

## MK-801 투여에 의한 몰핀의존성랫드 뇌선조체중 도파민신경전달물질의 변화

이선희\* · 신대섭 · 이덕주 · 유영아 · 류승렬 · 김대병 · 이종권 · 김부영  
식품의약품안전본부 독성연구소 특수독성과

### Changes of the Extracellular Concentrations of Striatal Dopamine and Its Metabolites by MK-801 in Morphine- Dependent Rats

Sun Hee LEE\*, Dae Sup SHIN, Duck Joo RHIE, Young A YOO, Seung Rel RYU,  
Dai Byung KIM, Jong Kwon LEE and Pu Young KIM

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea  
Food & Drug Administration, Seoul 122-020, Korea

(Received November 17, 1997; accepted December 29, 1997)

**Abstract** – The roles of dopamine(DA) and N-methyl-D-aspartate(NMDA) system in the development and expression of morphine dependence were investigated by monitoring the concentrations of extracellular DA and its metabolites by *in vivo* microdialysis and simultaneous observation of behavioral changes in morphine-dependent rats. Extracellular DA level in caudate putamen of morphine-dependent rat was decreased and the concentrations of its metabolites, dihydroxy phenylacetic acid(DOPAC) and homovanillic acid(HVA), were increased during naloxone-precipitated withdrawal. DA contents were recovered to normal levels by pre-treatment of MK-801, a noncompetitive NMDA receptor antagonist, which may explain the mechanism of diminishing effect of MK-801 on withdrawal symptoms in morphine-dependent rats. MK-801(0.3 mg/kg, i.p.) induced the untoward harmful neurological signs such as ataxia and severe rotations, which may be produced by hyperactivation of dopaminergic system. These results suggest that MK-801 may inhibit the expression of morphine dependence by altering the dopamine release.

**Keywords** □ morphine dependence, MK-801, microdialysis, dopamine, caudate putamen

최근 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체 길항제인 MK-801((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-a,d-cycloheptane-5,10-iminemaleate 또는 dizocilpine maleate)와 dextromethorphan이 몰핀의 진통력에 대한 내성형성을 억제하고 몰핀의존성 랫드에서 날록손으로 유도한 금단증상을 감소시킨다는 사실이 본 연구자들(Lee 등, 1995)과 Trujillo 등(1991)에 의해 보고되었다. 본 연구는 MK-801의 몰핀의존성 억제효과에 대한 기전을 신경화학적 방법으로 규명하고자 하였다.

몰핀의존성 형성과 금단증상의 발현에 대한 신경화학적 변화에 대하여는 아직도 여러분야에서 연구가 진행중에 있다. Dopamine신경계는 많은 의존성약물의 자발섭취과정에 연관되어 금단시 약물을 더 갈망하는 rewarding 현상에 관

여할 것으로 추정되고 있는데(Rossetti 등, 1992), 몰핀을 1회 투여후 opioid신경계와 dopamine신경계의 연관성에 대하여는 몇몇 연구(Dourmap 등, 1990; Spanagel 등, 1990; Reid 등, 1990; Singh 등, 1991)가 진행되었으나 몰핀의존성 형성 또는 금단증상 발현시 어떻게 dopamine신경계가 변화되는지에 관한 상관성 연구는 미약한 실정이다. 이에 본 연구자들은 우선 몰핀 육체적 의존성 발현에 있어 신경말단에서의 dopamine의 유리 변화를 실험하였다. 한편, NMDA 수용체는 dopamine신경계를 interneuron으로 하고 있음이 (+)MK-801을 이용한 논문(Kashihara 등, 1990; Löscher 등, 1992)에서 증명되었으며 methamphetamine에 의한 dopamine신경계 손상에 MK-801이 보호효과를 가진다는 연구들이 진행되어 왔다(Sonsalla 등, 1989; Baldwin 등, 1993; Weihmuller 등, 1991). 또한 몰핀에 대한 금단반응에 몰핀 수용체가 매개되지 않고(Brent 등, 1993) 몰핀 반복투여에

\* To whom correspondence should be addressed.

