

Naloxone의 効果에 미치는 電解質의 影響

全北大學校 醫科大學 藥理學教室 및 麻酔科學教室

鄭 錫 求 · 宋 熙 善 · 曹 圭 朴

= Abstract =

Influence of Electrolyte on the Actions of Naloxone

S.K. Chung, H.S. Song and K.P. Cho

Depts of Pharmacology and Anesthesiology, College of Medicine, Chonbuk National University

In the electrically stimulated guinea-pig ileum, which was incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution containing various concentrations of electrolytes at 4°C for 24 hours, the effect of naloxone on the inhibitory action of morphine was investigated.

Incubation potentiated the inhibitory action of morphine. In the incubated preparation, the inhibitory action of morphine was potentiated in the Na⁺ 75mM, and K⁺ 2.9mM groups, while that action of morphine was reduced in the Ca⁺⁺ 3.6mM, Mg⁺⁺ free and Mn⁺⁺ 0.2 mM groups.

Naloxone in incubation media potentiated the inhibitory action of morphine. In the preparations which were incubated in various concentrations of electrolytes plus naloxone, the action of morphine was reduced in Na⁺ 75mM, K⁺ 2.9mM, and Ca⁺⁺ 3.6mM groups, while that action of morphine was potentiated in Mg⁺⁺ free and Mn⁺⁺ 0.2mM groups. Naloxone antagonised those actions of morphine. However, pA₂ values for naloxone (index for affinity for antagonist) was not changed. Thus changes in the inhibitory action of morphine caused by incubation are probably not the result of changes in the affinity of receptor, but due to the alterations in the events which precede or follow the receptor binding by incubations.

緒 論

Naloxone은 in vivo 및 in vitro 實驗에서 opiate agonist의 作用을 競爭的으로 拮抗하며, 이때 naloxone의 pA₂值가 同一한 opiate agonist의 藥理作用이 하나의 特殊한 受容體를 通하여 일어난을 示唆하는 것으로 推測되어 왔다^{1,2}. 最近 이 受容體는 神經組織內에 存在함이 밝혀졌고^{3,4} 더욱 重要한 事實은 이 受容體에 opiate isomers가 結合하며, 그 結合程度와 藥理的 作用間에는 密接한 相關關係가 있다는 것이 밝혀

진 點이다^{5,6,7}. 即 1971年 Goldstein等⁸이 처음으로 同位元素로 標識한 levorphanol과 opiate 受容體와의 結合이 藥理的으로 不活性인 dextrophan에 依하여 競爭的으로 抑制됨을 觀察하여 stereospecific binding의 概念을 紹介한 이래 많은 學子들에 依하여 saturable binding과 functional opiate receptor와의 關係가 檢討되었으며, 이를 大略 要約하면 1) saturable binding은 神經組織內에서만 觀察되고^{3,4} 2) 中樞神經係에서의 saturable binding은 部位에 따라 다르고⁹, 3) agonist에 對한 saturable binding sites의 Kd值는 그 藥物的 ED₅₀과 같은 範圍안에 있으며¹⁰, 4)

모든 opiate agonist와 antagonist의 saturable binding sites에 대한親和力은 그 藥物의 藥效와 比例한다는點^{5,11} 등이다.

Opiate receptor는 細胞膜에 存在하며, 따라서 細胞膜의 狀態를 變化시키면 saturable opiate binding도 變化됨이 잘 알려져 있다^{12,13}. 또한 opiate receptor는 incubation medium內 電解質 濃도에 따라 그 反應性이 달라지는데 例컨데 Na^+ 은 opiate antagonist의 binding을 增加시키며, agonist binding을 抑制하고, Ca^{++} , Mg^{++} 및 Mn^{++} 등은 agonist의 binding을 增加시키나 antagonist binding은 抑制함이 報告되어 있다¹⁴⁻¹⁶. 그러나 이들 大部分의 成績은 白鼠의 腦切片에서 얻어진 成績들로 functional opiate receptor와 直接 緣關시키기에는 어려운 點이 많다.

한편 opiate receptor의 specific antagonist로써의 作用外에 naloxone의 作用은 그리 많이 알려져 있지 않다. 따라서 著者は 本實驗에서 naloxone의 saturable binding이 電解質 濃도에 따라 달라진다는 點을 勘案하여 鎮痛製의 作用機轉 研究에 典型的인 model로써 사용되는 guinea-pig ileum¹⁷⁻¹⁹에서 naloxone의 opiate receptor에 대한 specific antagonist 外의 作用과 incubation에 따른 opiate receptor의 機能變化 有無를 檢討하여 보았다.

