

# 白鼠 腦組織에서 Morphine의 Saturable Binding에 미치는 電解質의 影響

全北大學校 醫科大學 藥理學教室

高 福 鉉·蔡 洙 完·曹 圭 朴

= Abstract =

## Effect of Electrolytes on the Saturable Binding of Morphine in Rat Brain Tissue

Bok-Hyun Ko, Soo Wan Chae and Kyu Park Cho

*Dept. of Pharmacology, Jeonbug University Medical School*

The binding *in vitro* of an opiate agonist, (<sup>3</sup>H)-morphine, was studied using rat brain slices which were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution containing various concentrations of electrolytes with or without morphine, naloxone or morphine+naloxone at 4°C for 24 hours. The binding of (<sup>3</sup>H)-morphine may be separated into two component; one a saturable binding and the other nonsaturable. The saturable binding may be calculated from the differences in binding observed in the absence and presence of high concentration of morphine. The maximal saturable binding and K<sub>D</sub> value in the naive preparations were 0.32±0.02 pmole/mg protein and 0.75±0.07 nM respectively. The saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine was significantly increased by low temperature-treatment, while K<sub>D</sub> value was not changed. Morphine in the incubation media significantly increased the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine and K<sub>D</sub> value. Naloxone also increased the maximal saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine and K<sub>D</sub> value of the drug. Decrease of K<sup>+</sup> and Mg<sup>++</sup>, and addition of Mn<sup>++</sup> in the incubation media significantly increased the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine, but decrease of Na<sup>+</sup> and increase of Ca<sup>++</sup> in the incubation media did not influence the binding. The increment of the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine by nonlabeled morphine in the incubation media was not affected by decrease of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> or Mg<sup>++</sup>, or addition of Mn<sup>++</sup> into the incubation media, but was inhibited by increase of Ca<sup>++</sup> in the incubation media, while the increment of the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine was not observed by decrease of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> or Mg<sup>++</sup>, or increase of Ca<sup>++</sup> in the incubation media. The above results indicate that change of opiate binding sites in quality, i.e. affinity, and quantity, i.e. number of binding sites, may occur by low temperature-treatment in the absence and presence of morphine or naloxone and that electrolytes play role of the changes of opiate binding sites.

### 緒 論

1971年 Goldstein<sup>1)</sup> 등이 처음으로 *in vitro* 實驗에서

同位元素로 標識된 levorphanol 이 생쥐의 腦組織片에서 約 2% 程度 saturable binding 을 일으킴을 報告한 以來 많은 學者들에 의하여 opiate receptor 에 대한 各種 opiate agonist 와 antagonist 의 試驗管內 satu-

nable binding 이 確認되었다. 이들은 이와같은 試驗管 內 saturable binding 이 全身動物에서의 opiates와 藥理作用을 司하는 opiate receptor와의 binding 自體를 意味하는 것이라고 主張하였고, 그 根據로서 이들은 opiates의 藥理的 作用部位와 saturable binding site는 神經組織에만 局限되어 있고, opiate agonists 또는 antagonists의 藥効와 binding site의 親和力間에는 有意한 相關關係가 있음을 들고 있다<sup>2,3,4,5,6</sup>.

一方 Pert等<sup>2,3</sup>은 opiate antagonist인 <sup>3</sup>H-naloxone을 使用하였을 때 opiate agonist를 使用한 Goldstein等<sup>1</sup>의 成績과는 달리 約 70%의 높은 saturable binding을 觀察할 수 있음을 報告하였는데 이들 두 成績에 있어 量的인 差異는 그후 opiate agonists와 antagonists의 receptor에 대한 結合能에 있어서의 性質上的 差異에 起因하지 않고 實驗構圖上的 差異에 起因함이 밝혀졌다. 卽 tritium으로 標識한 dihydromorphine이나 etorphine과 같은 opiate agonists를 底濃度로 使用하면 이들 藥物의 saturable binding이 大端히 增加됨을 볼 수 있다<sup>4,7~10</sup>.

이와같은 opiates의 saturable binding은 細胞의 形質膜狀態를 變化시키거나 incubation media의 電解質濃度를 變動시키면 달라짐이 알려져 있다<sup>2,3,6,11~14</sup>. 例컨데 Pert等<sup>2</sup>은 Na<sup>+</sup>이 opiate agonists의 binding은 減少시키나 opiate antagonists의 binding은 增加시키는데 이는 Na<sup>+</sup>이 opiate receptor를 變형시켜 agonist에 대한 binding site는 減少시키나 antagonist에 대한 binding site는 增加시키기 때문이라 하였고, Simon等<sup>11</sup>은 Na<sup>+</sup>에 의한 opiate antagonist의 binding增加는 Na<sup>+</sup>에 의하여 opiate receptor의 親和力이 增加되기 때문이라 하였다. Na<sup>+</sup>以外的 電解質에 關係해서도 K<sup>+</sup>은 opiate agonists 및 antagonists의 binding을 減少시키고, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> 및 Ni<sup>++</sup>等 2價 ion에 依해서는 opiate agonists의 binding은 增加되나 opiate antagonists의 binding은 抑制되거나 影響받지 않음이 報告되어 있다<sup>6,14,15</sup>.

한편 De la Lande等<sup>16</sup>은 기니피 回腸片에서 腸片을 粉碎 또는 低溫處理하거나 procaine 또는 高濃度의 K<sup>+</sup>를 media 內에 加하면 morphine의 acetylcholine 遊離效果가 抑制된다 하였고, 鄭等<sup>18</sup>과 曹等<sup>12</sup>은 기니피 回腸片에서 腸片을 低溫處理하면 morphine作用이 強化되며 이때 incubation media 內 電解質 組成이 morphine作用 強化發現에 대단히 重要な 役割을 하고, opiate receptor의 質的인 變動은 볼 수 없었다고 하였다.

따라서 著者는 opiate agonists와 antagonists의

saturable binding이 medium 內 電解質組成에 따라 달라진다는 點을 勘案하여 本 實驗에서는 低溫處理에 따른 opiate receptor의 性質과 量的인 變動有無를 檢討하고 電解質과의 關係를 追究코져 本 實驗을 試圖하였다.

## 實驗 方法

實驗動物로는 體重 200~250 g의 雄性 白鼠(Sprague-Dawley)를 使用하였다. 動物을 斷頭하고 即時 間腦를 採取하여 約 100 mg의 腦切片을 만든 다음 一部는 即時 binding 實驗에 使用하였고(naive group) 一部는 低溫處理實驗에 使用하였다.