의해 cyclic AMP, G-protein(Terwilliger 등, 1991), adenylate cyclase가 변화된다는 보고(De Vries 등, 1991; Van Vliet 등, 1991)들로 미루어 MK-801의 몰핀 육체적 의존성발현에 대한 억제작용기전이 dopamine신경계의 변화와 관련이 있을 것이라는 가정을 하게 되었다.

따라서 본 실험에서는 최근 개발되어 세포외액중의 미세한 신경전달물질의 변화를 측정하는데 유용성을 인정받고 있는 미세투석장치(microdialysis)를 이용하여 랫드 뇌선조체중의 dopamine계 신경전달물질의 시간에 따른 변화와 행동학적 변화와의 상관성을 분석하였다.

## 실험방법

### 미세투석탐침의 삽입 및 세포외액의 채취

230-280 g의 Sprague-Dawley 랫드를 사용하여 urethane 250 mg/ml 용액을 1.2 g/kg 복강투여하여 마취시켰다. Stereotaxic apparatus를 이용하여 Paxinos Atlas(1986)에 의하여 incisor bar를 -3.3 mm로 정하여 편평한 두부를 유지시키고 랫드뇌의 bregma로부터 전방 1 mm, 측방 -2.8 mm, 깊이 -6.8 mm로 coordinate를 정하여 랫드의 오른쪽 선조체에 미세투석탐침(CMA/12, OD 0.5 mm, 길이 3 mm)을 삽입하였다. 이때 랫드는 37°C의 직장온도를 유지하도록 하였다. 또한 미세투석탐침에는 계속적으로 인공뇌척수액(NaCl 145 mM, KCl 2.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4)이 1 µl/min의 속도로 관류되도록 하였다. 수술후 2시간부터 fraction collector로 세포외액을 채취하였다(Osborne 등, 1991). 세포외액의 채취가 끝난 후에는 10% formalin 인산완충액(pH 7.4)을 랫드 심장을 통해 관류시켜 뇌를 고정하고 분리하였다. 분리된 뇌는 brain mold를 이용하여 일정 두께로 절단하여 우측 선조체에 제대로 미세투석탐침이 삽입되었는지 육안 또는 현미경으로 관찰하였다.

### 세포외액중의 신경전달물질의 측정

1 µl/min로 인공뇌척수액을 관류시켜 미세투석막을 통해 얻어지는 세포외액을 20분 간격으로 0.1 M perchloric acid가 담긴 바이알에 포집하고 HPLC(ECD)를 이용하여 랫드 뇌선조체 중 dopamine과 그 대사물질인 dihydroxy phenylacetic acid(DOPAC) 및 homovanillic acid(HVA)량을 측정하였다(Osborne 등, 1991). HPLC는 BAS system을 이용하였고 column은 BAS의 Phase II-ODS(3 µm, 100×3.2 mm)를 사용하였다. Mobile phase의 조성은 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, EDTA 0.1 mM, Sodium octane sulfonic acid 1.1 mM(pH 3.5)과 methanol 11%로 0.6 ml/min 유속을 유지시켰고 ECD조건은 0.67 V, full scale 10 nA, 0.1 Hz filter를 사용하였다. 이때 dopamine은 0.01 pmol까지 측정되는 감도를 보여주었다.

### 몰핀의존성랫드의 생성

황산몰핀을 1일 2회씩 각 30, 45, 60, 90, 120, 120 mg/kg의 순서로 피하주사하여 몰핀의존성 랫드를 만들었다. 마지막 몰핀 투여후 24시간을 휴약하고 몰핀 10 mg/kg을 피하주사하였으며 그로부터 2시간 후에 날록손을 10 mg/kg 복강투여하여 금단증상을 측정하였다. 또한 전 투여기간동안 체중 및 행동이상을 관찰하였다(Lee 등, 1995).

### 통계처리

몰핀의존성 랫드와 정상 랫드의 행동양식 변화에 대한 유의성 검정은 student's t-test를 이용하였고, 정상상태의 세포외액 중의 신경전달물질 양과 naloxone 투여후의 신경전달물질량의 변화 또는 MK-801 투여에 따른 신경전달물질량의 변화등은 one-way analysis of variance(ANOVA) 방법으로 유의성을 검정하였다.

