Halothane, Enflurane 및 Isoflurane이 *Xenopus* Oocyte에 발현된 m1 및 m3 무스카린성 수용체에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 마취과학고실

도 상 환

= Abstract =

Effects of Halothane, Enflurane or Isoflurane on the m1 or m3 Muscarinic Receptor Expressed in *Xenopus* Oocytes

Sang-Hwan Do, M.D.

Department of Anesthesiology, Seoul National University Medical College, Seoul, Korea

Background: Muscarinic receptors are distributed abundantly in the central nervous system and peripheral visceral organs, and have a close relationship with anesthesia. We investigated the effects of halothane, enflurane or isoflurane on m1 or m3 muscarinic signaling.

Methods: Using two electrode voltage clamps, Ca^{2+} -activated Cl^- currents ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) were measured in *Xenopus* oocytes injected with an m1 or m3 receptor mRNA. $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ was induced with the application of acetyl β -methylcholine with or without exposure to volatile anesthetics.

Results: Halothane depressed the m1 and m3 receptor function significantly (m1; $0.49 \pm 0.17 \mu\text{A} \rightarrow 0.1 \pm 0.05 \mu\text{A}$, m3; $0.74 \pm 0.2 \rightarrow 0.23 \pm 0.06 \mu\text{A}$, $P < 0.05$). Enflurane also decreased signaling through both receptors significantly (m1; $0.49 \pm 0.1 \rightarrow 0.15 \pm 0.04 \mu\text{A}$, m3; $0.95 \pm 0.34 \rightarrow 0.19 \pm 0.05 \mu\text{A}$, $P < 0.05$). However, while isoflurane depressed m3 signaling significantly ($0.82 \pm 0.19 \rightarrow 0.3 \pm 0.09 \mu\text{A}$, $P < 0.05$), it did not cause significant changes in $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ through the m1 receptor (0.29 ± 0.05 vs $0.23 \pm 0.09 \mu\text{A}$, $P > 0.5$). From a concentration-response curve, enflurane decreased m1 and m3 signaling dose-dependently.

Conclusions: Our data suggests that m1 and m3 muscarinic receptors were depressed by halothane, enflurane or isoflurane except for the fact that the m1 receptor was not affected by isoflurane. (Korean J Anesthesiol 2000; 39: 854~859)

Key Words: Anesthetics, volatile: enflurane; halothane; isoflurane. Cells: *Xenopus* oocytes. Receptors: muscarinic.

서 론

무스카린성 수용체(muscarinic receptor)는 니코틴성

논문접수일: 2000년 10월 6일

책임저자: 도상환, 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교병원 마취과, 우편번호: 110-744

Tel: 02-760-2248, Fax: 02-747-5639

E-mail: shdo@snu.ac.kr

수용체(nicotinic receptor)와 더불어 콜린성 수용체(cholinergic receptor)를 구성한다. 무스카린성 수용체는 중추 신경계 및 말초 내장 장기(peripheral visceral organ)에 주로 분포하며, 중추 신경계의 무스카린성 신호 전달 체계는 의식 수준을 조절하고¹⁾ 기억 및 학습능력에 영향을 미치며,²⁾ 척수부위에서 진통작용에도 관여하는³⁾ 등 마취와 밀접한 관계를 가지고 있다. 무스카린성 작용약제나 차단약제는 마취전투약

또는 심폐혈관계치료 등의 목적으로 마취 중 또는 마취전후에 종종 사용되고 있다.

