

백서와 기니픽의 대뇌피질에서 Opioid Kappa 수용체의 특성에 관한 연구

전북대학교 의과대학 약리학교실¹, 생화학교실² 및 신경외과학교실³
전주우석대학교 약학과⁴

김 기 원¹ · 노 혜 원² · 김 형 일³
은 재 순⁴ · 소 수 미⁴ · 조 규 박¹

= Abstract =

Characteristics of Opioid κ -Receptors in Rat and Guinea pig Cortex

Kee-Won Kim¹, Hye-Won Rho², Hyung-Il Kim³, Jae-Soon Eun⁴
Soo-Mi Soh⁴ and Kyu-Park Cho¹

*Department of Pharmacology¹, Biochemistry², Neurosurgery³
Chonbuk National University Medical School;
Department of Pharmacy⁴, Chonju Woosuk University*

In this study, we tested the influences of several κ opioid ligands on the [³H]diprenorphine binding in rat and guinea pig cortex membrane preparations. Using paradigm to block μ and δ opioid receptors with DAMGO(1 μ M) and DPDPE(1 μ M), [³H] diprenorphine labeled κ sites. Competition analysis in both rat and guinea pig cortex has shown a single population of [³H] diprenorphine binding site with different Kd values, respectively. There is a significant difference in Ki values of (-) WIN44441 and (+)WIN44441 in both rat and guinea pig cortex. Bremazocine, (-)ethylketocyclazocine, (-)cyclazocine, nor-binaltorphimine effectively inhibited the [³H]diprenorphine binding with different Ki values in rat and guinea pig cortex. U-69,593, U-50,488H and dynorphine-A(1-8) did not inhibit the [³H] diprenorphine binding in rat but in guinea pig cortex. Nor-binaltorphimine was a ligand discriminate the κ_1 and κ_2 receptor most effectively. We, also, examined the influence of Na ion and GTP γ S, a nonhydrolyzable guanine nucleotide analog, on the inhibition of [³H]diprenorphine binding by diprenorphine, (-)ethylketocyclazocine, U-69,593 and bremazocine. By the replacement of NaCl with N-methyl-D-glucamine or addition of GTP γ S, Ki values of diprenorphine were not changed and that of ethylketocyclazocine were changed significantly in both rat and guinea pig cortex. The Ki value of bremazocine was decreased by removal of Na ion, and increased by GTP γ S, however, was not changed by any one of either.

These results suggest that there are 2 kinds of subtypes of κ opioid receptor, κ_1 and κ_2 , showing different Ki values for various κ opioid ligands, also, bremazocine possess the antagonistic property at κ_2 site which is dominant subtype of κ receptor in rat cortex.

Key Words: Opioid Kappa receptor subtypes, Receptor binding, Guanine nucleotides, Na ion

* 이 연구는 93년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과임. 과제번호 931-0700-013-1

서 론

Opioid 수용체가 μ , δ 그리고 κ 의 3가지 주된 형태로 존재함을 잘 알려져 있다. 최근 수용체 동정 기법의 발전으로 새로운 형태의 수용체가 보고되고 있다. 즉, μ -수용체가 μ_1 과 μ_2 (Pasternak, 1988)로, δ -수용체가 δ_1 과 δ_2 (Rothman 등, 1984)로 각각 독특한 형태로 존재할 수 있음이 제시되고 있으며 κ -수용체에 대해서도 Zukin 등 (1988)은 [^3H]ethylketocyclazocine([^3H]EKC)의 수용체결합이 guinea pig 뇌에서는 친화력이 높은 한 종류의 결합부위가, 그리고 백서 뇌에는 두 종류 즉, 고 친화력을 가지나 밀도는 낮은 것과 친화력은 낮으나 고밀도인 두가지 결합부위가 존재하며, 고친화력을 갖는 결합부위는 arylacetamides인 U-69,593(U69)과 U-50, 488H(U50)에 대해 [^3H]EKC의 결합이 민감하게 억제됨을 관찰하여 U69에 민감한 것을 κ_1 -, 그리고 U69에 반응치 않는 것을 κ_2 -수용체로 지칭하였다. Autoradiography에 의해 밝혀진 κ -수용체 subtypes의 분포는 실험동물의 종류와 뇌내 부위별로 현저한 차이를 보이고 있는 바 guinea pig 뇌에는 주로 κ_1 -수용체가, 백서의 뇌에는 주로 κ_2 -수용체가 우세하게 존재함이 보고되었다(Zukin 등, 1988). 그런데 현재 κ_1 -수용체의 존재는 U69이라는 선택적인 agonist와 nor-binaltorphimine(nor-BNI)이라는 선택적인 antagonist가 있으므로 그 존재가 광범위하게 인정되고 있으나, κ_2 -수용체에 대해서는 선택적인 약물이 밝혀지지 않고 있다.

수용체 반응을 연구함에 있어 방사면역측정법을 이용하여 수용체의 약물에 대한 친화력 상수(Kd 또는 Ki)와 수용체 (Bmax)를 측정함은 가장 보편적이며 효과적인 방법이다. 그런데, agonist의 수용체 결합은 guanine nucleotides 또는 sodium ion에 의해 agonist의 친화력을 감소시켜 수용체 결합이 억제되나, antagonist의 수용체 결합에 대해서는 guanine nucleotides나 sodium ion이 영향을 주지 않음은 널리 알려져 있다(Childers와

Snyder, 1980; Childers, 1988). 따라서 약물-수용체 결합에 있어 antagonist를 사용함이 바람직하다는 이론적 근거가 되고 있다. 그런데, 지금까지 κ -수용체 subtypes에 관한 실험은 EKC, dynorphine, etorphine 등 이 수용체에 대한 agonist를 동위원소를 표식하여 사용하였던 바, 실험 결과의 해석에 있어 오해의 소지가 있는 것이다. 최근 Kim과 Cox(1991)는 DAMGO($1\mu\text{M}$)과 DPDPE($1\mu\text{M}$)를 사용하여 opioid μ 와 δ 수용체를 봉쇄한 백서와 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본에서 opioid μ , δ , 그리고 κ 수용체에 거의 비슷한 친화력을 갖는 nonselective opioid antagonist인 diprenorphine(DIP)의 특이 결합부위가 존재함을 보고하였다.

최근, 여타의 수용체들과 마찬가지로 opioid 수용체에 있어서도 약물과 수용체의 결합 이후의 신호전달이 G-protein을 통하여 세포내로 전달됨이 밝혀졌다. Opioid μ -수용체와 δ -수용체에 있어서는 공히 Gi 또는 Go protein을 통하여 adenylate cyclase를 억제하며, guanine nucleotides가 agonist의 수용체결합을 억제하는 것으로 보고되고 있으나(Childers, 1988), κ -수용체에 대해서는 사용 표본에 따라 그 의견이 일치되지 않고 있다(Attali 등, 1989; Polastron 등, 1990). 또한, guanine nucleotides의 영향을 받는 것으로 보고된 μ -수용체와 δ -수용체에 있어서도 Na ion의 존재 여부에 따라서 guanine nucleotides의 영향이 서로 다름(Frances 등, 1985)은 이 수용체들이 서로 다른 특성을 갖고 있음을 시사하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 백서와 guinea pig 대뇌 피질 세포막표본에서 μ -그리고 δ -수용체를 봉쇄한 상태하 [^3H]DIP의 결합에 대한 제종 κ -수용체 결합자(ligand)의 영향을 검토하였으며, κ_1 -그리고 κ_2 -수용체에 있어서 [^3H]DIP와의 경쟁에 대한 GTP γ S와 Na ion의 영향을 관찰하여 이 수용체들의 생체내 신호전달에 관한 정보를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

실험 동물로는 웅성 백서(체중 150~250 g, Sprague-Dawley)와 웅성 guinea pig(체중 250~350 g, Hartley)을 사용하였다.