低溫處理는 腦切片을 對照實驗에서는 보통 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution(組成; 118 mM NaCl, 27.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> 및 11.1 mM glucose)에 담가 4°C에서 24時間 동안 低溫處理하였고, morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone과 電解質의 影響을 본 實驗에서는 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone을 加하거나 加하지 않고 해당 電解質만을 變動시킨 medium 內에 對照實驗에서와 同一한 方法으로 低溫處理하였다. 低溫處理한 標本은 37°C의 보통 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에 옮겨 3時間동안 震盪하면서 每 20分 間隔으로 같은 溶液으로 洗滌, 藥物을 完全히 除去하여 binding 實驗에 使用하였다.

Binding 實驗에서의 incubation은 두가지로 行하였다. 卽 標本을 여러 濃度의 morphine을 加하거나 加하지 않은 50 mM의 Tris-HCl 緩衝液(pH; 7.4, 總容積; 3 ml)에 37°C에서 10분간 preincubate 하고, 이어 (<sup>3</sup>H)-morphine(specific activity 46 Ci/mM)을 加하여 15分間 incubate 한 것과 標本을 10 μM의 morphine을 加하거나 加하지 않은 50 mM Tris-HCl 緩衝液에 10分間 preincubate 한 다음 濃度를 달리한 (<sup>3</sup>H)-morphine을 加하여 15分間 incubate 한 것이었다. Incubate 된 sample은 即時 0°C에서 Dounce ball-type homogenizer로 homogenate를 만들어 nitrocellulose filter(pore size; 0.8 μm. Millipore Corp., Bedford, Mass.)로 濾過하고 얼음으로 冷却시킨 15 ml의 Tris-HCl 緩衝液으로 洗滌하였다.

濾過紙는 1 ml의 ethylene glycol monoethyl ether에 溶解시킨 다음 counting cocktail 10 ml를 加하여 liquid scintillation counting으로 radioactivity를

測定하였다.

Saturable binding은 每 實驗值의 total binding에서 morphine 10  $\mu$ M 존재下에서 얻어진 nonspecific binding 値를 除하여 算出하였다.

蛋白質은 Lowry等<sup>19)</sup>의 方法으로 測定하였으며 結合된 morphine의 量은 pmoles/mg protein으로 表示하였다. 얻어진 實驗成績은 Student's t-test로 有意性을 判定하였다.

使用한 藥物은 morphine sulfate(Mallinkrodt Chemical Corp., St, Louis, MO.), naloxone hydrochloride(Endo Lab., Garden city, N.Y.) 및 (<sup>3</sup>H)-morphine(Amersham/Searle Corp. Arlington Heights, Ill.) 등이었다.

### 實驗成績

Opiate receptor에 對한 saturable binding 實驗에는 homogenate와 切片이 둘다 使用되고 있으나 本 實驗에서는 homogenation에 따른 細胞膜의 integrity의 變型을 考慮하여 腦切片을 使用하였다.

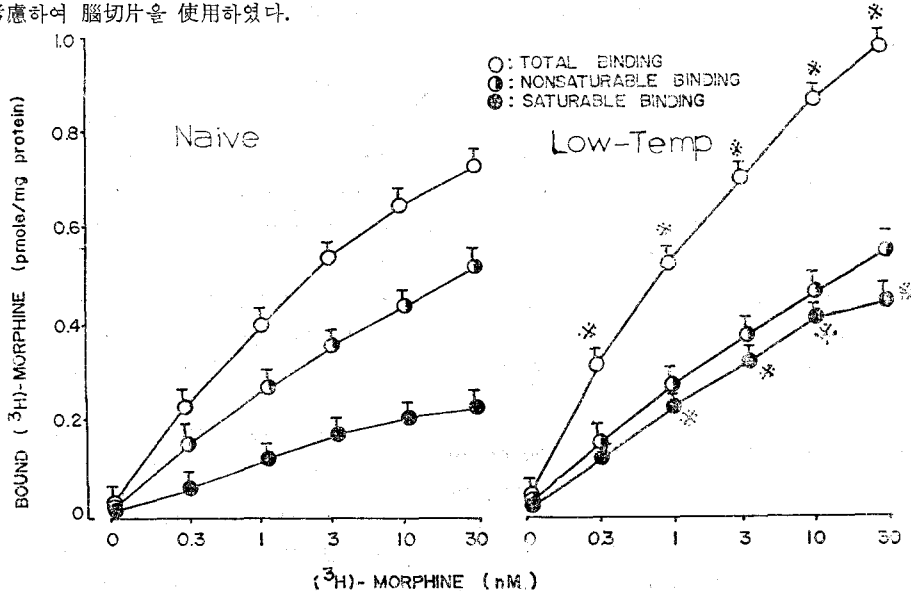


Fig. 1. Binding of <sup>3</sup>H-morphine in the presence of 10  $\mu$ M morphine in naive and low temperature-treated preparations. Preparations were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer for 10 minutes with or without 10  $\mu$ M morphine. Subsequently, various concentrations of <sup>3</sup>H-morphine were added to incubation mixtures and the binding was assayed. Total and nonsaturable binding are <sup>3</sup>H-morphine binding in the absence and presence of 10  $\mu$ M morphine, respectively. Saturable binding is the difference of <sup>3</sup>H-morphine binding in the absence and presence of morphine. For the low temperature-treatment, preparations were incubated in the Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution at 4°C for 24 hours. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group(p<0.05).

### 1) 低溫處理가 (<sup>3</sup>H-Morphine의 Saturable Binding)에 미치는 影響

먼저 低溫處理에 따른 saturable binding의 變動有無를 檢討코저 各各 8例의 正常標本과 低溫處理標本에서 binding 實驗을 行하였다.

Fig. 1에서 보는 바와같이 正常標本에서 (<sup>3</sup>H)-morphine의 binding은 (<sup>3</sup>H)-morphine의 量에 따라 增加하였고 un-labeled morphine으로 一部 抑制되었다. 卽 이는 morphine의 tissue binding에는 두가지 要素 saturable binding과 nonsaturable binding이 있음을 가리키고 있다(Fig. 1).

한편 正常標本에서 maximal saturable binding과 K<sub>D</sub>値는 各各 0.32±0.02 pmole/mg protein과 0.75±0.07 mM이었으며 (Table 1), 低溫處理로써 total binding과 saturable binding은 正常標本에서 보다 顯著히 增加하여 maximal saturable binding은 0.42±0.05 p mole/mg protein이었으나 K<sub>D</sub>値는 0.77±0.05 nM로 正常標本에서와 거의 같았다 (Table 1).

