

Synthetic peptide를 이용한 mu-opioid receptor에 대한 항혈청의 생산과 검정

이장현 · 권영배 · 한호재*

서울대학교 수의과대학 생리학교실

전남대학교 수의과대학 생리학교실

(1998년 11월 20일 접수)

Production and identification of antisera against mu-opioid receptor using synthetic peptide epitope

Jang-hern Lee, Young-bae Kwon, Ho-jae Han*

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Nov. 20, 1998)

Abstract : In the present study we have analyzed the characteristics and distribution of the mu-opioid receptor(MOR) by raising anti-peptide antisera to the C-terminal peptide of MOR. The antisera against MOR was produced in New Zealand White rabbit against 15 residue corresponding to amino acids, 384-398 of the cloned rat MOR. The antigenic peptide was synthesized using an Applied Biosystems 432 solid-phase peptide synthesizer. The specificity and identification of the antisera were tested by analysis of transfected cells, epitope mapping and immunohistochemical method. COS-7 cells electroporated with MOR cDNA were used to evaluate the characteristics and subcellular distribution of MOR. MOR immunoreactivity was predominant in the plasmalemma and subcellular compartments such as endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and vesicle like structure. Furthermore, both tissue sections and transfected cell lines could be immunostained with these antisera and the immunoreactivity was abolished when anti-MOR sera were preincubated with the peptide against which they were raised. Based on epitope mapping analysis, all antisera appeared to have a similar epitope, which was determined to be within the last amino acid, 391-398. Moreover, immunohistochemistry showed that MOR immunoreactivity was observed in many brain areas including cerebral cortex, striatum, hippocampus, locus coeruleus and the superficial laminae of the dorsal horn.

These stained spinal cord and brain areas showed the mirrored pattern observed in auto-

이 논문은 과학재단 특정기초(95-0403-60-3) 연구비 및 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소의 지원에 의해 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Jang-hern Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

radiographic studies of mu-opioid binding as well as a pattern similar to that seen by *in situ* hybridization for MOR. Thus, several lines of evidence support the conclusion that the antisera produced in the present study most likely recognize mu-opioid receptor.

These results suggest that MOR antisera may be utilized as useful tool to analyze the physiological and pharmacological studies for mu-opioid receptor in the future.

Key words : mu-opioid receptor, rabbit antisera, immunohistochemistry, COS-7 cell, confocal microscope.

서 론

현재까지 포유동물의 신경계에서 밝혀진 opioid peptides에 대한 수용체에는 적어도 3가지 종류의 opioid 수용체 subtype들이 존재하는 것으로 추측되며 이들 3종의 opioid 수용체 subtype은 delta, mu 및 kappa-opioid receptor인 것으로 알려져 있다. 이들 각각의 opioid 수용체 subtype들은 약리학적으로 현저히 구분되는 각자의 특성을 나타내며¹, 신경전달물질의 분비조절, respiratory depression, pain modulation, neuroendocrine secretion 및 장운동의 조절 등과 같은 여러가지 생리현상들에 관여하는 것으로 밝혀져 있다^{2,3}.

생체내에서 합성되는 opioid peptides들에는 enkephalin, dynorphin A1-8, dynorphin A1-13, dynorphin A1-17 및 beta-endorphin 등이 존재하는 것으로 밝혀져 있다⁴. Proenkephalin gene에 의해 만들어지는 enkephalin은 delta opioid 수용체에 높은 선택성을 나타내며 prodynorphin gene에 의해 생산되는 dynorphin들은 kappa opioid 수용체와 높은 친화성을 나타내어 여러가지 생리학적인 현상에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵. 한편 delta나 kappa opioid 수용체와는 달리 mu opioid 수용체에 높은 친화성을 나타내는 내인성 opioid peptide에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 많으나 proopiomelanocortin gene의 활성화에 의해 생산되는 beta-endorphin과 enkephalin이 mu opioid 수용체의 내인성 opioid peptide로서 작용한다는 것이 통설이다. 특히 마약성 진통제로 알려진 morphine은 강력한 진통효과를 나타내지만 심기능의 억제, 호흡억제, 변비, tolerance 및 dependence와 같은 부작용을 동반하며 이들 부작용을 나타내는 기전에 mu-opioid 수용체가 관여하고 있는 것으로

알려져 있다⁶⁻⁸.