백서와 guinea pig를 단두하고 그 뇌를 적출하여 얼음위에서 미리 냉각시킨 petri dish에 위치하고, 피질을 잘라내어 10배 용량의 냉각된 변형 Krebs-HEPES완충용액(25 mM HEPES, 118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, pH. 7. 4)에 넣고 Teflon glass분쇄기를 사용하여 70회전의 속도에서 분쇄, 균질화하였다. 이 균질액을 4°C, 27,000xg에서 15분간 원심하여 침전물을 얻어, 이를 20배 용량의 동일 완충액에 희석하여 얼음위에서 60분간 배양하여 수용체 결합에 영향을 줄 수 있는 내인성 물질들이 유리되도록 한다. 이 현탁액을 위와 동일한 조건에서 원심을 3회 반복하여 세척하였다. 최종 원심후 얻어진 침전물은 얼음으로 냉각한 완충액을 사용하여, 2% (W/V)의 농도로 희석하여 -70°C에 보관하여 사용하였다. Na⁺ ion의 농도를 변화시킨 실험에서는 감소된 Na⁺ ion농도만큼 수용체 결합에 영향을 주지 않는 N-methyl-D-glucamine(NMDG)으로 대체하였다. 이 상태로 보관된 세포막표본의 수용체 상태를 확인하기 위해 1개월에 1회씩, 본 실험에서 표식자로 사용할 DIP의 Kd치를 측정하여 비교하였다.

백서 또는 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본을 실온에서 용해한 후, Teflon glass분쇄기를 5회 통과시켜 얼음위에 두었다. Opioid μ -그리고 δ -수용체를 분쇄하기 위해 반응에 참여하는 모든 완충액에 각 1 μ M의 DAMGO와 DPDPE를 가하였다. 각 tube의 총 용량은 0.5 ml으로 하였으며, 약물한 농도당 3시험관을 반복측정하도록 하였다. 얼음위에 위치한 시험관에 경쟁 약물 50 μ l, 완충액 100 μ l, 세포막표본 250 μ l(300~500 μ g protein/tube)를 각각 투여하였다. 총결합량(total binding)과 비특이적 결합(non-specific binding)을 측

정하는 시험관에는 각각 경쟁약물대신 완충액 50 μ l, 또는 10 μ M naloxone용액 50 μ l를 투여하였다. 그리고 GTP γ S의 영향을 검토하는 실험에서는 완충액 100 μ l 대신 완충액 50 μ l와 50 또는 100 μ M GTP γ S 50 μ l를 투여하였다. 본 연구에서는 수용체 결합을 보다 생리적인 조건하에서 관찰하고자 변형 Krebs-HEPES완충액을 사용하여 37°C에서 행하였다. 이 시험관들을 37°C항온 수조에 옮겨서 10분간 전 배양한 후, 100 μ l의 [³H]DIP를 투여하고 20분간 배양하여, 수용체 부위에서 표식된 약물이 평형 상태가 되도록 하였다. 배양 후, 4 ml의 냉각된 완충액을 가하고, Cell Harvester (Inotech)을 사용하여 Whatman GF/B 여과지를 통한 급속 여과로 반응을 종료시켰다. 여과지는 다시 4 ml의 완충액으로 2회 더 수세한 다음, liquid scintillation vial에 옮겨 담고, 0.5 ml의 ethylalcohol로 적신후, 3 ml의 counting cocktail (Aqualuma plus, Lumac)를 가하고 잘 흔들어 균질하게 하여, Packard TriCarb liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

표본의 단백질 정량은 Lowry등(1951)의 방법으로 하였다.

[³H]Diprenorphine의 수용체 결합에 대한 경쟁 약물들의 작용은 LIGAND 프로그램(Munson과 Rodbard, 1980)을 이용하여 분석하였다. 이 프로그램은 nonlinear least-squares curve fitting algorithm을 이용한 것으로 하나 혹은 그 이상의 결합부위를 동시에 검정할 수 있는 것이며 다른 분석 방법에 비교하여 다음 몇가지 잇점을 갖고 있다. 종속변수로 특이결합량(specific binding) 대신 총결합량(total binding)을 사용하기 때문에 특이결합량을 구하기 위하여 비-특이결합량(non-specific bindings)을 제함으로써 야기될 수 있는 오차를 피할 수 있으며, 수용체 결합곡선의 양단과 중앙부의 측정치가 각각 다르게 중점이 주어지므로 곡선의 양단에서 주로 나타나는 측정치의 변이에 의한 곡선의 왜곡을 최소화 할 수 있으며, 곡선의 fitness의 적합성을 검정할 수 있으므로 곡선이 두개 이상의 기울기를 가질 때 결합에

참여하는 수용체의 수가 몇개인지 그리고 각각 친화력과 결합부위 수를 알 수 있도록 하는 점이다.

사용한 약물은 다음과 같다. [³H]diprenor-phine (Amersham, Arlington Heights, IL), (-)ethyl-ketocyclazocine, (-)cyclazocine, WIN44441-3, Win44441-2는 Sterling Winthrop(Rensselaer, NY)에서, haloperidol, U-50488H, (5a, 7a, 8b)-(-)-N-Met-N-(7-[1-pyrrolidinyl]-1-oxaspiro[4,5]-Dec-8-Yl)benzenacetamide(U-69, 593)와 GTPγS는 Sigma(St Louis, MO)에서, morphine sulfate는 Parke Davis Co. 에서, nor-binaltorphimine과 DTG는 Research Biochemical International Co.에서, 그리고 dynorphineA, DADLE, α-neo-endorphin, β-endorphin은 Peninsula Lab. 에서 구하여 사용하였다.

결 과

1) 백서와 guinea pig대뇌 피질 세포막 표본에서 [³H]DIP결합부위의 이질성

본 실험에서 DAMGO(1 μM)과 DPDPE(1 μM)를 사용하여 opioid μ와 δ수용체를 봉쇄한 백서와 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본에서 opioid μ, δ, 그리고 κ수용체에 거의 비슷한 친화력을 갖는 nonselective opioid antagonist인 DIP는 [³H]diprenorphine의 수용체 결합을 각 표본에서 억제하였다. 백서에서 DIP의 Kd치는 9.4±0.4 nM, Bmax는 372±30 fmol/mg protein이었으며, guinea pig에서는 Kd치가 1.0±0.2 nM, Bmax가 275±15 fmol/mg protein으로써, 두 표본에서의 측정치가 유의한 차이를 보였으며(p<0.05, Fig. 1 and Table 1), 각 표본에서 [³H]DIP결합에 대한 DIP의 수용체결합 억제 곡선의 분석에서 각각 한 종류의 결합부위를 갖는 것으로 나타났다(Fig. 1 and Table 1). 각 표본의 이 결합부위에서 WIN44441의 (-)isomer(WIN-3)가 (+)isomer(WIN-2)에 비하여 현저히 낮은 Ki치를 나타내었음은 이 부위가 수용체의 한 특성인 stereospecificity를 가짐을 의미한다(Table 1).