實驗 方法

實驗動物로는 體重 300~350 gm의 guinea-pig를 雌雄 區別없이 使用하였다. 標本은 動物의 頭部에 打擊을 加한 後 ileocecal junction 10 cm 上端部의 腸切片을 採取하여 Krebs-Henseleit solution으로 腸內用物을 數次 洗滌하여 除去한 다음, 電解質 濃도를 달리한 여러가지 modified Krebs-Henseleit solution에 naloxone을 添加하거나 않은 狀態에서 4°C에 24時間 incubate하여 使用하였다. Incubation後 37°C, 95% $\text{O}_2+5\%\text{CO}_2$ 로 飽和시킨 Ringer液이 들어있는 organ bath內에 約 4 cm의 標本을 白金 電導子사이에 懸垂하고, 藥物이 들어있지 않은 같은 溶液으로 約 2時間 동안 數次 洗滌하였다. 電氣刺戟은 0.1 Hz, 10 ms duration, 50 V/cm로 하였으며, 筋片의 收縮力을 isometric transducer로 記錄하였고(transducer: Grass instrument, CO., Quincy, MA; model FT-O3C; recorder; Gould Inc., Cleveland, OH, model 2400 Brush recorder), resting tension은 0.5 gm을 加했다. 腸片懸垂後 2時間에 腸片收縮은 平衡을 維

持하였고, 이때 bath內 morphine을 加하여 標本의 收縮抑制를 觀察한 다음 藥物이 들어있지 않은 Ringer液으로 5~6次 洗滌하였다.

Naloxone에 대한 functional binding sites의 affinity는 여러가지 濃度の naloxone 存在下에 morphine의 作用을 檢討하여 Arunlakshana等²⁰의 方法에 따라 pA_2 值를 產出하였고 收縮力의 50%減少量(ID_{50})은 $\text{Log}\{Y/(1-Y)\}$ 에 該當하는 linear regression line에서 產出하였다.

Krebs-Henseleit solution의 電解質 造成은 118 mM NaCl, 27.2 mM NaHCO_3 , 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.8 mM CaCl_2 및 11.1 mM glucose였으며 必要에 따라 電解質 濃도를 바꾸어 使用하였고, 이에 따른 osmolarity變動은 sucrose로 矯正하였다. 使用한 藥物은 morphine sulfate(Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, MO)와 naloxone hydrochloride (Endo Lab, Brussels Belgium)이었다.

實驗 成績

1) Incubation medium內 電解質 濃度變動이 morphine 作用에 미치는 影響

腸片을 incubation medium內 Na^+ 75 mM, K^+ 2.9 mM, Ca^{++} 3.6 mM, Mg^{++} 0 mM 또는 Mn^{++} 0.2 mM로 變動시킨 modified Krebs-Henseleit solution에 4°C에서 24時間 incubate하여 morphine의 作用을 觀察하였다(Fig. 1).

Fig. 1에서 한 plot는 各各 6例의 標本에서 morphine 5量을 使用하여 얻어진 morphine의 平均 ID_{50} 이다. Normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에 incubate한 標本에서 morphine의 ID_{50} 은 130 nM로 incubate하지 않은 標本(Fig. 1)에서의 190 nM보다 顯著히 적었다. Incubation medium內 電解質 濃도를 變動시켰을때 Na^+ 75 mM群과 K^+ 2.9 mM群에서의 morphine ID_{50} 가 對照群보다 적었고 Ca^{++} 3.6 mM群, Mg^{++} free群 및 Mn^{++} 0.2 mM群에서는 增加하였다(Fig. 1 및 Table 1). 以上の 成績은 incubate를 하지 않은 正常群에서의 實驗成績(未發表)과 變動樣相이 비슷하였다. Incubation을 한 標本에서 morphine 作用을 遮斷하는 naloxone의 効果를 본 實驗에서 morphine의 量은 全實驗群에서 bath內 naloxone의 量에 따라 比例하여 投與量이 增加하였다(Fig. 1).