최근에는 수용체에 대한 동정기법의 발전과 보다 선택적인 agonist와 antagonist의 개발에 힘입어 mu-opioid 수용체에 대한 subtype이 존재하고 있음이 밝혀지고 있다. 즉, mu1과 mu2로 다시 세분되어지는 이들 mu-opioid 수용체의 subtype들은 약리학적으로 구분되어지는 특성을 나타내고 있는 것으로 밝혀져 있으나 실질적으로 이들 subtype들이 여러가지 생리학적인 현상에 어떻게 특이적으로 관여하는지에 대해서는 아직 알려져 있지 않은 실정이다^{2,9,10}.

따라서 본 연구에서는 현재까지 밝혀진 mu-opioid 수용체의 cDNA cloning data를 기초로 하여 추론한 amino acid 배열에서 높은 항원성을 나타내는 amino acid를 peptide synthesizer를 이용하여 제작하고, 이를 항원으로 이용하여 mu-opioid 수용체에 대한 항혈청을 생산하고자 하였다. 뿐만 아니라 생산된 항혈청을 면역조직화학법을 이용하여 screening 하고 성적이 우수한 항혈청을 분리하여 absorption control 및 항원의 sub-epitope을 이용하여 epitope mapping을 시도하였다. 또한 1차 screening을 마친 항혈청을 이용하여 mu-opioid 수용체를 transfection 시킨 cell line에 적용하여 생산된 항혈청의 특이성과 선택성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

항원의 설계 및 합성 : 원질의 mu-opioid 수용체에 대한 cDNA library^{11,12}를 바탕으로 MacVector 4.1.4 computer program으로 검정한 결과 높은 항원성을 나타내는 것으로 나타난 mu-opioid 수용체의 C-terminal에 위치한 15개의 peptide(NHQLNLEAETAPLP/amino acids 384-398)를

항혈청 생산을 위한 항원으로 선택하였다. 항원으로 사용한 15개의 amino acid를 Applied Biosystem 432A solid-phase peptide synthesizer를 이용하여 합성하였으며, 합성된 peptide(약 10mg/ml)를 7% glutaraldehyde(Sigma; 30 μ l/ml)로 bovine thyroglobulin (Sigma: 40mg/ml)에 conjugate 시켜 항혈청 생산을 위해 New Zealand산 토끼에 접종하였다. 접종에 사용한 항원은 0.1M의 Sorenson's phosphate buffer로 희석하여 농도가 1mg/ml이 되도록 한 다음 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

항혈청 생산을 위한 동물접종 및 항혈청의 분리동정 : New Zealand산 토끼(7마리)를 이용하여 mu-opioid 수용체에 대한 항혈청을 생산하고자 하였다. 첫 접종에는 1mg의 peptide-thyroglobulin conjugate를 동일한 양의 Freund's complete adjuvant(Difco)와 섞어서 유제화 한 후 실험동물의 복부피하에 4곳으로 나누어 주사하였다. Boosting effect를 위한 차기접종시에는 첫번째 사용한 항원량의 1/2을 동일한 양의 Freund's incomplete adjuvant에 유제화시켜 첫 접종이후 2주일이 경과한 후부터 2주간격으로 주사한다. 3회에 걸쳐 항원을 접종한 후 1주일이 경과하였을 때(총 7주 경과시) 접종한 실험동물을 보정한 후 ear vein에서 주사기를 사용하여 소량 채혈하고 혈청을 분리하여 아래와 같은 초기검정에 사용하였다. 검정결과 생산된 항혈청이 높은 역가와 특이성을 보이는 개체를 선택하여 다시 2주간격으로 위에서 기술한 방법으로 재접종하여 항혈청의 역가를 높이고자 시도하였다.