## 실험결과

### 신경전달물질의 신경말단유래 여부 확인

미세투석장치를 통해 채취된 세포외액에서 측정된 dopamine과 그 대사물질이 뇌선조체의 dopamine 신경말단에서 유리된 것인지 확인하기 위하여 정상 랫드에 미세투석탐침을 삽입후 일반 조성의 인공뇌척수액(Ca<sup>++</sup>: 2.4 mM, K<sup>+</sup>: 2.7 mM)을 관류시킨 후 2시간동안 칼슘을 제거한 인공뇌척수액을 관류시켰더니 세포외액중의 dopamine과 그 대사물질인 DOPAC 및 HVA량이 감소되었다(Fig. 1). 아울러 고농도의 K<sup>+</sup>(50 mM)을 20분간 관류시켰을 때 dopamine량의 급격한 일시적 상승과 DOPAC 및 HVA량의 감소를 확인함으로써 미세투석에 의해 측정된 신경전달물질이 신경말단에서 유래된 것임을 확인하였다(Fig. 2).

### 몰핀의존성랫드 뇌선조체중의 dopamine과 대사물질량의 변화

몰핀의존성랫드에 몰핀 10 mg/kg을 피하주사한 2시간 후에 날록손을 10 mg/kg 복강투여함으로써 금단증상(wet-dog shake, 설사, 타액분비, 안검하수, 체중감소 등)을 모두 측정할 수 있었다. 몰핀의존성랫드를 24시간 휴약시킨 후 몰핀 10 mg/kg을 피하주사하였을 때 랫드 뇌선조체 세포외액 중의 dopamine량은 변화가 없었으나 대사물질 DOPAC량은 몰핀 투여후 1시간부터 유의적으로 상승하였다. 날록손 금단증상이 유발되는 동안 dopamine량은 감소하였으며 대사물질 DOPAC량은 날록손 투여전에 비해 유의성있게 증가하였고 HVA량도 DOPAC보다는 약하지만 증가 경향을 보였다(Fig. 3).

### 몰핀의존성랫드에서 dopamine 신경계에 대한 MK-801의 효과

몰핀의존성 랫드에서 날록손을 투여하기 40분전에 MK-801을 전처치하였을 때 dopamine량의 감소현상이 정상으로 회복되었으나 DOPAC 및 HVA량은 MK-801을 처치하

