{Ca}^{2+}$  current. After the current amplitude had stabilized 30  $\mu$ M cirazoline was applied to the cell from a micropipette which was placed close to the cell. D: Concentration-response curve for cirazoline. To reduce the effects of desensitization only one concentration was tested per neuron. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M.

## 2. SCG 신경세포에서 NE에 의한 칼슘전류의 억제

Cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제와 비교하기 위해 신경세포에서 NE를 외부에 가하였을 때 칼슘 전류에 미치는 영향을 관찰하였다. SCG에서 NE가  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 활성화시켜 칼슘 전류를 감소시킨다는 이전의 보고<sup>31</sup>와 같이 1  $\mu$ M의 NE에 의해 현저하게 칼슘 전류의 감소가 나타났다(그림 2A, 48.8  $\pm$  1.37%, n=5). 막전압을 -80mV로 고정된 후 0mV로 탈분극 시킨 첫 번째 구

관계(그림 2C)에서 칼슘 전류를 50% 억제시키는 NE농도는 약 1  $\mu\text{M}$ 임을 알 수 있었다.

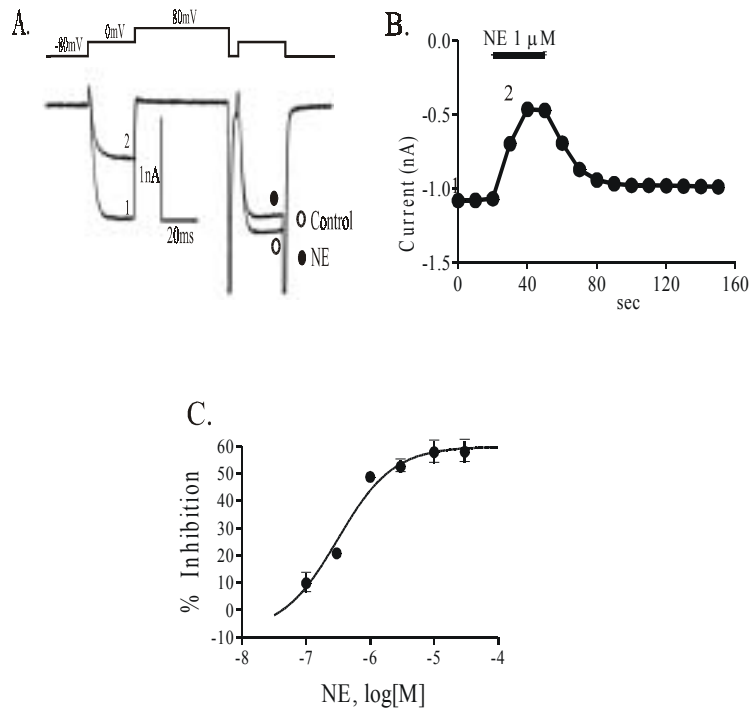


Fig. 2. The effects of 1  $\mu\text{M}$  norepinephrine (NE) on  $\text{Ca}^{2+}$  current of acutely isolated superior cervical ganglion neurons. A: Current traces in the absence (1) and presence (2) of 1  $\mu\text{M}$  NE. B: Time course of NE-induced blockade of the  $\text{Ca}^{2+}$  current. After the current amplitude had stabilized 1  $\mu\text{M}$  NE was applied to the cell from a micropipette which was placed close to the cell. C: Concentration-response curve for NE.

### 3. NE에 의한 칼슘전류의 억제에 3 $\mu\text{M}$ rauwolscine 이 미치는 영향

Rauwolscine을 전처치(5분)하지 않은 세포와 전처치 한 세포에서 NE에 의한 칼슘 전류 억제 정도를 비교하였다. Rauwolscine은  $\alpha_2$ -adrenoceptor 길항제로 알려져 있으나, 최근 보고<sup>29</sup>에 따르면 낮은(3  $\mu\text{M}$ ) rauwolscine농도에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor가 block되고 높은(30  $\mu\text{M}$ ) rauwolscine 농도에서 non- $\text{I}_{1,2,3}$ 수



용체도 block된다. 3  $\mu\text{M}$  rauwoscine을 전처치하지 않았을 경우 1  $\mu\text{M}$ 의 NE에 의해 칼슘 전류가 현저하게 감소한 반면(그림 3A), 3  $\mu\text{M}$  rauwoscine을 5분간 전처치한 후의 NE에 대한 칼슘 전류의 감소는 거의 나타나지 않았다(그림 3B,  $8.07 \pm 2.64\%$ ,  $n=4$ ). 이것으로 NE는  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 통해 칼슘 전류를 억제함을 확인할 수 있었다. 또한 +80mV의 강한 탈분극을 가하기 전 탈분극시키는 것을 prepulse, 강한 탈분극을 가한 뒤 탈분극시키는 것을 postpulse로 하여 각각에서 칼슘 전류를 억제하는 정도를 facilitation ratio (post/pre)로 나타내었을 때 3A의 경우 prepulse facilitation이 일어났으나 3  $\mu\text{M}$  rauwoscine을 전처치 한 경우 prepulse facilitation이 일어나지 않았다.