무스카린성 수용체는 G단백질결합 수용체의 하나로, 1986년에 이르러 수용체가 클로닝(cloning)되기 시작하였다. 무스카린성 수용체에는 m1, m2, m3, m4, m5의 다섯 가지 아형(subtype)이 있으며, 홀수군인 m1, m3, m5는 활성화되면 세포내 칼슘 농도를 증가시켜 Ca-activated K channel을 활성화시키는 쪽으로 작용하며, 짝수군인 m2, m4는 활성화될 때 cAMP농도를 감소시키는 쪽으로 작용한다.⁴⁾ 홀수군의 무스카린성 수용체의 신호 전달 기전에 대해 설명하면 다음과 같다(Fig. 1). G단백질과 결합된 수용체에 작용제(agonist)가 결합되면 G단백질의 α -subunit에 의해 phospholipase C (PLC)가 활성화되고, 이 활성화된 PLC에 의해 phosphatidylinositolbisphosphate (PIP₂)로부터 inositoltrisphosphate (IP₃)와 diacylglycerol이 생성되며, IP₃는 세포내 저장고로부터 칼슘 이온을 방출시켜 세포내 증가된 Ca 이온은 Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel을 활성화시키고 Cl⁻ 이 방출되게 된다.⁵⁾

최근까지 이러한 무스카린성 신호전달체계에 관한 연구는 동물실험 등에서 심혈관계 반응 등을 보는 연구나 또는 세포 생물학적 연구에서도 생화학적 방법 등이 주를 이루어 왔다.⁶⁾ 그러나 마취제의 효과

에 관한 연구를 동물 실험으로 할 경우 마취제에 의해 세포의 여러 신호 전달 기전이 영향을 받음으로써 결과 해석에 제약을 받는 경우가 많았다. 하지만 *Xenopus* oocyte를 이용한 전기 생리학적 실험 방법은 각 수용체의 mRNA를 oocyte내로 주입하여 oocyte의 세포막에 특정 수용체를 발현시킴으로써 각 수용체에 대한 특이적인 반응을 얻을 수 있을 뿐 아니라 기타 조작이 간편하여 이 분야의 연구에 널리 이용되고 있다.

본 연구의 목표는 two electrode voltage clamp technique과 *Xenopus* oocyte expression system을 이용하여 halothane, enflurane, isoflurane 등의 흡입마취제가 m1 및 m3 수용체에 미치는 영향을 알아보고, 또한 m1 및 m3 수용체의 enflurane에 대한 농도-반응곡선을 구해봄으로써 흡입 마취제와 무스카린성 수용체간의 상호 작용에 대한 세포 생물학적 이해를 넓히려는데 있다.

대상 및 방법

Xenopus oocyte

개구리의 일종인 *Xenopus laevis*는 독립된 수조에 서 주당 2회씩 먹이를 공급받으며 관리되었다. Oocyte의 채취를 위해 0.2% 3-aminobenzoic ethyl ester (Sigma, USA)를 물 500 ml에 첨가한 후 실험 동물을 30분 정도 담근 후, 통증 자극에 반응이 없어지면, 얼음 위에 양위위로 눕혔다. 우측 또는 좌측 하복부에 0.5-1 cm의 절개를 가한 후 난소 조직의 일부를 채취하여 즉시 modified Barth's solution (NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, CaCl₂ 0.41, MgSO₄ 0.82, Ca(NO₃)₂ 0.3, gentamicin 0.1, HEPES 15, 이상 단위는 mM, pH는 7.6으로 맞추)에 넣은 다음, follicular layer를 제거한 후 OR-2 용액(NaCl 82.5, KCl 2, MgCl₂ 1, HEPES 5, collagenase type Ia 0.1%, 이상 단위 mM, pH는 7.5로 맞추)에 넣어 2시간 동안 약하게 흔들어 준 후에 다시 modified Barth's solution에 넣어 16°C에 보관하였다.

mRNA 제조 및 발현

본 연구에 사용된 rat m1, m3 cDNA는 Dr. T.I. Bonner (National Institutes of Mental Health, USA)가 기증한 것으로서 약 2.8 kilobasepair의 유전자로서

Fig. 1. A schematic representation of muscarinic signaling in *Xenopus* oocytes. The double line indicates the cell membrane. Acetyl β -methylcholine (agonist) activates an m1 or m3 muscarinic receptor. The signal is transduced through a G-protein to phospholipase C (PLC), which generates inositoltrisphosphate (IP₃) from phosphatidylinositolbisphosphate (PIP₂). Ca²⁺ released by IP₃ activates a Ca²⁺-dependent chloride channel in the membrane, resulting in Cl⁻ flux.