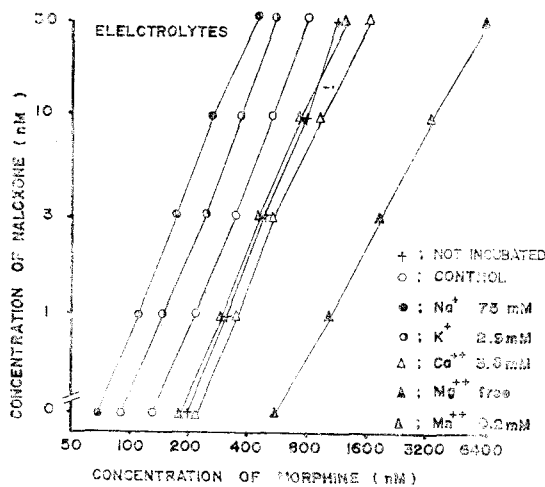


Fig. 1. Effects of various electrolytes in the incubation media on the concentration of morphine to cause a 50 percent inhibition of the contraction of guinea-pig ileum. Preparations were incubated in a modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which were consisted of various concentrations of electrolytes as indicated in the figure at 4°C for 24 hours. Each plot denotes the mean ID₅₀ of 6 experiments.

2) Morphine의 작용에 미치는 incubation media 내 naloxone의影響

Normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에 naloxone 10 nM을 加하여 incubation한 標本을 使用하였다. Incubation을 하지 않은 標本에서 naloxone 10 nM을 投與하고 10分後 5~6回 洗滌하면 20分後에는 morphine作用이 原狀으로 回復되었다. Fig. 2는 標本을 懸垂하고 2時間동안 數次 洗滌하고 난 後 morphine作用을 觀察한 實驗成績이다. 本標本에서 morphine의 ID₅₀은 70 nM로 對照群(130 nM)에서 보다 morphine作用이 顯著히 強化됨을 보았다 (Fig. 2 및 Table 1). Morphine作用에 對한 naloxone의 拮抗效果는 naloxone의 量에 따라 morphine量이 比例하여 增加함을 보았다(Fig. 2 및 Fig. 3).

3) Morphine作用에 미치는 incubation media 내 naloxone 및 電解質 濃度變動의影響

Fig. 3은 incubation media 내 naloxone 10 nM과 電解質 濃度를 變動시킨 實驗群, 即 Na⁺ 75 mM, K⁺

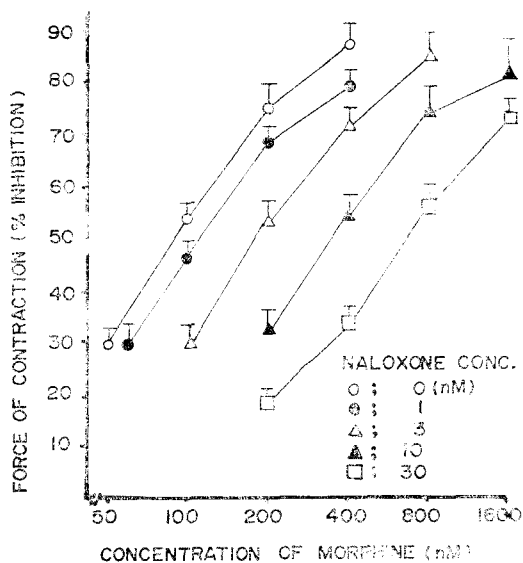


Fig. 2. The influence of naloxone in the incubation media on the inhibitory action of morphine in isolated guinea-pig ileum. Preparations were incubated in normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which contained 10 nM of naloxone at 4°C for 24 hours. After equilibration, the inhibitory action of morphine was studied. Each point represents the mean of 6 experiments. Vertical lines indicate S.E.

2.9 mM, Ca²⁺ 3.6 mM, Mg²⁺ free, Mn²⁺ 0.2 mM 群에서 Fig. 2와 같은 方法으로 實驗하여 얻은 成績을 綜合한 것이다. 上述한 바처럼 incubation media 내 naloxone+電解質을 變動시킨 群에서는 incubation media 내 naloxone을 加하지 않고 incubation한 群과 比較하여 Na⁺ 75 mM, K⁺ 2.9 mM 및 Ca²⁺ 3.6 mM 群에서는 morphine作用이 弱화되나, Mg²⁺ free 및 Mn²⁺ 0.2 mM 添加群에서는 morphine作用이 強化되었다(Table 1 및 Fig. 3). Incubation media 내 naloxone을 添加하고, 電解質 濃度를 變動시킨 群에서도 morphine의 藥物反應曲線은 naloxone의 濃度增加 따라 右轉移(right shift)를 일으켰다. Table 1은 以上の 實驗을 綜合한 것이다.