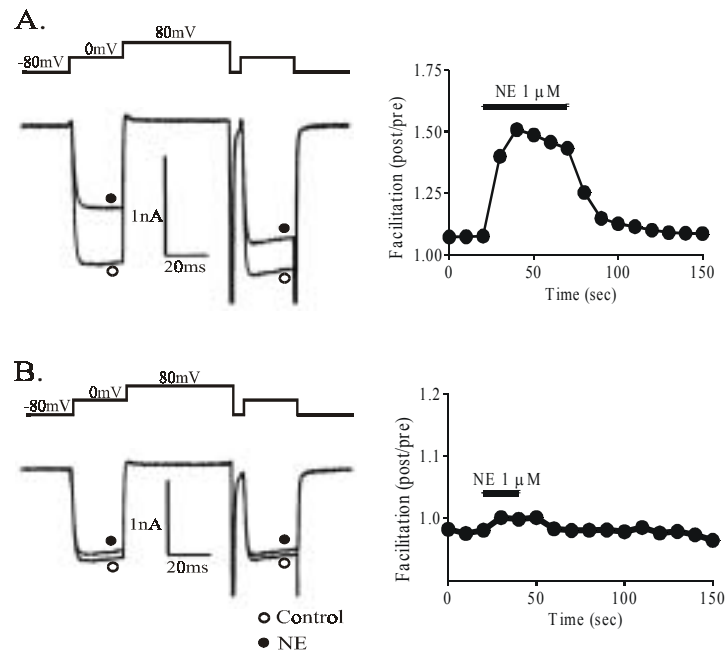


Fig. 3. The effect of low-dose (3  $\mu\text{M}$ ) rauwoscine on NE-induced calcium current inhibition. A: Experiments without rauwoscine. ; B: Experiments in the presence of 3  $\mu\text{M}$  rauwoscine. The  $\text{Ca}^{2+}$  current was evoked every 10 sec by a double-pulse voltage protocol consisting of two identical test pulses (0 mV from a holding potential of -80 mV) separated by a large depolarizing conditioning pulse to +80 mV. Prepulse facilitation was calculated by the ratio of the postpulse to prepulse current amplitude measured isochronally at 10 msec after the start of the test pulse.

#### 4. Cirazoline에 의한 칼슘전류의 억제에 3 $\mu$ M, 30 $\mu$ M rauwolscine이 미치는 영향

Rauwolscine을 각각 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M로 전처리(5분)한 후, cirazoline 30  $\mu$ M를 가하여 칼슘 전류를 기록하였다. 3  $\mu$ M의 rauwolscine을 전처리 하였을 때 대조군(그림 1, 50%)에 비해 칼슘 전류는 적게(그림 4B,  $32.63 \pm 1.52\%$ ,  $n=7$ ) 감소하여 cirazoline이 일부  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 매개함을 알 수 있었다. 30  $\mu$ M rauwolscine을 전처리 하였을 때 칼슘 전류는 cirazoline에 의해 거의 영향을 받지 않았다(그림 4C,  $7.06 \pm 0.68\%$ ,  $n=5$ ). 이상의 결과 cirazoline이 NE와는 다른 수용체를 경유함을 알 수 있었다. 또한 +80mV의 아주 큰 탈분극을 미리 가하는 경우 cirazoline에 의한 억제 효과가 감소하는 ‘prepulse facilitation’ 현상이 일어나는지 알아보았다. Rauwolscine을 전처리 하지 않은 A의 경우 ‘prepulse facilitation’이 나타났으나 3  $\mu$ M의 rauwolscine을 전처리 하였을 경우에는 ‘prepulse facilitation’이 거의 일어나지 않았다(그림 4B). 30  $\mu$ M의 rauwolscine을 전처리 하였을 경우 역시 ‘prepulse facilitation’ 관찰되지 않았다(그림 4C). 각각의 조건에서의 칼슘 전류 억제 정도의 결과를 요약한 것이 그림 4D이다.

#### 5. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 G-protein이 미치는 영향

그림 5는 cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제가 G-protein을 경유하는지 알아보기 위해 pipette내에 2mM GDP- $\beta$ -S를 넣어 실험한 것이다. GDP- $\beta$ -S는 GDP의 non-hydrolysable analog로 신경세포의 칼슘 전류에서 신경전달 물질의 영향을 조절하는 G-protein을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>32,33</sup> 세포막을 rupture 시킨 후, 10분 후에 NE와 cirazoline을 각각 가하여 칼슘 전류의 억제정도를 알아보았다. NE 1 $\mu$ M를 가한 경우 칼슘 전류의 감소는 거의 일어나지 않았다(그림 5A,  $5.49 \pm 1.45\%$ ,  $n=5$ ). 이는 NE가 SCG세포에서 G-protein을 통해 칼슘 전류를 억제한다는 보고와도 일치하는 결과이다.<sup>34</sup> 마찬가지로, cirazoline 30  $\mu$ M을 가하였을 때도 칼슘 전류의 감소는 나타나지 않았다(그림 5B,  $4.99 \pm 1.91\%$ ,  $n=4$ ) cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 G-protein이 관여함을 알 수 있었다. 이것을 요약한 것이 그림 5C이다. 그리고 그림

5A, 5B 두 경우 모두 prepulse facilitation이 일어나지 않았다.

