

## GABA수용체가 흰쥐 적출부신에서 카테콜아민 분비작용에 미치는 영향\*

조선대학교 의과대학 내과학교실\*\* 및 약리학교실

홍순표\*\* · 임동윤 · 오진희 · 최철희 · 유호진 · 이재준  
허재봉 · 장 영 · 김진호 · 강정원

= Abstract =

### Influence of GABAergic Receptors on Catecholamine Secretion in the Isolated Rat Adrenal Glands

Soon-Pyo Hong, M.D.,\*\* Dong-Yoon Lim, M.D., Jin-Hee Oh, M.D.,  
Cheol-Hee Choi, M.D., Ho-Jin Yoo, M.D., Jae-Joon Lee, M.D.,  
Jae-Bong Heo, M.D., Young Jang, M.D.,  
Jin-Ho Kim, M.D., Jeong-Won Kang, M.D.

Department of \*\*Internal Medicine and Pharmacology, College of Medicine,  
Chosun University, Kwang Joo, Korea

**Background** : The influence of gamma-aminobutyric acid (GABA), which is well-known as a major inhibitory neurotransmitter in central nervous system, on secretion of catecholamines (CA) was investigated in the isolated perfused rat adrenal gland.

**Method** : Mature male Sprague-Dawley rats were anesthetized with ether. The adrenal gland was isolated by the methods of Wakade. A cannula used for perfusion of the adrenal gland was inserted into the distal end of the renal vein. The adrenal gland, along with ligated blood vessels and the cannula, was carefully removed from the animal and placed on a platform of a leucite chamber.

**Results** : GABA given into an adrenal vein of the rat produced markedly secretion of CA from the adrenal gland. Tachyphylaxis to the releasing effect of CA evoked by GABA was observed. The secretory effect of CA evoked by GABA was attenuated significantly by pretreatment with mecamylamine or atropine. Ouabain inhibited greatly the secretory response of GABA. When omitting the external potassium ion, the basal release of CA was increased. During this period GABA no longer revealed the increase in CA release. CA secretion evoked by GABA was blocked significantly by perfusion of calcium-free Krebs solution containing 5mM-EGTA for 30min. Pretreatment with bicuculline or picrotoxin inhibited CA secretion evoked by GABA as well as ACh. ACh-evoked CA release was potentiated by GABA infusion (400ug/30min).

\*본 논문은 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원에 의해서 이루어졌음.

**Conclusion :** These experimental findings suggest that GABA causes the secretory effect of CA in a fashion of external calcium and potassium ions-dependence, and that this releasing effect of CA induced by GABA may be exerted by stimulation of GABAergic A-receptors located on adrenomedullary chromaffine cell, which is likely associated with cholinergic receptor activation evoked CA secretion.

**KEY WORDS :** GABAergic A-receptors · Catecholamine Secretion · Adrenal Gland.

## 서 론

Gamma-aminobutyric acid는 glutamate로부터 glutamate decarboxylase의 작용을 받아 형성되어지며, 일반적으로 포유동물의 중추신경계에서 고농도로 존재하며 대부분이 신경전달물질로서 작용하는데 거의 모든 경우에  $Cl^-$  이온에 대한 pre-post-synaptic memberane에서 투과성을 증가시켜 과분극 또 탈분극을 일으킴으로써 억제적으로 작용한다<sup>1,2)</sup>. 척추에서는 pre-synaptic inhibition를 매개할 수 도 있으며 포유동물의 자율신경절에서 탈분극과 관계된 전달을 억제하는 것으로 나타났다<sup>3)</sup>.

일반적으로, 부신수질의 크롬친화세포는 CA의 합성, 저장, 분비에 특수한 작용을 나타낸다. 이와같은 과정은 크롬친화 세포막에 존재하고 있는 니코틴 수용체에 의하여 조절되며, 내장신경의 콜린신경 축삭에 의해 지배를 받고 있다<sup>4)</sup>. 그러나 최근에는 부신수질의 기능에 대한 신경조절 작용에 대해서 포유 동물의 자율 신경절에서 탈분극과 관련된 신경전달을 억제한다고 알려져 있다<sup>5,6)</sup>.

Sangiah등<sup>6)</sup>은 GABA가 소의 적출관류부신에서 CA 유리를 일으킨다고 하였으나 분비기전에 대한 약리작용에 대해서는 알려진바가 없다. Kitayama등<sup>7)</sup>은 GABA가 적출관류 부신에서 수용체와 결합하여 칼슘 의존성으로 CA 유리를 일으키며, 세포의  $Na^+$ 이나  $Cl^-$  에는 영향을 받지 않는다고 하였다. 또한 소의 배양 크롬친화세포에서 GABA가 CA 유리와 함께  $^{45}Ca$  uptake를 증가시키며, voltage-sensitive  $Ca^{++}$  channel을 통해서 작용한다고 하였다<sup>9)</sup>. 더우기 최근에는 CA 유리를 일으키며, ACh, 고농도의  $K^+$ , veratridine에 의한 CA 유리 작용을 증강시킨다고 하였다<sup>9)</sup>. GABA의 CA 분비 작용에 대한 반응금강 현상은 소<sup>6)</sup>의 경우에서 관찰되었으나 개<sup>7)</sup>의 경우는 나

타나지 않는다고 하였다.

지금까지 부신수질에서 CA 유리 작용에 대한 GABA의 영향에 대해서는 개의 적출부신<sup>7)</sup>, 소의 부신<sup>6)</sup>, 소의 배양 부신 크롬친화세포<sup>9)</sup>를 제외하고 별로 알려진 바가 없으며, 특히 쥐의 부신에서 GABA의 영향은 알려진바가 없다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐 적출관류 부신을 이용하여 GABA가 CA 분비작용에 미치는 영향을 관찰하고 그 작용기전을 규명코자 본 실험을 시행하였다.