본 실험에서 opioid μ와 δ수용체를 봉쇄하였고, σ-수용체의 antagonist인 haloperidol또는 agonist인 DTG등에 의해 [³H]DIP의 결합이 전혀 영향받지 않았으므로(Table 1) 본 실험 조건하에서 [³H]DIP가 결합하는 부위는 opioid κ-수용체인 것으로 추측되었던 바, 이 결합 부위가 두 종의 실험표본에서 κ-수용체의 subtypes인 κ₁과 κ₂수용체 가운데 어느 수용체에 결합하는지 알기위하여 opioid κ₁ 또는 κ₂수용체에 친화력을 갖는 것으로 알려진 제종 opioids의 [³H]DIP 결합에 대한 효과를 검토하였다.

Table 1. Ki(nM) for displacement of [³H]DIP(0.5 nM) in the presence of DAMGO(1 μM) and DPDPE(1 μM) in rat and guinea pig cortical membranes

Displacer	Ki(nM)	
	Guinea pig	Rat
Diprenorphine	1.0±0.2	9.4±0.4
WIN44441-3 (-)-isomer)	0.3±0.01	2.0±0.1
WIN44441-2 (+)-isomer)	170±32	540±76
(-)-EKC	18.9±1.4	75.8±6.8
Bremazocine	1.7±0.1	5.2±0.4
(-)-Cyclazocine	3.4±0.4	16±3.0
nor-BNI	3.9±0.2	340±32
Morphine	770±89	380±53
Dynorphin-A	28±3	2400±300
DADLE	>10,000	2900±510
α-neo-Endorphin	>10,000	4700±930
β-Endorphin	>10,000	3060±580
U-50488H	13±1	>10,000
U-69593	28±1	>10,000
Haloperidol	>10,000	>10,000
DTG	>10,000	>10,000

Ki values were derived by the computer program LIGAND. Each value represents the mean of three independent experiments with SEM. All experiments were carried out using modified Krebs-HEPES(containing 125 mM of Na⁺).

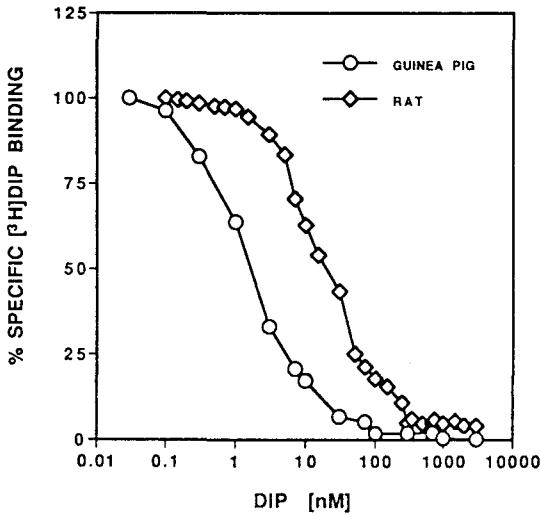


Fig. 1. Differences in binding affinity at non- μ , non- δ site(s) for [^3H]DIP, a non-selective opioid antagonist, were seen in the presence of excess amount of DAMGO and DPDPE as a blocking ligands for μ and δ opioid receptors in rat and guinea pig cortical membranes. Modified Krebs-HEPES buffer was used in these experiments.

Opioid κ_2 -수용체가 우세하게 분포되어 있는 것으로 보고된 백서 대뇌피질 세포막 표본에서 [^3H]DIP 결합억제역가의 순서는 WIN44441-3(WIN-3), bremazocine(BRM), DIP, (-)cyclazocine, (-)EKC, nor-BNI, morphine, WIN-2이었고, Dyn-A, DADLE, α -neo-endorphin 그리고 β -endorphin 등의 펩타이드들은 그 K_i 치가 $1 \mu\text{M}$ 이상이므로 이 수용체에 대한 친화력이 극히 낮음을 나타내었다. U69와 U50은 κ_1 opioid수용체에 높은 친화력을 갖는 반면, κ_2 수용체에 대해서는 친화력이 거의 없는 것으로 보고된 약물로서, κ -opioid수용체의 분류에 가장 유용하게 사용되는 것이다. 본 실험에서 U69와 U50은 백서에서는 $1 \mu\text{M}$ 정도의 농도에서도 [^3H]DIP의 수용체결합을 거의 억제하지 못하였으나, guinea pig에서는 [^3H]DIP결합을 효과적으로 억제하였다. 이는 본 실험에서 사용한 [^3H]DIP가 opioid μ 와 δ 수용체를 봉쇄한 백서와 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본에서 각각 opioid κ_1 및 κ_2 수용체를 그 결합부위로 하고 있음을 나타낸다(Table 1, Fig. 2).

한편 guinea pig 대뇌피질 세포막 표본에서는

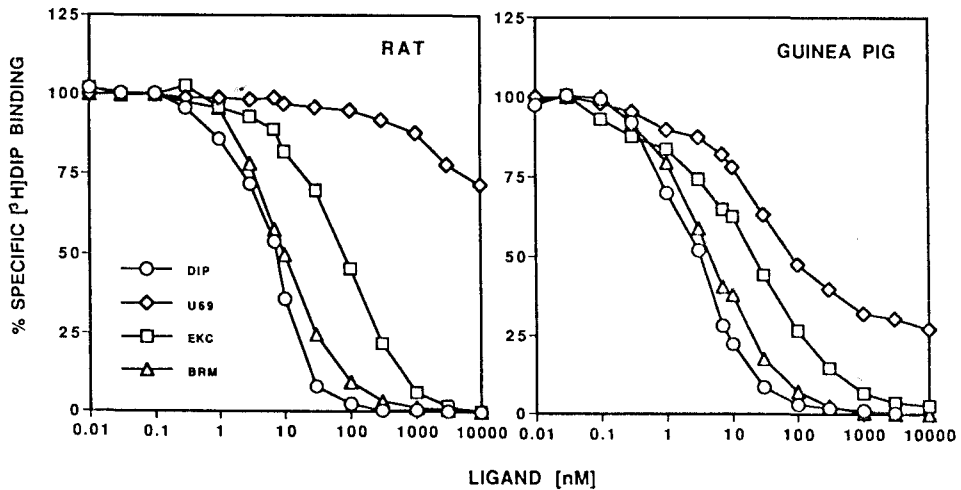


Fig. 2. Comparison of inhibitory potency of DIP, U69, a selective κ_1 agonist, BRM, a κ_1 agonist and a possible κ_2 antagonist, and EKC, a κ_1 and κ_2 agonist, on the [^3H]DIP binding in rat and guinea pig cortical membranes.