MOR transfected COS-7 cell을 이용한 항혈청의 검증 : COS-7 cell line을 이용하여 mu-opioid 수용체와 human influenza virus hemagglutinin epitope를 동시에 transfection시켜 제작한 epitope-tagged opioid receptor COS-7 cell을 Dr. Horance H. Loh(미국 미네소타 주립대학교 의과대학 약리학교실)로부터 공급받아 본 연구의 당해연도 연구결과로 생산한 mu-opioid receptor에 대한 항혈청의 specificity를 검정하였다. Coverslip상에서 배양한 transfected COS-7 cell을 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 포함한 0.1M phosphate buffer(pH 6.9)로 1시간동안 처리하여 고정하였다. 고정이 끝난 COS-7 cell은 phosphate buffer로 잔류고정액을 제거한 후 1% normal goat serum, 1% bovine serum albumin 및 0.3% Triton X-100로 비특이적인 반응을 억제하였다.

생산된 MOR에 대한 항혈청(1:5,000)과 human influenza virus hemagglutinin epitope에 대한 monoclonal antibody

(12CA5, 1:800)을 희석한 용액으로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간이상 처리하였다. 일차 항혈청의 처리가 끝난 transfected COS-7 cell은 fluorescein isothiocyanate(1:50) 또는 lissamine rhodamine과 conjugate 되어 있는 이차항체로 가시화 하였다.

Immunohistochemistry 법을 이용한 항혈청의 검증 : 체중 150~200g 정도의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 7% chloral hydrate(350mg/kg, i.p.)로 심마취시킨 후 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 포함한 0.1M phosphate buffer를 심장을 통해 주입시켜 고정한 후 brain과 spinal cord를 분리하여 절편을 제작하기 전까지 10~20%의 sucrose가 함유된 PBS에 처리하였다¹⁴. Sucrose 처리가 끝난 brain과 spinal cord는 cryotome을 사용하여 두께가 10~14 μ m 되도록 section한 후 indirect immunofluorescent histochemistry법¹⁵에 사용하였다. 생산한 항혈청을 section한 조직에 농도를 각기 달리하여(1:500~1:10,000) 처리한 후 18~24시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응을 유도하였다. 반응후 조직은 PBS를 사용하여 잔류 항혈청을 씻어낸 후 lissamine rhodamine이 conjugate 되어 있는 donkey secondary antibody(1:100, Jackson Lab. MN)을 실온에서 45분간 처리하여 반응이 일어나게 하였다. 반응을 마친 조직은 Odyssey Laser Confocal Microscope system을 이용하여 면역염색성 여부를 관찰하고, 관찰결과가 지금까지 ligand binding autoradiograph법 및 *in situ* hybridization법을 이용해 밝혀진 이들 mu-opioid receptor의 ligand binding site와 transcription site의 분포도와 비교하였다. 또한 immunohistochemistry에 사용한 항혈청을 조직에 처치하기 전에 항원으로 사용했던 synthetic peptide를 실온에서 1시간동안 전처리한 후 위에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 absorption control로 이용하였다.

Epitope mapping : 항원의 sub-epitope을 이용하여 본 실험에서 생산된 항혈청이 항원의 어떤 부위를 항원으로 하여 생산되었는지의 여부를 검정하기 위해서 항원으로 사용한 peptide를 다음과 같이 3가지 sub-epitope로 분리하여 제작하여 본 실험의 epitope mapping에 사용하였다(1)NHQLENL, 2)ENLEAET 및 3)AETAPLP]. 앞서 설명한 바와 같이 생산한 항혈청을 조직에 처치하기 전에 각각의 sub-epitope를 항혈청과 실온에서 1시간동안 반응시켜 absorption 반응이 일어나도록 하였다. Absorption 반응이 끝난 항혈청을 조직에 처치하고 위에서 기술한 것과 동일한 방법으로 각각의 subepitope에 대해 얼마나

absorption 되었는지의 여부를 면역조직화학법으로 검증하였다.

결과의 분석 : 실험에 사용한 조직 및 transfected COS-7 cell은 면역조직염색이 완료된 후 Bio-Rad MRC-1024 Confocal Imaging System(Bio-Rad Microscience Division)를 이용하여 고해상도의 영상을 수집하여 분석에 사용하였다. 수집한 영상들은 digital image analysis system(Meta-Morph, Universal Imaging Co.)을 이용하여 분석하였다.