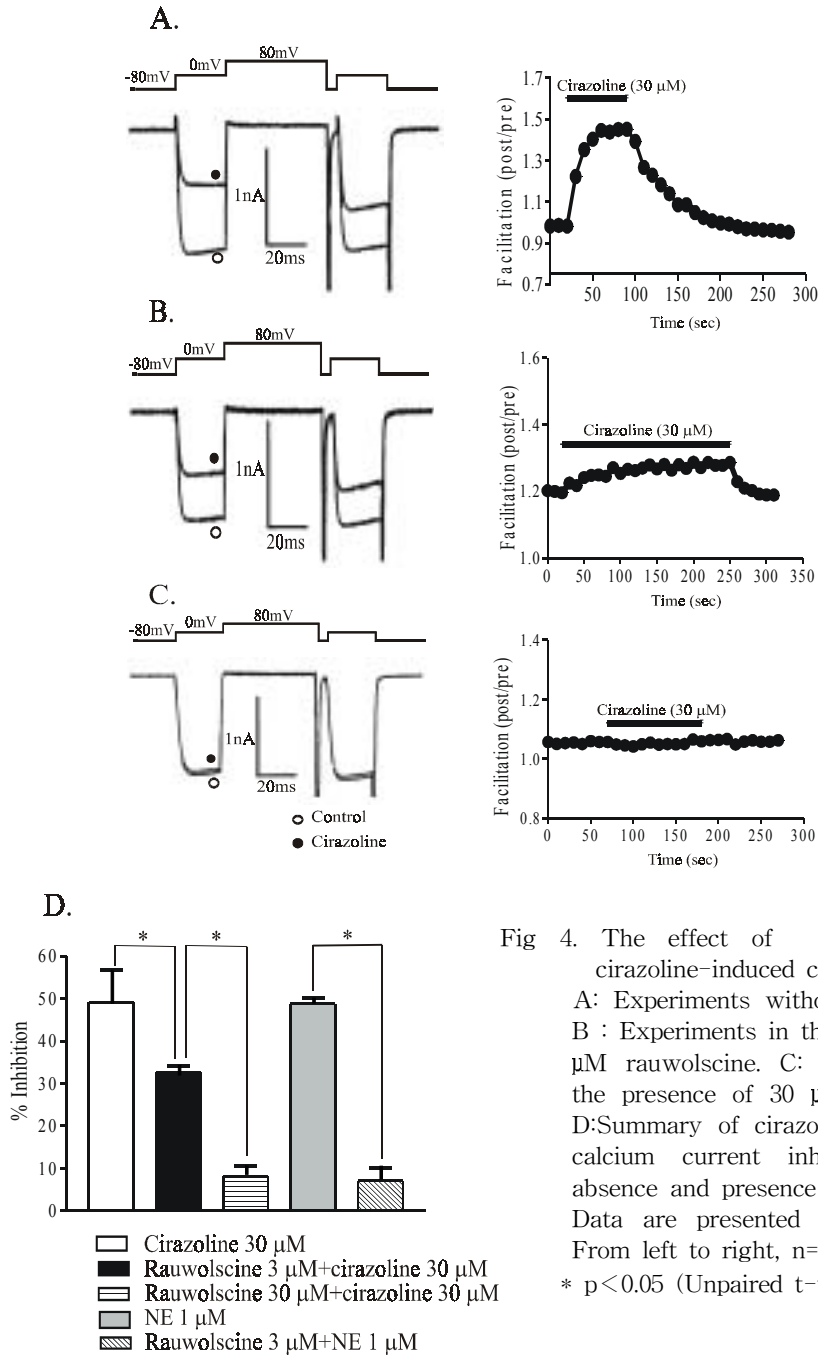


Fig 4. The effect of rauwolscine on cirazoline-induced calcium current. A: Experiments without rauwolscine. B: Experiments in the presence of 3 μM rauwolscine. C: Experiments in the presence of 30 μM rauwolscine. D: Summary of cirazoline/NE-induced calcium current inhibition in the absence and presence of rauwolscine. Data are presented as mean±SEM. From left to right, n=4, 7, 5, 5, 3. \* p<0.05 (Unpaired t-test).

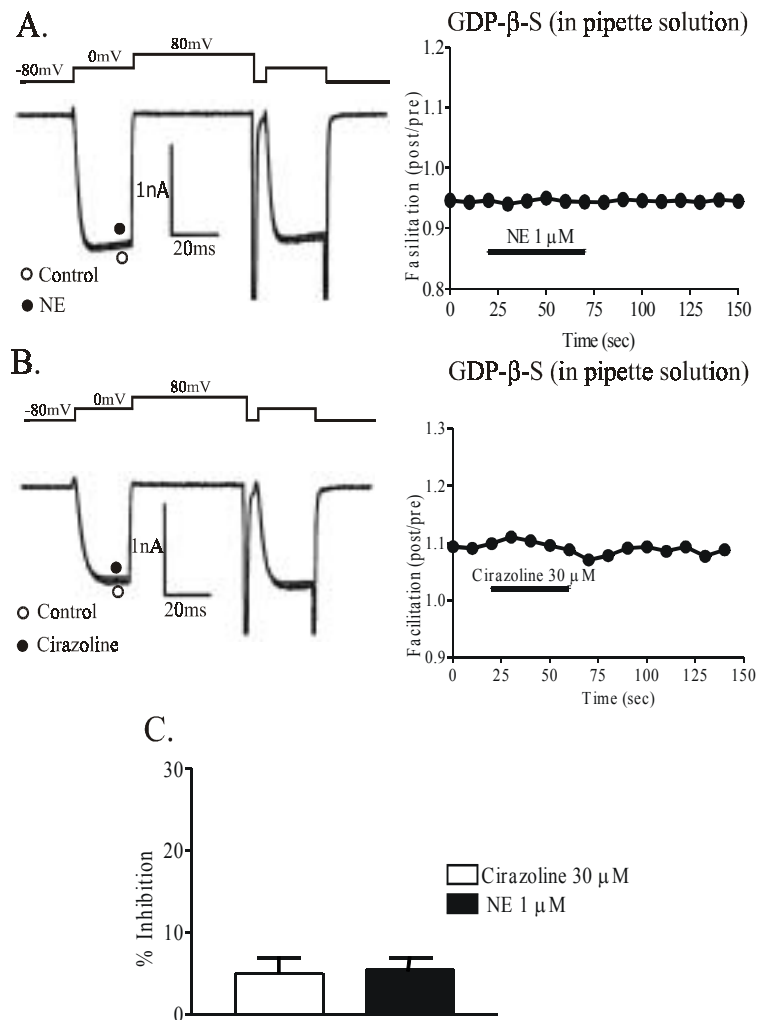


Fig. 5. The effect of GDP- $\beta$ -S (2 mM) on NE and cirazolin-induced calcium current inhibition. A: Current traces in the absence and presence of 1  $\mu$ M NE after 5min dialysis with 2 mM GDP- $\beta$ -S containing recording pipette solution. Records in A and B are from different cells and were elicited by test potential of 0mV from a holding potential of -80mV. B: Inhibition induced by 30  $\mu$ M cirazoline application in the presence of intracellular GDP- $\beta$ -S. C: Comparison of inhibition of calcium current amplitude induced by NE and cirazoline with GDP- $\beta$ -S (2 mM). The data was shown as mean  $\pm$  S.E.M.  $p > 0.05$  (Unpaired t-test).