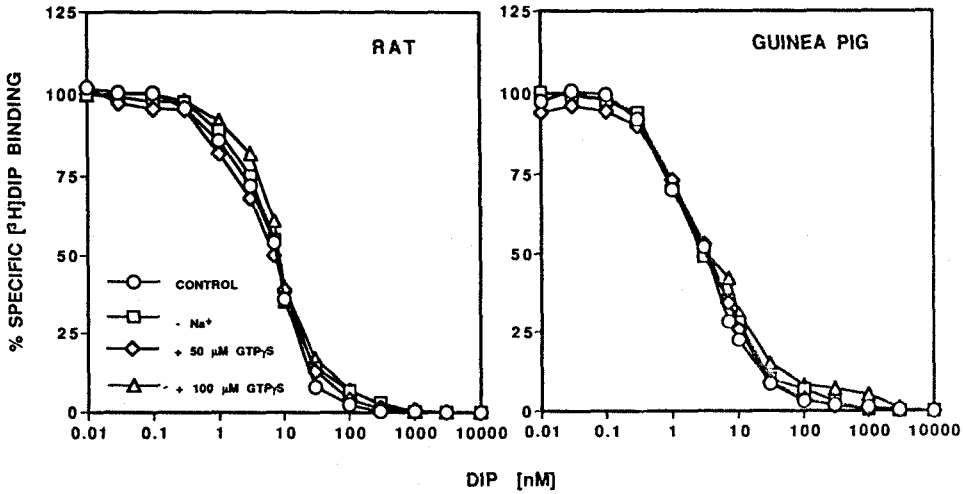


Fig. 3. Inhibitory effect of DIP on the [³H]DIP binding was not influenced by Na ion and guanine nucleotide in rat and guinea pig cortical membrane.

[³H]DIP결합억제역가의 순서는 백서의 표본에서와 비슷하였으나, 약물의 Ki치는 백서 표본에서보다 현저히 낮았다. 그런데 morphine의 경우 그 Ki치가 다른 약물과 달리 백서표본에서 그 Ki치가 더욱 낮았으며, 두 표본에서 Ki치의 가장 큰 차이를 보인 약물은 nor-BNI로서 백서 표본에서 100배 이상 높은 점은 κ_1 과 κ_2 -수용체를 구별함에 있어 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다(Table 1, Fig. 2).

2) 백서와 guinea pig 대뇌피질 세포막 표본에서 DIP, (-)EKC, bremazocine과 U69의 [³H]DIP 결합억제효과에 대한 sodium ion과 GTP γ S의 영향

(1) DIP의 [³H]DIP결합 억제효과에 대한 Na⁺과 GTP γ S의 영향: 백서에서 [³H]DIP결합 억제실험에서 배양액내 125 mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태 또는 배양액내 각 50 또는 100 μ M의 GTP γ S 존재시의 Ki치는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 3, Table 2).

Guinea pig대뇌 피질 표본에서 DIP의 Ki치는 배양액내 NaCl의 생략 또는 배양액내 각 50 또는

100 μ M의 GTP γ S 존재에 의해 변동되지 않았다(Fig. 3와 Table 3).

(2) 백서와 Guinea pig대뇌 피질 세포막 표본에서 (-)EKC의 [³H]DIP결합 억제효과에 대한 Na⁺과 GTP γ S의 영향: 백서에서 (-)EKC의 Ki치는 배양액내 125 mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서 현저히 감소되었다. 또한 배양액내 GTP γ S 50 μ M에 의해서는 영향받지 않았으나, 100 μ M에 의해서는 (-)EKC의 Ki는 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 4, Table 2).

Guinea pig 대뇌 피질 표본에서 (-)EKC의 [³H]DIP 결합억제실험에 있어서의 Ki치는 배양액내 125 mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서 현저히 감소되었다. 배양액내 각 50 또는 100 μ M의 GTP γ S에 의해서는 (-)EKC의 Ki는 대조군에 비하여 각각 유의한 증가를 보였다(Fig. 4, Table 3).

3) U69의 [³H]DIP 결합 억제효과에 대한 Na⁺과 GTP γ S의 영향: Opioid κ_2 수용체가 주로 분포하고 있는 것으로 보고된 백서 대뇌 피질 표본에서 opioid κ_1 수용체에 선택적인 친화력을 갖는 것으로 알려진 U69는 [³H]DIP 결합에 영향을 미

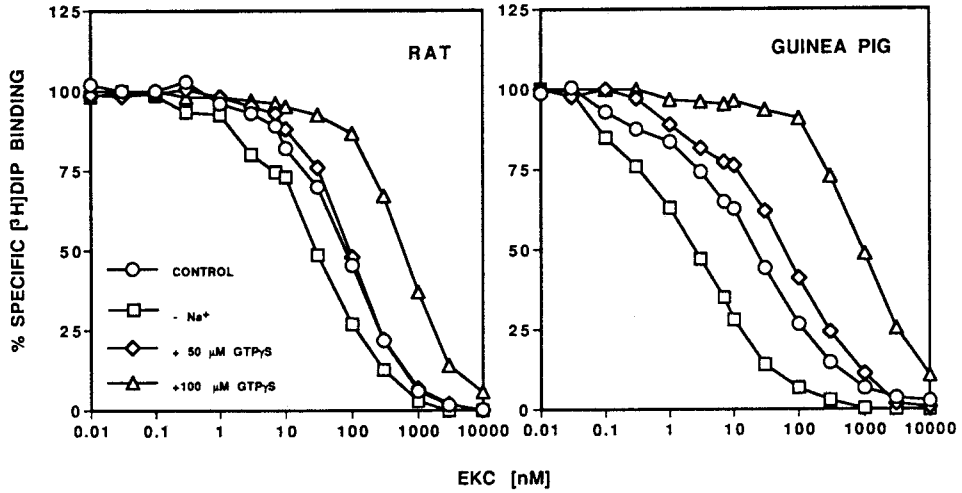


Fig. 4. Influences of Na ion and guanine nucleotide on the inhibitory potency of EKC on the [³H]DIP binding in rat and guinea pig cortical membranes.

Table 2. The effects of GTP γ S and Na⁺ on the K_i values of κ -opioids at the binding site for [³H]diprenorphine in the presence of DAMGO(1 μ M) and DPDPE(1 μ M) in rat cortex membranes

Ligands	K _i (nM)			
	Control	-Na ⁺	+GTP γ S(50 μ M)	+GTP γ S (100 μ M)
Diprenorphine	9.5 \pm 0.8	8.2 \pm 0.7	9.7 \pm 1.0	9.8 \pm 1.1
(-)EKC	75.8 \pm 6.8	40.2 \pm 3.5a	83.6 \pm 8.7	519.0 \pm 46.7a
Bremazocine	5.2 \pm 0.4	5.7 \pm 0.5	6.1 \pm 0.7	5.8 \pm 0.6
U-69, 593	>10,000	ND	ND	ND

K_i values were derived by the computer program LIGAND. Each value represents the mean of two or three independent experiments with SEM. Modified Krebs-Henseleit buffer containing 125 mM NaCl was used with GTP γ S(50 or 100 mM). For experiments in which the binding assays were conducted in sodium-free buffer, NaCl was replaced with isoosmolar N-Methyl-D-Glucamine. In each case, the data were better fit by a single-site model than by more complex model. a: Significantly different from the control value(p<0.05). ND: Not determined.