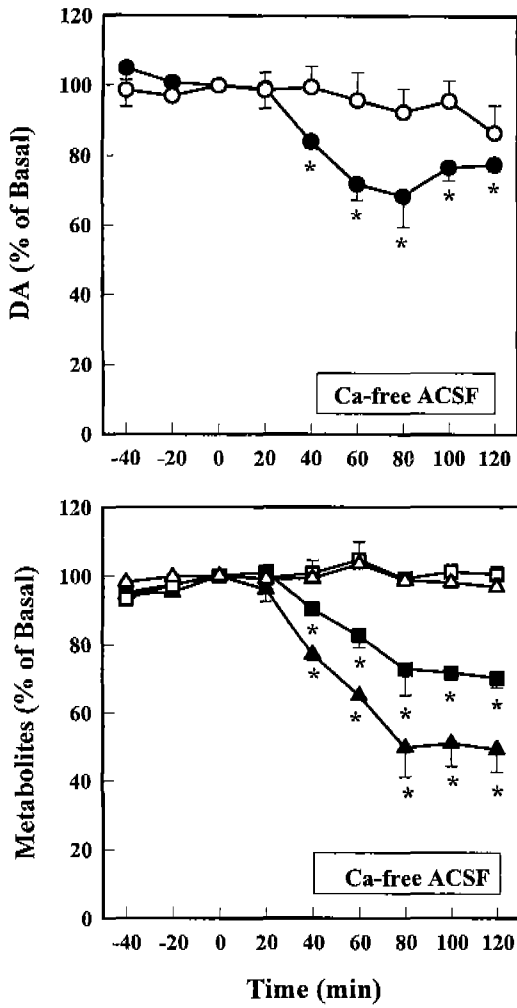


Fig. 1. Effects of  $Ca^{2+}$  on the extracellular dopamine (DA, ●) release and its metabolites (DOPAC, ▲ and HVA, ■) in the caudate-putamen of rats. The perfusate was replaced with  $Ca^{2+}$ -free ACSF 3 hr after implanting microdialysis probe. \* $p < 0.05$ , significantly different from control group (DA, ○; DOPAC, △; HVA, □).

지 않은 군에 비해 큰 변화가 없었다. 오히려 MK-801 0.3 mg/kg을 물편의존성랫드에 복강투여한 경우에는 날록손 투여후에도 대사물질의 양이 계속 증가되는 양상을 보였다 (Fig. 4). 한편 정상 랫드에 MK-801만을 0.1 mg/kg 복강투여시 뇌선조체 중 dopamine 및 그 대사물질량에는 영향을 주지 않았고, 0.3 mg/kg 복강투여군에서는 dopamine량은 변화가 없었으나 DOPAC과 HVA량은 증가되는 양상을 보여주었다(Fig. 5).

고 찰

물편의존성 랫드에서 NMDA수용체 길항제 MK-801의 금단증상 억제효과에 대한 기전연구의 일환으로 *in vivo* 미

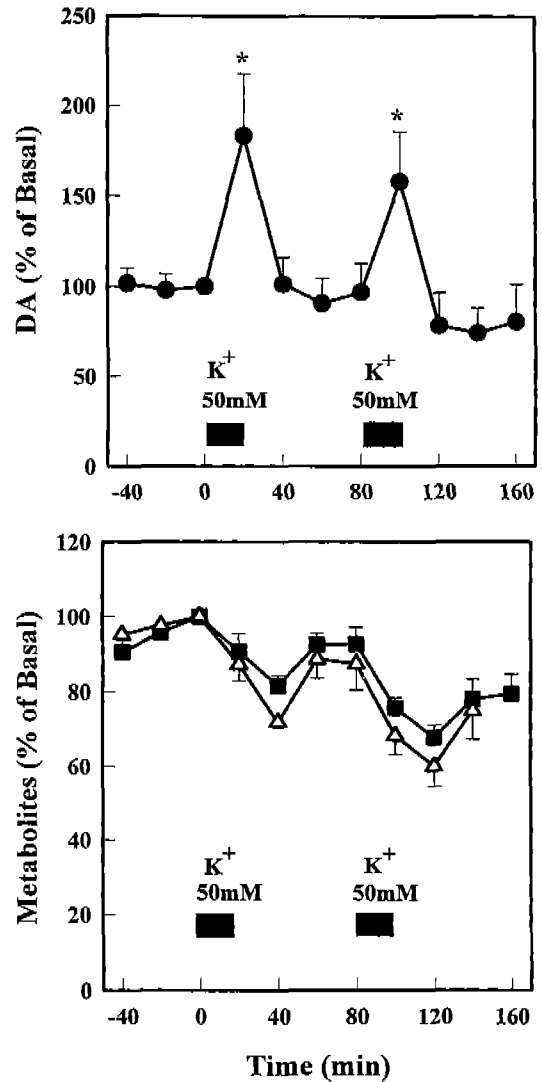
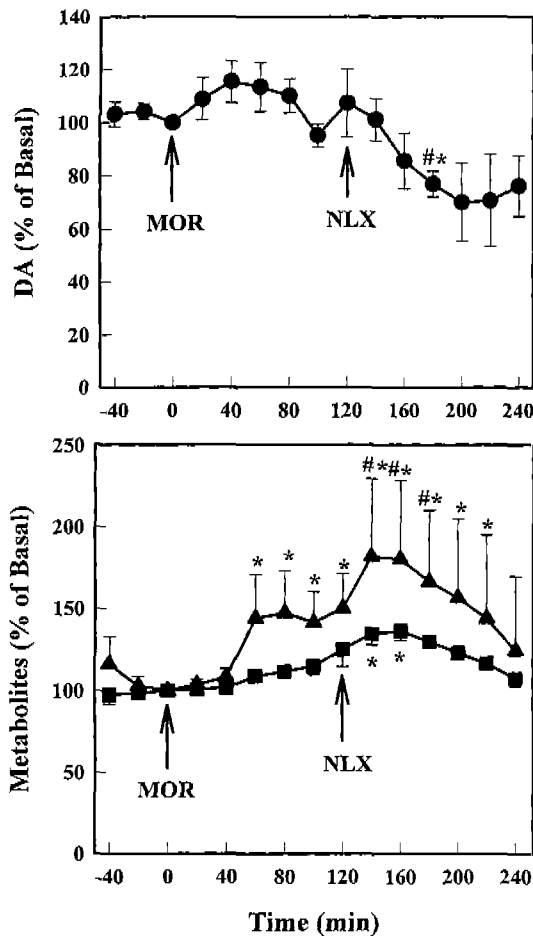