결 과

Epitope-tagged opioid receptor의 세포내 분포 : Transfected COS-7 cell 내에서 관찰되는 mu-opioid 수용체에 대한 immunoreactivity(MOR-ir)는 Fig 1B에서 보는 바와 같이 plasmalemma 상에서 주로 관찰되었다. 뿐만 아니라 endoplasmic reticulum과 Golgi apparatus와 같은 subcellular component들에서도 면역염색성을 관찰할 수 있었다. 또한 Dr. Loh로부터 공급받은 transfected COS-7 cell의 전체 약 5% 정도에서만 MOR-ir을 나타내는 것으로 관찰되었으며 MOR-ir을 관찰할 수 있었던 모든 세포에서는 TAG-immunoreactivity(TAG-ir)을 관찰할 수 있어 동일세포에서 MOR과 TAG를 동시에 발현한 것을 확인할 수 있었다. TAG-ir의 염색성 경향은 MOR-ir의 염색성 경향과 동일하게 관찰되었다(Fig 1A와 1B). 뿐만 아니라 MORTAG COS-7 cell에 MOR에 대한 항혈청을 처치하기 전에 면역에 사용했던 항체로 absorption 시켰을 경우 TAG-ir은 영향을 받지 않았지만 MOR-ir은 완전히 없어짐을 관찰할 수 있었다(data not shown).

Epitope Mapping : 본 연구에서 생산한 MOR에 대한 항혈청이 혈청생산에 항원으로 사용한 synthetic peptide의 어떤 부분에 의해 생산되었는가를 검증하기 위해서 epitope mapping법을 이용하였다. 항원으로 사용한 peptide를 서로 조금씩 중복되도록 peptide synthesizer로 제작한 subepitope(1) NHQLENL, 2) ENLEAET 및 3) AETAPLP)과 항혈청을 조직에 처치하기 전에 실온에서 반응시킨 후 조직에 처치하였다. Fig 2에서 보는 바와 같이 amino acid 384-390(Fig 2A ; NHQLENL) 및 388-393(Fig 2B ; ENLEAET)을 이용하여 MOR 항혈청을 전처리하였을 경우에는 $10^{-3}M$ 에서도 MOR에 대한 항혈청의 염색성이 영향을 받지 않았다. 하지만 amino acid 391-398을 이용하여 전처리하였을 경우 $10^{-6}M$ 에서도 MOR에 대한 항혈청의 염

색성이 완전히 차단되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 2C). 따라서 본 실험에서 생산한 MOR에 대한 항혈청은 amino acid 391-398 사이의 5-8개의 amino acid를 epitope로 하여 생산된 것으로 생각된다.

mu-opioid 수용체의 세포내 분포도 : 흰쥐의 중추신경계의 신경세포내에서 관찰되는 MOR-ir의 분포는 신경세포의 위치와 종류에 따라 다양한 형태로 관찰되었다(Fig 3A~C). Spinal cord dorsal horn의 superficial layer에서 주로 관찰되었던 신경세포내의 MOR-ir은 대부분 신경세포체(perikaryon)의 세포막(Fig 3A, arrows)에서 관찰되었으며 경우에 따라서는 dendrite 부분에서도 염색성을 관찰할 수 있었다(Fig 3A, arrowheads). 반면 fasciculus retroflexus(Fig 3B, arrowhead), medial optic tract(Fig 3B, arrow) 및 sciatic nerve(Fig 3C)에서 관찰되는 MOR-ir은 대부분 axon에 한정되어 관찰되었다. Fig 3B에서 보는 바와 같이 실험동물에서 enucleation을 실시하여 medial optic tract의 한쪽 목적장기를 제거시켰을 경우 정상적인 쪽(목적장기를 가지고 있는 medial optic tract)과 enucleation을 시술한 쪽을 비교해보면 enucleation에 의해 한쪽의 medial optic tract내의 MOR-ir이 상실되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 3B, open arrow). 뿐만 아니라 sciatic nerve를 수술적으로 절찰 하였을 경우에도 절찰후 시간이 경과함에 따라 MOR-ir이 절찰부위에 축적되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig 3C).