치지 못하였다. 백서에서 125mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서는 대조군에 비해서 보다 큰 정도의 [³H]DIP결합억제를 보였으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 5, Table 2).

Guinea pig 대뇌 피질 표본에서는 백서의 표본에서와 달리 U69는 [³H]DIP결합을 효과적으로 억제 (K_i = 31.5 \pm 2.3 nM) 하였으며, NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서 U69의 [³H]DIP결합

억제실험에 있어서의 K_i치는 12.0 \pm 1.5 nM으로 감소되어 친화력이 증대됨을 보였고, 배양액내 각 50 또는 100 μ M의 GTP γ S존재시 K_i치는 대조군에 비하여 각각 현저한 증가를 일으켰다(Fig. 5, Table 3).

(4) 백서와 Guinea pig대뇌 피질 세포막 표본에서 Bremazocine의 [³H]DIP결합 억제효과에 대한 Na⁺과 GTP γ S의 영향: 백서에서 배양

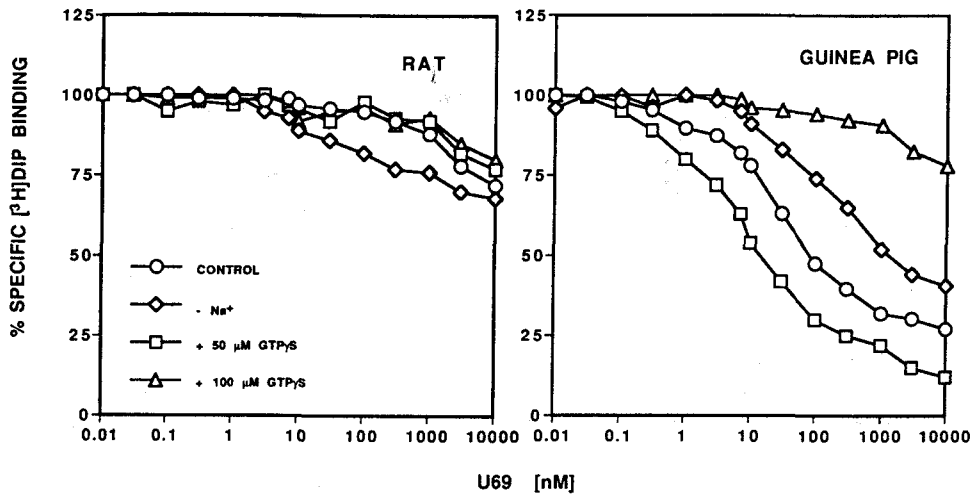


Fig. 5. Influences of Na ion and guanine nucleotide on the inhibitory potency of U69 on the [³H]DIP binding in rat and guinea pig cortical membranes.

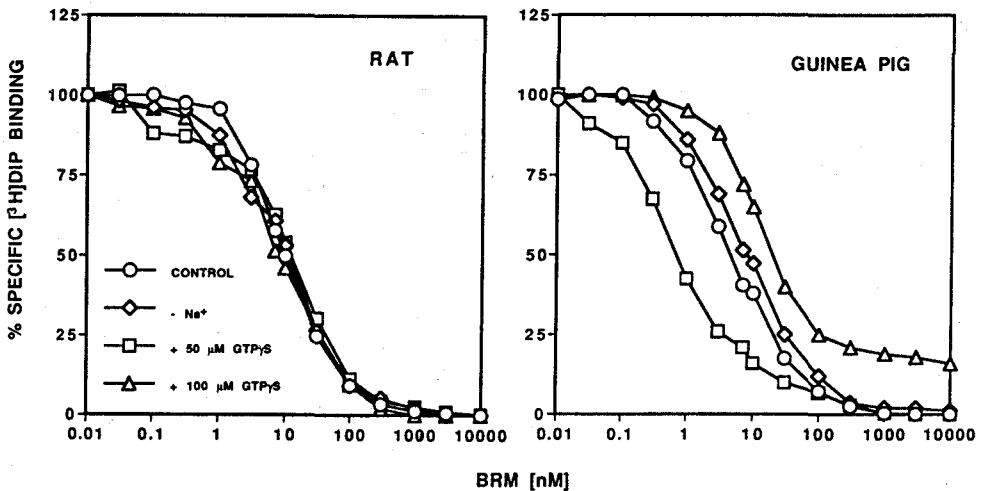


Fig. 6. Influences of Na ion and guanine nucleotide on the inhibitory potency of BRM on the [³H]DIP binding in rat and guinea pig cortical membranes.

액내 125 mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서 bremazocine의 [³H]DIP결합억제실험에 있어서의 Ki치는 변동이 없었으며, 배양액내 각 50 또는 100 μM의 GTPγS 존재시 Ki치 역시 대조군과 차이가 없었다(Fig. 6, Table 2).

Guinea pig 대뇌 피질 표본에서 배양액내 125 mM NaCl을 NMDG로 대체한 상태에서 bremazocine의 Ki치는 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, 배양액내 각 50 또는 100 μM의 GTPγS 존재시 대조군에 비하여 유의한 증가를

Table 3. The effects of GTP γ S and Na⁺ on the K_i values of κ -opioids at the binding site for [³H]diprenorphine in the presence of DAMGO(1 μ M) and DPDPE(1 μ M) in guinea pig cortex membranes

Ligands	K _i (nM)			
	Control	-Na ⁺	+GTPS(50 μ M)	+GTP γ S(100 μ M)
Diprenorphine	3.1±0.2	2.8±0.2	2.8±0.2	2.7±0.3
(-)EKC	18.9±1.4	4.8±0.5a	67.1±5.8a	845.0±56.9a
Bremazocine	1.7±0.1	0.6±0.1a	5.2±0.3a	39.8±4.0a
U-69, 593	31.5±2.6	12.0±1.5a	290.2±25.3a	1023±86.7a

Legends are the same as in the Table 2.

보여 백서 표본에서의 상이함을 보였다(Fig. 6, Table 2).

고 안

본 실험에서 opioid μ 와 δ 수용체를 봉쇄한 백서와 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본에서 [³H]DIP의 결합부위가 서로 다른 결합 특성을 보였다.