## 6. Omega-conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx) 민감성 칼슘 전류에 대한 cirazoline의 효과

그림 6은  $\omega$ -conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx)에 의한 칼슘 전류의 억제와  $\omega$ -CgTx 전처리 후 cirazoline(30  $\mu$ M)에 의한 칼슘 전류 억제를 보여준다.  $\omega$ -CgTx (1  $\mu$ M)을 전처리 한 세포의 경우 상당량의 칼슘 전류가 억제되었고 [그림 6B(2), 76.19 $\pm$ 4.52%, n=5], 이러한 억제된 칼슘 전류는  $\omega$ -CgTx에 민감한 N-형 칼슘 전류이다. Omega-conotoxin을 가하여 N-형 칼슘 전류를 억제한 다음 cirazoline을 가하였을 경우 cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제가 대조군(49.05 $\pm$ 7.75%, n=4)과 비교하여 현저하게 줄어들었으며 [그림 6B(4), 6.49 $\pm$ 1.39%, n=5], 이러한 차이는 통계적으로 유의하였다(그림 6C;  $p < 0.05$ ). 따라서 cirazoline은 N-형 칼슘 전류를 통해 칼슘 전류를 억제함을 알 수 있었다.

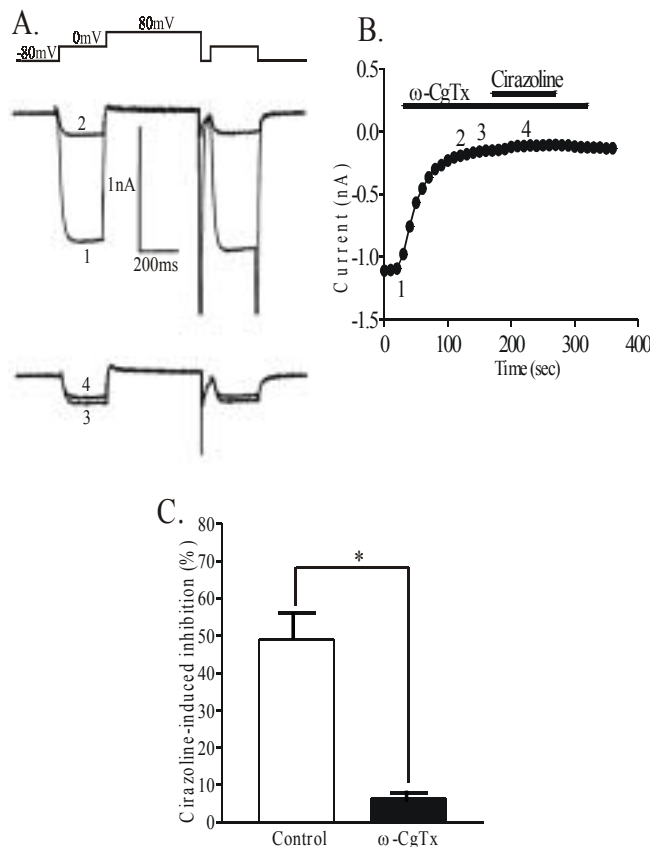


Fig. 6. The effects of Omega-conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx) on  $Ca^{2+}$  current amplitude and inhibition induced by 30  $\mu$ M cirazoline. A: Current trace in the absence and presence of 1  $\mu$ M  $\omega$ -CgTx and inhibition induced by 30  $\mu$ M cirazoline in the presence 1  $\mu$ M  $\omega$ -CgTx. B: Time course of the application of 30  $\mu$ M cirazoline on  $\omega$ -CgTx GVIA-insensitive  $Ca^{2+}$  currents. C: Summary of  $Ca^{2+}$  current inhibition by 30  $\mu$ M cirazoline in the absence and presence 1  $\mu$ M  $\omega$ -CgTx. Data are presented as mean $\pm$ SEM.  $p < 0.05$  (Unpaired t-test).

## 7. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 대한 imidazoline receptor antagonist의 효과

Cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제가 non-I<sub>1,2,3</sub>수용체가 아닌 다른 imidazoline 수용체(I<sub>1</sub>-, I<sub>2</sub>-, I<sub>3</sub>-수용체)를 통하여 일어나는지 확인하기 위해 각 수용체의 길항제를 미리 전처리한 후 칼슘 전류에 대한 cirazoline의 효과를 관찰하였다. I<sub>1</sub>-수용체 길항제인 efaroxan 1  $\mu$ M, I<sub>2</sub>-수용체 길항제인 BU224 1  $\mu$ M, I<sub>3</sub>-수용체 길항제 KU14R 1  $\mu$ M을 5분간 전처리한 후, 30  $\mu$ M cirazoline의 효과를 관찰하였다. Efaroxan을 전처리 하였을 때 30  $\mu$ M cirazoline에 의해 칼슘 전류는 약 42%(그림 7A, 42.14 $\pm$ 2.57%, n=5)억제되었고, BU224의 경우 약 38%(그림 7B, 37.97 $\pm$ 2.36%, n=5), KU14R의 경우 약 46%(그림 7C, 46.05 $\pm$ 1.98%, n=5) 칼슘 전류가 억제되었다. 이러한 억제정도는 대조군의 값(49.05 $\pm$ 7.75%)과 통계적으로 유의하지 않으므로(그림 7D, p >0.05) cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제는 I<sub>1</sub>-, I<sub>2</sub>-, I<sub>3</sub>-수용체를 경유하지 않음을 알 수 있었다.

