

백서 뇌내 Opiate 수용체의 일주기 변동에 대한 연구

전북대학교 의과대학 약리학교실 및 전남대학교 의과대학 마취과학교실*

이 무 석* · 김 기 원 · 조 규 박

= Abstract =

A Study on the Circadian Rhythm of Opiate Receptor in Rat Brain

Moo-Suck Lee*, Ki-Won Kim and Kyu-Park Cho

*Dept. of Anesthesiology, Chonnam Natl. Univ., Med. School**

Dept. of Pharmacology, Chonbug Natl. Univ., Med. School

To investigate diurnal variations of opiate receptor binding and its modification by experimental condition or treatment of various centrally-acting drugs, the amount of maximum ^3H -morphine binding in rat midbrain homogenates was measured at 4 hour intervals for 24 hours. Animals were conditioned under the controlled L: D, 12:12 cycle or D: D, 12:12 cycle for 3 weeks and treated with 0.5 ml of physiological saline or drugs for 2 weeks.

A highly significant diurnal rhythm with peak at 22 hour of early dark phase with an amplitude (0.68 ± 0.06 pmole/mg protein) of +51.1% and nadir (0.33 ± 0.03 mole/mg prtein) at 18 hour of late light phase with an amplitude of -26.6% was found in control group. 24 hour mean of ^3H -morphine binding was 0.45 ± 0.03 pmole/mg protein respectively. Constant dark adaptation or treatment of reserpine, pargyline, imipramine, amphetamine and chlorpromazine modified the diurnal rhythm in the time of peak and nadir binding shape, phase, amplitude of the diurnal curve and 24 hour mean of ^3H -morphine binding. However, Kd values were not changed in all experimental groups; Statistical analysis at times of least and great binding indicates that the differences in ^3H -morphine binding were due to changes not in the affinity, but in the number of binding sites.

The results are interpreted with regard to the diurnal rhythm of opiate receptor binding. The modes of action of psychoactive drugs are closely related to postulated changes of receptor sensitivity in neuropharmacological aspects.

서 론

인체를 포함한 포유동물에서 24시간을 주기로 생리적 기능, 생화학적 측정치 및 행동양식등이 일중변동을 일으키는 잘 알려져 있는 사실이다. 예컨대 실험적으로 명암조건을 가한 생쥐와 흰쥐에서 명암주기에 따라 암기에는 음식물 섭취와 운동수행 능력이 증가하고 명기에는 현저히 저하되는 생리적 리듬을 나타낸 것은 잘 알려져 있으며^{1~4)}, 이들 실험동물 체내에서 acetylcho-

line, norepinephrine 또는 dopamine 과 같은 신경전도물질의 합성, 유리, 대사 및 뇌내 함량등이 24시간을 주기로 변동됨이 보고되어 있다^{5~10)}. 또한 인체에서도 근력활성, 혈중 cortisol 치, 뇨중 전해질 배설량, 정신 및 육체적인 작업수행능력, mood 및 감각의 예민성 등이 일중변동을 일으키는 것으로 보고되어 있으며¹¹⁾. Lutch와 Morris¹²⁾, Vasell¹³⁾, Scheving¹⁴⁾등, Nair와 Casper¹⁵⁾ 및 Pauly와 Scheving¹⁶⁾등은 흰쥐에서 phenobarbital, niketamide, tremorine, amphetamine

및 morphine 등 중추신경계에 작용하는 약물들의 약리적 작용, 독성 및 약물대사등이 일증변동을 일으키는 보고하였다. 그러나 이들 대부분의 문헌들은 일증생리화학적 척도변동 또는 약물작용변동에 대하여 시간적인 관계만을 연계시키는데 그치고 있다.

이들 보고와는 달리 최근 몇몇 보고는 약물작용의 일증변동이 수용체의 변동과 유관함을 시사하여 비상한 관심을 끌고 있다. 즉 Nagayama 등¹⁷⁾, Evane 등¹⁸⁾, Wolfe 등¹⁹⁾ 및 Nagayama 등²⁰⁾은 apomorphine, amphetamine 및 dopamine의 길항제인 chlorpromazine과 haloperidol의 약리작용이 일증변동을 보이는데 이는 dopamine성 수용체의 감수성 변동에 기인할 것이라 추측하였고, Remero와 Axelrod²¹⁾은 흰쥐의 송과선에서, Kefka 등²²⁾은 hypothalamus와 forebrain에서 아드레날린성 수용체 binding이 주기적으로 변동됨을 관찰하였으며, Naber 등²³⁾은 흰쥐의 striatum에서 dopamine 수용체 binding의 일증변동이 imipramine 장기치리로 영향을 받음을 보고하였다.

한편 동통은 해로운 자극에 의하여 야기되는 불쾌한 감각으로써 Daugherty²⁴⁾와 Procacci 등²⁵⁾은 동통의 감수성도 일증변동을 일으키며, 더우기 Davis 등²⁶⁾은 동통 감수성의 일증변동이 naloxone으로 억제됨을 관찰하여 opiate 수용체의 일증변동을 암시하였다. 따라서 본실험은 실험적으로 명암조건을 가한 흰쥐에서 opiate 수용체의 일증변동 유무를 확인하고 수중 중추신경계 약물의 영향을 검토코저 시행하였다.