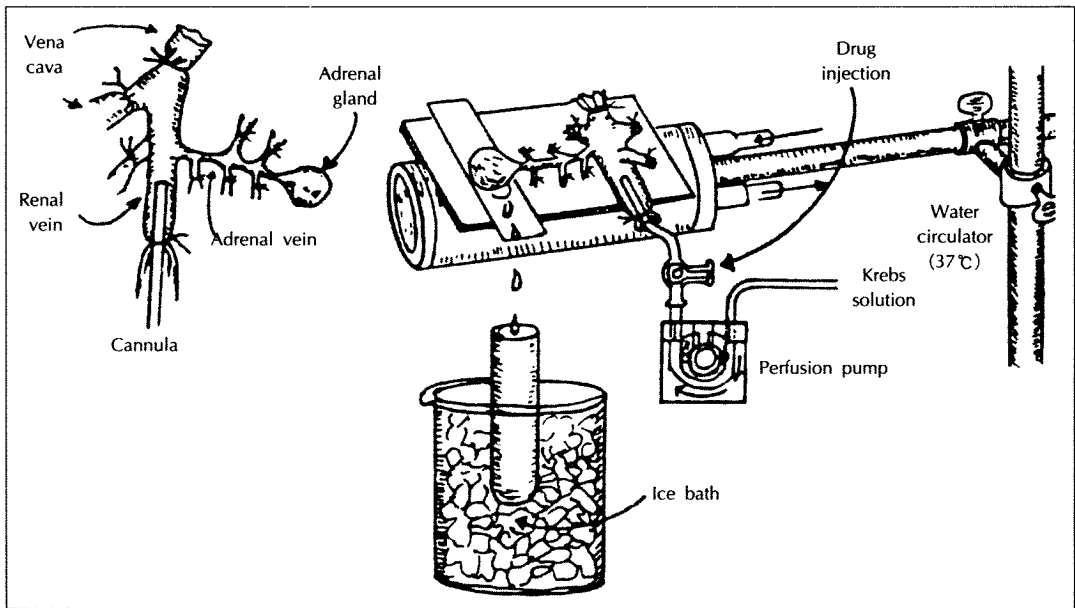
## 실험재료 및 방법

### 1. 부신적출방법

실험동물로는 체중 200~300g의 Sprague-Dawley종의 웅성 성숙 흰쥐를 사용하였다. 부신의 적출은 Wakade방법<sup>12)</sup>에 따라서 먼저 흰쥐를 ether로 마취한 다음 동물고정대에 배위로 고정후 복부를 정중선을 따라 절개하고 적출을 용이하도록 three-hook retractor로 고정하여 부신 및 주위 장기를 노출시킨 다음 혈액의 응고를 방지하기 위해서 신정맥 직하부 하대정맥에서 heparin (400 I.U./ml)을 주입하였다. 혈관 결찰과 cannulation을 위하여 위, 장관, 간을 제거하지 않고 우측으로 체쳐둔 다음 생리식염수 거즈를 덮어두고, 방광안의 요를 제거하였다. 다음은 부신주위의 모든 혈관을 결찰한후 신정맥에 가는 polyethylene tube(19G)를 삽입 고정하여 관류시에 이용하였다. 부신정맥 입구 반대측의 부신피질 부위에 작은 slit를 만든 후 즉시 관류를 시작하여 slit 이외의 부위로부터 유출 유무를 확인하고 혈관 및 cannula를 따라서 조심스럽게 적출 분리하여 leucite chamber상에 고정하여 Krebs액의 관류를 시작하였다(Fig. 1).

### 2. 적출부신의 관류

적출한 부신은 0.4ml/min의 속도로 ISCO사(U.S.A.)의 peristaltic pump를 이용하여 관류를 시행하였다. 관



**Fig. 1.** Schematic drawing of the preparation used to study secretion of catecholamines(CA) in the isolated perfused adrenal gland of the rat.

류액으로는 Krebs-bicarbonate 용액을 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다(mM). : NaCl, 118.4 ; KCl, 4.7 ;  $\text{CaCl}_2$ , 2.5 ;  $\text{MgCl}_2$ , 1.18 ;  $\text{NaHCO}_3$ , 25 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 ; glucose 11.7. 최종 pH는 7.4~7.5가 되도록 조절하였고, 95%  $\text{O}_2$ 와 5%  $\text{CO}_2$ 의 혼합가스를 공급하면서 관류를 시행하였으며 이때 관류액의 온도는  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절하였다. 또한 CA의 산화 방지를 위하여 disodium EDTA(10ug/ml) 및 Ascorbic acid(100ug/ml)를 관류액에 첨가 하였다.

### 3. 약물의 투여

약물의 투여는 three-way stopcock를 통해서 관류액 내로 주입하였으며 ACh(50ug) 및 GABA(40ug)를 투여시는 각 0.05ml 용량으로 주사하였다. 다른 약물의 전처리 시에는 Krebs액에 용해하여 관류시켜 투여하였다. 예비실험을 통해서 ACh 및 GABA투여에 의한 CA 분비효과는 대략 4분내에 투여전 상태로 복귀됨을 확인하였으며, 따라서 모든 부신의 perfusate는 약물투여후 4분동안 채집하였다. ACh 및 GABA의 투여는 실험조작 완료한 후 약 60분동안 Krebs액으로 관류시킨 다음 시행하였다. 부신 perfusate는 CA의 산화 및 분해를 최소화 하기 위하여 ice bath상에서 채집하였다.

### 4. Catecholamine의 측정

CA의 측정은 Anton 및 Sayre<sup>13)</sup>의 방법에 따라서 alumina 상에서 중간 정제를 거치지 않고 Shimadzu사(JAPAN)의 fluorospectrophotometer를 이용하여 직접 측정하였다. 채취한 시료중 0.2ml를 측정에 사용하였으며, 여러 약물로 자극한 부신에서 perfusate중 CA 함량은 대조치(background)보다 수배 이상 높았다. 시료중의 CA함량은 기저 농도의 표준 norepinephrine(base로 환산)으로 얻은 값과 비교 계산후 총량으로 표시하였다. DATA처리는 Student's t-test를 시행하였으며, Tal-larida 및 Murray<sup>14)</sup>의 computer program을 이용하여 검정하였다.

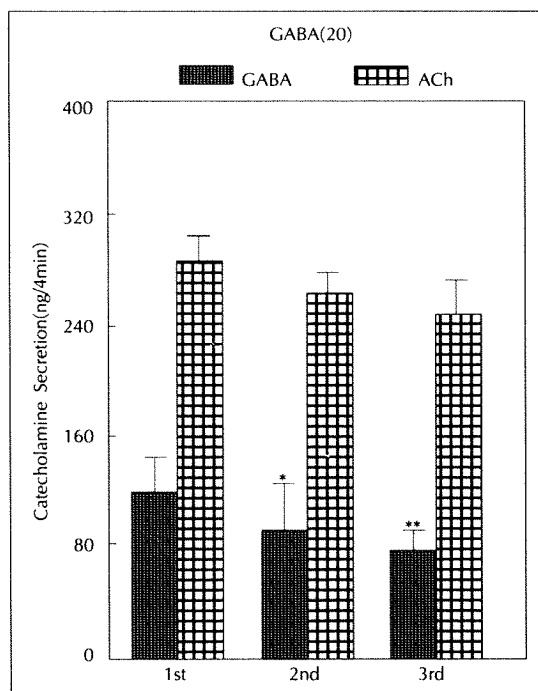
### 5. 사용약물

본 연구에 사용한 약물로는 gamma-aminobutyric acid, acetylcholine chloride, ouabain octahydrate, mecamlamine chloride, norepinephrine bitartrate, bicuculline methiodide, EGTA(이상 Sigma Co., U.S.A.), atropine sulfate(Merk Co., U.S.A.), picrotoxin(Kishida Chemical Co., Japan)등이며, 모든 약물은 증류수로 Stock액을 제조한 다음 Krebs액에 희석하여 본실험에 사용하였다.