포유류의 중추신경계에는 μ , δ 그리고 κ 의 3가지 주된 형태의 opioid수용체가 존재함은 잘 알려져 있다. 그런데 최근 수용체 동정 기법의 발전과 새로운 작용 약물의 개발로 새로운 형태의 수용체가 보고되고 있는 바 μ -수용체가 μ_1 과 μ_2 (Pasternak, 1988)로, δ -수용체가 δ_1 (Rothman등, 1984)로 각각 독특한 형태가 존재함이 보고되고 있으며, κ -수용체에 대해서도 Attali등(1989)이 guinea pig와 백서의 척수에서 κ -agonist의 원형인 EKC의 수용체 결합이 μ/δ -수용체에 대한 mixed agonist인 DADLE에 의해 각각 다르게 영향받음을 관찰하여 DADLE에 민감한 것을 κ_1 , 그리고 DADLE에 의해 영향받지 않는 것을 κ_2 -수용체로 분류하였다. 그러나, 백서와 guinea pig의 척수에 opioid μ -, 그리고 δ -수용체가 존재함이 밝혀지고(Gouarderes등, 1983), guinea pig 뇌내 κ_2 -수용체가 μ 또는 δ -ligand에 민감치 않다는 보고(Tiberi와 Magnan, 1989)는 μ/δ -ligand에 대한 민감성을 지표로한 이들의 주장에 심각한 의문을 갖게 하는 것이었다. 그런데, μ - 또는 δ -수용체에

대한 고도의 선택적인 약물(DAMGO, DPDPE)들이 개발됨에 따라 이들 약물들을 반응액에 포함하여 μ - 그리고 δ -수용체를 봉쇄한 상태에서 역시 서로 다른 수용체 결합 특성을 보이므로써 κ -수용체의 subtypes의 존재에 대한 새로운 증거가 되었다(Traynor와 Rance, 1985; Zarr등, 1986). 따라서 κ -수용체 실험에 있어서 여타 수용체의 봉쇄는 필수적인 것으로 인식되었고, 이 조건하에서 Zukin등(1988)은 [³H]EKC의 수용체결합이 guinea pig뇌에서는 친화력이 높은 (K_d=0.66 nM, B_{max}=80fmol/mg of protein)한 종류의 결합체가, 그리고 백서 뇌에는 두종류 즉, 고 친화력을 가지나 밀도는 낮은 것(K_d=1 nM, B_{max}=16 fmol/mg protein)과 친화력은 낮으나 고밀도(K_d=13 nM, B_{max}=111 fmol/mg protein)인 두가지 결합부위가 존재하며, 고친화력은 갖는 결합부위는 arylacetamides인 U69과 U-50,488H에 대해 [³H]EKC의 결합이 민감하게 억제됨을 관찰하여 U69에 민감한 것을 κ_1 -, 그리고 U69에 반응치 않는 것을 κ_2 -수용체로 지칭하였다. Diprenorphine은 opioid 수용체의 세가지 주된 types 즉, μ , δ 그리고 κ -수용체에 대하여 거의 비슷한 친화력을 갖는 nonselective opioid antagonist로서 본 실험에서 μ 와 δ -수용체를 각각 충분한 용량(K_d치의 1000배)으로 두 수용체를 봉쇄한 상태에서의 DIP의 결합부위는 opioid κ -수용체인 것으로 믿어진다. 이는 본 실험에서 opioid σ -수용체의 antagonist인 haloperidol 또는 agonist인 DTG등에 의해

[³H]DIP의 결합이 전혀 영향 받지 않았던 사실로 더욱 뒷받침된다. 그리고 각 표본의 이 결합부위에서 WIN44441의 (-) isomer(WIN-3)가 (+) isomer(WIN-2)에 비하여 현저히 낮은 Ki치를 나타내었음은 이 부위가 수용체의 한 특성인 stereospecificity를 가짐을 의미한다. 그런데 각 표본에서 DIP의 Kd치가 서로 다른 두 표본의 [³H]DIP의 결합부위가 상이함을 시사하는 것이다. 이 점은 백서 표본에서 [³H]DIP수용체결합에 대한 opioid κ_1 과 κ_2 -수용체에 각각 친화력을 갖는 (-) EKC의 Ki치가 guinea pig 표본에서보다 유의하게 낮았으며, 더우기 백서에서 (-)EKC와 κ_1 opioid 수용체에 높은 친화력을 갖는 반면, κ_2 수용체에 대해서는 친화력이 거의 없는 것으로 보고(Zukin 등, 1988)된 U69이 [³H]DIP결합에 영향을 주지 못하였으나, guinea pig 표본에서는 효과적으로 억제할 수 있었음은 본 실험 조건하에서 [³H]DIP결합 부위가 백서 표본에서는 κ_2 -수용체, guinea pig 표본에서는 κ_1 -수용체를 시사하는 것이다. 이는 autoradiography에서 guinea pig 뇌에는 주로 κ_1 -수용체가, 백서의 뇌에는 주로 κ_2 -수용체가 우세하게 존재하다는 보고(Zukin 등, 1988)와 일치되는 것이다. 그런데, agonist의 수용체 결합은 guanine nucleotides 또는 sodium ion에 의해 영향받으며, antagonist의 수용체 결합에 대해서는 guanine nucleotides가 영향을 주지 않음은 널리 알려져 있다(Childers와 Snyder, 1980; Childers, 1988). 따라서 약물-수용체 결합에 있어 antagonist를 사용함이 바람직하다는 이론적 근거가 되고 있다. 그런데, 지금까지 κ -수용체 subtypes에 관한 실험은 EKC, dynorphine, etorphine 등 이 수용체에 대한 agonist를 동위원소로 표식하여 사용하였던 바, 실험결과의 해석에 있어 오해의 소지가 있는 것이다. 본 연구의 결과는 κ -수용체에 친화력을 갖고 있으며, guanine nucleotide에 의해 수용체결합이 영향받지 않는 것으로 보고(Polastron, 1990)된 opioid antagonist인 [³H]DIP의 결합이 생리적인 배양액에서도 μ -그리고 δ -수용체를 봉쇄한 상태에서 백서와 guinea pig의

대뇌피질 세포막표본에서 κ -수용체 subtypes를 구별할 수 있음을 보여주는 것이다. 그리고 nor-BNI와 dynorphin-A는 Ki치가 백서 표본에서 100배 이상 높으므로써 κ_1 과 κ_2 -수용체를 구별함에 있어 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 배양액내 sodium ion의 제거는 백서 표본에서 DIP와 BRM의 Ki치를 변화시키지 못하였으나, (-)EKC의 [³H]DIP의 수용체 결합 억제능은 강화시켰고, guinea pig 표본에서는 EKC, BRM 또는 U69의 [³H]DIP의 수용체 결합 억제능을 각각 유의하게 강화시켰다.