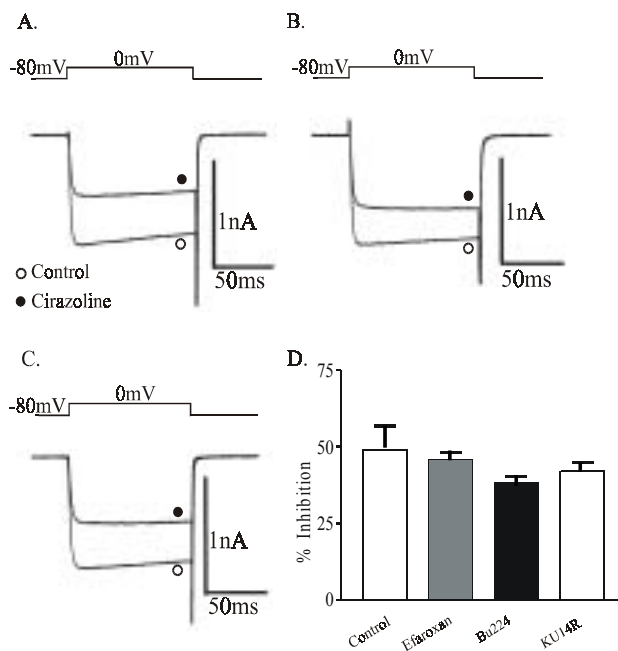


Fig. 7. The effects of various imidazoline receptor antagonists on inhibition of Ca<sup>2+</sup> current induced by 30  $\mu$ M cirazoline. A: Inhibition of Ca<sup>2+</sup> current when the bath contained 1  $\mu$ M efaroxan. B: Inhibition of Ca<sup>2+</sup> current when the bath contained 1  $\mu$ M BU224. C: Inhibition of Ca<sup>2+</sup> current when the bath contained 1  $\mu$ M KU14R. Various antagonists of 1  $\mu$ M were applied to the cell from a micropipette which was placed close to the cell. D: Summary of Ca<sup>2+</sup> current inhibition by 30  $\mu$ M cirazoline in the presence 1  $\mu$ M imidazoline antagonists. From left to right, n=4, 5, 5, 5.

## 8. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 pertussis toxin(PTX)이 미치는 영향

분리된 신경세포들을 500 ng/ml 의 PTX가 들어있는 배지에서 18시간 동안 배양한 후 실험하였다. PTX를 전처리 한 신경세포에서 cirazoline(30  $\mu$ M)에 의한 칼슘 전류 억제가 감소하였다(그림 8). Rauwolscine 3  $\mu$ M을 전처리 한 후 cirazoline 30 $\mu$ M에 의해 32.63 $\pm$ 1.52%의 칼슘 전류 감소가 일어났고 PTX를 전처리 한 경우 cirazoline 30  $\mu$ M에 의해 23.04 $\pm$ 1.95%의 억제를 보였다. 반면, NE의 경우 PTX를 전처리 한 경우 칼슘 전류의 억제가 대조군에 비해 현저히 감소하였다(5.91 $\pm$ 1.85%). 이와 같은 결과로부터 cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 PTX-sensitive G-protein(Go/Gi)과 PTX-insensitive G-protein이 관여하고 있음을 알 수 있다.

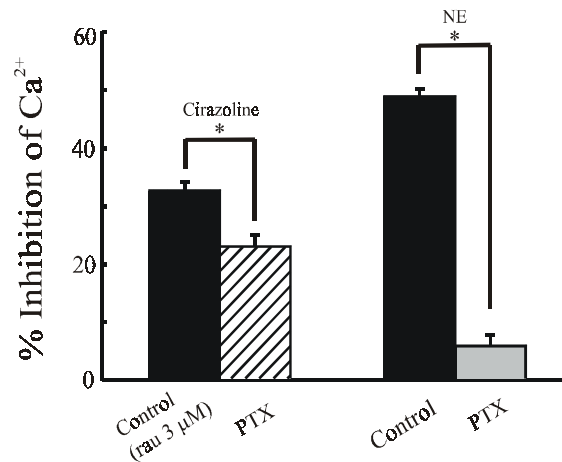


Fig. 8. Ca<sup>2+</sup> current amplitude and inhibition induced by NE/cirazoline application in neurons recorded from control and pertussis toxin-treated cells.

Bars are mean inhibition of calcium current by 30  $\mu$ M cirazoline and 1  $\mu$ M NE. Cells were cultured overnight with 500 ng/ml PTX. From left to right, n=7, 7, 5, 5.

\* p<0.05(Unpaired t-test).

## 9. Cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제에 second messenger의 관여 여부

Cirazoline의 작용기전에 diffusible cytoplasmic messenger가 관여하는지의 여부를 bath에 효현제를 가하여 cell-attached patch 방법을 이용하여 알아보았다. 이러한 상태에서 cirazoline이 membrane-delimited pathway를 통해 칼슘 전류를 억제한다면 효현제에 의한 G-protein의 활성화가 patch안의 이온통로와 상호작용이 일어나지 않아 효현제의 효과가 나타나지 않지만 diffusible messenger가 관여한다면 patch안의 이온통로로 이동할 수 있어서 효현제를 가하였을 때 반응이 나타난다. 실험결과(그림 9A, 9B) cirazoline에 의해 바륨 전류의 변화가 없었으며 따라서 cirazoline 수용체 활성화에 의한 칼슘 통로 억제의 세포내 기전에 diffusible second messenger가 관여하는 것이 아니라 membrane-delimited pathway를 경유함을 알 수 있었다.

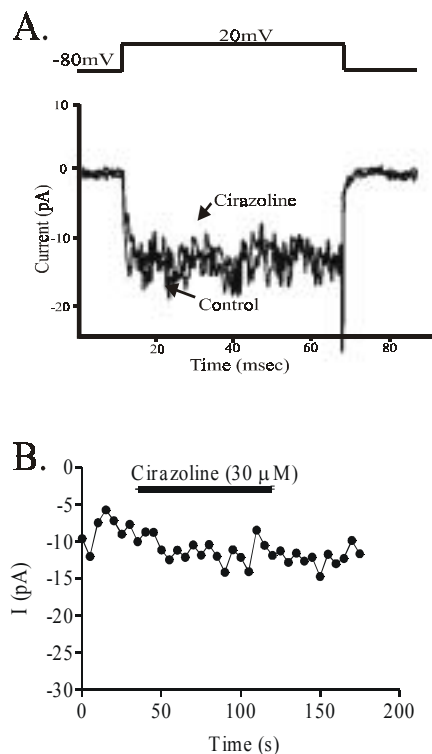


Fig. 9. Cell-attached patch recording of  $Ba^{2+}$  currents evoked by a step depolarization to +20 mV from a holding potential of -80mV in the presence and absence of bath-applied cirazoline (30  $\mu$ M).

A: Cirazoline did not reduce current amplitude in any of the cells tested (n=4).

B: Averaged relative peak current amplitude of  $I_{Ba}$  from 4 cell-attached patches.