## 실험성적

### 1. GABA의 흰쥐 적출부신에서 CA분비작용에 대한 영향

적출부신은 Krebs액으로 1시간동안 관류한 후 Ach (5ug)을 관류액내로 주입한 다음 부신의 slit를 통해 나온 관류액을 ice bath상에서 chilled tube에 4분동안 채취한 CA함량을 측정된 결과 20예의 부신에서  $284.2 \pm 21.5$  ng/4min을 나타냈으며 다시 동일부신에 동일용량 (50ug)의 ACh을 60분 간격으로 반복 투여시 4분동안 CA 분비량은 각각  $268.3 \pm 18.2$  ng(2nd),  $255.7 \pm 26.1$  ng(3rd)으로 나타났으며, 이는 최초 투여한 ACh에 의한 CA 분비량에 비해 각각 94%와 90%로 큰 차이를 볼



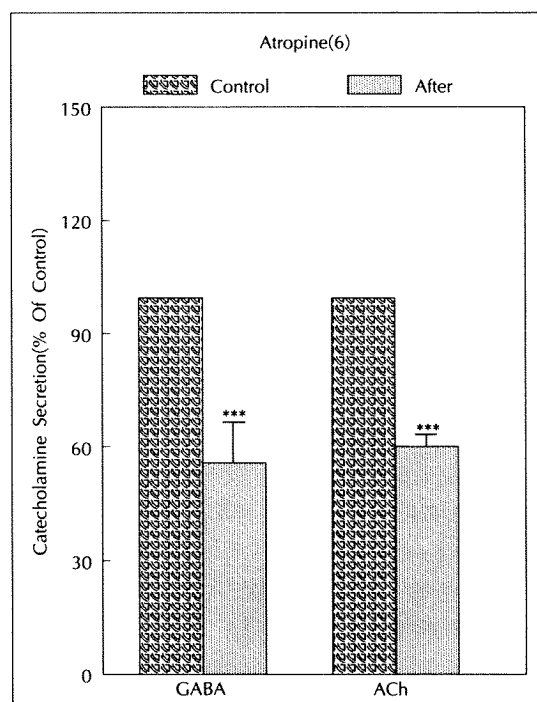
**Fig. 2** The effect of repetitive administration of GABA on CA secretion in the perfused rat adrenal gland. GABA(400ug) and ACh(50ug) were injected into an adrenal vein at the one hour interval about 60min after the beginning of perfusion with Krebs solution. These results were obtained from 20 rat adrenal glands. Abscissa : dosage of ACh or GABA in ug. Ordinate : secretion of catecholamines in ng for 4min. The vertical bars denote the standard error of the corresponding mean, ACh : acetylcholine, GABA : gamma-aminobutyric acid. Number in the upper bracket indicates the number of animals used in the experiments. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.001$

수 없었다(Fig. 2). 그러나 GABA(400ug)의 경우는 60분 간격으로 3회 반복 투여 하였을때 4분 동안 CA 분비량은 GABA(400ug)의 경우는 60분 간격으로 3회 반복 투여 하였을때 4분 동안 CA 분비량은  $119.7 \pm 25.7$  ng(1st),  $88.5 \pm 28.0$  ng(2nd),  $70.9 \pm 16.7$  ng(3rd)을 나타냈으며, 2회, 3회의 CA 분비량은 최초 1회에 비교하여 각각 74% ( $p < 0.05$ )와 59% ( $p < 0.001$ )로 현저하게 감소하였다 (Fig. 2). 본 실험에서 CA 기초 분비량(background)은  $23.5 \pm 3.1$  ng/4min이었다.

이와 같은 연구 결과는 소의 부신<sup>6</sup>에서 보고된 바와같이 GABA에 의한 CA분비 작용에 대한 반응급강 현상이 나타남을 관찰하였다. 따라서 본연구에서 GABA는 반응 급강 현상유발로 인하여 2회이상 투여하지 않았다.

### 2. GABA의 CA 분비작용에 대한 atropine 및 Mecamylamine의 영향

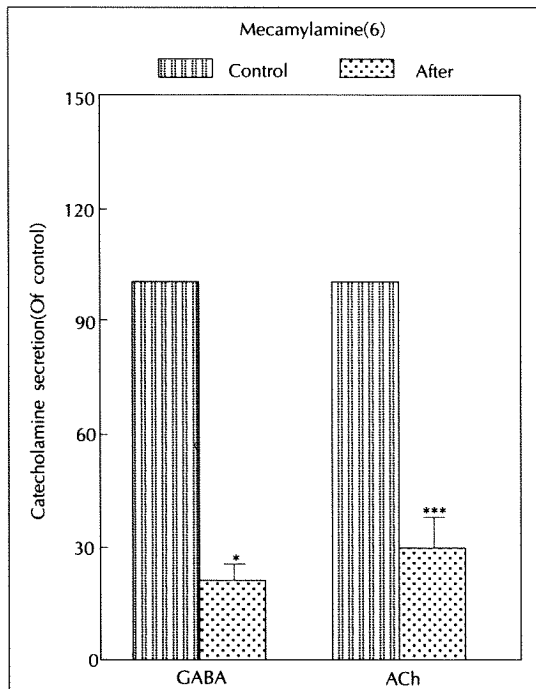
전술한 바와같이 흰쥐 부신에서 GABA가 현저한 CA 분비 작용을 나타냄을 관찰하였다. 따라서 GABA의 CA



**Fig. 3.** The effect of atropine on the CA secretion evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. CA secretion was produced 30min after perfusion with Krebs solution containing 0.015uM-atropine. The results are obtained after comparing each value with its corresponding control. Other legends are the same as in Fig. 2. \*\*\* :  $p < 0.001$ .

분비작용이 어떠한 기전을 통해 나타나는가를 확인하기 위해 cholinergic muscarine 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine(0.015 $\mu$ m)을 30분간 관류시킨 다음 ACh(50 $\mu$ g)과 GABA(400 $\mu$ g)을 각각 투여하였을때 6예의 흰 쥐 부신에서 ACh의 경우 CA분비량은 atropine 처치전 대조치(100%)와 비교할때  $59.1 \pm 4.7\%$  ( $p < 0.001$ )로 현저한 감소현상을 나타내었으며 GABA 역시 대조치와 비교시  $55.4 \pm 12.2\%$  ( $p < 0.001$ )로 ACh의 경우와 유사한 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

자율신경절 차단제로써 즉, neuronal nicotinic receptor를 선택적으로 차단하는 약물로 알려진 mecamylamine이 GABA로 인한 CA분비작용에 미치는 영향을 파악하고자 0.59mM-mecamylamine을 Krebs액에 포함시켜 30분간 관류시킨 다음 ACh(50 $\mu$ g)와 GABA(400 $\mu$ g)을 투여했을때 6예의 부신에서 각각의 분비량은 대조치(100%)의  $29.1 \pm 8.6\%$  ( $p < 0.001$ ),  $19.9 \pm 5.1\%$  ( $p < 0.05$ )로 현저한 억제현상을 볼 수 있었다(Fig. 4).