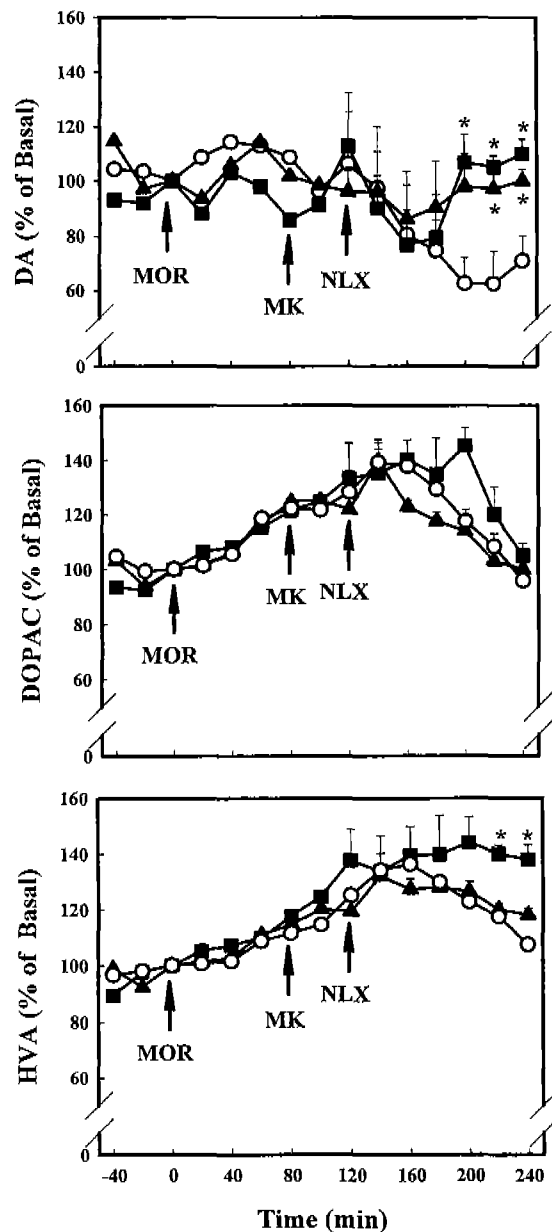
Fig. 2. Effects of high  $K^+$  (50mM) on the extracellular dopamine (DA, ●) release and its metabolites (DOPAC, △ and HVA, ■) in the caudate-putamen of rats. \* $p < 0.05$ , significantly different from basal level.