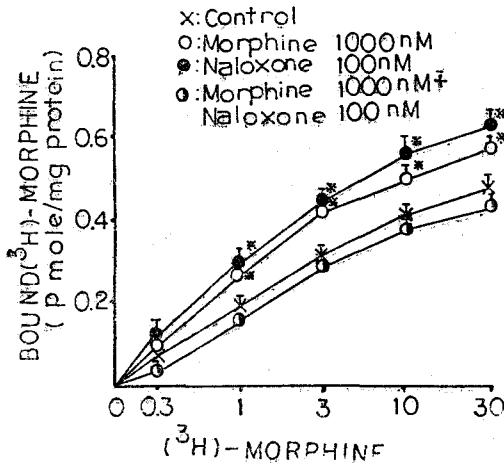


Fig. 2. Saturable binding of  $(^3\text{H})$ -morphine in the absence and presence of  $10 \mu\text{M}$  of morphine. Preparations were incubated in Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution containing  $1,000 \text{ nM}$  morphine,  $100 \text{ nM}$  naloxone or  $1,000 \text{ nM}$  morphine +  $100 \text{ nM}$  naloxone at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours. After drugs were thoroughly washed out, preparations were incubated in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl buffer for 10 minutes with or without  $10 \mu\text{M}$  morphine. Subsequently, various concentrations of  $(^3\text{H})$ -morphine were added to the incubation mixture and the binding was assayed. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in control group ( $p < 0.05$ ).

2) 低溫處理時 Media 內 Morphine 과 Naloxone 이  $(^3\text{H})$ -Morphine 의 Saturable Binding 에 미치는 影響

鄭等<sup>17)</sup>과 賈等<sup>18)</sup>은 기니피그腸片에서 低溫處理時 incubation media 內 morphine 은 腸片의 morphine 에 대한  $\text{ED}_{50}$ 를 增加시켰고, naloxone 은 이를 減少시켰음을 報告하였다. 따라서 本 實驗에서는 低溫處理時  $(^3\text{H})$ -morphine 의 saturable binding 에 미치는 morphine 과 naloxone 의 影響을 檢討코져 incubation media 內  $1,000 \text{ nM}$  morphine,  $100 \text{ nM}$  naloxone 또는  $1,000 \text{ nM}$  morphine +  $100 \text{ nM}$  naloxone 을 加하여 低溫處理한 各各 8例의 標本에서 實驗을 行하였다 (Fig. 2).

Table 1. Maximum binding and  $K_D$  values for saturable  $(^3\text{H})$ -morphine binding to naive and low temperature-treated brain slices of rat. Apparent  $K_D$  values and maximal binding were determined from Scatchard plots of data for each experiment (Fig. 1 and Fig. 2).

Treatment	Maximal binding (p mol/mg protein)	Apparent $K_D$ (nM)
Naive	$0.32 \pm 0.02$	$0.75 \pm 0.07$
Incubation control	$0.42 \pm 0.05$ ⓐ	$0.77 \pm 0.05$
Morphine $1,000 \text{ nM}$	$0.60 \pm 0.07$ ⓐ	$1.25 \pm 0.08$ ⓐ
Naloxone $100 \text{ nM}$	$0.74 \pm 0.06$ ⓐ	$1.28 \pm 0.09$ ⓐ
Morphine $1,000 \text{ nM}$ + Naloxone $100 \text{ nM}$	$0.40 \pm 0.05$	$1.75 \pm 0.11$ ⓐ

ⓐ: Significantly different from the value in naive group ( $p < 0.05$ )

ⓑ: Significantly different from the value in control group ( $p < 0.05$ )

低溫處理 incubation media 內 morphine 과 naloxone 存在는  $(^3\text{H})$ -morphine 의 saturable binding 을 顯著히 增加시켰으며, morphine 에 있어서의 maximal saturable binding 과  $K_D$ 値는 各各  $0.6 \pm 0.07 \text{ pmole/mg protein}$  과  $1.25 \pm 0.06 \text{ nM}$  이었고, naloxone 에 있어서는 maximal saturable binding 과  $K_D$ 値가 各各  $0.74 \pm 0.06 \text{ pmole/mg protein}$  과  $1.28 \pm 0.07 \text{ nM}$  로 對照群과 比較하여 顯著히 增加하였다. 그러나 morphine + naloxone 에 있어서는  $K_D$ 値는  $1.75 \pm 0.11 \text{ nM}$  로 顯著히 增加하였으나 maximal saturable binding 은 對照群과 비슷하였다.

Table 1은 以上の 實驗成績을 綜合한 것이다.

3) 低溫處理時 Media 內 電解質變動이  $(^3\text{H})$ -Morphine 의 Saturable Binding 에 미치는 影響

Opiates 의 saturable binding 은 檢定에 使用되는 media 內 電解質濃度에 따라 달라짐이 잘 알려져 있다<sup>5~8)</sup>. 따라서 本實驗에서는 各各 8例에서 低溫處理時 incubation media 內 電解質濃度を 變動시켜 이에 따른 morphine 의 saturable binding 變動有無를 觀察하였다 (Fig. 3).

低溫處理時 media 內  $\text{Na}^+$  減少 또는  $\text{Ca}^{++}$  增加는  $(^3\text{H})$ -morphine 의 saturable binding 에 거의 影響을 미치지 못하였으나  $\text{K}^+$  減少,  $\text{Mg}^{++}$  제거 또는  $\text{Mn}^{++}$  添加는  $(^3\text{H})$ -morphine 의 saturable binding 을 顯著히 增加시켰다 (Fig. 3).

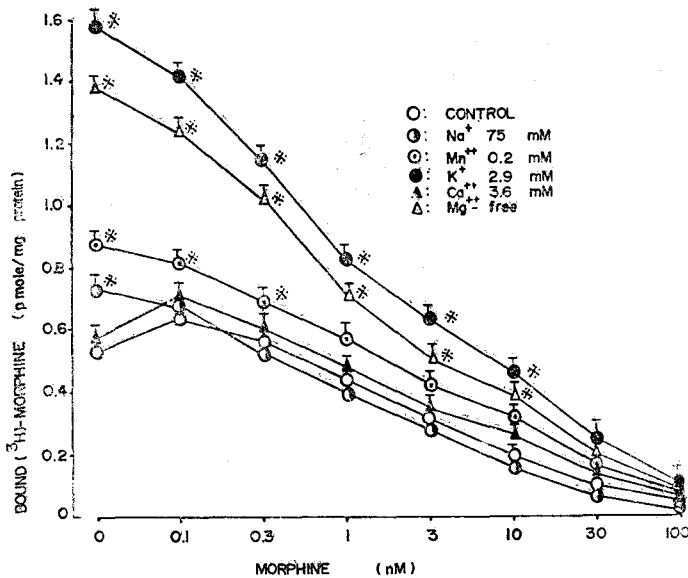


Fig. 3. Effects of electrolytes in the incubation media on the saturable binding of  $(^3\text{H})$ -morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution containing various concentrations of electrolytes as shown in the figure at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours. After the incubation period, preparations were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer containing various concentrations of nonlabeled morphine for 10 minutes. Subsequently,  $(^3\text{H})$ -morphine was added to the mixture and the binding was observed. Saturable binding is the difference of the value in each experiment and the value in  $10\ \mu\text{M}$  morphine. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in the naive group ( $p < 0.05$ ).