4) Incubation media 내 naloxone 및 電解質 變動이 naloxone의 pA₂值에 미치는影響

Incubation, naloxone 添加 또는 電解質 濃度變動이 opiate receptor에 어떠한 影響을 주는가 보기 爲하여 各群에서 Schild²⁰⁾方法으로 receptor에 對한 ant-

Table 1. Effect of naloxone and various electrolytes in the incubation media on the concentration of morphine to cause a 50 percent inhibition of the contraction of guinea-pig ileum

Electrolytes	Without naloxone	With naloxone 10 nM
Control	130	70
Na ⁺⁺ 75 mM	70	105
K ⁺ 2.9 mM	80	95
Ca ⁺⁺ 3.6 mM	210	380
Mg ⁺⁺ free	630	320
Mn ⁺⁺ 0.2 mM	170	120

agonist의 affinity index인 pA₂值를 產出하였다 (Table 2). 正常群에서의 naloxone의 pA₂值는 8.81 이었으며 incubation, naloxone 添加 또는 incubation media 內 電解質濃度를 變動시킨 群에서의 pA₂值도 正常群과 비슷하였다 (Table 2).

考 按

Morphine은 電氣的으로 刺戟한 guinea-pig ileum에서 量에 따른 筋收縮을 抑制하며 이와같은 morphine의 抑制作用은 naloxone 存在下에서 dose-response curve의 parallel right shift를 일으킨다^{18, 21, 22}.

本實驗에서 여러가지 條件下에 incubate한 標本에서 morphine 收縮曲線이 naloxone에 依하여 parallel right shift 일으키는 morphine에 依한 腸收縮 抑制作用이 opiate receptor를 通하여 일어남을 示唆한다. 그러나 本實驗에서 incubation에 依하여 morphine作用이 增大되고 incubation media 內 naloxone, 또는 電解質濃度變動에 依하여 morphine의 作用이 變動되었다.

Table 2. Effect of electrolytes and naloxone in the incubation media on the pA₂ value for naloxone to antagonise the action of morphine. The pA₂ value for naloxone was determined from plots using data obtained with a modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution with or without naloxone, in which the concentration of one electrolyte was altered. Each value represents the mean of 6 experiments. pA₂ value for naloxone in naive preparation was 8.81 respectively

Electrolytes Drugs(nM)	Normal solution	Na ⁺⁺ 75 mM	K ⁺ 2.9 mM	Ca ⁺⁺ 3.6 mM	Mg ⁺⁺ free	Mn ⁺⁺ 0.2 mM
Control	8.6	8.7	8.6	8.4	8.9	8.5
Naloxone 10	8.4	8.8	8.5	8.5	8.8	8.5

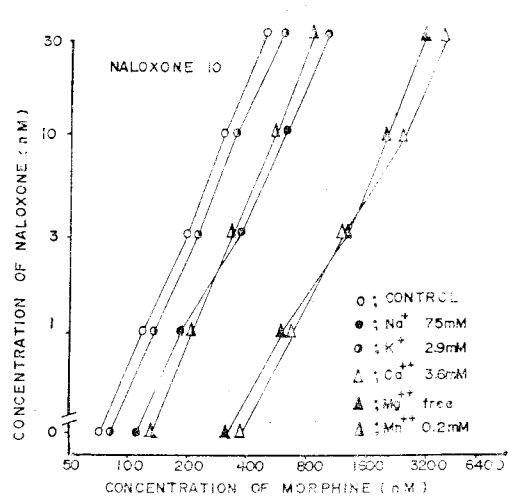


Fig. 3. Effect of naloxone in the incubation media on the concentration of morphine to cause a 50 percent inhibition of the contraction of guinea-pig ileum. Preparations were incubated in a modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which were consisted of various concentrations of electrolytes with or without naloxone as indicated in the figure at 4°C for 24 hours. Each point denotes the mean ID₅₀ of 6 experiments.

그 機轉에 關하여 推論하면, 1. 神經末端에서의 neurotransmitter 遊離의 變動, 2. opiate receptor의 數나 affinity의 變動, 3. cytoplasmic membrane의 integrity 또는 ionic strength를 包含한 contractile structure의 變化等을 생각할 수 있다.