상업용 벡터(pGEM1: Promega, USA)에 포함되어 있었다. Nuclease Hind III로 처리한 후 bacteriophage RNA polymerase T7을 사용하여 mRNA를 추출하였다. 이것을 분광광도계(spectrophotometer)로 정량한 후 RNase free water로 희석한 후, 이렇게 만들어진 mRNA는 5 ng/30 nl의 농도로 미세주사기(microinjector; Drummond "Nanoject", Drummond Scientific Co., USA)를 이용하여 oocyte내로 주입되었으며, 주입시 세포 크기가 약간 증가하는 것을 현미경으로 관찰함으로써 주입이 적절히 되는 것을 확인하였다. 주입 후 oocyte는 사흘간 배양기(incubator) 내에서 배양한 후 실험에 이용되었다.

전기생리학적 측정

실험은 상온(22°C)에서 시행되었다. 하나의 oocyte를 recording chamber (약 0.5 ml volume)에 위치시킨 후 Tyrode's solution (NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1, Dextrose 10, HEPES 10, 이당 단위 mM, pH는 7.4로 맞추)으로 3 ml/min의 속도로 관류시켰다. 미세전극은 micropipette puller (model 700C; David Kopf Instruments, USA)을 이용하여 모세유리관(World Precision Instruments, USA)으로부터 만들어 사용하였다. 미세전극의 선단부는 직경이 약 10 μ m로서, 1-3 M Ω 의 저항을 나타내며 미세전극의 내부는 3 M KCl로 채워졌다. Voltage clamp amplifier (OC725-A; Warner Corporation, USA)는 IBM 컴퓨터에 연결되어 자료 획득 및 분석 소프트웨어로 처리되었다. 모든 측정은 -70 mV의 지지전압(holding potential) 하에서 이루어졌으며, 1 μ A 미만의 안정적인 지지전류(holding current)를 보이지 않는 oocyte (전체의 5% 미만)는 대상에서 제외하였다. Ca²⁺-activated Cl⁻ current (I_{Cl(Ca)})를 125 Hz의 빈도로 작용제(acetyl β -methylcholine; Mch) 투여시작 5초 전부터 1분간 측정하였으며, Mch는 각 수용체의 적정 EC₅₀ 농도로 투여하였다. 각각의 반응은 최대전류치를 μ A단위로 측정하였으며, 매 실험마다 최소한 두 마리의 실험동물에서 추출한 oocyte를 사용하여 실험을 수행하였다.

약제투여

Mch는 Tyrode's solution으로 희석하여 사용하였으며, oocyte에 3 ml/min의 속도로 20초간 관류시켰다. 흡입마취제의 투여는 기화기에 연결된 튜브를 Tyro-

de's solution이 들어있는 용기에 집어넣은 후 의료용 공기(500 ml/min)를 기화기에 통과시켜 기포를 만들어 투여하였으며, 용액과 마취제가 평형상태에 도달하도록 최소 10분간 기다린 후 실험에 임하였다. 분자 생물학 시약은 Promega (USA)에서, 기타약제는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Halothane은 Halocarbon laboratory (River Edge, USA)에서, enflurane과 isoflurane은 Ohmeda (USA)에서 구입하였다.