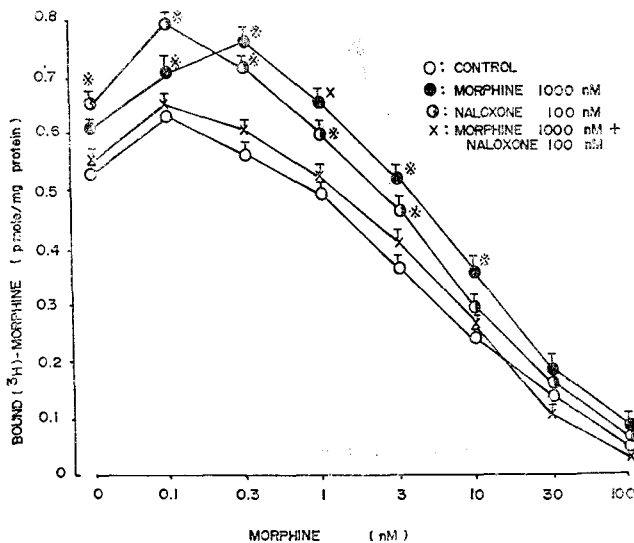


Fig. 4. Effects of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of  $(^3\text{H})$ -morphine. Preparations were incubated in the normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution in the absence and presence of 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours. After drugs were thoroughly washed out, preparations were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer containing various concentrations of nonlabeled morphine for 10 minutes. Subsequently,  $(^3\text{H})$ -morphine was added to the mixture and the binding was observed. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group ( $p < 0.05$ ).

4) 低溫處理時 Media內 電解質變動, Morphine 및 Naloxone이 (<sup>3</sup>H)-Morphine의 Saturable Binding에 미치는 影響

Normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에서의 實驗: 對照實驗으로 前述한 Fig. 2의 實驗을 各各 前項 3에서와 같이 實驗方法을 달리하여 反復하였다. 低溫處理만을 行한 對照群에서 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding은 binding media內 morphine 0.1 nM 일때 0.65±0.06 pmole/mg protein으로 가장 높았고, binding media內 morphine의 量을 增量하면 量에 따른 binding의 抑制를 일으켰다(Fig. 4).

또한 低溫處理 media內 morphine과 naloxone은 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding을 顯著히 增加시켰으나 morphine+naloxone은 거의 影響을 미치지 못하였다(Fig. 4).

한편 最高의 saturable binding은 對照群과 naloxone을 加한 群에서는 binding media內 morphine 0.1 nM에서, morphine을 加한 群에서는 binding media內 morphine 0.3 nM에서 볼 수 있었다(Fig. 4).

Na<sup>+</sup>의 影響: 各各 8例의 標本을 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone을 加하거나 加하지 않은 75 mM Na<sup>+</sup>의 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 溶液에 低溫處理하였고, 이때 Na<sup>+</sup>濃度 減少에 따른 osmolarity 減少는 sucrose로 矯正하였다.

本 實驗에서 media內 Na<sup>+</sup>濃度 減少는 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding에 별로 影響을 미치지 못하였다(Fig. 3 參照).

그러나 media內 Na<sup>+</sup>減少와 더불어 morphine을 加했을 때 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding은 顯著히 增加하였고, media內 Na<sup>+</sup>減少와 더불어 naloxone을 加했을 때 saturable binding은 對照群에 比하여 減少되었다.

한편 最高의 saturable binding은 對照群과 naloxone을 加한 群에서 binding media內 morphine 0 nM에서, morphine을 加한 群에서는 binding media內 morphine 0.1 nM에서 볼 수 있었다(Fig. 5).

K<sup>+</sup>의 影響: 各各 8例의 標本을 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone을 加하거나 加하지 않은 2.9 mM K<sup>+</sup>의 modified Krebs-Henseleit bicarbonate

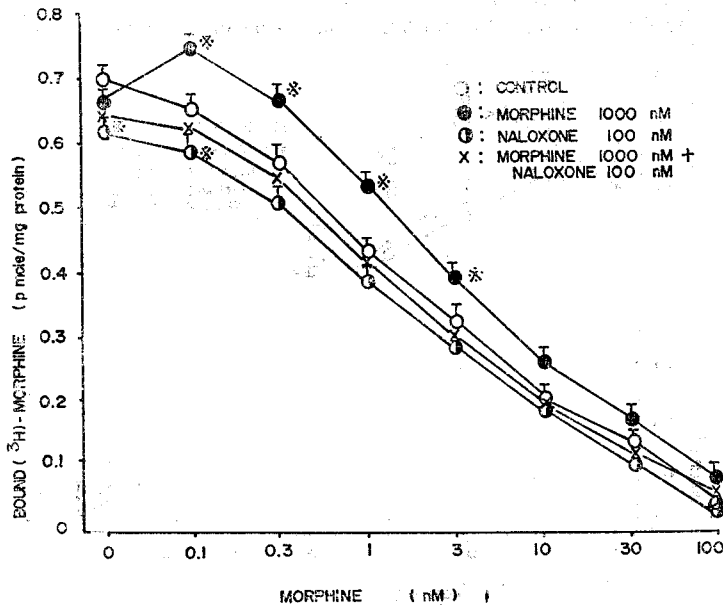
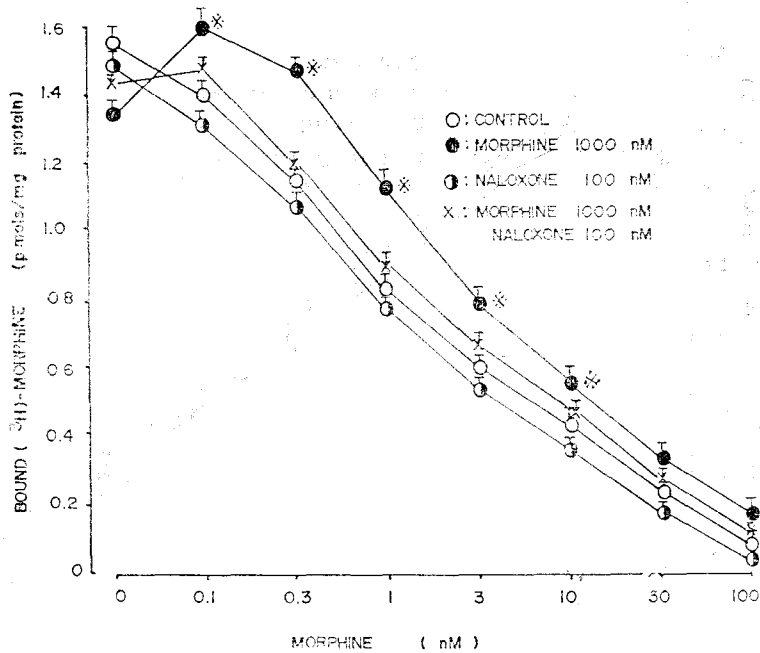