중추신경계내의 MOR-ir 분포도 : Spinal cord dorsal horn의 superficial layer에서 MOR에 대한 강한 면역염색성을 나타내는 신경 network을 관찰할 수 있었다(Fig 4A). 이 신경 network에서 관찰되는 MOR-ir은 Fig 3A에서 보는 바와 같이 신경세포의 세포체를 구성하고 있는 세포막과 dendrite에서 주로 관찰되며, 신경세포의 varicosity에서도 관찰되었다(data not shown). Dorsal rhizotomy를 시술하였을 경우 시술한 쪽의 spinal cord내의 신경세포 varicosity에서 관찰되었던 MOR-ir은 현저히 감소하였지만(Fig 4B, arrows), 이 부위의 신경세포 perikaryon 상에서 관찰되던 염색성에는 영향을 미치지 못하였다(Fig 4B). 뿐만 아니라 dorsal root ganglion내에서도 MOR에 대한 면역염색성을 나타내는 신경세포의 세포체를 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 사실로 미루어 볼 때 spinal cord superficial dorsal horn에서 관찰되는 MOR에 양성을 나타내는 axon의 대부분은 dorsal root ganglion에서 유래된 것으로 보인다.

Fig 4C와 D에서 보는 바와 같이 striatum과 subcallosal streak에서도 patch 형태의 MOR에 대한 강한 면역염색 반응을 관찰할 수 있었으며 patch 형태의 MOR-ir 이외의 부분에서도 약하기는 하지만 MOR에 대한 면역반응을 나타내었다(Fig 4C). Patch 형태의 MOR-ir은 대체로 striatum의 rostral-lateral portion에서 강하게 관찰되었으며 이러한 현상은 *in situ* hybridization 법에 의해 지금까지 밝혀진 MOR mRNA의 분포성향과 일치한다. Patch내의 MOR-ir을 고배율로 관찰한 결과 MOR에 대해 면역염색 반응을 보이는 작고 미세한 vesicle들이 patch 내에서 관찰되었다(Fig 4D). 이외에도 nucleus accumbens와 island of Calleja에서도 MOR-ir을 관찰할 수 있었다(data not shown).

Habenular nucleus의 lateral portion에서 MOR에 대한 강한 면역염색반응이 관찰되었다(Fig 5A). 이 부위의 MOR-ir은 고배율로 관찰한 결과 앞서 striatum내의 patch에서 관찰할 수 있었던 것과 동일하게 MOR에 강한 면역반응을 보이는 미세한 vesicle들로 구성되어 있었다(Fig 5B, arrowheads). 뿐만 아니라 habenular nucleus의 꺾외곽에서는 신경세포체의 plasmalemma상에서도 강한 면역염색 반응을 관찰할 수 있었다(Fig 5B, arrow). Locus coeruleus에서도 지금까지 *in situ* hybridization법에 의해 밝혀진 MOR mRNA의 분포도와 동일한 양상의 MOR-ir을 관찰할 수 있었다(Fig 5C). 뿐만 아니라 interpeduncular nucleus에서도 MOR에 대한 면역염색반응을 관찰할 수 있었으며 특히 interpeduncular nucleus의 caudal subnucleus내에는 강한 면역반응을 나타내었다(Fig 5D).

고 찰

최근에 들어 흰쥐의 중추신경계에 존재하는 mu-opioid 수용체에 대한 cloning data가 발표된 이후^{12,16}, *in situ* hybridization 법을 이용하여 중추신경계내의 mu-opioid 수용체 mRNA의 분포가 보고되었으며^{13,17,18}, 이들 mu-opioid 수용체의 분포도는 앞서 밝혀진 ligand binding autoradiograph법에 의한 mu-opioid receptor의 binding site에 대한 분포성향과 잘 일치하는 것으로 알려져 있다^{12,13,16}.