**Fig. 4.** The effect of mecamylamine on the secretion of CA evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. Secretion of CA was produced 30min after perfusion with Krebs solution containing 0.59mM-mecamylamine. Other legends are the same as in Fig. 2. and 3. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ .

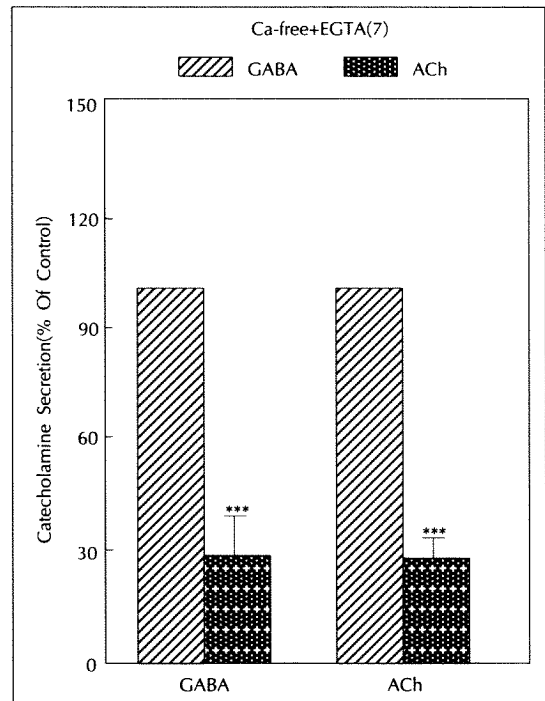
### 3. GABA의 CA 분비작용에 대한 $Ca^{++}$ -free + EGTA관류의 영향

크롬친화성 세포가 CA를 분비하는 과정에서 필수적인  $Ca^{++}$ 과의 관계를 검색하기위해 5mM EGTA를 함유한  $Ca^{++}$ -free Krebs액을 30분간 부신편맥을 통해 관류한후 ACh(50 $\mu$ g)을 주입할때 CA 분비량은 7예의 부신에서 처치전 대조치(100%)의  $27.7 \pm 5.9\%$  ( $p < 0.001$ )로 뚜렷한 감소현상을 보였으며 GABA(400 $\mu$ g)을 주입한 경우에는 처치전 대조치의  $28.6 \pm 10.7\%$  ( $p < 0.01$ )로 역시 유의있는 감소반응을 볼 수 있었다(Fig. 5).

### 4. GABA의 CA 분비에 대한 ouabain의 영향

Cardiac glycosides가 관류부신<sup>12,15-18)</sup> 및 적출 부신 크롬친화세포<sup>19,22)</sup>에서 CA 분비를 일으킨다고 보고 되어 있다.

따라서 0.5 $\mu$ M-ouabain을 Krebs액에 포함시켜 30분 동안 관류시킨 다음 ACh(50 $\mu$ g)와 GABA(400 $\mu$ g)를 투여하였을 때 CA 분비량은 대조치를 100%로 하였을때



**Fig. 5.** The effect of  $Ca^{++}$ -free Krebs solution plus EGTA on the secretion of CA evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. Secretion of CA was induced 30min following perfusion of adrenal gland with  $Ca^{++}$ -free Krebs solution containing 5mM EGTA. Other legends are the same as in Fig. 2. and 3. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

7예의 실험에서 각각  $120.7 \pm 6.9$  ( $p < 0.05$ ),  $120.1 \pm 10.3\%$  ( $p < 0.05$ )로 나타나 통계학적으로 유의성 있게 증가됨을 볼 수 있었다(Fig. 6).

##### 5. GABA의 CA 분비 작용에 대한 K<sup>+</sup>-free의 영향

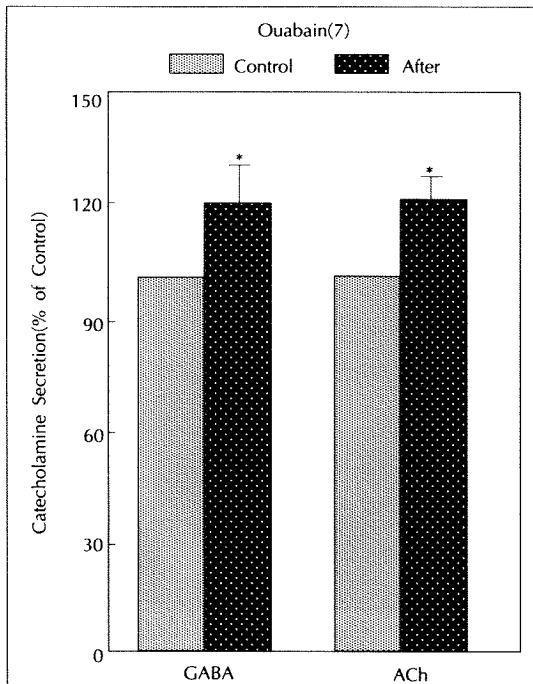
크롬친화성 세포막을 직접적으로 세분극시킴으로써 CA분비작용을 나타내는 K<sup>+</sup>에 대한 GABA의 영향을 관찰하기 위해 KCl을 제거한 Krebs 액으로 30분간 적출부신을 관류한 후 6예의 부신에서 ACh(50ug)을 투여시 CA 분비량은 대조치의  $24.2 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 감소되었으며 GABA(400ug)로 인한 CA분비 역시 대조치의  $33.9 \pm 11.7\%$  ( $p < 0.001$ )로 감소되었다. 그리고 이 실험결과 자발적인 CA 분비가 크게 증가하였으며 GABA는 이 분비를 억제함을 관찰할수 있었다(Fig. 7).