#### IV. 고 찰

Cirazoline은 NE와 유사하게 가역적이며(reversible), 농도 의존적으로 SCG에서 칼슘 전류를 감소시켰다(그림1). 만약 NE와 cirazoline이 같은 수용체를 경유한다면 3  $\mu\text{M}$  rauwolscine을 전처리 하였을 경우에도 같은 효능을 나타내는 효현제 각각의 농도에서 칼슘전류의 억제 정도가 비슷하여야 할 것이다. 하지만  $\alpha_2$ -adrenoceptor을 block한다고 보고된 rauwolscine 낮은 농도(3  $\mu\text{M}$ )를 전처리 했을 때 NE에 의한 칼슘 전류의 억제는 거의 일어나지 않았지만, cirazoline에 의해서는 칼슘 전류가 상당량 억제되었다(그림 4). 이러한 실험결과는 NE의 경우 대부분  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 통해 칼슘 전류를 억제하나 cirazoline은  $\alpha_2$ -adrenoceptor가 아닌 다른 수용체도 매개하여 칼슘 전류를 억제할 것임을 시사하며 좀더 구체적인 실험을 통하여 이 과정에 non- $I_{1,2,3}$  수용체가 관여함을 확인할 수 있었다.

보고에 따르면 imidazoline계의 약물(BDF 6143, clonidine, idazolixan, phentolamine)의 대부분은 non- $I_{1,2,3}$  수용체(presynaptic imidazoline receptor)는 물론  $\alpha_2$ -adrenoceptor에도 binding affinity를 가진다고 알려져 있다. 본 실험에 사용한 imidazoline 유도체인 cirazoline은 토끼의 동맥과 폐동맥에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor에는 영향을 주지않고 non- $I_{1,2,3}$  수용체에 선택적으로 작용한다고 보고된 바 있다.<sup>13</sup> 하지만 본 실험에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor을 block하지 않은 조건에 비해 block 한 조건에서 cirazoline의 칼슘 전류 억제효과가 적게 나타났다. 이러한 실험 결과는 쥐의 SCG neuron에서 cirazoline은 선택적으로 non- $I_{1,2,3}$  수용체에만 작용하지 않고 부분적으로  $\alpha_2$ -adrenoceptor에도 작용함을 의미하며 이러한 차이는 아마도 종 혹은 조직의 차이에 기인하는 것으로 추측된다. 따라서 본 실험에서 cirazoline의 작용중 imidazoline receptor를 매개하는 부분만을 관찰할 때는  $\alpha_2$ -adrenoceptor의 관여를 배제하기 위해 저농도(3  $\mu\text{M}$ )의 rauwolscine을 전처리 하였으며 이 상태를 대조군으로 하여 비교하였다.

대부분의 신경에서 신경전달 물질의 수용체는 막전압 의존적 칼슘 통로(voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel)와 기능적으로 연결되어 있다. 신경전달 물질이 칼슘 통로를 조절하는 기전 중 가장 잘 알려진 것은 pertussis toxin(PTX) 민감성 G-protein( $\text{Gi}/\text{Go}$ )을 매개로 하고, 세포막에 국한된

(membrane-delimited) 기전을 통해, 막전압 의존적으로 칼슘 통로를 억제하는 것이다.<sup>24</sup> 특히 쥐의 SCG 세포에서 somatostatin, adenosine, prostaglandin E<sub>2</sub> 등 많은 물질들이 membrane-delimited pathway, 막전압 의존적 억제를 한다고 알려져 있다. NE를 포함하여 일반적으로 막전압 의존적 억제현상에서는 아래의 몇가지 특징을 나타내는데 1)membrane-delimited pathway를 경유하며 실험적으로는 cell-attached patch를 하여 세포 밖에 효현제를 가하였을 때 아무 반응이 나타나지 않으며, 2)효현제에 의해 ‘kinetic slowing’ 이라는 칼슘 전류 활성화의 특성<sup>35</sup>을 보이며 3)큰 탈분극의 자극을 미리 가하면 억제효과가 감소하는 ‘prepulse facilitation’ 현상을 보인다.<sup>36</sup> 본 실험에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor을 차단한 상태에서 즉 imidazoline receptor만을 매개한 cirazoline의 칼슘전류 억제 기전에서는 위에서 언급한 막전압 의존적 억제의 특징을 모두 나타내지는 않았다. 즉 ‘pre-pulse facilitation’ 이 대조군(그림 4A)에 비해 거의 소실되었고, ‘kinetic slowing’ 현상도 관찰할 수 없었다(그림 4B). 그러나  $\alpha_2$ -adrenoceptor를 차단하지 않은 상태에서 cirazoline의 칼슘전류 억제 기전에서는 ‘prepulse facilitation’, 그리고 ‘kinetic slowing’ 현상을 어느정도 관찰할 수 있었는데 이는 아마도 일부  $\alpha_2$ -adrenoceptor가 활성화되어 나타난 것으로 추측된다. 왜냐하면  $\alpha_2$ -adrenoceptor가 활성화 될 경우 ‘prepulse facilitation’, 그리고 ‘kinetic slowing’ 현상이 나타난다는 사실이 잘 알려져 있기 때문이다.

한편 cell-attached patch 방법을 이용해 세포 밖으로 cirazoline을 가하였을 때 아무 변화가 나타나지 않는것으로 보아 그 과정은 membrane-delimited pathway를 경유하는 것으로 생각된다(그림 9). 이어서 이러한 cirazoline의 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체를 통한 칼슘 전류 억제기전에 G-protein의 연관성 여부 및 그 종류를 알아보기 위한 실험을 진행하였다. G-protein에 대한 GTP binding의 competitive inhibitor인 GDP- $\beta$ -S 2mM을 파이펫내에 넣고 cirazoline을 가하였다. 또한 세포에 pertussis toxin(PTX)을 18h 전처리한 후 cirazoline을 가하여 칼슘 전류의 변화를 관찰하였다. 2 mM GDP- $\beta$ -S을 파이펫 내에 넣어 G-protein의 활성화를 억제 하였을때 cirazoline에 의한 칼슘 전류 억제는 거의 일어나지 않았다(그림 5A). 이는 NE에 의한 칼슘 전류 억제 기전과 유사하다<sup>34</sup>. 하지만 PTX-sensitive G-protein(Gi/Go)을 통하여 칼슘 전류를 억제한다고 알려진 NE와 다르게 PTX를 18hr 전처리 한 경우에도 cirazoline에 의