실험 방법

실험동물로는 체중 120 gm 내외의 웅성 백서(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 동물은 36수를 1군으로 하여 빛과 소음이 차단된 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 동물 cage 내에 넣고 3주간 08:00시에서 20:00시까지 조명을 가한 다음 20:00시에서 08:00시까지 조명을 가하지 않거나(L:D, 12:12), 24시간동안 지속적인 암조건하에 둬으로써(D:D, 12:12) 명암주기에 적응시킨 다음 대조군에서는 생리적 식염수를 그리고 실험군에서는 약물을 각각 2주간 12시간 간격으로 2회 복강내에 주사하여 실험에 사용하였다. 뇌내 opiate 수용체의 일증변동은 06:00시부터 매 4시간마다 백서 6수를 단두하여 약 0.5 gm의 간뇌를 채취한 다음 표본을 즉시 얼음으로 냉각시킨 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4) 15 ml homogenate를 만든 다음 homogenate에 대한 ³H-morphine의 saturable binding을 측정함으로써

관찰하였다. ³H-morphine의 saturable binding은 Goldstein 등²⁷⁾의 방법에 따랐다. 즉 tris-HCl buffer 0.7 ml에 non-labelled morphine 0.75 ml와 0.05 ml의 ³H-morphine(specific activity 60 Ci/ml)를 혼합하여 37°C 수조에서 5분간 preincubation 한 후 이어 0.5 ml의 homogenate를 혼합하여 동일조건에서 15분간 incubation 한 다음 진공여과기(Toyo MF-12)를 이용하여 nitrocellulose filter paper(pore size 0.8 μm, Whatman Co.)로 여과시키고 얼음으로 냉각시킨 tris-HCl buffer로 수차례 세척하였다. 다음 여과지를 1 ml의 ethyleneglycolmonomethyl ether에 완전히 용해시킨후 counting cocktail 9 ml를 가하여 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

Specific binding은 total binding으로부터 non-labeled morphine 10 μM 존재하에서 얻어진 nonspecific binding치를 제하여 산출하였다. Bmax와 Kd치는 Akera와 Cheng의 방법²⁸⁾에 따라 산출하였다. 단백질은 Lowry 등²⁹⁾의 방법으로 측정하였으며 결합된 ³H-morphine의 양은 pmoles/mg protein으로 표시하였다. 얻어진 실험성적은 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance)과 이원 배치 분산분석(two-way analysis of variance)로 분석하였으며 시간별 측정치의 유의성검정은 q ratio로 검정하였다.

사용한 약물은 morphine HCl(삼성제약), reserpine HCl(아주약품), pargyline HCl(Sigma), imipramine HCl(영풍제약), amphetamine HCl(Sigma), chlorpromazine HCl(삼성제약) 및 ³H-morphine sulfate(New England Nuclear Co.)이었다.

실험 성적

1) 대조군에서의 실험

L:D, 12:12로 적응시킨 대조군의 뇌내 opiate receptor binding은 암기초기인 22시에 최고에 달하는 일증변동을 보였다. 즉 대조군의 24시간 평균 maximum ³H-morphine binding치는 0.45 ± 0.03 p mole/mg protein이었고 명기초기인 10시의 binding치는 0.46 ± 0.04 p mole/mg protein이었으나 점차 감소하여 명기말기인 18시에는 0.33 ± 0.03 p mole/mg protein으로 최저로 감소하나 조명을 중단한 후 22에는 0.68 ± 0.07 p mole/mg protein으로 급격히 상승하여 최고에 달했고 24시간 평균 binding치의 백분율로 표시한 진폭은 18시에 -26.6%였으며, 22시에 +51.1%였다(Fig. 1, Table 2). 이들 성적으로부터 일원 배치

Table 1. Diurnal rhythm of specific opiate receptor binding in control and its modification by constant darkness and various drugs in the rat midbrain homogenates. Specific ³H-morphine binding and Kd values were measured at 6 points of 4 hour interval throughout the day. Each value represents the mean±SEM from 6 experiments

	control	constant darkness	reserpine	pargyline	imipramine	amphetamine	chlorpromazine
2 hr.							
Bmax(pM/mg protein)	0.44±0.03	0.58±0.05	0.72±0.06*	0.24±0.02*	0.21±0.01*	0.30±0.03	0.28±0.06
Kd(nM)	0.85±0.07	0.85±0.08	0.81±0.08	0.83±0.07	0.85±0.08	0.85±0.08	0.75±0.07
6 hr.							
Bmax	0.38±0.03	0.52±0.04	0.52±0.04	0.59±0.06	0.27±0.02	0.04±4.04	0.32±0.03
Kd	0.82±0.07	0.84±0.08	0.79±0.07	0.83±0.08	0.80±0.07	0.85±0.08	0.77±0.07
10 hr.							
Bmax	0.46±0.04	0.45±0.04	0.31±0.02*	0.69±0.05*	0.58±0.05	0.24±0.01*	0.23±0.02*
Kd	0.83±0.07	0.86±0.08	0.77±0.07	0.81±0.07	0.85±0.08	0.83±0.08	0.74±0.06
14 hr.							
Bmax	0.42±0.04	0.14±0.01*	0.42±0.02	0.34±0.03	0.63±0.05*	0.41±0.04	0.27±0.02
Kd	0.82±0.08	0.80±0.07	0.79±0.07	0.84±0.08	0.85±0.08	0.84±0.08	0.75±0.07
18 hr.							
Bmax	0.33±0.3*	0.22±0.02	0.59±0.05	0.28±0.02	0.31±0.03	0.34±0.03	0.65±0.05*
Kd	0.83±0.07	0.80±0.07	0.80±0.07	0.82±0.08	0.79±0.07	0.86±0.08	0.78±0.07
22 hr.							
Bmax	0.68±0.06*	0.27±0.02	0.63±0.06	0.60±0.05	0.50±0.05	0.55±0.05*	0.54±0.05
Kd	0.82±0.07	0.81±0.08	0.76±0.07	0.86±0.08	0.87±0.07	0.86±0.08	0.80±0.07

*: Peak

*: Nadir

Table 2. 24 hour mean of specific opiate receptor binding and amplitude of peak and nadir in control and constant darkness, reserpine, pargyline, imipramine, amphetamine and chlorpromazine treatment in the rat midbrain homogenates

Treatment	pmole/mg protein	Amplitude(%)	
		peak	nadir
Control	0.45±0.03	+51.1	-26.6
Constant darkness	0.36±0.03*	+6.11	-60.4
Reserpine	0.52±0.06	+38.4	-40.4
Pargyline	0.45±0.06	+53.3	-46.7
Imipramine	0.42±0.07	+50.0	-50.0
Amphetamine	0.38±0.04*	+44.7	-36.8
Chlorpromazine	0.38±0.04*	+71.2	-39.5

*: Significantly different from control value(p<0.05)

Amplitude denotes % change from 24 hour mean.