##### 6. GABA의 CA분비작용에 대한 Bicuculline 및 Picrotoxin의 영향

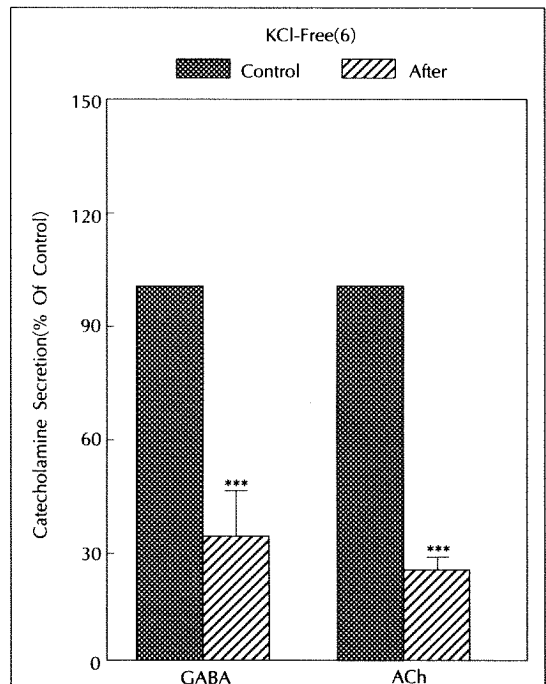
Bicuculline은 GABA A-receptor의 선택적인 길항제<sup>9</sup>로 알려져 있으며 소의관류부신<sup>7</sup>과 배양크롬 친화세포

<sup>10-11)</sup>에서 GABA의 CA 유리작용을 차단하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서 bicuculline( $10^{-6}$ M)을 30분 관류한 다음 GABA(400ug)을 투여하였을때 8예의 실험에서 대조치(100%)에 비하여  $23.6 \pm 5.9\%$  ( $p < 0.001$ )로 현저히 감약되었다(Fig. 8). 더우기 ACh(50ug)에 의한 CA분비도 bicuculline 전처치후에 대조치에(100%)에 비하여  $12.8 \pm 2.0\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n=8$ )로 뚜렷이 억제됨을 볼수 있었다(Fig. 8).

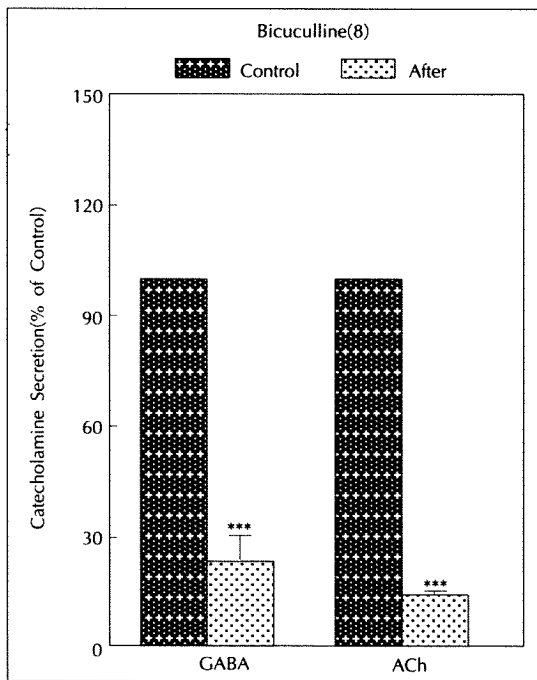
Picrotoxin은 chloride conductance에 대한 GABA 효과를 억제 함으로써 GABA의 기능을 방해하는 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. 따라서 본 연구에서는 GABA의 CA 분비 작용에 대한 picrotoxin의 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐 부신 12예에서 picrotoxin( $3 \times 10^{-6}$ M)으로 30분간 전처치하였다. picrotoxin 전처치후에 GABA(400ug)에 대한 CA 분비량은 대조치(100%)에 비하여  $17.7 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.001$ )로 억제 되었으며 또한 ACh(50ug)에 의한 CA 유리량도 대조치의  $21.6 \pm 3.9\%$  ( $p < 0.001$ )로 현저히 차단됨을 관찰하였다. Fig. 9는 ACh과 GABA에 의한 CA 분



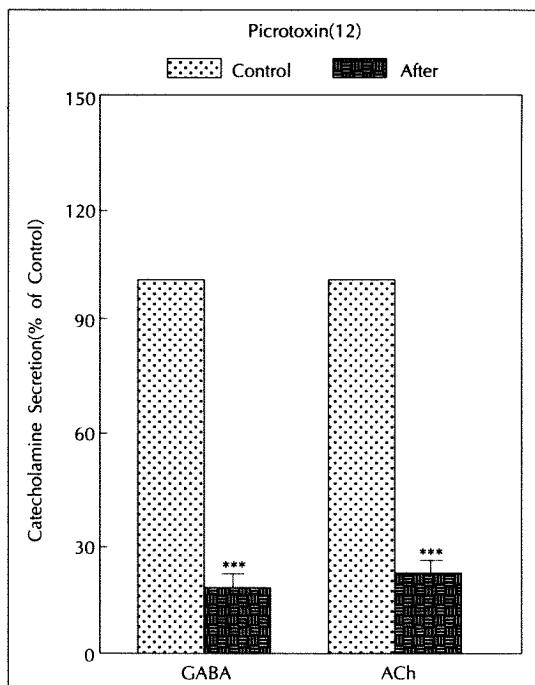
**Fig. 6.** The effect of ouabain on the secretion of CA evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. Secetion of CA was produced 30min after perfusion with Krebs solution containing 0.5mM-ouabain. Other legends are the same as in Fig. 2. and 3. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 7.** The effect of KCl-free Krebs on the secretion of CA evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. ecretion of CA was produced 30min after perfusion with KCl-free Krebs solution. Other legends are the same as in Fig. 2. and 3. \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Fig. 8.** The effect of bicuculline on the secretion of CA evoked by ACh and GABA in the isolated rat adrenal gland, CA secretion was produced 30min after perfusion with Krebs solution containing with 10uM-bicuculline. Other method and legends are the same as in Fig. 2. and 3. \*\* :  $p < 0.001$ .



**Fig. 9.** The effect of picrotoxin on secretion of CA evoked by ACh and GABA in the perfused rat adrenal gland. CA secretion was induced 30min after perfusion with Krebs solution containing  $3 \times 10^{-6}$ M-picrotoxin. Other legends and the methods are the same as in Fig. 2. and 3. \*\*\* :  $p < 0.001$ .

비가 picrotoxin으로 뚜렷이 억제됨을 보여준다.

### 7. ACh의 CA 분비 작용에 대한 GABA의 영향

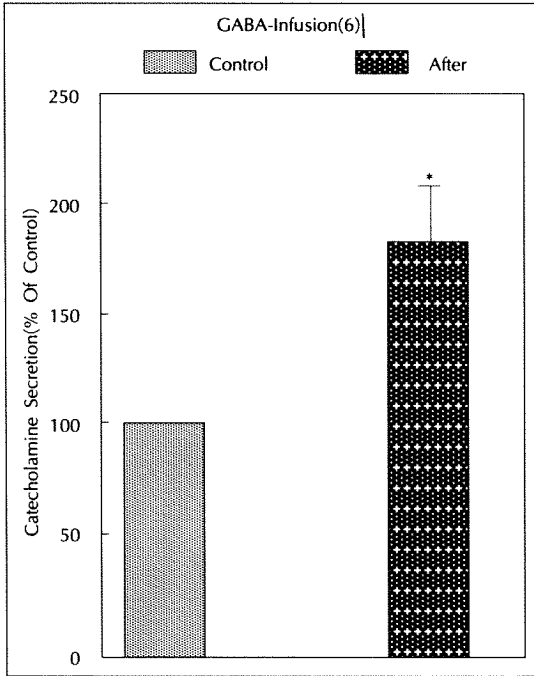
앞서 실험에서 GABA의 CA 분비작용이 atropine이나 mecanylamine의 전처치로 현저히 억제된다는 사실로 보아, 만일 GABA가 부신수질에서 muscarine이나 nicotine 양 작용이 있다면, GABA가 ACh의 CA 분비작용을 증강시킬수 있는지를 검색코자 하였다. 먼저 GABA를 400ug/30min 속도로 30분간 투입한 다음 ACh(50ug)을 투여하였을때 ACh의 CA 분비량은 대조치(100%)에 비교하여  $175.9 \pm 27.5\%$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 증강되었다(Fig. 10).