본 연구에서 생산한 MOR에 대한 항혈청은 지금까지 밝혀진 MOR의 cDNA data를 바탕으로 C-terminus쪽 마지막 15개의 amino acid와 일치하는 synthetic peptide를 항원으로 이용하여 생산하였다. 생산된 항혈청은 tissue section과 transfected cell line에 성공적으로 면역염색반응

을 나타내는 것으로 검증되었으며, 이러한 면역염색반응은 동물접종에 사용하였던 항원과 전처치함으로써 완전히 제거시킬 수 있었다. 또한 epitope mapping 결과에서 나타난 바와 같이 생산한 항혈청은 MOR의 C-terminus 쪽 마지막 5~8개의 amino acid에 높은 친화성과 특이성을 나타내었다. 뿐만 아니라 면역조직염색법을 이용하여 실험동물의 중추신경계내의 MOR에 대한 면역반응을 조사한 결과도 autoradiograph 법을 이용하여 얻은 mu opioid binding site와 *in situ* hybridization 법에 의한 MOR mRNA의 발현경향과 완전히 일치하는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험결과 미루어 본 연구에서 생산한 항혈청은 mu-opioid receptor에 대해 높은 특이성과 선택성을 나타내는 것으로 검증되었다.

생산된 항혈청을 이용하여 MOR의 신경세포내 분포도를 조사하였던 바 대부분의 MOR에 대한 면역염색반응은 신경세포의 세포체와 dendrite에서 관찰되었다. 그러나 신경세포의 세포체에서 관찰되는 MOR의 분포양상은 신경세포의 종류와 분포되어 있는 위치에 따라서 다양한 형태로 나타났다. 예를 들어서 spinal cord dorsal horn의 superficial layer에서 관찰되는 MOR-ir은 대부분 신경세포체의 plasmalemma 상에 위치하고 있는 반면 cerebral cortex나 locus coeruleus와 같은 brain nuclei에서 관찰되는 MOR에 대한 면역염색반응은 신경세포체의 subcellular component들에서 관찰되었다. 이러한 차이를 나타내는 기전에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없으나 receptor의 turnover rate, trafficking mechanism 및 internalization의 현상에서 기인되는 것으로 추측된다.

신경계 내에서 관찰되는 MOR의 axonal transport 현상은 dorsal root ganglion에서 spinal cord dorsal horn의 superficial layer¹⁹ 및 accessory medial optic tract²⁰ 등에서 보고된 바 있다. 본 실험에서도 spinal cord dorsal horn에서 varicose fiber 내에 미세한 vesicle 모양의 MOR-ir을 관찰할 수 있었으며, dorsal rhizotomy 이후 dorsal horn의 superficial layer에서 관찰되던 MOR-ir이 현저히 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라 sciatic nerve를 수술적으로 결찰하였을 경우 결찰부위를 중심으로 MOR-ir이 축적되었으며, unilateral enucleation에 의해 한쪽의 medial optic fiber의 MOR-ir이 소멸되는 현상도 관찰되었다. 한편 대부분의 경우 axon 내에서 관찰되는 MOR-ir은 axolemma의 표면에서 관찰되지 않고 vesicle 형태로 관찰되는 것으로 미루어 세포체내에서 합성된 MOR이 vesi-

cle의 형태로 axon의 말단이나 목적장기로 수송되는 것으로 추측된다.

생산된 항혈청을 이용하여 관찰한 중추신경계내의 MOR-ir의 분포도는 지금까지 밝혀진 mu-opioid에 대한 ligand binding autoradiograph 법을 통해 밝혀진 중추신경계내의 mu-opioid 수용체의 분포부위인 caudate putamen, thalamus, interpeduncular nuclei, locus coeruleus, nucleus of the solitary tract 및 spinal cord의 dorsal horn 등에서 높은 밀도로 관찰되었다²¹⁻²³. 특히 mu-opioid 수용체가 높은 binding density를 나타내는 부위들은 포유동물의 신경계 내에서 sensorimotor integration, pain modulation 및 tolerance 현상 등과 밀접하게 관계되어 있음을 강력히 시사하고 있다^{24,25}.