Fig. 5. Influence of Na<sup>+</sup> to the action of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which contained 75 mM Na<sup>+</sup> with or without 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at 4°C for 24 hours. Osmolarity was corrected with sucrose. (<sup>3</sup>H)-morphine binding was assayed in 50 m Tris-HCl buffer. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group(p<0.05).



**Fig. 6.** Influence of  $K^+$  to the action of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of  $(^3H)$ -morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which contained 2.9 mM  $K^+$  with or without 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at  $4^\circ C$  for 24 hours.  $(^3H)$ -morphine binding was assayed in 50 mM Tris-HCl buffer. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group ( $p < 0.05$ ).

buffer 溶液에 incubate 하여 低溫處理하였다.

本實驗中 對照群에서  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding은 顯著히 增加되었으며 (Fig. 3 參照), media 內 morphine을 加하면 saturable binding은 더욱 增加되었으나 naloxone을 加하면 抑制되는 傾向을 보였다 (Fig. 6).

한편 最高의 saturable binding을 對照群과 naloxone을 加한 群에서는 binding media 內 morphine이 없는 狀態에서, morphine을 加한 群에서는 binding media 內 morphine 0.1 nM에서 볼 수 있었다.

$Ca^{++}$ 의 影響: 各各 8例의 標本을 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone을 加하거나 加하지 않은 3.6 mM  $Ca^{++}$ 의 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 溶液에 incubate 하여 低溫處理하였다. 本實驗對照群에서  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding은 normal Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 溶液을 使用하여 低溫處理만을 行한 標本에서의 成績과 거의 비슷하였으며 media 內  $Ca^{++}$ 濃度增加와 더불어 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone

을 加한 群에서의 成績도 對照群과 거의 비슷하였다 (Fig. 7).

한편 最高의 saturable binding은 binding media 內 morphine 0.1 nM에서 볼 수 있었다.

$Mg^{++}$ 의 影響: 各各 8例의 標本을 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone을 加하거나 加하지 않은  $Mg^{++}$ 제거 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 溶液에 incubate 하여 低溫處理하였다. 本實驗의 對照群에서  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding은 對照實驗에서 보다 顯著히 增加되었으며 (Fig. 3 參照), media 內 morphine을 加했을 때 saturable binding은 더욱 增加되었다. 그러나 media 內 naloxone은 아무런 影響을 미치지 못하였다 (Fig. 8).

한편 最高의 saturable binding은 對照群과 media 內 naloxone을 加한 群에서는 binding media 內 morphine이 없는 狀態에서, media 內 morphine을 加한 群에서는 binding media 內 morphine 0.1 nM에서 볼 수 있었다.

$Mn^{++}$ 의 影響: 各各 8例의 標本을 morphine, nalo-

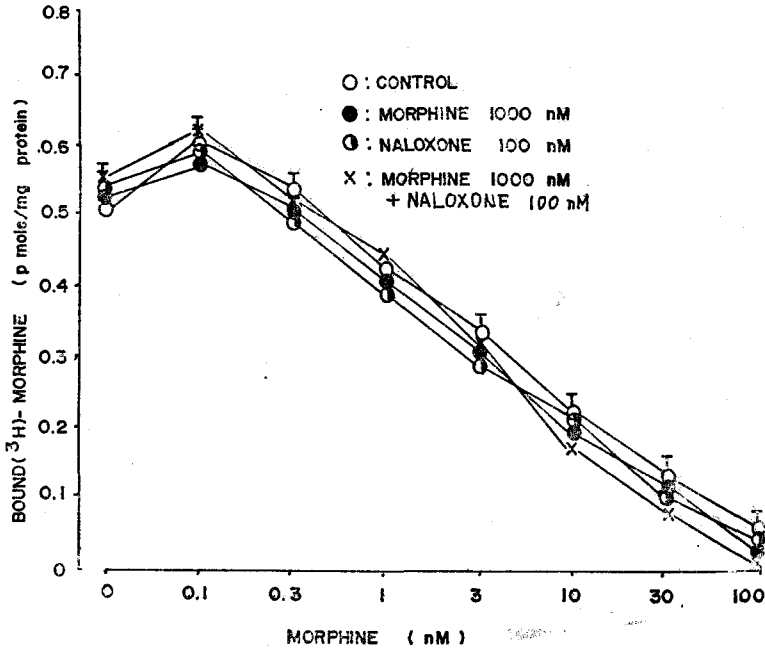


Fig. 7. Influence of  $\text{Ca}^{++}$  to the action of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of  $(^3\text{H})$ -morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which contained 3.6 mM  $\text{Ca}^{++}$  with or without 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours.  $(^3\text{H})$ -morphine binding was assayed in 50 mM Tris-HCl buffer. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group ( $p < 0.05$ ).

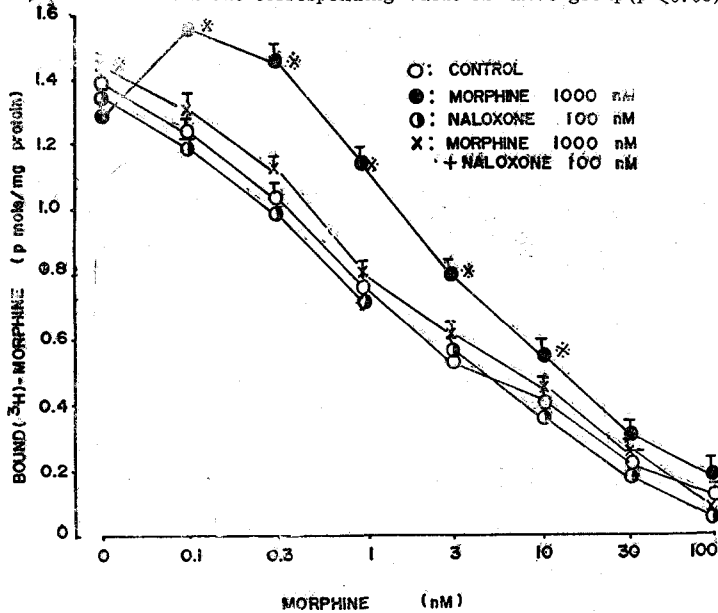


Fig. 8. Influence of  $\text{Mg}^{++}$  to the action of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of  $(^3\text{H})$ -morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which did not contain  $\text{Mg}^{++}$  with or without 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours.  $(^3\text{H})$ -morphine binding was assayed in 50 mM Tris-HCl buffer. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group ( $p < 0.05$ ).