## 고 찰

본 실험에서 흰쥐 적출 관류부신을 이용하여 GABA의 CA 분비 작용에 대한 영향을 확인하기 위하여 GABA를 부신정맥에 투여하였을때 현저한 CA 분비작용을 관찰할

수 있었다. 이러한 CA 분비작용은 개의 부신<sup>7)</sup>이나 소의 부신<sup>6)</sup> 및 소의 배양 크롬친화세포<sup>9,11)</sup>에서 GABA의 CA 분비작용과 유사함을 알수 있었다. Kitayama<sup>7)</sup>등의 보고에 의하면 개의 부신에서 GABA를 투여시 dose-dependent하게 CA 분비를 증가시킨다고 하였으며, 한편 Sangiah등<sup>6)</sup>은 소의 부신에서는 현저한 반응급강화 현상을 보고하였는데 본 연구의 흰쥐 부신의 경우에서도 동일한 결과를 관찰하였다. 이러한 결과는 전술한 바와같이 동물의 종차(species difference)가 있음을 확인할 수 있었다. 초회 투여한 GABA용량에서 분비되는 CA량이 가장 많았으며 이 함량은 ACh로 인한 CA함량보다는 훨씬 적었다.

본 연구에서 GABA의 CA 분비효과에 대한 작용을 고찰해보면, 첫째, muscarine 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine으로 전처치한 다음 관찰한 결과 선택적인 nicotine 수용체 차단제인 ACh과 GABA의 CA분비작용이 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다. 또한 mecanylamine으로 전처리 한 경우에도 이들의 CA 분비량이



**Fig. 10.** The effect of GABA-infusion on ACh-evoked CA secretion. CA secretion was induced 30min after perfusion with Krebs containing GABA at a rat of 400ug/30min. Other legends and the methods are the same as in Fig. 2. and 3. \*p : < 0.05.

유의하게 억제됨을 볼수 있었다. 이와 같은 사실은 GABA의 CA 분비작용이 cholinergic muscarinic 수용체와 부신크롬친화성세포 대부분을 차지하는 nicotine 수용체의 활성화에 의해 나타나는 것으로 생각된다.

둘째, 크롬친화성 세포가 CA를 유리시 exocytosis에 필수적인 역할을 하는  $Ca^{++}$ 과의 관계를 보면, Douglas 등<sup>27-28)</sup>의 보고에 의하면 ACh이 부신허수질 크롬친화성 세포막에 작용하여  $Ca^{++}$ 의 세포내 이동을 증가시킨다고 하였으며  $Ca^{++}$ 의 저장과는 무관하고 분비 과정과 관계가 있다고 하였다. 본 실험에서도 Krebs 액중의  $Ca^{++}$ 을 제거하고 EGTA를 포함시켜 n-Krebs액으로 관류한 후 ACh와 GABA의 CA 분비작용을 관찰한 결과 모두 억제되었으나 상당한량(대조치의 20%이상)이 나타났다. 그러나, 고양이<sup>27)</sup>, 소의 부신<sup>29)</sup>, 소의 부신 slice<sup>30)</sup> 흰쥐의 부신<sup>31)</sup>에서는  $Ca^{++}$ -free medium에서 ACh에 의한 CA유리작용이 거의 완전히 억제되거나 95% 이상이 차단되는 것으로 알려졌다. 그러나 본 연구에서 GABA의 CA 분비작용이  $Ca^{++}$ -free medium에서도 상당한 정도가 유지되는 것에 대한 명확한 이유는 알수 없으나 흰쥐

의 부신 크롬친화세포내에 intracellular  $Ca^{++}$  store를 함유하고 있어서 이것이 CA 유리작용에 관여할수 있을것으로 생각된다.

왜냐하면 이러한 intracellular  $Ca^{++}$ -free medium에서 ACh나 norepinephrine에 의한 평활근 수축 작용에 일부 작용한다고 보고된 점을<sup>32-34)</sup> 감안한다면 세포내 저장  $Ca^{++}$ 의 역할을 배제하지 못하는 것은 무리가 아닐것 같다.

세째, ouabain과의 관계를 보면 ouabain은 많은 조직에서 membrane  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ -activated ATPase를 선택적으로 억제하는 것으로 알려져 있으며, Garcia등<sup>35)</sup>은 ouabain이 고양이의 부신에서 CA 및 dopamine beta-hydroxylase의 유리작용을 일으킨다고 하였으며 이러한 ouabain의 CA유리작용은 chromaffin cell에 대한 직접 작용을 통해서 나타나며 sodium pump의 억제에 따라서 이차적으로 일가 양 ion의 재분포를 통해서 나타난다고 하였다. 본 실험에서는 ouabain의 전처리서 ACh의 CA 분비작용은 유의하게 증가되었으며 GABA의 CA분비 역시 증가되는 점으로 보아 GABA의 CA 유리작용은 ouabain이 갖고 있는 작용외에 또다른 작용을 경유해서 유발될수 있음을 시사해준다.

네째, KCl-free Krebs액이 GABA이 CA 분비작용에 미치는 효과를 검토해 본 결과 Kitayama등<sup>7)</sup>의 보고에 의하면 개의 부신에서 외부의  $K^{+}$ 이온을 제거했을때 CA 자발적인 분비는 증가하나 GABA에 의해 가역적으로 억제된다고 하였다. 부가적으로  $K^{+}$ 를 다시 추가할 경우 자발적인 분비가 감소하고 GABA로 인한 CA분비가 회복된다고 보고 하였다. 본 실험에서도 KCl을 제거한 Krebs액으로 관류한후 CA의 spontaneous quantal release는 증가 되었으나 ACh로 인한 CA분비는 현저히 감소되었으며, 또한 GABA로 인한 분비 역시 오히려 억제됨은 GABA의 분비작용에  $K^{+}$ ion이 개재되어 있음을 나타내며 Kitayama등<sup>7)</sup>의 연구결과와 유사함을 관찰할 수 있었다.