세투석법을 이용하여 물편의존성 랫드 뇌선조체에서의 dopamine 유리 변화를 측정하였다. 물편의존성 랫드에서 날록손 금단을 유발시 나타나는 육체적 금단증상 즉 wet-dog shake, teeth chattering 등의 원인물질중 하나로 locus coeruleus에서의 norepinephrine의 일시적인 증가가 보고되어 있다(Done 등, 1992). 최근에는 육체적 금단증상의 또다른 요인으로 dopamine신경계의 변화에 관심이 모아지고 있다. 즉, 물편 1회 투여시의 opioid신경계와 dopamine신경계의 연관성에 대한 연구들(Dourmap 등, 1990; Spanagel 등, 1990; Reid 등, 1990; Singh 등, 1991)로부터 발전하여 Acquas 등(1991 & 1992)은 물편금단시에는 약에 대한 혐오현상이 나타나 dopamine량이 감소하고 양성강화제(positive



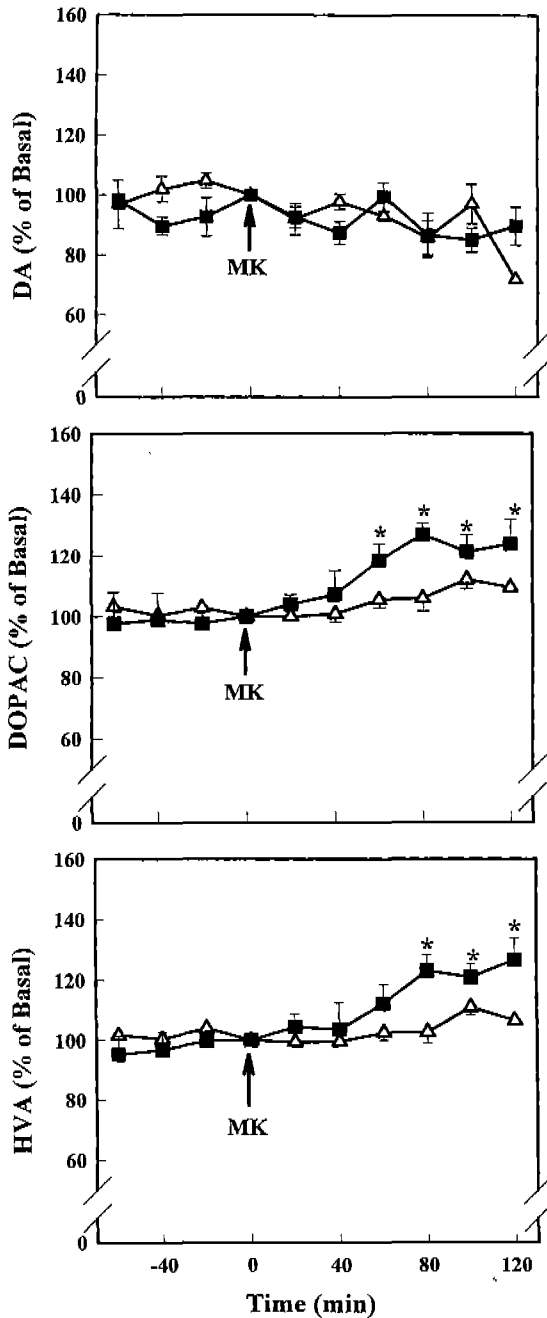
**Fig. 3.** Time-dependent changes of dopamine (DA, ●) and its metabolites (DOPAC, ▲ and HVA, ■) concentrations in the caudate-putamen during morphine challenge and naloxone withdrawal. Arrows represent morphine (MOR, 10 mg/kg, s.c.) and naloxone (NLX, 10 mg/kg, i.p.) injection. \* $p < 0.05$ , significantly different from basal level. # $p < 0.05$ , significantly different from the level before naloxone treatment.

reinforcer)를 사용시에는 dopamine량이 증가될 것이라는 가정하에 물핀의존성 랫드의 nucleus accumbens에 미세투석막을 가로로 삽입하고 단순한 휴약 schedule에 따라 금단을 유도했을 때 nucleus accumbens 세포외액 중의 dopamine량이 감소함을 보고하였다. 본 실험에서는 물핀의존성 랫드를 1일간 휴약시키고 물핀을 투여하여 challenge시킨 후 날록손을 투여함으로써 금단증상을 유발시켰으며 이러한 금단증상을 보이는 동안 수직으로 삽입된 미세투석막을 통하여 측정된 랫드 뇌선조체 세포외액 중의 dopamine량이 감소하고 DOPAC 과 HVA량이 증가하여 물핀의 육체의존성 발현기간동안 dopamine 유리의 변동이 있음을 밝혔다. 물론 물핀 반복투여에 의해 cyclic AMP, G-protein, adenylate cyclase가 변화된다는 보고(De Vries 등, 1991; Van Vliet 등, 1991)는 있지만 본 실험에서와 같이 물핀의존성 발현시