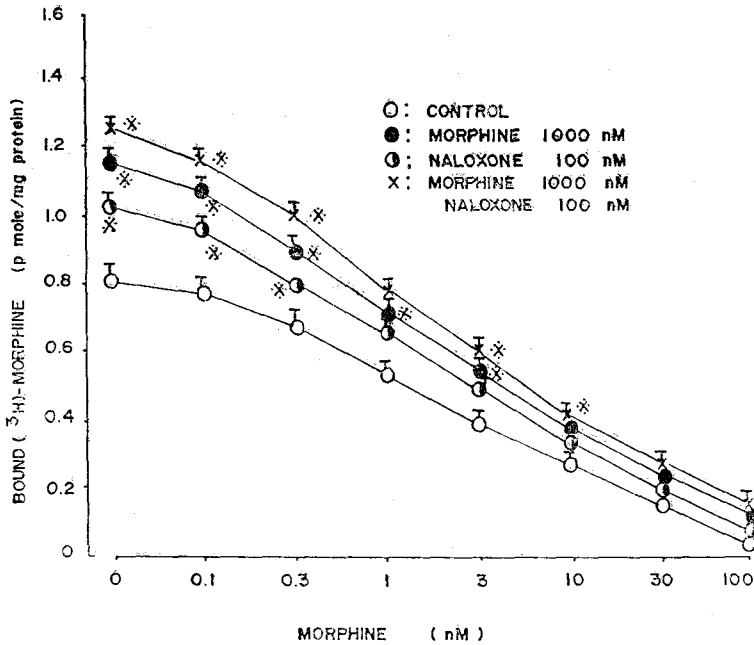


Fig. 9. Influence of  $Mn^{++}$  to the action of morphine and naloxone in the incubation media on the saturable binding of  $(^3H)$ -morphine. Preparations were incubated in the modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution which contained 0.2 mM  $Mn^{++}$  with or without 1,000 nM morphine, 100 nM naloxone or 1,000 nM morphine+100 nM naloxone at  $4^{\circ}C$  for 24 hours.  $(^3H)$ -morphine binding was assayed in 50 mM Tris-HCl buffer. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical line indicates standard error.

\*: Significantly different from the corresponding value in naive group ( $p < 0.05$ ).

xone 또는 morphine+naloxone 을 추가거나 추가하지 않은 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution에 0.2 mM  $Mn^{++}$ 을添加하고 incubate 하여 低温處理하였다. 本實驗의 對照群에서  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding은 對照實驗에 비추어 增加되었으며 (Fig. 3 參照), media내 morphine, naloxone 또는 morphine + naloxone 을 추가하면  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding은 顯著히 增加되었다(Fig. 9).

한편 最高의 saturable binding은 binding media內 morphine이 없는 狀態에서 볼 수 있었다.

以上の 實驗成績을 綜合하면 低温處理時 media內 morphine에 의한  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding 增加는 media內  $Na^+$ 減少,  $K^+$ 減少,  $Mg^{++}$ 제거 및  $Mn^{++}$ 添加로는 影響받지 않았으나,  $Ca^{++}$ 增加로는 抑制되었고, media內 naloxone에 의한  $(^3H)$ -morphine의 saturable binding 增加는  $Mn^{++}$ 添加로는 影響받지 않았으나 media內  $Na^+$ 減少,  $K^+$ 減少,  $Mg^{++}$ 제거 및  $Ca^{++}$ 增加로 抑制되었다.

## 考 按

Opiates의 saturable binding은 homogenate에서 보다 切片에서 더 잘 일어나는데 그 이유는 homogenation 過程에서 binding site의 構造가 파괴 또는 變型되거나, opiate binding에 必要한 activator 혹은 cofactor가 消失되거나, 또는 binding을 抑制하는 內在性物質의 遊離 등을 들고 있다<sup>19-22</sup>). 따라서 本實驗에서는 腦切片을 만들어 實驗하였다.

試驗管內 opiate agonists와 antagonists의 saturable binding은 이들 藥物과 藥理的 效果를 나타내는 opiate receptor와의 binding과 同一한 것으로主張되고 있는데 그 根據으로써 兩者가 다 神經組織에서만 觀察되며 藥物-受容體間的 親和力이 이들 藥物의 藥理的 効能和 密接한 相關關係를 갖고 있음을 들고 있다<sup>2,3,6,10</sup>). 따라서 本實驗에서 低温處理, media內 morphine 또는 電解質 등을 變化시켰을 때 saturable

binding이 變動됨은 이들 조건에 의하여 functional opiate receptor가 變하였다고 할 수 있다.

本實驗에서 腦切片을 低溫處理하면 nonspecific binding은 거의 影響받지 않으나 saturable binding은 正常標本과 比較하여 顯著히 增加하였고, 이때 maximal saturable binding은 增加하였으나  $K_D$ 値는 變하지 않았다. 이는 低溫處理로서 opiate receptor가 數的인 增加를 일으키나 親和力에는 變動이 없음을 말해준다. 한편 鄭等<sup>17)</sup>과 曹等<sup>18)</sup>은 guinea pig ileum을 低溫處理하면 morphine의  $ID_{50}$ 가 顯著히 減少된다 하였는데 本實驗成績은 guinea pig ileum에서의 이와같은 morphine 作用의 強化機轉을 밝혀주는 것이라 하겠다.