여러 monovalent cation들이 opioid수용체결합에 영향을 줄 수 있으나, 그중 opioid-binding site의 sodium ion에 대해 보다 민감함은 Simon 등(1973)에 의해 처음 보고되었고, 이러한 sodium ion의 효과는 주로 opioid agonist의 수용체에 대한 친화력의 감소에 의한다고 하였다(Simon 등, 1975). 이에 대한 원인으로 Blume(1978)는 agonist의 dissociation rate의 가속이라 하였으나 다른 보고들(simantov 등, 1976; Puttfarcken 등, 1986)은 신경세포막에서 opioid수용체의 수가 감소되어 초래된다고 하였다. 그런데, opioid수용체의 이질성과, 수용체조절에 있어서 mono- 또는 divalent cation들과 guanine nucleotides의 상호작용은 이러한 차이를 설명함에 있어 어려움을 주었다. 보다 최근의 보고들은 각 opioid receptor의 종류에서 sodium ion의 수용체결합에 대한 영향을 기술하였던 바, puttfarcken 등(1986)은 opioid 수용체중 δ -수용체만을 갖는 76315c세포에서 sodium ion의 [³H]etorphine의 수용체결합에 대한 효과를 관찰하였다. 이들의 보고에서 sodium ion은 opioid μ -수용체와 δ -수용체에 대한 agonist결합을 억제하나 각각 다른 기전으로 이루어짐을 보고하였다. 즉, opioid δ -수용체에 대해서는 agonist의 친화력은 변동되지 않으나 수용체의 수가 감소되어 초래된다 한 반면, opioid μ -수용체에 있어서는 수용체의 수에는 영향을 미치지 아니하고, agonist의 친화력을 감소시켜 초래된다고 하였다. Opioid δ -수용체에 대한 sodium ion의 효과는

guinea pig 소뇌 세포막 표본에서도 유사한 결과가 보고되어 있다(Werlling 등, 1986). 한편 opioid κ -수용체에 대한 sodium ion의 효과는 다른 수용체에서보다 복잡한 양상을 보인다. Mack 등(1985)은 백서 뇌에서 100 mM sodium ion에 의해서 [3H]EKC의 수용체 결합의 Kd치를 약 2.5배 증가시키고, 동시에 Bmax역시 약 1.5배 증가됨을 보고하였다. 한편, Frances 등(1985)은 guinea pig 소뇌 세포막 표본에서 sodium ion이 [3H]DIP의 수용체 결합에 대한 EKC의 경쟁실험에서 EKC의 Ki치의 유의한 증가를 일으킴을 보고하였다. 본 실험의 백서 대뇌 피질 세포막표본에서 sodium ion으로 EKC의 Ki치를 현저히 증가됨은 백서 대뇌에 있는 κ -수용체의 주된 type인 κ_2 -수용체에서 sodium ion이 수용체의 agonist에 대한 친화력을 저하시킴을 시사하는 것이다. 또한 비선택적 opioid 길항제인 DIP와 BRM의 Ki치가 변동되지 않았음은 이 수용체에서 BRM이 DIP와 같이 길항제로 작용할 수 있음을 시사하며, guinea pig 대뇌 피질 표본에서 sodium ion의 BRM의 효과에 대한 영향이 opioid κ_1 수용체의 agonist로 알려진 EKC 또는 U69와 유사한 양상을 보인점은 BRM이 수용체에서 agonist로 작용할 수 있음을 시사한다. 또한 백서에서 sodium ion이 U69의 결합이 억제되었고, EKC작용에 대한 sodium ion의 영향이 guinea pig 표본에서 더욱 현저하였던 점은 opioid κ_1 -수용체가 κ_2 수용체보다 sodium ion에 의해 더욱 민감하게 영향받음을 시사한다.

본 실험에서 GTP γ S는 guinea pig에서 EKC, BRM 그리고 U69의 Ki치를 유의하게 증가시켰고, 이와는 달리 백서에서는 BRM의 결합특성은 변동시키지 아니하였으나, EKC의 Ki치의 현저한 증가를 일으켰다.

opioid μ - 그리고 δ -수용체에 있어서 GTP와 그 유사체가 각 수용체의 agonist binding의 친화력과 결합능을 억제함은 잘 알려져 있다(Childers와 Snyder, 1980). 본 실험에서 백서와 guinea pig에서 opioid κ_1 -agonist인 U69의 수용체결합의 친화력을 감소시켰음은 GTP의 영향이 opioid μ -와 δ -

수용체에서와는 서로 다름을 보여준다. 그리고 guinea pig에서 EKC와 U69의 결합특성과 Na ion과 GTP γ S에 의한 영향이 서로 유사한 점은 이 두 약물의 작용 수용체가 동일한 것임을 시사하며 Zukin 등(1988)의 guinea pig의 대뇌에는 주로 κ_1 -수용체가 균질하게 분포되어 있다는 보고와 일치한다. 그런데, 백서와 guinea pig에서 EKC의 Ki치의 증가 정도가 저명한 차이를 보이고 있음은 opioid κ_1 과 κ_2 -수용체가 모두 GTP에 의해 영향받으나 κ_1 -수용체의 GTP에 대한 sensitivity가 κ_2 -수용체에 비하여 더욱 높은 것을 의미한다. 그리고, Na ion과 GTP γ S 존재시 백서에서는 EKC의 결합특성 변동에 있어서 상가 작용을 보이지 않았으나, guinea pig에서는 EKC와 U69의 친화력을 증가시키에 있어서 상가작용을 보였다. 이는 GTP γ S의 수용체 결합능을 확인 할 수 없었다고 한 Frances 등(1985)의 보고와 아울러 생각하면 opioid κ_1 -수용체에 있어서 Na ion의 수용체 결합특성에 대한 효과는 비경쟁적인 것으로, 그리고 GTP γ S의 효과는 경쟁적인 것으로 추측된다. 그리고 K $_2$ 수용체는 K $_1$ -수용체와 달리 GTP γ S의 영향을 전혀 받고 있지 않음을 시사하며 이같은 차이는 이들 두 수용체가 서로 다른 수용체임을 다시 확인시켜주는 것이다. 이러한 수용체의 특성 차이는 기능적인 면에서도 그 증거를 찾을 수 있는바, 백서의 척수에서 EKC 의해 adenylate cyclase의 억제를 보고한 Attali 등(1989)의 보고와 guinea pig 소뇌에서 이같은 효과를 볼 수 없었음을 보고한 Polastron 등(1990)의 보고는 두 표본에 존재하는 수용체가 서로 다른 생리적 기능을 갖고 있음을 시사한다. 한편 opioid κ_1 수용체에 대해서 agonist로 작용하며 κ_2 수용체에 대한 친화력을 갖는 것으로 보고된 BRM에 대한 guanine nucleotide analogues의 영향이 백서 대뇌 피질 표본에서는 관찰되지 않았고, guinea pig 표본에서는 opioid κ_1 수용체 agonist인 EKC 또는 U69와 비슷한 양상으로 변화됨은 최근 백서 대뇌피질 절편에서 [3H]norepinephrine유리에 있어서 BRM이 EKC의 효과를 억제한 Kim과 Cox(1993)의 보고

와 그 견해를 같이하는 것이며, BRM이 κ_1 수용체에서는 agonist로, κ_2 수용체에서는 antagonist로써 작용할 수 있음을 시사하는 생화학적 증거를 제시한 것이다. 따라서 BRM은 현재까지 그 생리적 작용이 분명치 않은 κ_2 수용체 기능연구에 유용한 도구로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Opioid수용체에는 μ , δ 그리고 κ 의 세가지 주요한 형태가 있는 것으로 알려져 있으며, 수용체 동정기법의 발달과 선택적인 약물의 개발로 각 opioid 수용체의 subtypes이 존재를 시사하는 많은 실험적 근거가 제시되어 opioid수용체의 multiplicity개념이 굳어져왔던 바, κ 수용체에 있어서도 그 subtypes, κ_1 및 κ_2 의 존재에 대한 많은 증거가 제시되고 있다. 그런데 κ_2 수용체에 대한 선택적인 agonist 또는 antagonist가 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 opioid κ_1 과 κ_2 수용체에 대한 선택적인 결합자를 모색하고, 각 수용체의 ligands결합특성에 관한 지견을 얻고자 하였다.