Table 3. Statistical analysis of circadian rhythm of specific ³H-morphine binding to the opiate receptor in the rat midbrain homogenates

Treatment	One-way analyses of variance		q ratio test
	F	P	(p<0.01)
Control	3.99	p<0.05	22*>2, 6, 10, 14, 18
Constant darkness	5.34	p<0.01	2*, 6, 10>14, 18, 22
Reserpine	4.6	p<0.01	18, 22, 2*>6, 10, 14
Pargyline	5.66	p<0.01	6, 10*, 22>2, 6, 18
Imipramine	5.12	p<0.01	10, 14*, 22>2, 6, 18
Amphetamine	3.21	p<0.05	6, 22>2, 10, 14, 18
Chlorpromazine	4.82	p<0.01	18*, 22>1, 6, 10, 14

*: peak

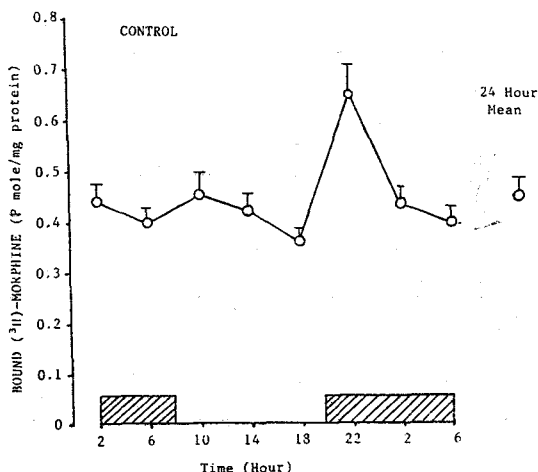


Fig. 1. Diurnal variation of opiate receptor binding (specifically bound ³H-morphine) in control rat midbrain homogenates. Animals were adjusted to the light-dark cycle(L: D, 12: 12) for 5 weeks and 0.5 ml of physiological saline was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean±SEM from 6 experiments. The shaded area indicates the dark phase of light-dark cycle.

분산분석을 행하였던 바 시간별 binding 치간에는 유의한 차이가 있음을 보여주며(F=3.99, p<0.05), 또한 이때 동시에 산출한 q ratio로써 22시의 ³H-morphine binding 치가 2,6,10,14 및 18시의 치보다 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다(Table 3). 그러나 수용체의 수적 변동과는 달리 Kd 치는 변하지 않았다

(Table 1).

이상 실험성적으로 대조군에서 opiate 수용체는 고유의 일중변동을 일으키며 이는 수용체의 수적 변동에 기인함을 알 수 있다.

2) 지속적인 암적응이 opiate 수용체 일중변동에 미치는 영향

Fig. 2는 L: D, 12:12로 적응시킨 백서의 뇌내 opiate receptor binding의 일중변동을 보여준다. 본 표본에서 24시간 평균 maximum ³H-morphine binding 치는 0.36±0.03 pmole/mg protein으로 대조군에서 보다 현저히 감소되었다(p<0.05). 또한 지속적인 암적응으로 opiate receptor binding 일중 변동곡선은 그 shape, phase, 최고 및 최저 binding 치의 시기 그리고 그 진폭이 대조군과는 다를 수 있다. 즉 ³H-morphine binding 치는 대조군에서와는 달리 14시에 최저로 0.14±0.01 pmole/mg protein으로 떨어지나 점차 증가하여 2시에 최고로 0.72±0.08 pmole/mg protein까지 증가하는 단상성의 변동을 보이며 이때의 진폭은 18시에 -26.6%였으며, 22시에 +51.1%였다. 일원배치 분산분석 결과 지속적인 암적응을 시킨 표본의 시간별 binding 치는 유의한 차이가 있음을 보였고(F=5.34, p<0.05), 암적응 표본에서의 q ratio로써 2,6 및 10시의 binding 치가 14,18 및 22시의 binding 치보다 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다(Table 3). 또한 대조군과 지속적인 암적응 표본에서의 ³H-morphine binding의 일중변동에 미치는 암적응의 영향 및 시간적인 차이를 동시에 검토한 이원배치 분산분석 성적은 암적응에 의한 F가 6.8(p<0.05), 그리고 시각에 따른 F가 16.5(p<0.05)로 암적응 표본에서의 ³H-morphine binding 곡선이 대조

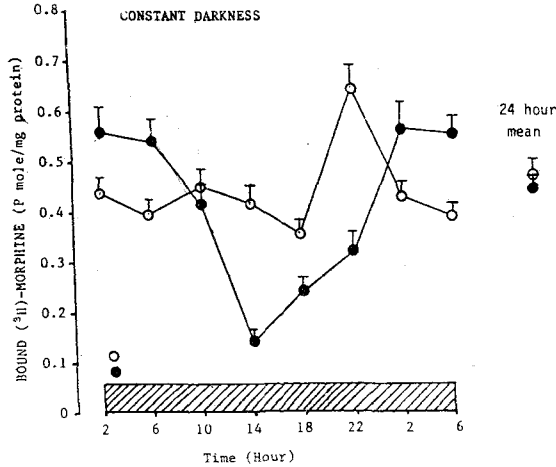


Fig. 2. Diurnal variation of specific opiate receptor binding and its modification by constant dark condition in the rat midbrain homogenates. Animals were housed in constant dark state(D: D, 12:12) for 5 weeks and 0.5 ml of physiological saline was injected twice a day for 2 weeks before the experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean \pm SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=5.34(p<0.01)$, q ratio; 2, 6, 10 > 14, 18, 22 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and constant dark group shows significant change over time ($F=16.5$, $p<0.01$) and treatment ($F=6.8$, $p<0.05$).

군에서와는 현저한 차이가 있음을 보였다(Table 4). 한편 암적용 표본에서의 Kd 치는 대조군에서와 비슷하였으며 시간에 따른 변동도 볼 수 없었다(Table 1).