Morphine은 中樞 및 末梢에서 acetylcholine의 遊離를 抑制함이 알려져 있으며, 이와같은 acetylcholine 遊離抑制가 電氣的으로 刺戟한 腸片收縮을 抑制함이

알려져 있다^{3,13,23,24}).

Neurotransmitter의遊離와 더불어 筋收縮에는 Ca ion이 重要な 役割을 하며, 그러므로써 여러가지 cations는 直接 또는 間接으로 筋收縮에 關與할 수 있음은 周知의 事實이다. 더우기 functional receptor-opiates binding은 cell membrane의 Ca ion permeability를 變化시켜 藥理作用을 나타낼 수 있다^{25,26}).

本實驗에서, 모든 實驗群에서 naloxone에 對한 pA₂ 値는 變하지 않았다. 이 點은 brain homogenates에서 opiates-receptor binding이 電解質濃度 變動에 依해 달라진다는 報告^{9,11,13,14})와는 다른 것으로, functional opiate receptor는 incubation, incubation media內 電解質濃度の 變動 또는 naloxone으로 그 數 또는 affinity에 있어서 달라지지 않음을 意味하며 그 作用點이 다른 部位, 即 細胞膜 또는 細胞內에 있음을 示唆하는 것이라 하겠다. 더우기 naloxone을 加하지 않고 incubation만을 施行한 實驗群의 成績이 程度의 差異는 있으나 같은 方法으로 施行한 正常群에서의 實驗成績(未發表)과 비슷하였음은 이 點을 더욱 推測케 한다. 一般的으로 naloxone의 藥理作用은 opiate receptor의 specific antagonist로써 agonist의 作用을 抑制하는 것만을 생각하여 왔다. 本實驗에서 naloxone을 加하여 incubate하였을 때 morphine의 作用이 더욱 強化되고, incubation media內 電解質濃度 變動과 더불어 naloxone을 加했을 때 Na⁺ 75 mM 群, K⁺ 2.9 mM 群 및 Ca⁺⁺ 3.6 mM 群에서는 morphine 作用이 弱화되나 Mg⁺⁺ free 群과 Mn⁺⁺ 0.2 mM 群에서는 強化됨은 naloxone의 opiate receptor에 대한 作用外의 다른 作用을 推測케 하는 것으로 대단히 重要な 成績으로 思料된다.

本實驗 結果는 naloxone도 morphine과 마찬가지로 opiate receptor 外의 部位, 推測컨대 細胞膜 또는 細胞內의 contractile structure에 影響을 미칠 수 있음을 提示하고 있다.

要 約

Guinea-pig ileum을 naloxone을 加하거나 加하지 않은 電解質 濃도가 다른 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에 4°C에서 24시간 incubation 한 다음, morphine의 收縮 抑制作用을 觀察하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1) Incubation 自體로써 morphine의 作用은 強化되었다.

2) Incubation media內 電解質 變動은 Na⁺ 75 mM 群과 K⁺ 2.9 mM 群에서는 morphine의 作用이 強化되었고, Ca⁺⁺ 3.6 mM 群, Mg⁺⁺ free 群과 Mn⁺⁺ 0.2 mM 群에서는 弱화되었다.

3) Incubation media內 naloxone은 morphine의 作用을 強化하였다. Incubation media內 naloxone을 加하고 電解質을 變動시킨 實驗에서 Na⁺ 75 mM 群, K⁺ 2.9 mM 群과 Ca⁺⁺ 3.6 mM 群에서는 naloxone에 依하여 morphine 作用이 弱화되었고, Mg⁺⁺ free 群과 Mn⁺⁺ 0.2 mM 群에서는 強化되었다.

4) Naloxone에 對한 pA₂ 値는 全群에서 變動이 없었다.

5) 以上 實驗成績은 naloxone opiate receptor에 對한 作用外에 세포막 또는 筋細胞收縮機構에 影響을 미쳐 morphine의 作用에 影響을 줄 수 있음을 示唆한다.