한 칼슘 전류 억제는 일어났으며(그림 8) 그 억제 정도가 PTX 처치하지 않은 경우에 비해 조금 감소되었다. 결과적으로 SCG 신경세포에서 imidazoline receptor를 통한 cirazoline의 칼슘전류 조절기전에는 부분적으로(약 30%) PTX-sensitive G-protein(Gi/Go)이 관여하고 약 70% 정도는 PTX-insensitive G-protein을 통해 활성화 됨을 알 수 있었다. 이러한 G-protein에 대한 특성 및 membrane-delimited pathway 경유특성 등은 SP(substance P)에 의한 N-형 칼슘 전류 조절 기전의 특성과 유사하다.<sup>37</sup>

한편 SCG 신경세포에서 칼슘 전류는 N-형 칼슘 통로 차단제인  $\omega$ -conotoxin GVIA( $\omega$ -CgTx; 1 $\mu$ M)에 의해서 대부분 억제되어 이미 보고된 칼슘 통로 분포 특성과 일치 하였다. N-형 칼슘 통로를 차단시킨 상태에서 cirazoline (30  $\mu$ M)을 가하여도 칼슘 전류의 억제는 일어나지 않았다(그림 6). 이는 SCG 신경세포에서 cirazoline은 주로 N-형 칼슘 통로를 억제함을 의미 한다. 또한 쥐의 sympathetic axon terminal에서 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체를 통해 NE release를 조절하는 것으로 보고되었는데 본 실험 결과 이와 부합되게 non-I<sub>1,2,3</sub> 수용체를 제외한 다른 imidazoline 수용체에 의해서는 칼슘 전류의 억제가 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

SCG 신경세포에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor의 활성화에 의한 칼슘 전류의 억제는 negative feedback mechanism으로 신경자극 동안 NE의 유리를 감소시킴은 잘 알려져 있다. 또한 imidazoline-preferring binding site는 중추조직과 말초 조직에서 규명되었으며<sup>3</sup>, 이와 같은 부위는 혈압조절에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다<sup>4</sup>. 이상의 실험 결과를 통해 SCG에서  $\alpha_2$ -adrenoceptor가 아닌 presynaptic imidazoline receptor에 의한 신경전달물질 유리의 조절기전을 알 수 있었으며, 본 연구 결과는 앞으로 교감 신경의 항상성 이상에서 비롯되는 고혈압과 같은 질병의 약리학적 연구의 기초가 될 것으로 기대하며,  $\alpha_2$ -adrenoceptor에 의한 혈압조절제의 부작용을 보완하는 새로운 약물 개발을 위한 기초자료가 될 것으로 기대한다.

## V. 결 론

흰쥐 수컷 SCG 신경세포에서 cirazoline은 N-형 칼슘 전류를 억제하여 신경 전달 물질의 유리를 조절하게 됨을 알 수 있었다. Cirazoline에 의한 칼슘 전류의 억제는 PTX-비민감성 및 PTX-민감성 G-protein을 매개하여 membrane-delimited pathway를 경유하는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험 결과들은 심혈관계와 관련된 SCG에서 non- $I_{1,2,3}$  수용체의 신경 전달 물질 유리 조절기전 및 생리학적 역할을 이해하는데 기여할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Hartmann M, Isler H. Chemische Konstitution und pharmakologische Wirksamkeit von in 2-Stellung substituierten Imidazolinen. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 1939;192:141-154.
2. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. J Pharmacol Exp Ther 1984;230:232-236.
3. Michel MC, Insel PA. Are there multiple imidazoline binding sites. Trends Pharmacol Sci 1989;10:342-344.
4. Ernsberger P, Giuliano R, Willette RN, Reis DJ. Role of imidazoline receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. J Pharmacol Exp Ther 1990;253:408-418.
5. Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, Collins LA, et al. I<sub>1</sub>-imidazoline receptor: Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. Ann NY Acad Sci 1995;763:22-42.
6. Menargues A, Cedo M, Artiga O, Obach R, Garcia-Sevilla JA. Modulation of food intake by  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonists and I<sub>2</sub>-imidazoline drugs in rat: LSL60101 as a novel and selective ligand for I<sub>2</sub>-imidazoline sites[abstr.]. Br J Pharmacol 1994;111:298p.
7. Garcia-Sevilla JA, Escriba PV, Sastre M, Walzer C, Busquets X, Jaquet G, et al. Immunodetection and quantitation of imidazoline receptor proteins in platelets of patients with major depression and brains of suicide victims. Arch Gen Psychiatry 1996;53:803-810.
8. Olmos G, Gabilondo AM, Miralles A, Escriba PV, Garcia-Sevilla JA. Chronic treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline down-regulates non-adrenoceptor [<sup>3</sup>H]-idazoxan binding sites in the rat brain. Br J Pharmacol 1993;108:597-603.
9. Alemany R, Olmos G, Garcia-Sevilla JA. The effects of phenelzine and other monoamine oxidase inhibitor antidepressants on brain and liver I<sub>2</sub>