3) Opiate receptor binding 일중변동에 미치는 수증 중추신경계 약물의 영향

제종 실험동물에서 아드레날린성 신경계와 dopamine 성 수용체에 작용하는 약물들이 신경전도 물질의 합성 유리, 대사 및 뇌내 함량의 일중변동과 제종약물의 약리작용, 독성 및 대사의 일중변동에 영향을 미친다 알려져 있으므로 본 실험에서는 L : D, 12 : 12 cycle 에 적응시킨 표본에서 opiate receptor binding 의 일중변동에 미치는 수증 중추신경계에 작용하는 약물들의 영향을 관찰하였다.

Reserpine 의 영향 : Fig. 3은 opiate receptor binding 의 일중변동에 미치는 reserpine 의 영향을 관찰

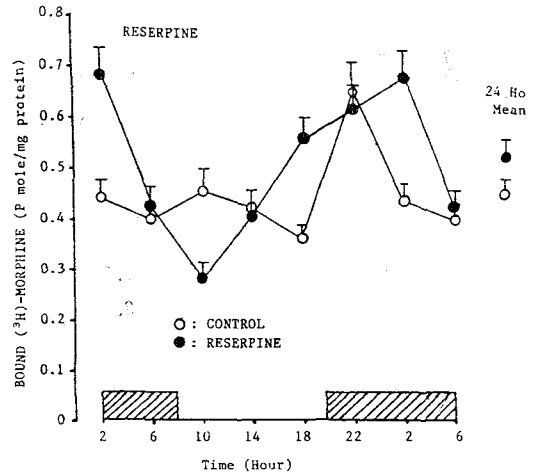


Fig. 3. Diurnal variation of specific binding and its modification by reserpine in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 1 mg/kg of reserpine was injected twice a day for 2 weeks before the experiments intraperitoneally. Each point denotes mean \pm SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=4.6(p<0.01)$, q ratio; 18, 22 > 2, 6, 10, 14 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and reserpine-treated group shows significant change over time ($F=12.8$, $p<0.01$) and treatment ($F=6.1$, $p<0.01$).

한 것이다. Reserpine 1 mg/kg 을 1일 2회 2주간 처리한 표본에서 24시간 평균 maximum 3H -morphine binding 치는 0.5 ± 0.06 pmole/mg protein (진폭 : -40.4%) 으로 대조군에 비하여 다소 증가하는 경향을 보였고, 최하의 binding 치는 명기초기인 10시에 0.31 ± 0.03 pmole/mg protein (진폭 : +38.4%) 이었으며 점차 증가하여 최고 binding 치는 0.72 ± 0.06 pmole/mg protein 이었고 대조군에서와는 달리 암기중간인 2시에서 볼 수 있었다(Fig. 3, Table 1, 2).

Reserpine 을 처리한 표본에서 일원 배치 분산분석 결과 시간별 각 3H -morphine 의 binding 치 변수는 유의한 차이가 있었고 ($F=4.6$, $p<0.01$), reserpine 처리군에서의 q ratio 로써 18, 22 및 2시의 binding 치가 6, 10 및 14시의 binding 치보다 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다 ($p<0.01$) (Table 3). 또한 대조군과 reserpine 처리군의 일중변동간의 시간변동에 따른 차이 및 약물치리에 따른 차이를 동시에 검토한 이원

Table 4. Statistical analysis of the influences of time and various drugs on the specific ³H-morphine binding to the opiate receptor in the rat midbrain homogenates: Two-way analysis of variance

	Two-way interaction			
	Drug dependent process		Time dependent process	
	F	P	F	P
Constant darkness	6.8	p<0.05	16.5	p<0.01
Reserpine	6.1	p<0.01	12.8	p<0.01
Pargyline	8.2	p<0.05	8.4	p<0.01
Imipramine	17.4	p<0.005	7.8	p<0.01
Amphetamine	11.5	p<0.01	8.3	p<0.01
Chlorpromazine	15.8	p<0.01	9.7	p<0.01

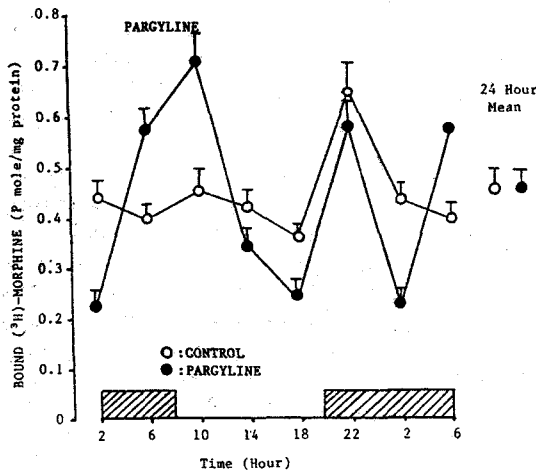


Fig. 4. Diurnal variation of specific opiate receptor binding and its modification by pargyline in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L: D, 12: 12 cycle for 5 weeks and 5 mg/kg of pargyline was injected twice a day for 2 weeks before experiment. Each point denotes mean±SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; F=5.66(p<0.01), q ratio; 6, 10, 22>14, 18, 2(p<0.01). Two-way analysis of variance comparing control and pargyline-treated group shows significant change over time (8.4, p<0.01) and treatment(F=8.2, p<0.05).

배치 분산분석으로 reserpine 처리에 의한 F가 6.1(p<0.01), 그리고 시간에 따른 F가 16.5(p<0.01)로 대조군의 일중변동과는 현저한 차이가 있음을 볼 수

있었다(Table 4). 그러나 reserpine 처리군에서의 Kd 치는 대조군에서와 같이 변동되지 않았다(Table 1).