**Fig. 4.** Effects of MK-801 on the extracellular concentrations of dopamine (DA) and its metabolites (DOPAC and HVA) in the caudate-putamen of morphine dependent rats. Arrows represent morphine (MOR, 10 mg/kg, s.c.), naloxone (NLX, 10 mg/kg, i.p.) and MK-801 (MK, 0.1 mg/kg, i.p., ▲ or 0.3 mg/kg, i.p., ■). \* $p < 0.05$ , significantly different from control group (○).

나타난 dopamine 유리체계의 변화가 이러한 2차 매체들을 경유하는 것인지에 대하여는 아직 더 연구되어야 할 부분이다. 물핀의존성 랫드에서 날록손 투여 40분전에 MK-801을 전처치하였을 때 dopamine량의 감소현상이 정상으로 회복되었는데 이는 NMDA수용체의 비상경적 길항제인 MK-801 0.1 mg/kg 복강투여에 의한 날록손유도 금단증상



**Fig. 5.** Effects of MK-801 (MK) on the extracellular concentrations of dopamine (DA) and its metabolites (DOPAC and HVA) in normal rat caudate-putamen. Arrow represents MK-801 0.1 mg/kg, i.p., (△) or 0.3 mg/kg, i.p., (■). \*p<0.05, significantly different from the level before MK-801 treatment.

억제작용(Lee 등, 1995)과 상관성이 있다고 생각된다. 한편 물핀의존성 랫드에서 MK-801 0.3 mg/kg을 투여시 나타난 DOPAC 및 HVA량의 지속적인 증가는 MK-801 자체의 효과임을 알 수 있었다. MK-801에 의한 dopamine 유리에 대하여는 투여농도에 따라 결과가 달리 보고되고 있다(Kashi-

hara 등, 1990; Löscher 등, 1992). 또한 MK-801 0.3 mg/kg 용량은 물핀의존성 랫드에서 운동실조와 회전운동 등의 부작용을 보였고(Lee 등, 1995) Rasmussen 등(1991)도 locus coeruleus내 신경활성과 NMDA신경계와의 연관성을 보고 하면서 MK-801의 부작용에 대한 우려를 표한 바 있다. 본 실험에서도 정상랫드에 MK-801 0.3 mg/kg을 복강투여시 자발운동량과 회전운동의 증가와 함께 뇌선조체 중의 dopamine 대사물질량의 증가를 보여주어 MK-801의 phen-cyclidine유사 부작용이 dopamine신경계를 경유할 것으로 추정된다. 본 실험은 마취된 상태의 랫드에서의 세포외액 중의 신경전달물질량의 변화를 살폈으나 동일 개체에서 의식상태의 랫드의 행동변화와 신경화학적 변화를 동시에 측정하는 체계로 확대시험하면 동물수 및 실험오차를 더 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 dopamine은 약물의존시 일반적으로 보상작용(rewarding)을 할 것이라고 추정(Rosetti 등, 1992)하고 있는 바, 물핀의 자가섭취실험을 실시하면서 dopamine신경계의 변화를 측정하면 정신의존성 발현시 신경화학적 지표로 삼을 수 있을 것으로 사료된다.

**참고문헌**

Acquas, E., Carboni, E. and Chiara, G. D. (1991). Profound depression of mesolimbic dopamine release after morphine withdrawal in dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **191**, 133-134.

Acquas, E. and Di Chiara, G. (1992). Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J. Neurochem.*, **58**(5), 1620-1625.

Baldwin, H. A., Colado, M. I., Murray, T. K., De Souza, R. J. and Green A. R. (1993). Striatal dopamine release *in vivo* following neurotoxic doses of methamphetamine and effect of the neuroprotective drugs, chlormethiazole and dizocilpine. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 590-596.