통계분석

모든 결과는 mean $\pm$ SE으로 표시하였으며, 흡입마취제의 영향은 *t-test*를 이용하여 분석하였다. P값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Xenopus oocyte에서 m1 및 m3 수용체의 발현

mRNA를 주입하지 않은 oocyte에서는 Mch 투여시 아무런 반응을 보이지 않았으나(결과 제시하지 않음), m1 또는 m3 mRNA를 주입한 oocyte는 Mch (10^{-6} - 10^{-9} M) 투여 시 용량에 비례하는 전류변화를 나타내었다(Fig. 2). Hill equation을 이용하여 EC₅₀를 구한 결과, m1 수용체의 경우 170 nM이었고, m3 수용체의 경우 16 nM이었다. 따라서, m1 수용체의 작용제로는 200 nM의 Mch를, m3 수용체의 작용제로는 20 nM의 Mch를 각각 사용하였다.

흡입마취제가 m1 및 m3 무스카린성 신호전달에 미치는 영향

Halothane을 2 MAC (minimum alveolar concentration) 농도로 2분간 관류시킨 결과 m1 수용체의 경우 $0.49 \pm 0.17 \mu$ A에서 $0.1 \pm 0.05 \mu$ A로 I_{Cl(Ca)}가 유의하게 감소하였으며(P < 0.05, n = 10), m3 수용체의 경우에도 $0.74 \pm 0.2 \mu$ A에서 $0.23 \pm 0.06 \mu$ A로 현저히 감소하였다(Fig. 3, P < 0.05, n = 10). Enflurane도 halothane에서와 마찬가지로 m1 ($0.49 \pm 0.1 \mu$ A에서 $0.15 \pm 0.04 \mu$ A로 감소, P < 0.05, n = 12) 및 m3 수용체($0.95 \pm 0.34 \mu$ A에서 $0.19 \pm 0.05 \mu$ A로 감소, P < 0.05, n = 11)에서 유의한 억제 효과를 보였다(Fig. 3). 하지만, isoflurane의 경우 m3 수용체에서는 $0.82 \pm 0.19 \mu$ A에서 $0.3 \pm 0.09 \mu$ A

Fig. 2. Concentration-Response curve of m1 and m3 signaling. Oocytes injected with m1 or m3 receptor mRNA responded to application of acetyl β -methylcholine (MCh; 10^{-6} – 10^{-9} M) in a concentration-dependent manner. EC_{50} values calculated from Hill equation were 170 nM for m1 and 16 nM for m3 signaling. Hill equation is as follows: $y = y_{min} + (y_{max} - y_{min}) \{ 1 - x^n / (x^n + x_{50}^n) \}$, where y_{max} and y_{min} are the maximum and minimum obtained response, n is the Hill coefficient, and x_{50} is the EC_{50} . 200 nM MCh for agonist to m1 receptor and 20 nM for agonist to m3 receptor were used throughout the experiments. Data are mean $\pm$ SE. $n = 5-9$ for each response. $I_{Cl(Ca)}$; Ca^{2+} -activated Cl^- current.

Fig. 3. Effects of volatile anesthetics on m1 and m3 receptor functioning. m3 Receptor was depressed after exposure to 2 MAC of halothane, enflurane or isoflurane for 2 min. However, m1 receptor was not depressed by isoflurane, while it was also depressed by halothane or enflurane. Data are mean $\pm$ SE. $n = 10-12$ for each response. *, $P < 0.05$ compared with control. $I_{Cl(Ca)}$; Ca^{2+} -activated Cl^- current.

로 $I_{Cl(Ca)}$ 의 유의한 감소를 보였지만($P < 0.05$, $n = 12$), m1 수용체에서는 별다른 억제 효과를 나타내지 못했다(Fig. 3, 0.29 ± 0.05 vs $0.23 \pm 0.09 \mu A$, $P = 0.567$, $n = 10$). Enflurane이 m1 및 m3 수용체에 나타내는 농도-반응 곡선은 Fig. 4와 같다. m1 수용체의 경우 0 MAC에서 $0.46 \pm 0.07 \mu A$ 를 나타냈으나 enflurane의 농도가 증가함에 따라 $I_{Cl(Ca)}$ 가 점차 감소하여 2 MAC에서는 $0.18 \pm 0.14 \mu A$ 의 수치를 보였다. m3 수용체의 경우도 마찬가지로 0 MAC에서

$0.69 \pm 0.13 \mu A$ 를 보였으나 2 MAC에서 $0.23 \pm 0.06 \mu A$ 로서 enflurane의 농도 증가에 따라 $I_{Cl(Ca)}$ 값이 점차로 감소하는 것을 볼 수 있었다.