本實驗中 低溫處理時 media內 morphine과 naloxone은 maximal saturable binding과  $K_D$ 値를 顯著히 增加시켰다. Morphine은 電氣刺戟으로 誘發시킨 剔出腸片의 收縮을 抑制함이 잘 알려져 있다. 即 Schuman<sup>24)</sup>과 Paton<sup>25)</sup>은 電氣刺戟을 加한 guinea pig ileum에서 morphine이 acetylcholine 遊離를 減少시키며, morphine의 acetylcholine 抗遊離效果는 電氣刺戟頻度와 密接한 關係가 있다 하였으나 Cox等<sup>26)</sup>, Gyang<sup>27)</sup>等 및 Lees<sup>28)</sup>等은 諸種 narcotics의 腸片에서의 acetylcholine 遊離效果가 特殊受容體를 통한 narcotics의 agonist의 作用때문이라 하여 narcotics의 opiate receptor의 重要性을 強調하였다. 이와같은 opiate receptor는 실험조건에 따라 그 性質이 달라질 수 있음이 알려져 있다. 即 De la Lande等<sup>16)</sup>은 標本을 粉碎하거나 低溫處理, 또는 procaine 및 高濃度の  $K^+$ 을 media內에 加하면 morphine 作用이 抑制된다 하였고, 鄭等<sup>17)</sup>과 曹等<sup>18)</sup>은 guinea pig ileum에서 低溫處理時 media內 morphine이나 naloxone을 加하면 morphine으로는 morphine의 腸收縮抑制作用이 抑制되나 naloxone으로는 morphine의 腸收縮抑制作用이 強化되는데 이때 naloxone에 對한  $PA_2$ 値가 달라지지 않음을 觀察하여 opiate receptor의 數나 親和力에 變動이 없음을 示唆하였고, Davis等<sup>29)</sup>은 tolerance를 誘發시킨 標本에서 morphine의 binding이 減少됨을 觀察하여 tolerance로 因한 opiate의 作用減少는 tolerance發現으로 opiate receptor의 數는 增加되나 親和力이 減少되기 때문이라 하였다. 本實驗成績과 이들 成績과는 多少의 差異가 있는데 本實驗만으로는 그 理由를 說明할 수 없으나 몇가지 'receptor theory'를 根據로 생각해 볼 때 藥物의 最高效果는 藥物이 藥理作用을 나타내는 活性受容體의 極히 一部分을 占有

하여도 나타날 수 있다는 點<sup>29-31)</sup>, 藥効力은 藥物과 受容體間의 相對的인 親和力과 藥物과 受容體의 結合後 intrinsic activity<sup>32,33)</sup>, 또는 efficacy<sup>29)</sup>에 의하여 決定된다는 點으로 미루어 이들 差異를 說明할 수 있지 않을까 생각된다.

本實驗中 media內 電解質濃度を 變動시킨 實驗에서 media內  $K^+$ 減少,  $Mg^{++}$ 제거 또는  $Mn^{++}$ 添加는 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding을 顯著히 增加시켰으나 media內  $Na^+$ 減少 또는  $Ca^{++}$ 增加는 (<sup>3</sup>H)-morphine의 saturable binding에 거의 影響을 미치지 못하였다.

Saturable opiate binding은 細胞膜의 狀態를 變動시키거나 binding media內 電解質濃度を 變動시키면 달라짐이 잘 알려져 있다. 即 Pert等<sup>24)</sup>은  $Na^+$ 은 opiate agonist의 binding은 減少시키나 opiate antagonist의 binding은 增加시키며, 이는  $Na^+$ 에 의하여 受容體의 構造가 變型되기 때문이라 하였고, Simon等<sup>30)</sup>은  $Na^+$ 에 의한 opiate antagonist binding 增加는 opiate 受容體의 親和力이 增加되기 때문이라 하였다.  $Na^+$ 외의 電解質에 關係서도  $K^+$ 은 opiate agonist 및 antagonist binding을 減少시키고,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  및  $Ni^{++}$ 等 2價 ion에 의해서는 agonist binding은 增加되나 antagonist binding은 抑制되거나 影響받지 않음이 報告되어 있다<sup>6,14)</sup>. 本實驗成績은 이들 正常標本에서의 實驗成績과 다르며, 또한 guinea pig ileum에서 低溫處理時 media內 電解質濃도를 變動시켰을 때  $Na^+$ 減少와  $K^+$ 減少는 morphine의 腸收縮抑制作用을 強化하고  $Ca^{++}$ 增加,  $Mg^{++}$ 제거 또는  $Mn^{++}$ 添加는 morphine의 腸收縮抑制作用을 抑制한다는 報告와도 다름을 알 수 있다. 이러한 差異는 本實驗만으로 그 理由를 說明할 수 없으나 低溫處理가 opiate 受容體를 包含하여 細胞膜, 細胞內의 筋收縮기구 및 이에 關與하는 ion channel等을 廣範圍하게 變型시켜 오는 것이 아닌가 推測된다. 더욱이 opiates의 受容體와의 binding은 細胞膜의  $Ca^{++}$ 透過性을 變化시켜 藥理作用을 나타낸다는 점<sup>34-36)</sup>과 本實驗에서 低溫處理時 media內 電解質濃度變動으로 media內 morphine에 의한 saturable binding 增加가 影響받았음은 이點을 더욱 뒷받침하여 주는 것이라고 생각할 수 있다.

한편 opiates에 의한 negative cooperativity는 intact tissue에서만 觀察될 수 있는데 그 機轉은 아직도 未詳이나 本實驗에서 低溫處理時 media內 電解質濃度變動으로 消失됨은 興味있는 事實로 더욱 追求해 볼 問題이다.

要 約

電解質濃도를 달리하고 morphine, naloxone 또는 morphine+naloxone 을 추가거나 추가하지 않은 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 溶液에 흰쥐의 腦切片을 incubate 하여 低溫處理와 media 內 電解質組成이 (<sup>3</sup>H)-morphine 의 saturable binding 에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1) 低溫處理는 (<sup>3</sup>H)-morphine 의 saturable binding 을 顯著히 增加시켰고, maximal saturable binding 은 增加시키나 K<sub>D</sub> 値에는 影響을 미치지 못하였다.

2) 低溫處理時 media 內 morphine 과 naloxone 은 (<sup>3</sup>H)-morphine 의 maximal saturable binding 과 K<sub>D</sub> 値를 增加시켰다.

3) 低溫處理時 media 內 K<sup>+</sup> 減少, Mg<sup>++</sup> 제거 또는 Mn<sup>++</sup> 添加는 (<sup>3</sup>H)-morphine 의 saturable binding 을 顯著히 增加시켰고, Na<sup>+</sup> 減少, Ca<sup>++</sup> 增加는 saturable binding 에 影響을 미치지 못하였다.

4) 低溫處理時 media 內 morphine 에 의한 (<sup>3</sup>H)-morphine 의 saturable binding 增加는 media 內 Na<sup>+</sup> 減少, K<sup>+</sup> 減少, Mg<sup>++</sup> 제거 또는 Mn<sup>++</sup> 添加로는 影響받지 않았으나 Ca<sup>++</sup> 增加로 抑制되었고, media 內 naloxone 에 의한 saturable binding 增加는 Mn<sup>++</sup> 添加로는 影響받지 않았으나 media 內 Na<sup>+</sup> 減少, K<sup>+</sup> 減少, Ca<sup>++</sup> 增加 또는 Mg<sup>++</sup> 제거로 抑制되었다.