Pargyline의 영향: MAO 억제제가 cholinergic 및 adrenergic receptor 등의 일중변동에 영향을 미치지 알려져 있다^{30,31}). Fig. 4는 pargyline의 opiate receptor binding의 일중변동에 미치는 영향을 관찰한 것이다. Pargyline 처리군에서 24시간 평균 maximum ³H-morphine binding은 0.45±0.07 pmole/mg protein으로 대조군과 비슷하였다(Table 2). 그러나 maximum ³H-morphine binding 일중 변동곡선의 shape, phase, 진폭 및 최고 또는 최저 binding 시기 등에 있어서는 대조군에서와는 달랐다. 즉 최고 ³H-morphine binding은 명기초기인 10시에 볼 수 있었으며 그치는 0.69±0.06 pmole/mg protein(진폭: +53.3%)이었고, 최저 binding은 명기말기인 18시에 0.28±0.02 pmole/mg protein(진폭: -46.7%)으로 대조군에 비하여 현저히 감소한 후 암기초기인 22시에는 대조군과 비슷한 0.60±0.05 pmole/mg protein(진폭: +33.3%)을 보여 양상성인 변동을 보였다(Fig. 4, Table 1, 2). Pargyline 처리군에서 ³H-morphine binding의 시간별 변수의 차이를 일원배치 분산분석으로 검토하였을 때 pargyline 처리군에서의 시간별 binding 치는 유의한 차이가 있음을 볼 수 있었으며(F=5.66, p<0.01), q ratio는 6, 10 및 12시의 binding 치가 14, 18 및 2시의 binding 치보다 유의하게 증가되어 있음을 보여준다(p<0.01)(Table 3). 또한 이원배치분산분석 결과는 약물처리에 의한 F가 8.2(p<0.05), 그리고 시간에 따른 F가 8.4(p<0.01)로 대조군과는 현저한 차이가 있음을 보여준다(Table 4). 한편 pargyline 처리로써 Kd 치는 변동되지 않았다(Table 1).

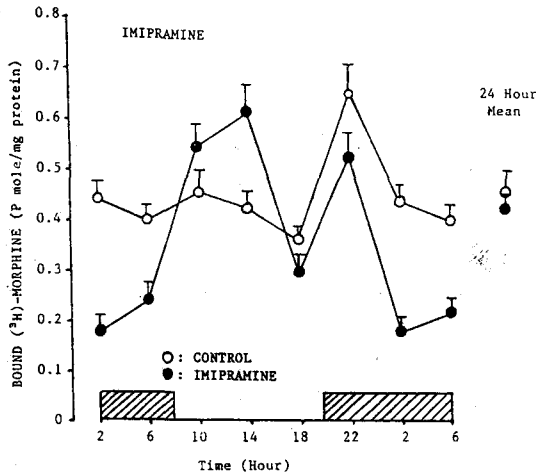


Fig. 5. Diurnal variation of specific opiate receptor binding and its modification by imipramine in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L: D, 12:12 cycle for 5 weeks and 10 mg/kg of imipramine was injected twice a day for 2 weeks before experiment. Each point denotes mean \pm SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=5.12(p<0.01)$, q ratio; 10, 14, 22 $>$ 2, 6, 18 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and imipramine-treated group shows significant change over time ($F=7.8$, $p<0.01$) and treatment ($F=17.4$, $p<0.005$).

Imipramine의 영향: Imipramine은 antidepressant의 하나로서 교감신경 절후섬유 말단에서의 monoamine reuptake를 차단함이 잘 알려져 있으며, Naber²³⁾등은 imipramine이 쥐 뇌내 dopaminergic 수용체의 일주기 변동에 영향을 미친다 하였다. Fig. 5는 imipramine 처리동물에서 maximum opiate receptor binding 일주기 변동을 관찰한 것이다. Imipramine 처리군에서의 24시간 평균 maximum ³H-morphine binding 치는 0.42 ± 0.07 pmole/mg protein으로 대조군에서와 비슷하였으나 일주기 변동곡선의 shape, phase, 진폭 및 최고 또는 최저 binding 치의 시간등은 대조군과는 현저한 차이가 있었으며 pargyline 처리군에서와 비슷하였다. 즉 최고의 ³H-morphine binding은 명기중간에 해당하는 14시에 0.63 ± 0.06 pmole/mg protein(진폭: +50.0%)을 보였으며 명기 말기에는 급속히 저하되었다가 암기초기인 22시에는 재차 증가한 후 (0.50 ± 0.04 pmole/mg protein) 급격히 감소되었다. 최하의 binding 치는 2시에는 0.21 ± 0.01 (진폭: -52.0

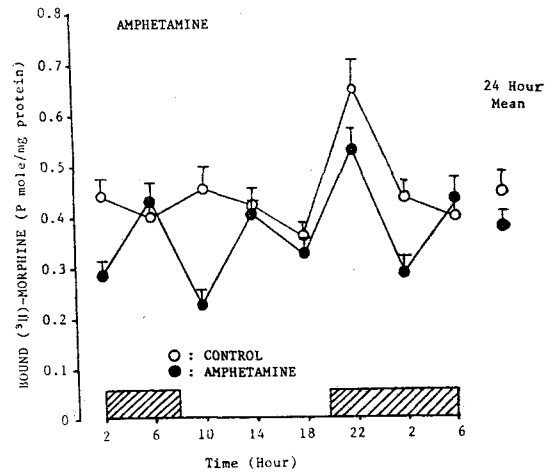


Fig. 6. Diurnal rhythm of specific opiate receptor binding and its modification by amphetamine in rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L: D, 12:12 cycle for 5 weeks and 5 mg/kg of amphetamine was injected twice a day for 2 weeks before experiment. Each point denotes mean \pm SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=3.21(p<0.05)$, q ratio; 6, 22 $>$ 2, 10, 14, 18 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and amphetamine-treated group shows significant change over time ($F=8.3$, $p<0.01$) and treatment ($F=11.5$, $p<0.01$).

%)에 이르렀다(Fig. 5, Table 1, 2). Imipramine 처리군에서의 일주기 변동 특성인 시간별 각 변수가 유의한 차이를 갖고 있음을 보여주며 ($F=5.12$, $p<0.05$), q ratio로써 10, 14 및 22시의 binding 치가 2, 6 및 18시의 binding 치보다 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다($p<0.05$)(Table 3). 또한 이월배치 분산분석 결과는 imipramine 처리에 의한 F 가 17.4 ($p<0.005$), 그리고 시간에 따른 F 가 7.8 ($p<0.01$)로 대조군과는 현저한 차이가 있음을 보여준다(Table 4). 그러나 K_d 치는 imipramine 처리로써 변동되지 않았다(Table 1).