고 찰

본 연구 결과 halothane과 enflurane은 모두 m1 및 m3 수용체의 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 이것은 halothane의 경우 기존의 연구 결과와 부합되

Fig. 4. Concentration-response curve of enflurane on m1 and m3 receptor functioning. Both m1 and m3 receptors showed concentration-dependent decrease in the currents. Data are mean $\pm$ SE. $n = 12$ for each response. $I_{Cl(Ca)}$; Ca^{2+} -activated Cl^- current.

며,^{7,8)} enflurane의 경우 m1 뿐만 아니라 m3 수용체에 대해서도 억제 작용을 나타낸다는 새로운 연구 결과를 얻을 수 있었다.⁹⁾ Isoflurane의 경우 m1 수용체에는 억제작용이 없이 m3 수용체에만 억제를 나타내는 결과를 보였는데 이것 역시 기존의 연구 결과와 부합된다.⁸⁾ 또한 농도-반응 곡선을 보면 enflurane이 m1 및 m3 수용체에 농도에 비례하는 억제작용을 나타냈으며, 이는 halothane (m1, m3 수용체)과 isoflurane (m3 수용체)이 나타내는 억제 작용과 같은 양상이었다. 기타 흡입 마취제가 무스카린성 수용체에 미치는 영향에 대해서도 연구가 되어 있는데, Nietgen 등에⁸⁾ 의하면 desflurane은 m1 수용체에 대해 이상성 효과(biphasic effect)를 나타내어 1 MAC에서는 항진작용을, 2 MAC에서는 억제작용을 나타낸다고 하였으며, 또한 sevoflurane은 m1 및 m3 수용체의 기능을 억제한다고 발표하였다. 이와같이 각 흡입마취제가 m1 및 m3 수용체에 미치는 영향이 각기 다른 점을 고려할 때 흡입마취제가 무스카린성 수용체에 미치는 영향은 마취작용 자체의 발현이라기 보다는 부작용의 발현과 상관이 있지 않나 하는 시사점을 던져주고 있다.

본 연구에서 사용된 *Xenopus* oocyte를 이용한 전기 생리학적 실험 방법은 Gurdon 등에¹⁰⁾ 의해 처음으로 도입된 이래 진핵세포의 여러 구조 및 기능을 연구하는 실험 방법으로서 널리 이용되고 있다. 특히 *Xenopus* oocyte는 외부로부터 주입된 mRNA를 확실하고 효율적으로 발현시킴으로써 신경 전달 물질 수

용체(neurotransmitter receptor)나 전위작동 이온통로(voltage-gated ion channel)에 대한 생체내(in vivo) 실험모델로서 그 중요성을 인정받고 있다.¹¹⁾ 또한 *Xenopus* oocyte의 크기가 직경이 1 mm 전후에 달할 정도로 커서 유전자 주입이나 미세전극 거치 등의 조작이 용이한 점도 이 방법의 확산에 일조를 하였다.