Opioid μ 와 δ 수용체를 각 수용체의 선택적 작용 약물인 DAMGO와 DPDPE로 봉쇄한 상태에서 [3 H]diprenorphine은 백서와 기니피크의 대뇌피질 세포막표본에서 opioid κ 수용체를 표지하였다. 경쟁적 수용체 결합실험에서 [3 H]diprenorphine은 백서와 기니피크의 대뇌피질에서 각 한 종류의 결합부위를 나타내었고, 그 Ki치가 서로 다른 이들 두가지 수용체의 subtype이 상이함을 시사한다. Bremazocine, (-)ethyketocyclazine, (-)cyclazocine, 그리고 nor-binaltorphimine등은 백서와 기니피크 대뇌피질에서 [3 H]diprenorphine의 결합을 효과적으로 억제하였으며, 그 억제 정도는 기니피크에서 더욱 현저하였다. U-69,593, U-50,488H 그리고 dynorphine A(1-8)의 [3 H]diprenorphine결합을 기니피크에서는 효과적으로 억제하였으나, 백서에서는 억제치 못하였다. 백서와 기니피크 표본에서 nor-binaltorphimine과 dynorphin A(1-8)의 Ki치는 시험한 약물 중 가장 현저한 차이를 보였다.

또한 본 연구에서 diprenorphine, (-)ethyketocyclazocine, brema-zocine 그리고 U-69,593의 [3 H]diprenorphine결합억제에 대한 Na ion과 GTP γ S의 영향을 검토하였다. 두 종의 대뇌피질표본에서 diprenorphine의 Ki치는 반응액내 Na ion의 제거 또는 GTP γ S의 투여에 의해 영향받지 않았으나, κ_1 과 κ_2 수용체의 효현제인 (-)ethylketocyclazocine 또는 U-69,593의 Ki치는 유의한 변동을 보였다. 그런데 bremazocine의 효과는 백서표본에서 Na ion제거와 GTP γ S에 의해 영향받지 않았으나, 기니피크 표본에서는 Na ion제거에 의해 강화되었고 GTP γ S에 의해 억제되었다.

본 연구에서 얻은 성적은 백서와 기니피크의 대뇌피질에는 각각 κ_1 과 κ_2 의 서로 다른 κ opioid수용체의 subtypes이 존재하며, bremazocine은 백서표본의 κ_2 수용체의 길항제로써의 특성을 갖고 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Attali B, Gouarderes C, Mazarguil H, Audigier Y and Cros J: *Evidence for multiple "kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea pig lumbosacral spinal cord. Neuropeptides 3: 53-64, 1982*
- Attali B, Saya D and Vogel Z: *Kappa and Mu-Opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterogenous desensitization in rat spinal cord. J Neurochem 52: 360-369, 1989*
- Blume A: *Interaction of ligands with the opiate receptors of brain membranes: regulation by ions and nucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1713-1717, 1978*
- Childers SR: *Opioid-coupled second messenger systems. In the Opioid Receptors(ed. GW Pasternak) Human Clifton NJ, pp123-157, 1988*
- Childers SR and Snyder SH: *Differential regulation by guanine nucleotide of opiate agonist and antagonist receptor interactions. J Neurochem 34: 583-593, 1980*
- Frances B, Moisand C and Meunier Jean-Claude: *Na⁺ ions and Gpp(NH)p selectively inhibit ago-*

- nist interactions at μ - and κ -opioid receptor sites in rabbit and guinea-pig cerebellum membranes. *Eur J Pharmacol* 117: 223-232, 1985
- Gouarderes C, Attali b, Audigier Y and Cros J: *Interaction of selective mu and delta ligands with the subtype of κ -opiate binding sites. Life Sci* 33(Suppl.1): 175-178, 1983
- Kim KW and Cox B M: *Inhibition of norepinephrine release from rat cortex slices by opioids: Differences among agonists in sensitivities to antagonists suggest receptor heterogeneity. J Pharmacol Exp Ther* 267: 1153-1160, 1993
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L and Randall RJ: *Protein measurement with Folin reagent. J Biol Chem* 193: 265-273, 1951
- Mack KJ, Lee MF and Weyhenmeyer JA: *Effects of guanyl nucleotides and ions on kappa opioid binding. Brain Res Bull* 14: 301-306, 1985
- Munson PJ and Rodbard D: *LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. Anal biochem* 107: 220-226, 1980
- Pasternak GW: *Multiple μ - opiate receptors. ISI Atlas of Science Pharmacology* 2: 148-154, 1988
- Polastron J, Boyer M-J, Quertermont Y, Thouvenot JP, Meunier J-C and Jaujac PH: *μ -Opioid-receptors and not κ -opioid receptors are coupled to the adenylate cyclase in the cerebellum. J Neurochem* 54: 562-570, 1990
- Puttfarcken P, Werling LL, Brown SR, Cote TE and Cox BM: *Sodium regulation of agonist binding at opioid receptors. I. Effect of sodium replacement on binding at Mu- and Delta-type receptors in 7315c and NG 108-15 cells and cell membranes. Mol Pharmacol* 30: 81-89, 1986
- Rothaman RB, Bowen WD, Bykov V, Schumacher UK, Pert CB, Jacobson Ae, Burke TE and Rice KE: *Preparation of rat brain membranes greatly enriched with either type-I-delta or type-II-delta opiate binding sites using site directed alkylating agents: evidence for a two-site allosteric model. Neuropeptides* 4: 201-215, 1984
- Simantov R, Snowman AM and Snyder SH: *Temperature and ionic influences on opiate receptor binding. Mol Pharmacol* 12: 977-986, 1976
- Simon EJ, Hiller JM and Edelman I: *Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [³H]etorphine to rat brain homogenate. Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1947-1949, 1973
- Simon EJ, Hiller JM, Groth J and Edelman I: *Further properties of stereoselective opiate binding sites in rat brain: on the nature of the sodium effect. J Pharmacol Exp Ther* 192: 531-537, 1975
- Tiberi M and Magnan J: *Pharmacological characterization of the binding of [³H]bremazocine in guinea pig brain: evidence for multiplicity of the κ -opioid receptors. Can J Physiol Pharmacol* 67: 1336-1334, 1989
- Traynor JR and Rance MJ: *Unexpected properties of [³H]bremazocine binding to rat lumbosacral spinal cord membranes. Br J Pharmacol* 84: 52p, 1985
- Werling LL, Brown SR, Puttfarcken P and Cox BM: *Sodium regulation of agonist binding at opioid receptors. II. Effects of sodium replacement on opioid binding in guinea pig cortical membranes. Mol Pharmacol* 30: 90-95, 1986
- Zarr GD, Werling LL, Brown SR and Cox BM: *Opioid ligand binding sites in the spinal cord of guinea-pig. Neuropharmacology* 25: 471-480, 1986
- Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM and Tempel A: *Characterization and visualization of rat and guinea pig brain κ - opioid receptors: Evidence for κ_1 - and κ_2 - opioid receptors. Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4061-4065, 1988