Amphetamine의 영향: Amphetamine은 직접 또는 간접적으로 뇌내 신경전도물질체에 영향을 미칠 뿐만 아니라 특히 중추의 dopamine 성 기전에 대한 작용이 강력한 약물로써 잘 알려져 있다²²⁾. 또한 apomorphine 및 chlorpromazine 등의 약리적 작용이 일주기 변동을 일으킴도 보고되어 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. Fig. 6은 amphetamine 처리가 maximum opiate receptor binding 일주기 변

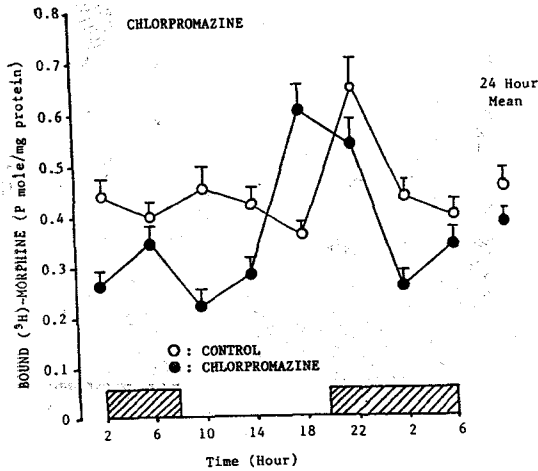


Fig. 7. Diurnal variation of specific opiate receptor binding and its modification by chlorpromazine in rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L: D, 12: 12 cycle for 5 weeks and 10 mg/kg of chlorpromazine was injected twice a day for 2 weeks before experiment. Each point denotes mean \pm SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=4.82$ ($p<0.01$), q ratio; 18, 22 $>$ 2, 6, 10, 14 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and chlorpromazine-treated group shows significant change over time ($F=9.7$, $p<0.01$) and treatment ($F=15.8$, $p<0.01$).

에 미치는 영향을 관찰한 것이다. Amphetamine 처리군에서 24시간 평균 maximum ^3H -morphine binding 치는 0.38 ± 0.04 pmole/mg protein 으로 대조군에서 보다 현저히 감소하였고 일중 최고의 binding 은 0.41 ± 0.04 pmole/mg protein (전폭: +44.7%)로 대조군에서와 같이 암기초기인 22시에 볼 수 있었으나 그 치는 대조군에서 보다 약간 감소하는 경향을 보였고 최하의 binding 치는 명기초기인 10시에 0.24 ± 0.04 p mole/mg protein (전폭: -36.8%)을 보였다 (Table 1, 2). Amphetamine 처리군에서 시간별 변수간의 차이를 본 일원배치 분산분석 성적은 이들 변수가 유의한 차이가 있음을 보였으며 ($F=3.21$, $p<0.05$), q ratio 는 6시와 22시의 binding 치가 2, 10, 14 및 18시의 치 보다 유의하게 증가되어 있음을 나타내었다 ($p<0.01$) (Table 3). 또한 이원배치 분산분석 결과로 양군의 opiate receptor binding 일중변동간에는 약물처리에 의한 F 가 11.5 ($p<0.01$), 그리고 시간에 따른 F 가

8.3 ($p<0.01$)으로 현저한 차이가 있음을 볼 수 있다 (Table 4). 그러나 amphetamine 처리로써 K_d 치는 변동되지 않았다 (Table 1).

Chlorpromazine의 영향: Fig. 7은 chlorpromazine 처리군에서의 maximum ^3H -morphine binding의 일중변동을 보여준다. Chlorpromazine 처리군에서 24시간 평균 ^3H -morphine binding 치는 0.38 ± 0.06 p mole/mg protein 으로 대조군에 비하여 다소 감소하였으며 최고의 binding 치는 대조군에서와는 달리 명기말기인 18시에 0.65 ± 0.06 pmole/mg protein (전폭: +71.2%)을 보였고, 암기가 시작됨에 따라 binding 치는 급속히 감소되어 명기초기까지 진행되어 최하의 binding 치는 10시에 0.23 ± 0.02 pmole/mg protein (전폭: -39.5%)을 보였다 (Table 1, 2). 일원배치 분산분석 결과 chlorpromazine 처리 표본에서의 ^3H -morphine binding 은 시간별 변수간에 현저한 차이가 있으며 q ratio 는 18시 및 22시의 binding 치가 2, 6, 10 및 14시의 binding 치보다 유의하게 증가되어 있음을 보였다 (Table 3). 또한 Table 4의 이원배치 분산분석 성적은 chlorpromazine 처리에 의한 F 가 15.8 ($p<0.05$), 그리고 시간에 따른 F 가 9.7 ($p<0.05$)로 chlorpromazine 처리군에서의 ^3H -morphine의 일중변동이 대조군에서와는 현저히 다름을 나타내었다 (Table 4). 그러나 chlorpromazine 처리군에서의 K_d 치는 대조군에서와 같이 변동되지 않았다 (Table 1).

고 안

본 실험의 대조군에서 뇌내 opiate receptor binding 은 명암주기에 따라 생리적으로 매우 특이한 일중변동을 일으키며, 지속적인 암적응을 시키면 opiate 수용체의 일중변동 양상이 달라짐을 알 수 있다. 이와같은 수용체의 일중변동은 adrenergic alpha 및 beta receptor^{21, 22}와 dopaminergic receptor²³등에서도 볼 수 있으나 그 최고 또는 최저 binding 시기, phase 또는 전폭등에 차이가 있다. 더우기 Naber 등²³은 dopaminergic receptor binding 이 지속적인 암적응으로 증가되거나 지속적인 명적응으로는 감소된다고 하여 본 성적에서와는 다른 성적을 제시하였다. 본 실험에서 대조군에서와는 다르나 지속적인 암조건하에서도 opiate receptor binding의 일중변동을 일으키는 일중변동이 내재성 요인에 의한을 말해준다. 생리적으로 수용체의 활성은 그에 해당되는 신경전도물질의 유리정도와 밀접한 관계가 있음은 주지의 사실이다. 즉 adren-