다섯째, 본 연구에서 GABA에 의한 CA 분비작용은 bicuculline이나 picrotoxin의 전처리로 현저히 억제되었으며, 이같은 점은 포유동물의 소장<sup>36)</sup>, 개의 적출관류부신<sup>7)</sup>, 소의 배양크롬친화세포<sup>9,11)</sup>에서 GABA 수용체 존재가 보고되어 있다. 이와 같은 사실은 흰쥐 부신허수질에서도 GABA가 GABA 수용체와 결합함으로써 CA 분비작용에 관여하는 것으로 사료된다. 일반적으로 Cl conduct-



ance에 대한 GABA 작용을 억제함으로써 이같은 약물은 중추의 교감신경 유출을 증가시키고 동맥압을 상승시키는 것을 보고되어있다<sup>37,38)</sup>. 또한 GABA 수용체 type에 대한 정의는 agonist와 antagonist의 종류에 따라서 달라진다<sup>39)</sup>: GABA A-receptor는 bicuculline-sensitive하고 chloride(Cl<sup>-</sup>) inophore에 coupling되는 반면에 GABA B-receptor는 bicuculline-insensitive하고 Cl<sup>-</sup>-independent하며 adenylate cyclase나 calcium channel과 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>40,41)</sup>. 더우기, GABA 자체는 GABA A- 및 B-receptor의 agonist이지만, 3-amino-1-propanesulphonic acid(3APS)는 GABA A- 수용체의 선택적인 agonist이며 반면에 baclofen(b-cp-chlorophenyl-GABA)는 GABA A- 수용체에 대한 작용이 없는 선택적인 GABA B- 수용체 agonist로 알려져 있다<sup>40,42,43)</sup>.

이상과 같은 점에서 볼때, 본 연구에서 GABA의 CA 분비작용은 흰쥐 부신의 크롬친화 세포막 및 내장 신경 말단에 존재하는 GABAergic A-receptor를 통해서 나타나는 것으로 생각된다. 후자의 경우에서 GABA는 장관에서와 같이 ACh유리를 자극함으로써 효과를 나타내며, 이러한 GABA의 흥분반응은 ACh 유리의 향진을 통해서 매개되는 것을 사료된다. 그러나, Kitayama등<sup>7)</sup>은 GABA의 CA유리작용이 ACh 뉴론 상호작용에 의해서 유발되지 않는다고 하였으며, 이는 atropine과 hexamethonium에 의해서 GABA 반응이 영향을 받지 않기 때문이라고 하였다. 한편 본 실험에서는 GABA의 CA 유리작용이 muscarine 및 nicotine 수용체의 활성화와 관계가 있다고 생각된다. 왜냐하면 atropine이나 mecamylamine 전처리로 현저히 억제 되었기 때문이다. 더우기 GABA로 전처리시 ACh의 CA 유리반응이 현저히 증가되었다. 이러한 결과는 GABA가 ACh의 CA 유리를 향진시키는데 Ca<sup>++</sup> 유입을 증가시키는 과정 단계에 작용할 수 있음을 시사한다고 할수 있다. Kitayama등<sup>10)</sup>은 소의 배양 부신 크롬친화세포에서 GABA가 CA 유리와 함께 <sup>45</sup>Ca uptake를 증가시킨다고 하였다. 이와같이 Ca<sup>++</sup> 유입의 향진으로 인해서 부신수질로부터 ACh로 CA 유리작용이 증강된다고 가정하는 것은 합당한것으로 사료된다. 이러한 사실은 GABA가 ACh, excess K<sup>+</sup> 및 Veratridine에 의한 CA 유리 반응을 증가시킨다는 Kitayama등<sup>19)</sup>의 연구 결과와 상당히 일치함을 알수 있다. 여하튼 본 연구의 결과로 보아, 흰쥐 관류 부신에서

GABA는 CA 유리를 일으키며 이는 GABAergic A-receptor의 활성화를 통해서 나타나며, 또한 cholinergic receptor 활성화에 의한 CA 분비 작용과도 관련성이 있는 것으로 사료된다.

## 요 약

### 연구배경 :

중추신경계에서 중요한 억제성 신경전달 물질로 알려진 GABA가 흰쥐 적출 관류 부신에서 CA 분비작용에 미치는 영향을 검색하고 작용기전을 규명하고자 하였다.

### 방 법 :

Wakade 방법에 따라서 Sprague-Dawley종의 흰쥐의 좌측 부신을 분리 카놀라를 삽입한 다음 적출하여 leucite chamber에 고정하고, Krebs액으로 관류하면서 실험을 시행하였다.

### 결 과 :

GABA를 흰쥐 부신정맥내로 주입시 현저한 CA 분비작용을 일으켰으며 반복 투여시 CA 분비 작용에 대한 반응급강현상을 관찰 할수 있었다. GABA의 CA 분비 작용은 mecamylamine이나 atropine, ouabain으로 전처리시 현저히 억제되었다. K<sup>+</sup>-free Krebs액을 관류시 CA 기초 분비량은 증가 하였으나, GABA는 더이상 CA 유리 증가를 나타내지 못하였다. GABA의 CA 분비 작용은 5mM EGTA를 함유한 Ca<sup>++</sup>-free Krebs액으로 30분간 관류시 뚜렷이 차단되었다. Bicuculline이나 picrotoxin으로 전처리시 GABA 뿐만 아니라 ACh에 의한 CA 분비 작용이 억제되었다. 또한 ACh의 CA 유리 작용은 GABA 관류(400ug/30min)시 유의하게 증강되었다.

### 결 론 :

GABA는 흰쥐 적출관류 부신에서 Ca<sup>++</sup> 및 K<sup>+</sup> 의존성 CA 분비 작용을 일으키며, 이러한 작용은 부신수질 크롬친화 세포상에 있는 GABAergic A-receptor의 활성화를 통해서 나타나며, ACh의 CA 분비작용과 관련성이 있는 것으로 사료된다.