以上 實驗成績은 低溫處理 및 低溫處理時 media 內 morphine 또는 naloxone 이 opiate 受容體의 量的인 變動과 또는 親和力의 變動을 誘發하며, media 內 電解質組成이 이들 變動에 影響을 미치는 示唆한다.

REFERENCES

1) Goldstein, A., Lowney, L.I. and Pal, B.K.: Stereospecific and non-specific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1742, 1971.

2) Pert, C.B., Pasternak, G. and Snyder, S.H.: Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science(Washington)* 182:1359, 1973.

3) Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science(Washington)* 179:1011, 1973.

4) Terenius, L.: Stereospecific interaction between

narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32:317, 1973.

5) Kosteritz, H.W. and Waterfield, A.A.: In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann. Rev. Pharmacol.* 15:29, 1975.

6) Pasternak, G.W. and Snyder, S.H.: Identification of novel high affinity opiate receptor binding in rat brain. *Nature(London)* 253: 563, 1975.

7) Lee, C.Y., Stolman, S., Akera, T. and Brody, T.: Saturable binding of (<sup>3</sup>H)-dihydromorphine to rat brain tissue in vitro: Characterization and effect of morphine treatment. *Pharmacologist* 15:202, 1973.

8) Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, I.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (<sup>3</sup>H)-morphine to rat brain homogenate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:1947, 1973.

9) Kuhar, M.J., Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature(London)* 245:447, 1973.

10) Wong, D.T. and Horng, J.S.: Stereospecific interaction of opiate narcotics in binding of (<sup>3</sup>H)-dihydromorphine to membranes of rat brain. *Life Sci. Part 1. Physiol. Pharmacol.* 13:1543, 1973.

11) Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Opiate receptor binding of agonist and antagonist affected differentially by sodium. *Mol. Pharmacol.* 12: 115, 1974.

12) Hitzemann, R.J., Hitzemann, G.A. and Loh, H.H.: Binding of (<sup>3</sup>H)-naloxone in the mouse brain: Effect of ions and tolerance development. *Life Sci.* 14:2393, 1974.

13) Davis, M.E., Akera, T. and Brody, T.M.: (D-alanine<sup>2</sup>)-methionine enkephalinamide binding to rat brain slices: Difference from opiate binding and reduction by chronic morphine treatment. *Life Sci.* 23:2675, 1978.

14) Lee, C.Y., Akera, T. and Brody, T.M.:

- Effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> and Ca<sup>++</sup> on the saturable binding of (<sup>3</sup>H)-dihydromorphine and (<sup>3</sup>H)-naloxone in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther. 202:196, 1977.*
- 15) Lee, C.Y., Akera, T., Stolman, S. and Brödy, T.M.: *Saturable binding of dihydromorphine and naloxone to rat brain tissue in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194:583, 1975.*
- 16) De la Lande, I.S. and Porter, R.B.: *Factors influencing the action of morphine on acetylcholine release in the guinea pig intestine. Br. J. Pharmacol. 29:158, 1967.*
- 17) 鄭錫求, 宋熙善, 曹圭朴: *Naloxone의 効果에 미치는 電解質의 影響. 대한약리학회잡지, 17:17, 1981.*
- 18) 曹圭朴, 任哲完: *Morphine의 藥理的 作用에 關한 研究. 전북의대잡지, 6:29, 1982.*
- 19) Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.*
- 20) Hughes, J., Smith, T., Morgan, B. and Fothergill, L.: *Purification and properties of enkephalin—the possible endogenous ligand for the morphine receptor. Life Sci. 16:1753, 1975.*
- 21) Terenius, L. and Wahlström, A.: *Morphine-like ligand for opiate receptors in human CSF. Life Sci. 16:1759, 1975.*
- 22) Teschemacher, H., Opheim, K.E., Cox, B.B. and Goldstein, A.: *A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 1. Isolation. Life Sciences 16:1771, 1975.*
- 23) Cox, B.M., Opheim, K.E., Teschemacher, H. and Goldstein, A.: *A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. Life Sci. 14:615, 1974.*
- 24) Schauman, W.: *Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the intestine of guinea pig. Br. J. Pharmacol. 12:115, 1957.*
- 25) Paton, W.D.M.: *The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea pig ileum. Br. J. Pharmacol. 27:81, 1957.*
- 26) Cox, B.M. and Weinstock, M.: *The effect of analgesic drugs on the release of acetylcholine from electrically stimulated guinea pig ileum. Br. J. Pharmacol. 27:81, 1966.*
- 27) Gyang, E.A. and Kosteritz, H.W.: *Agonistic and antagonistic action of morphine-like drugs on the guinea pig isolated ileum. Br. J. Pharmacol. 27:514, 1966.*
- 28) Lees, G.M., Kosteritz, H.W. and Waterfield, W.W.: *Characteristics of morphine sensitive release of neurotransmitter substances. In: Agonist and Antagonist Action of Narcotic Analgesic Drugs. edited by Kosteritz, H.W., Collier, H.O.J. and Villareal, J.E. 142-152, Macmillan Press London, 1972.*
- 29) Stephenson, R.P.: *A modification of receptor theory. Br. J. Pharmacol. 11:379-393, 1956.*
- 29) Nickerson, M.: *Receptor occupancy and tissue response. Nature(London) 178:697, 1956.*
- 31) Ariens, E.J., van Rossum, J.M. and Koopman, P.C.: *Receptor reserve and threshold phenomena I. Theory and experiment with autonomic drugs tested on isolated organs. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 99:32, 1954.*
- 32) Ariens, E.J.: *Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 99:32, 1954.*
- 33) Ariens, E.J., van Rossum, J.M. and Simonis, A.M.: *Affinity, intrinsic activity and drug interactions. Pharmacol. Rev. 9:218, 1957.*
- 34) Guerrero-Munoz, F., Guerrero, M.L. and Way, E.L.: *Effect of morphine on calcium uptake by lysed synaptosomes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211:370, 1979.*
- 35) Harris, R.A., Loh, H.H. and Way, E.L.: *Antinociceptive effects of lanthan and cerium in nontolerant and morphine tolerant-dependent animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 196:288, 1976.*
- 36) Yamamoto, H., Harris, R.A., Loh, H.H. and Way, E.L.: *Effect of acute and chronic morphine treatments on calcium location and binding in brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 205:255, 1978.*