REFERENCES

- 1) Jaffe, J.H. and W.R. Martin: *Narcotic analgesics and antagonists. The pharmacological basis of therapeutics, edited by L.S. Goodman and Gilman, pp 245-283, Macmillan, New York. 1975.*
- 2) Takemori, A.E.: *Determination of pharmacological constants: Use of narcotic antagonists to characterize analgesic receptors. Narcotic antagonists. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 8:335, 1974.*
- 3) Kostelitz, H.W. and A.A. Waterfield: *In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. Ann. Rev. Pharmacol. 15:29, 1975.*
- 4) Terenius, L.: *Steospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol. Toxicol. 32:317, 1973.*
- 5) Terenius, L.: *Contribution of 'receptor' affinity to analgesic potency. J. Pharm. Pharmacol. 29:146, 1974.*
- 6) Pert, C.B., Pasternak G. and S.H. Snyder: *Opiate receptor demonstration in nervous tissue. Science. 197:1011, 1973.*
- 7) Simon, E.J., Hiller, J.M., and I. Edelman:

- Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic to 3 H-etorphine to rat brain homogenates. Proc. Natl. Acad. Sci USA 70, 1947.*
- 8) Goldstein, A., Lowney, L.I. and B.K. Pal: *Stereospecific and non-specific interaction of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc Natl. Acad. Sci. USA 68:1742, 1971.*
 - 9) Hiller, J.M. Pearson, J. and E.J. Simon: *Distribution of stereospecific binding of potent narcotic analgesic etorphine in human brain: Predominance in the limbic system. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 6:1052, 1973.*
 - 10) Pert, C.B. and S.H. Snyder: *Properties of opiate receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci USA 70:2243, 1973.*
 - 11) Pasternak, G.W. and S.H. Snyder: *Opiate receptor binding; Effect of enzymatic treatments. Mol. Pharmacol. 10:183, 1974.*
 - 12) Hitzemann, R.J., Hitzemann G.H. and H.H. Loh: *Binding of ³H-naloxone in the mouse brain. Effect of ions and tolerance development. Life Sci. 14:2393, 1974.*
 - 13) Pasternak, G.W., Snowman A.M. and S.H. Snyder: *Selective enhancement of (³H)-opiate agonist binding by divalent cations. Mol. Pharmacol. 11:735, 1975.*
 - 14) Lee, C.Y., Akera, T. and T.M. Brody: *Effect of Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ on the saturable binding of ³H-dihydromorphine and ³H-naloxone in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther., 202: 166, 1977.*
 - 15) Pert, C.B. and S.H. Snyder: *Opiate receptor binding of agonist and antagonists affected differentially by sodium. Mol. Pharmacol., 10: 808, 1974.*
 - 16) Lee, C.Y., Akera, T., Stolman, S. and T.M. Brody: *Saturable binding of dihydromorphine and naloxone to rat brain tissue in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther., 194:583, 1975.*
 - 17) Paton, W.D.M.: *The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol., 12:119, 1957.*
 - 18) Cox, B.M. and M. Weinstock: *The effect of analgesic drug dependence by induction of receptor. Nature(London), 205:181, 1966.*
 - 19) Gyang, E.A. and H.W. Kosteritz: *Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on the guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol., 27: 514, 1966.*
 - 20) Arunlakshana, O. and H.O. Schild: *Some quantitative uses of drug antagonists. Brit. J. Pharmacol., 14:48, 1956.*
 - 21) Kosteritz, H.W. and J. Hughes: *Isolated organs and cultured cells as models for the study of narcotic action. In factors affecting the action of narcotics, edited by M.W. Adler, Manara, L. and R. Samanin(Rave Press, New York) pp.13-37, 1978.*
 - 22) Lees, G.M., Kosteritz, H.W. and A.A. Waterfield: *Characteristics of morphine sensitive release of neurotransmitter substances. In agonist and antagonist actions of narcotic analgesic drugs, ed. by Kosteritz, H.W., Collier, O.S. and J.E. Villarreal(University Park Press, Baltimore), pp.142, 1973.*
 - 23) Domino, E.F. and A. Wilson: *The effect of narcotic analgesic agonist and antagonists on rat brain acetylcholine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 184:14, 1973.*
 - 24) Matthews, J.D., Lubrecque, G. and E.F. Domino: *Effect of morphine, nalorphine and naloxone on neocortical release of acetylcholine in rat. Psychopharmacol., 29:113, 1973.*
 - 25) Guerrero-Munoz, F., Guerrero, M.L. and E.L. Way: *Effect of morphine on calcium uptake by lysed synaptosomes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211:370, 1979.*
 - 26) Harris, R.A. Loh, H.H. and E.L. Way: *Antinoceptive effects of lanthanum and cerium in nontolerant and morphine tolerant dependent animals. J. Pharmacol. Exp. Ther., 196:288, 1976.*