## References

- 1) Roberts ER : *r-Aminobutyric acid and nervous system function-a perspective. biochem Pharmacol* 23 : 2637-2649, 1974

- 2) Oja SS, Kontro P, Lahdesmaki P : *Amino acid as inhibitory neurotransmitters*. Fisher. Stuttgart New York, pp1-102, 1977
- 3) De Groat WC : *The actions of r-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia*. *J Pharmacol Expt Ther* 172 : 384-396, 1970
- 4) Viveros OH : *Mechanism of secretion catecholamines from adrenal medulla*. In *hand book of physiology, Endocrinology*. Vol. VI, Sect. 7. *The adrenal gland*. American Physiology Society, Washington DC, pp389-426, 1975
- 5) Bowery NG, Brown DA : *Depolarizing action of r-aminobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglia in vitro*. *Br J Pharmacol* 50 : 205-218, 1974
- 6) Sangiah S, Borowitz JL, Yim GKW : *Actions of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla*. *Eur J Pharmacol* 27 : 130-135, 1974
- 7) Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A : *The nature of the stimulatory action of r-aminobutyric acid in the isolated perfused dog adrenals*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326 : 106-110, 1984
- 8) Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A : *GABAergic modulation of catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Evidence for the involvement of Cl<sup>-</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> entry*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341 : 419-424, 1990
- 9) Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A : *Enhancement by GABA of the stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341 : 414-418, 1990
- 10) Kitayama S, Koyama Y, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A : *Increase in catecholamine release and <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake induced by GABA in cultured bovine adrenal chromaffin cells*. *Eur J Pharmacol* 131 : 145-147, 1986
- 11) Kitayama S, Koyama Y, Motita K, Dohi T, Tsujimoto A : *GABAergic modulation of stimulation-evoked catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells in culture*. *Jpn J Pharmacol* 43 : 157-169, 1987
- 12) WaKade AR : *Studies on secretion of catecholamines evoked by acetylcholine or transmural stimulation of the rat adrenal gland*. *J Physiol* 313 : 463-480, 1981
- 13) Anton AH and Sayre DF : *A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines*. *J Pharmacol Exp Ther* 138 : 360-375, 1962
- 14) Tallarida RJ, Murray RB : *Manual of pharmacologic calculation with computer programs*. 2nd Ed. New York, Springer-Verlag, pp132, 1987
- 15) Banks P : *The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium*. *J Physiol* 193 : 631-637, 1967
- 16) Banks P : *Involvement of calcium in the secretion of catecholamines*. In *Calcium and Cellular Function*, ed. Cuthbert AW pp.148-162 London : Macmillan and Co Ltd. 1970
- 17) Garcia AG, Garcia-Lopez E, Horga JF, Kirpekar SM, Montiel C and Sanchez-Garcia P : *Potentiation of K<sup>+</sup>-evoked catecholamine release in the cat adrenal gland treated with ouabain*. *Br J Pharmacol* 74 : 673-680, 1981b
- 18) Nakazato Y, Ohga A and Yamada Y : *Facilitation of transmitter action on catecholamine output by cardiac glycoside in perfused adrenal gland of guinea-pig*. *J Physiol* 374 : 475-491, 1986
- 19) Anuis D and Garcia AG : *Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [<sup>3</sup>H]-ouabain binding to plasma membranes*. *Br J Pharmacol* 72 : 31-40, 1981
- 20) Sorimachi M, Nishimura S and Yamagami K : *Possible occurrence of Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup>-influx mechanism in isolated bovine chromaffin cells*. *Brain Res*. 208 : 442-446, 1981
- 21) Pocock G : *Ionic and metabolic requirements for stimulation of secretion by ouabain in bovine adrenal medullary cells*. *Mol Pharmacol* 23 : 671-680, 1983a
- 22) Pocock G : *Ion movements in isolated bovine adrenal medullary cells treated with ouabain*. *Mol Pharmacol* 23 : 681-697, 1983b
- 23) Andrews PR and Johnston GAR : *GABA agonist and antagonists*. *Biochem Pharmacol* 28 : 2697-2702, 1979
- 24) Curtis DR, Duggan AW, Felix D and Johnston GAR : *Bicuculline, an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat*. *Brain Res* 32 : 69-96, 1971a
- 25) Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GAR and McLennan H : *Antagonism between bicuculline*

- and GABA in the cat brain. *Brain Res* 35 : 56-73 1971b
- 26) Ticke MK, Bar M, Olsen RW : Binding of [ $^3$ H]  $\alpha$ -dihydropicrotoxin, an  $\alpha$ -aminobutyric acid synaptic antagonist, to rat brain membranes. *Mol Pharmacol* 14 : 391-403, 1987
  - 27) Douglas WW and Rubin RP : The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* 167 : 288-310, 1963
  - 28) Douglas WW and Poisner AM : On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion : increased uptake of calcium during the secretory response. *J Physiol Lond* 162 : 385-392, 1962
  - 29) Philipu A, Schumann HJ : Der Eomfuss vpm ca : coi auf die Bremxatechinamin freisetzung. *Experientia* 18 : 133-140, 1962
  - 30) Oka M, Ohuchi T, Yoshida H, Imaizumi R : The importance of  $Ca^{++}$  on the release of catecholamine from the adrenal medulla. *Jap J Pharmacol* 15 : 348-356, 1965
  - 31) Ishkawa D, Kanno T : Influence of extracellular Ca, K concentration on adrenalin release and membrane potential in the perfused adrenal medulla of the rat. *Jap J Physiol* 28 : 275-280, 1978
  - 32) Bozler E : Role of calcium in initiation activity of smooth muscle. *Am J Physiol* 216 : 671-674, 1969
  - 33) Ohashi H, Takewaki T and Okada T : Calcium and contactile effects of carbachol in the depolarized guinea-pig taenia caecaum. *Jap J Pharmac* 24 : 601-611, 1974
  - 34) Casteels R & Raeymaekers L : The action of acetylcholine and catecholamines in an intracellular calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *J Physiol* 294 : 51-68, 1979
  - 35) Garcia AG, Hernandez M, Horga JF and Sanchez-Garcia P : On the release of catecholamines and dopamine- $\beta$ -hydroxylase evoked by ouabain in the perfused cat adrenal gland. *Br J Pharmacol* 68 : 571-583, 1980
  - 36) Krantis A, Kerr DIB : GABA induced excitatory responses in the guinea-pig small intestine are antagonized by bicuculline. Picrotoxin and chloride ion blockers. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317-257-261, 1981
  - 37) Kimicco JA : Neurocardiovascular effects of the GABA antagonists picrotoxin and bicuculline in the cat : evidence for involvement of GABA in central cardiovascular control. PhD. Thesis, Georgetown University, 1978
  - 38) Antonaccio MJ, Kerwin L, Taylor DG : Effects of central GABA receptor agonism and antagonism on evoked diencephalic cardiovascular responses. *Neuropharmacology* 17 : 579-603, 1978b
  - 39) Persson B : Cardiovascular effects of intracerebroventricular GABA, glycine, and muscimol in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 313 : 225-236, 1980b
  - 40) Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Show JS, Turnbull MS : Baclofen : a selective agonist for a novel type of GABA receptor. *Br J Pharmacol* 67 : 444-452, 1979
  - 41) Hill DR, Bowery NG : [ $^3$ H] Baclofen and [ $^3$ H] GABA bind to bicuculline-insensitive GABA-B sites in rat brain. *Nature* 290 : 149, 1981
  - 42) Ong J : Baclofen : Some effects in guinea-pig small and large intestine. *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc* 12(2) : 114-125, 1981
  - 43) Kaplita PV, Waters DH, Triggle DJ :  $\alpha$ -Aminobutyric acid action in guinea-pig ileal myenteric plexus. *European J Pharmacol* 79 : 43-54, 1982