무스카린성 신호 전달 체계는 작용제의 수용체에의 결합으로부터 마지막 단계인 세포내로의 칼슘 이온의 방출에 이르기까지 여러 단계의 경로를 거치게 되는데 이중 흡입 마취제의 작용 부위와 작용 기전에 대해서는 많은 연구가 있어 왔다. Durieux는⁷⁾ 무스카린성 수용체와 동일한 세포내 경로를 가지고 있는 angiotensin II 수용체의 경우 halothane에 의해 전혀 억제되지 않는 것으로 보아 수용체나 또는 G단백질의 단계에서 흡입 마취제가 작용할 것으로 추정하였다. 최근 들어 흡입 마취제가 각종 수용체에 미치는 억제 작용이 protein kinase C (PKC)와 연관이 있으리라는 연구 결과가 다수 발표되고 있다. Minami 등은^{12,13)} 에타놀과 흡입 마취제가 serotonin 및 glutamate 수용체에 억제 작용을 나타내며, 이것이 PKC 항진 작용과 관계가 있다고 발표하였으며, Sanna 등은¹⁴⁾ 에타놀이 m1 수용체에 미치는 억제 작용이 PKC 항진 작용에 의한 것이라고 발표하였으며, 최근에 Minami 등은¹⁵⁾ halothane이 m1 수용체에 미치는 억제작용이 PKC 항진작용에 의한 것이라고 발표하였다. PKC는 m1 및 m3 수용체의 자극시 생산되는 최종 산물인 칼슘 이온과 diacylglycerol에 의해

활성화되는데 이것은 수용체의 인산화를 초래하고 이는 작용제에 대한 탈감작(desensitization)을 초래하여 결국 PKC에 의한 인산화는 수용체 기능의 음성 되먹이기(negative feedback)기전으로 이해되고 있다. 흡입 마취제의 무스카린성 수용체에 대한 정확한 작용 기전 및 작용 부위에 대해서는 앞으로 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 *Xenopus* oocyte를 이용한 전기생리학 적 방법으로 흡입마취제가 무스카린성 수용체에 미치는 영향을 알아본 결과, halothane과 enflurane은 m1 및 m3 무스카린성 수용체를 억제하며, isoflurane은 m3 수용체만을 억제하고 m1 수용체에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Jones BE: The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. *Prog Brain Res* 1993; 98: 61-71.
2. Fibiger HC, Damsma G, Day JC: Behavioral pharmacology and biochemistry of central cholinergic neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 1991; 295: 399-414.
3. Yaksh TL, Dirksen R, Harty GC: Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur J Pharmacol* 1985; 117: 81-8.
4. Durieux ME: Muscarinic signaling in the central nervous system. Recent developments and anesthetic implications. *Anesthesiology* 1996; 84: 173-89.
5. Yost CS: G proteins: basic characteristics and clinical potential for the practice of anesthesia. *Anesth Analg* 1993; 77: 822-34.
6. Aronstam RS, Dennison RLJ: Anesthetic effects on muscarinic signal transduction. *Int Anesthesiol Clin* 1989; 27: 265-72.
7. Durieux ME: Halothane inhibits signaling through m1 muscarinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology* 1995; 82: 174-82.
8. Nietgen GW, Honemann CW, Chan CK, Kamatchi GL, Durieux ME: Volatile anesthetics have differential effects on recombinant m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptor function. *Br J Anaesth* 1998; 81: 569-77.
9. Lin LH, Leonard S, Harris RA: Enflurane inhibits the function of mouse and human brain phosphatidylinositol-linked acetylcholine and serotonin receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 941-8.
10. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G: Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 1971; 233: 177-82.
11. Snutch TP: The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci* 1988; 11: 250-6.
12. Minami K, Minami M, Harris RA: Inhibition of 5-hydroxytryptamine type 2A receptor-induced currents by n-alcohols and anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 1136-43.
13. Minami K, Gereau RW, Minami M, Heinemann SF, Harris RA: Effects of ethanol and anesthetics on type 1 and 5 metabotropic glutamate receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 148-56.
14. Sanna E, Dildy-Mayfield JE, Harris RA: Ethanol inhibits the function of 5-hydroxytryptamine type 1c and muscarinic m1 G protein-linked receptors in *Xenopus* oocytes expressing brain mRNA: role of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 1004-12.
15. Minami K, Vanderah TW, Minami M, Harris RA: Inhibitory effects of anaesthetics and ethanol on muscarinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 1997; 339: 237-44.