- imidazoline-preferring receptors. *Br J Pharmacol* 1995;114:837-845.
10. Plant TD, Henquin JC. Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive  $K^+$  channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Br J Pharmacol* 1990;101:115-120.
  11. Chan SLF, Dunne MJ, Stillings NR, Morgan NG. The  $\alpha_2$ -antagonist efaroxan modulates  $K^+$ -ATP channels in insulin secreting cells. *Eur J Pharmacol*. 1991;204:41-48.
  12. Molderings GJ, Gothert M. Imidazoline binding sites and receptors in cardiovascular tissue. *Gen. Pharmacol* 1998;32:17-22.
  13. Likungu J, Molderings GJ, Gothert M. Presynaptic imidazoline receptors and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the human heart: Discrimination by clonidine and moxonidine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996;354:689-692.
  14. Molderings GJ, Likungu J, Jakchik, Gothert M. Presynaptic imidazoline receptors and non-adrenoceptor [ $^3H$ ]-idazoxan binding sites in human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol* 1997;122:43-50.
  15. Moldering GJ, Gothert M. Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from  $I_1$ - and  $I_2$ -imidazoline binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 1995;351:507-516.
  16. Gothert M, Molderings GJ. Involvement of presynaptic imidazoline receptors in the  $\alpha_2$ -adrenoceptor-independent inhibition of noradrenaline release by imidazoline derivatives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1991;343:271-282.
  17. Molderings GJ, Gothert M. Presynaptic imidazoline receptor mediate inhibition of noradrenaline release from sympathetic nerves in rat blood vessels. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;12:388-397.
  18. Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977;77:1-124.
  19. Starke K, Gothert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 1989;69:864-989.

20. Starke K. Presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1987;107:73-146.
21. Molderings GJ, Hentrich F, Gother M. Pharmacologic characterization of the imidazoline receptors which mediates inhibition of noradrenaline release in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 199;44:630-638.
22. Takahashi E, Murata Y, Oki T, Miyamoto N, Mori Y, Takada N, et al. Isolation and functional characterization of the 5'-upstream region of mouse P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1A}$  subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:54-59.
23. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 1992;9:85-95.
24. Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptor. *Trends Neurosci* 1994;17:531-536.
25. Ikeda SR, Dunlap K. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: Role of G protein subunits. *Adv Second Messenger phosphoprotein Res* 1999;33:131-151.
26. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-268
27. Krzysztof Kukula, Pawel Jerzy Szulczyk. Properties of  $\text{Na}^+$  currents in putative submandibular and cardiac sympathetic postganglionic neurons. *Journal of the Autonomic Neurons System* 1998;69:12-20.
28. Lockhart ST, Turrigiano GG, Birren SJ. Nerve growth factor modulates synaptic transmission between sympathetic neurons and cardiac myocytes. *J of Neuroscience* 1997;17(24):9573-9582.
29. Gother M, Bruss M, Bonisch H, Molderings GJ. Presynaptic imidazoline receptor. *Annals New York Academy of Sciences* 1999;881:171-184.
30. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.
31. Schofield GG. Norepinephrine blocks a calcium current of adult rat sympathetic neurons via an  $\alpha_2$ -adrenoceptor. *European Journal of*

- Pharmacology 1990;180:37-47.
- 32.Holz GG, Rane SG, Dunlap K. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1986;319:670.
- 33.Dolphin AC, Scott RH. Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurons: modulation by guanine nucleotides. *J. Physiol (London)* 1987;386:1.
- 34.Schofield GG. Norepinephrine inhibits a  $Ca^{2+}$  current in rat sympathetic neurons via a G-protein. *European Journal of Pharmacology* 1991;207:195-207.
- 35.Elmslie KS, Zhou W, Jones SW. LHRH and GTP- $\gamma$ -S modify calcium currents activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 1990;5:75-80.
- 36.Ikeda SR. Prostaglandin modulation of  $Ca^{2+}$  channels in rat sympathetic neurons is mediated by guanosine nucleotide binding proteins. *J. Physiol (Lond)* 1992;458:339-359.
- 37.Shapiro MS, Hille B. Substance P and Somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G-protein Pathways. *Neuron* 1993;10:11-20.



**Abstract**

**Inhibition of N-type calcium current by cirazoline  
in rat superior cervical ganglion**

**Yun Suk Kim**

Brain Korea 21 Project for Medical Science  
Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Taick Sang Nam)

Presynaptic imidazoline receptors that mediate inhibition of norepinephrine (NE) release have first been identified in rabbit cardiovascular tissue. Superior cervical ganglion (SCG) neurons have imidazoline receptors and N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to modulate neurotransmitter release. However, whether inhibitory action of imidazoline receptor activation is associated with N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade is unknown. This study was conducted to see if N-type  $\text{Ca}^{2+}$  current observed in SCG neurons is modulated by activation of imidazoline receptors.

$\text{Ca}^{2+}$  currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique from neurons isolated enzymatically from adult rat SCG.  $\text{Ca}^{2+}$  current was evoked by a depolarizing stepping pulse from  $-80$  to  $0\text{mV}$ . Cirazoline ( $30\ \mu\text{M}$ ) decreased the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  current and slowed its rising phase. However, in the presence of alpha-2 antagonist rauwolscine ( $3\ \mu\text{M}$ ), the cirazoline-induced inhibitory effect on  $\text{Ca}^{2+}$  current was decreased and did not show a kinetic slowing suggesting that alpha-2 adrenoceptors were partially activated by cirazoline in SCG neurons. Most of  $\text{Ca}^{2+}$  current was inhibited by N-type channel blocker omega-conotoxin. And in the presence of N-type channel blocker( $\omega$ -conotoxin GVIA) cirazoline could not inhibit the  $\text{Ca}^{2+}$  current indicating that cirazoline inhibited the N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Internal dialysis with solutions containing  $2\ \text{mM}$  guanosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) ( $\text{GDP-}\beta\text{-S}$ ) blocked the  $\text{Ca}^{2+}$  current inhibition by NE or cirazoline. Compared with control, the inhibitory effects of cirazoline on  $\text{Ca}^{2+}$  current were decreased when SCG neurons were pretreated with pertussis toxin (PTX) for 18 hr. The presynaptic imidazoline receptor effects were mediated

by a membrane-delimited pathway, because the modulation was not seen in cell-attached patches when cirazoline was applied to the bath.

Taken together, the results suggest that activation of presynaptic imidazoline receptor in SCG neurons reduced N-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents via a membrane-delimited, both PTX-sensitive and PTX-insensitive G-protein pathway. This imidazoline receptor mediated inhibition of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  current may play an important role in modulating neurotransmitter release from SCG neurons.

---

Key words: cirazoline,  $\text{Ca}^{2+}$  channels, superior cervical ganglion