Spinal cord dorsal horn의 superficial layer에서의 MOR-ir은 대부분 신경세포의 세포체와 dendrite에서 관찰되었으며 dorsal rhizotomy 이후에 이들 MOR-ir이 현저히 감소하는 것으로 보아 이들 대부분은 dorsal root ganglion에서 유래되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 dorsal rhizotomy를 실시하고 난 후에도 잔류하는 MOR-ir이 있는 것으로 미루어 spinal cord 내의 mu-opioid receptor는 dorsal root ganglion에서 유래하는 presynaptic site와 spinal cord 내에 존재하는 신경세포의 세포체나 dendrite와 같은 postsynapse에 모두 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 spinal cord 내의 MOR은 primary afferent fiber의 신경 전달물질의 분비를 조절할 뿐만 아니라 spinal cord 내에 위치하고 있는 dorsal horn neuron의 반응을 조절하는데에도 관여할 것으로 사료된다. 이러한 결과는 이미 알려

진 수많은 약리학 및 전기생리학적인 실험결과들과 일치하고 있다²⁶⁻²⁹.

결론

본 연구에서 생산한 mu-opioid receptor(MOR)에 대한 항혈청은 지금까지 밝혀진 MOR의 cDNA data를 바탕으로 MOR의 C-terminus쪽 마지막 15개의 amino acid와 일치하는 synthetic peptide를 항원으로 이용하여 생산하였다. 생산된 항혈청의 특이성과 선택성 및 역가를 검증하기 위해 tissue section과 transfected cell line을 이용한 분자생물학적인 방법과 면역조직염색법을 통해 조사하였던 바 생산된 MOR 항혈청은 조직과 배양세포에 존재하는 MOR을 선택적으로 감지하는 것을 알 수 있었다. 또한 epitope mapping 결과에서 나타난 바와 같이 생산한 항혈청은 MOR의 C-terminus쪽 마지막 5~8개의 amino acid에 높은 친화성과 특이성을 나타내었다. 뿐만 아니라 면역조직염색법을 이용하여 실험동물의 중추신경계 내의 MOR에 대한 면역반응을 조사한 결과도 기존에 밝혀진 autoradiograph 법을 이용하여 얻은 mu opiod binding site 및 *in situ* hybridization 법에 의한 MOR mRNA의 발현경향과 완전히 일치하는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험결과 미루어 본 연구에서 생산한 항혈청은 mu-opioid receptor에 대해 높은 특이성과 선택성을 나타내는 것으로 검증할 수 있었으며 이러한 MOR에 대한 우수한 항혈청을 바탕으로 앞으로 진행될 MOR의 세포생물학적인 기능을 밝히는데 유용하게 이용되리라 사료된다.

Legends for figures

- Fig 1. Testing of MOR antisera specificity on transfected cells. Immunofluorescence confocal images of COS-7 cells transfected with MORTAG. MORTAG cells were stained with anti-Human Agglutinin epitope(A) or anti-MOR antisera(B).
- Fig 2. Epitope mapping of MOR antisera. The MOR antisera were pre-treated with epitopes of MOR: amino acid 384-390(A), 388-393(B), and 391-398(C).
- Fig 3. Cellular localization of MOR-ir in the central nervous system and the sciatic nerve: Sections of spinal cord(A), midbrain(B) and sciatic nerve(C) stained with anti-MOR using immunofluorescence as visualized by confocal microscopy.
- Fig 4. Distribution of MOR-ir in the spinal cord(A and B) and striatum(C and D). (A) Immunofluorescent confocal images of the dorsal horn stained with anti-MOR. (B) Seven days after a unilateral dorsal rhizotomy, a reduction of the labeling was apparent on the ipsilateral side. (C) MOR-ir was abundant within patches as well as in the subcallosal streak. A fine punctate labeling as well as a more diffuse labeling were seen in the patches at higher magnification(D).

Fig 5. Localization of MOR-ir in habenular nucleus(A and B), locus coeruleus(C), and interpeduncular nucleus(D). Confocal images of coronal sections stained with anti-MOR.

Fig 1.

Fig 2.

Fig 3.

Fig 3.

Fig 4.

Fig 5.