Brent, P. J. and Chahl, L. A. (1993). Enhancement of the opiate withdrawal response by antipsychotic drugs in guinea-pigs is not mediated by sigma binding sites. *Eur. Neuro-psychopharmacol.*, **3**, 23-32.

De Vries, T. J., Van Vliet, B. J., Hogenboom F., Wardeh, G., Van der Laan, J. W., Mulder, A. H. and Schoffelmeer, A. N. M. (1991). Effect of chronic prenatal morphine treatment on  $\mu$ -opioid receptor-regulated adenylylase activity and neurotransmitter release in rat brain slices. *Eur. J. pharmacol. -Mol. Pharmacol. Section*, **208**, 97-104.

Done, C., Silverstone, P. and Sharp T. (1992). Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.*, **215**, 333-337.

Dourmap, N., Michael-Titus, A. and Costentin, J. (1990). Local enkephalins tonically modulate dopamine release in the striatum: a microdialysis study. *Brain Res.*, **524**, 153-155.

Kashihara, K., Hamamura, T., Okumura, K. and Otsuki S. (1990). Effect of MK-801 on endogenous dopamine release

- in vivo*. *Brain Res.*, **528**, 80-82.
- Lee, S. H., Shin, D. S., Yoo, Y. A. Kim, D. B., Lee, J. K. and Kim, P. Y. (1995). Comparison of effects of MK-801 and dextromethorphan on opioid physical dependence and analgesic tolerance. *Kor. J. Toxicol.*, **11**(1), 63-68.
- Löscher, W. and Höonack D. (1992). The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.*, **215**, 199-208.
- Osborne, P. G., O'Connor, W. T. and Ungerstedt, U. (1991). Effect of varying the ionic concentration of a microdialysis perfusate on basal striatal dopamine levels in awake rats. *J. Neurochem.*, **56**(2), 452-456.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Ed., Academic Press Inc., San Diego.
- Rasmussen, K. (1991). Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. *Brain Res.*, **88**, 207-216.
- Reid, M. S., Herrera-Marschitz, M., Hökfelt, T., Lindefors, N., Persson, H. and Ungerstedt, U. (1990). Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms. *Exp. Brain Res.*, **82**, 293-303.
- Rossetti, Z. L., Melis, F., Carboni, S. and Gessa, G. L. (1992). Dramatic depletion of mesolimbic extracellular dopamine after withdrawal from morphine, alcohol or cocaine; A common neurochemical substrate for drug dependence. *Ann. N. Y. Academy of Sci.*, **654**, 513-516.
- Singh, N. A., Midgley, L. P., Bush, L. G., Gibb, J. W. and Hanson, G. R. (1991). N-Methyl-D-aspartate receptors mediate dopamine-induced changes in extrapyramidal and limbic dynorphin systems. *Brain Res.*, **555**, 233-238.
- Sonsalla, P. K., Nicklas, W. J. and Heikkila, R. E. (1989). Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science*, **243**, 398-400.
- Spanagel, R., Herz, A. and Shippenberg T. S. (1990). The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: An *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.*, **55**(5), 1734-1740.
- Terwilliger, R. Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K. A., Crain, S. M. and Nestler, E. J. (1991). A general role for adaptations in G-protein and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.*, **548**, 100-110.
- Trujillo, K. A. and Akil, H. (1991). Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, **251**, 85-87.
- Van Vliet, B. J., De Vries, T. J., Wardeh, G., Mulder, A. H. and Schoffelmeer, A. N. M. (1991).  $\mu$ -Opioid receptor-regulated adenylate cyclase activity in primary cultures of rat striatal neurons upon chronic morphine exposure. *Eur. J. Pharmacol. -Mol. Pharmacol. Section*, **208**, 105-111.
- Weihmuller, F. B., O'Dell, S. J., Cole B. N. and Marshall, J. F. (1991). MK-801 attenuates the dopamine-releasing but not the behavioral effects of methamphetamine: an *in vivo* microdialysis study. *Brain Res.*, **549**, 230-235.