ergic alpha 및 beta receptor^{7,8,22}), dopaminergic receptor^{20,23}) 또는 acetylcholine의 유리 및 대사와 밀접한 관계가 있으며^{6~8,20~23}), 또한 동통의 감수성과 같은 opiate 수용체와 관계되는 기능의 일차변동도 이들이 뇌, 혈장 또는 뇌척수액내 opioid peptides 함량 변동과 유관함이 보고되어 있다^{26,33~35}). 이들 성격과 본 실험성적으로 감안하여 볼 때 동통감수성의 일차변동과 제종 analgesics의 약리적 효과변동은 일차적으로 opiate 수용체의 결합능변동에 기인하며, 이 수용체의 결합능변동은 체내 opioid peptide의 유리가 주기적으로 변동되기 때문이라고 추측할 수 있다. 본 실험의 전 실험군에서 Bmax는 변동하였으나 Kd치는 변동치 않았음은 opiate binding의 변동이 opiate 수용체의 친화력변동이 아니라 수의 변동에 의한을 나타낸다. 본 실험에서 reserpine 처리는 24시간 평균 opiate receptor binding치를 현저히 증가시켰고, 최고의 binding은 2시에, 최하의 binding은 10시에 보여 대조군에서와는 시간에 있어서나 그 양상이 다른 일차변동을 일으켰다. Reserpine은 neuroleptics의 하나로써 뇌내 monoamines나 5-hydroxytryptamine 등의 함량을 저하시켜 그 작용을 나타냄이 잘 알려져 있다. 또한 Nagayama³⁶) 등은 중추에서 reserpine과 동일한 작용을 나타내는 tetrabenazine의 진정효과가 1일을 주기로 달라짐을 관찰하고 이는 serotonin의 합성 및 유리가 1일을 주기로 변동함과 밀접한 관계가 있다 하였다. 한편 opiate 수용체는 주로 신경조직내에만 국한하여 존재하며, opiate agonist는 신경 말단으로부터 신경전도물질 유리를 감소시키는 것이 잘 알려져 있다^{37,38}). 따라서 opiate 수용체의 활성변동은 제종 neuroleptic drug의 약리적 효과의 변동을 가져올 수 있으며, 또한 뇌내 biogenic substance 함량변동은 opiate의 작용내지는 수용체의 활성변동을 가져올 수 있음을 쉽사리 추측할 수 있다. 본 실험의 pargyline 또는 imipramine 처리군에서의 성격이 reserpine 처리군에서의 성격과는 대조적인 차이를 나타내는 것은 이를 더욱 뒷받침하는 것이라 하겠다. Sewell과 Spencer³⁹), 그리고 Iwamoto와 Way⁴⁰) 등은 뇌내 monoamine 작용을 변동시키는 약물들이 opiate 약리작용을 변동시키는 것을 관찰하였다. 즉 뇌내 monoamine oxidase를 억제시키면 일반적으로 narcotics의 작용이 강화되며, monoamine oxidase 억제제는 뇌내 norepinephrine과 serotonin뿐만 아니라 dopamine 함량도 증가시켜 중추 monoaminergic tone의 변동과 더불어 morphine 등 narcotics의 진통작용을 변동시킨다 하였다. 또한 Wirz-

Justice 등⁴¹)은 clorgyline이 adrenergic alpha 및 beta receptor를 포함한 제종 수용체의 일차변동을 변동시키며 중추의 circadian pacemaker를 억제시킴으로써 흰쥐의 야간활동 시작시간을 지연시킨다 하였다. 본 실험에서도 opiate 수용체는 pargyline 처리로써 대조군과는 상이한 일차변동은 일으켰으며 이와같은 pargyline의 phase-shifting 효과는 antidepressant가 임상적으로 phase 전이를 일으킨 환자에서 사용될 수 있는 기전을 설명하여 주는 것이라 하겠다.

Imipramine, amphetamine 또는 chlorpromazine과 같은 dopaminergic receptor에 작용하는 약물들이 근육운동, 행위 및 생화학적 척도인 receptor binding 등의 일차변동을 변화시키는 것으로 알려져 있다^{19,28,41}). 본 연구에서 대조군에서와는 달리 imipramine 처리군에서의 최고 binding치는 14시에, amphetamine 처리군에서는 22시에 그리고 chlorpromazine 처리군에서는 18시에 볼 수 있었으며 이들 약물처리로써 일차변동의 양상에 있어서도 대조군에서와는 큰 차이를 나타내었다. 이점은 imipramine과 같은 약물을 장기처리하고 일중 어느 일시점에서 (3H)-spiroperidol binding을 측정하였을 때 binding치가 변동되지 않았다는 Rosenblatt 등⁴²)의 성격과는 크게 차이가 있다. 한편 tricyclics가 mania를 유발하고 schizophrenia를 악화시키는 이들 질환이 dopaminergic receptor와 관계 있음을 암시하며^{43~45}), amphetamine과 chlorpromazine도 그 약리적 작용이 중추의 여러 신경전도물질계에 직접 또는 간접적으로 영향을 미칠 뿐만 아니라 그 중에서도 특히 중추의 dopamine성 기전에 대한 작용이 강력함으로써 이에 대한 작용으로 dyskinesia를 일으키며 사회적 행위 또는 활동성의 변동등을 일으키는 것으로 생각할 수 있다^{34,46}). 환언하면 비정상적으로 circadian rhythm의 phase 전위를 일으킨 각종 정신질환에서 이 phase 전위가 병태 생리학적으로 그 질환의 중요한 질병요인이 되어 있다면 이들 질환에 사용되는 약물의 약리적 작용기전은 receptor level에서 circadian rhythm을 정상으로 회복시켜 주는 것이라 하겠다.

본 실험성적에서 opiate receptor가 1일을 주기로 그 수에 있어 주기적인 변동을 일으키고, 이러한 opiate receptor 변동기전은 여러가지 요인을 생각할 수 있으나 그중 뇌내 endorphin 함량변동이 직접적인 영향을 미칠 것으로 사료되며, 이 opiate receptor binding일차변동이 중추에 작용하는 제종 psychoactive drugs에 의하여 변동될 수 있음은 동통감수성의 변동과

narcotic analgesics 효능의 변동, 생리학 및 약리학적인 측면에서 뿐만 아니라 신경정신과 영역의 질환치료 면에서도 중요한 의미를 갖는 것이라고 하겠다.