참 고 문 헌

1. Lutz LA, Pfister HP. Opioid receptors and their pharmacological profiles. *J Receptor Res* , 12:267-286, 1992.
2. Pasternak GW. Multiple mu opiate receptors. *ISI Atlas of Science, Pharmacology* , 2:148-154, 1988.
3. Herz A. *Handbook of experimental pharmacology, opioids II* , Berlin, Springer.
4. Simon EJ. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Medical Res Rev* , 11:357-374, 1991.
5. Corbett AD, Paterson SJ, Kosterlitz HW. Selectivity of ligands for opioid receptors. Springer-Verlag, *Handbook of experimental pharmacology* , Opioid I, Berlin : 645-679.
6. Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, *et al.* Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* , 246:950-955, 1988.
7. Porreca F, Mosberg HI, Hurst R, *et al.* Roles of mu, delta, and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot plate analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* , 230:341-348, 1984.
8. Russell RD, Chang KJ. Alternated delta and mu receptor activation : A stratagem for limiting opioid tolerance. *Pain* , 36:381-389, 1989.
9. Wolozin BL, Paternak GW. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* , 78:6181-

- 6185, 1981.
10. Pasternak GW, Wood PL. Multiple mu opiate receptors. *Life Sci*, 38:1889-1898, 1986.
 11. Herrero JF, Headley PM. The effects of sham and full spinalization on the systemic potency of mu- and kappa-opioids on spinal nociceptive reflexes in rats. *Br J Pharmacol*, 104:166-170, 1991.
 12. Fukuda K, Kato S, Mori K, et al. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta and mu subtypes. *Febs Lett*, 327:311-314, 1993.
 13. Thompson RC, Mansour A, Akil H, et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron*, 11:903-913, 1993.
 14. Lee JH, Beitz AJ. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture. *Pain*, 52:11-28, 1993.
 15. Coons AH. Academic Press, New York, *Fluorescent antibody methods*. In *General cytochemical methods*: 399-422.
 16. Chen Y, Mestek A, Liu J, et al. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol*, 44:8-12, 1993.
 17. Delfs JM, Kong H, Mestek A, et al. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain, an *in situ* hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol*, 345:46-68, 1994.
 18. Mansour A, Fox CA, Thompson RC, et al. Mu-opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res*, 643:245-265, 1994.
 19. Laduron PM, Castel MN. Axonal transport of receptors. A major criterion for presynaptic localization. *Ann NY Acad Sci*, 604:462-469, 1990.
 20. Giolli RA, Blanks RH, Torigoe Y, et al. Opioid receptors in the accessory optic system of the rat: effects of monocular enucleation. *Vis Neurosci*, 5:497-506, 1990.
 21. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, et al. Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci*, 7:2445-2464, 1987.
 22. Tempel A, Zukin RS. Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:4308-4312, 1987.
 23. Mansour A, Watson SJ. Anatomical distribution of opioid receptors in mammals: an overview. In: *Handbook of experimental pharmacology, Opioids I* (Herz A., ed), Berlin, Springer-Verlag:79-102, 1993.
 24. Mulder AH, Schoffelmeer ANM. Multiple opioid receptors and presynaptic modulation of neurotransmitter release in the brain. In: *Handbook of experimental pharmacology. Opioids I*(Herz A. ed), Berlin, Springer: 125-144, 1993.
 25. Mulder AH, Hogenboom F, Wardeh G, et al. Morphine and enkephalins potently inhibit [³H]noradrenaline release from rat brain cortex synaptosomes: further evidence for a presynaptic localization of mu-opioid receptors. *J Neurochem*, 48:1043-1047, 1987.
 26. Dong XW, Parsons CG, Headly PM. Effects of intravenous mu and kappa opioid receptor agonists on sensory responses of convergent neurons in the dorsal horn of spinalized rats. *Br J Pharmacol*, 103:1230-1236, 1991.
 28. Glaum SR, Miller RJ, Hammond DL. Inhibitory actions of delta 1 and delta 2, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 14:4965-4971, 1994.
 29. Grudt TJ, Williams JT. mu-opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea pig and rat. *J Neurosci*, 14:1646-1654, 1994.