요 약

실험적으로 명암주기 또는 암주기에 적응시킨 백서의 간뇌 homogenate 에서 opiate receptor 의 일중변동 유무를 검토하고, circadian rhythm 에 영향을 미치는 것으로 알려진 수종 중추작용약물의 영향을 비교저 7 group 에서 4시간 간격으로 1일 6회 maximum ^3H -morphine binding 을 측정하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) L : D, 12 : 12에 적응시킨 대조군에서 maximum ^3H -morphine binding 은 22시에 최고에 달하는 매우 유의한 일중변동을 보였고, 24시간 평균 ^3H -morphine binding 치는 0.45 ± 0.03 pmole/mg protein 이었다.

2) 지속적인 암적응을 시킨 D : D, 12 : 12군에서 ^3H -morphine binding 의 일중변동은 14시에 최하, 그리고 2시에 최고의 binding 치를 보이는 단상성의 일중변동은 보였으며 대조군의 곡선과는 그 shape, phase, 진폭, 최고 또는 최하 binding 시기 및 24시간 평균 opiate 수용체의 수에 현저한 차이가 있었다.

3) 지속적인 암적응, reserpine, pargyline, imipramine, amphetamine 또는 chlorpromazine 처리는 opiate receptor 의 일중변동을 변화시켰다.

4) 그러나 전 실험군에서 Kd 치는 변동되지 않았다. 이상 실험성적으로 백서뇌내 opiate 수용체의 일중변동은 수용체의 질적변동이 아닌 수적인변동에 의하고, 지속적인 암적응이나 circadian rhythm 을 변동시키는 중추성 약물들이 opiate receptor 의 일중변동을 변화시킬 수 있으며, 또한 동통을 포함하여 제종 진통제의 효과가 일중변동을 일으키는 것은 opiate receptor 의 일중변동과 밀접한 관계가 있을 것으로 추측하였다.

참 고 문 헌

- 1) Tadokoro, S., Kuribara, H., Shirasake, K., Alam, M.R. and Fugimoto, K.: *Fully automatic measurement of behavioural rhythms in rat and its applications. Japan. J. Psychopharmacol.*, 3:785-803, 1981.
- 2) Tadokoro, S., Kuribara, H., Shirasaka, K. and Alam, M.R.: *Automatic measurement of di-*

urnal rhythms of naive behaviors in rats and its pharmacological applications. In Toward Chronopharmacology. Advances in the Biosciences. Edited by Takahashi, R., Halberg, F. and Walker, C.A. Vol. 41, p.77-84, Pergamon Press., Oxford(1982).

- 3) Bunning, E.: *The physiological clock. Revised 2nd edit. Springer-Verlag. New York, 1967.*
- 4) Kuriqara, H., Hayashi, T., Alam, M.R., Tadokoro, S. and Miura, T.: *Autonomic measurement of drinking in rats: Effect of hypophysectomy. Pharmacol. Biochem. Behav.*, 9:697-702, 1978.
- 5) Friedman, A.H. and Walker, C.A.: *The acute toxicity of drugs acting at cholinceptive sites and 24 hour rhythm in brain acetylcholine. Arch. Toxicol.*, 29:39-49, 1972.
- 6) Hanin, I., Massarelli, R. and Costa, E.: *Acetylcholine concentrations in rat brain. Science*, 170:341-342, 1978.
- 7) Perlow, M.J., Ebert, M.H., Gordon, E.K., Ziegler, M.G., Lake, R.C. and Chase, T.N.: *The circadian variation of catecholamine metabolism in the subhuman primate. Brain Res.*, 139:101-113, 1978.
- 8) Scheving, L.E., Harrison, W.H., Gordon, P. and Pauly, J.E.: *Daily fluctuations in biogenic amines of the brain. Am. J. Physiol.*, 214: 166-173, 1978.
- 9) Simon, M.L. and George, R.: *Diurnal variations in plasma corticotrophin and growth hormones as correlated with regional variation in norepine phrine, dopamine and serotonin content of rat brain. Neuroendocrinology.*, 17: 125-138, 1975.
- 10) Lemmer, B. and Berger, T.: *Diurnal rhythm in the central dopamine turnover in the rat. Arch. Pharmacol.*, 303:257-261, 1978.
- 11) Wolpert, E.A.: *Major effective disorders in Comprehensive Text Book of Psychiatry III, Vol. II, 3rd ed. by Keplan, H.I. and Wilkins Company, pp.608-610, 1980.*
- 12) Lutsoh, E.F. and Morris, R.W.: *Light reversal of morphine-induced analgesia susceptibility*

- rhythm in mice. Experimentia(Basal)*, 27: 420-421, 1971.
- 13) Vasell, E.S.: *Genetic and environmental factors affecting hexobarbital metabolism in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151:900-912, 1968.
- 14) Scheving, L.E., Vadril, D.F. and Pauly, J.E.: *Daily circadian rhythm in rats to d-amphetamine sulfate: Effect of blinding and continuous illumination on the rhythm. Nature (London)*, 219:621-622, 1968.
- 15) Nair, V. and Casper, R.: *The influence of light on daily rhythm in hepatic drug metabolizing enzymes in the rat. Life Sci.*, 8:1291-1298, 1969.
- 16) Pauly, J.E. and Scheving, L.E.: *Temporal variations in the susceptibility of white rat to pentobarbital sodium and tremorine. Int. J. Neuropharmacology*, 3:651-658, 1964.
- 17) Nagayama, H., Takagi, A., Nakamura, E., Yoshiola, H. and Takahashi, R.: *Circadian susceptibility rhythm to apomorphine in the brain. Commun. Psychopharmacol.*, 2:30-310, 1978.
- 18) Evans, H.L., Ghiselli, W.B. and Patton, R.A.: *Diurnal rhythm in behavioral effects of methamphetamine, p-chloromethamphetamine and scopolamine. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 186:10:17, 1973.
- 19) Wolfe, G.W., Bousquet, W.F. and Schnell, R.C.: *Circadian variations in response to amphetamine and chlorpromazine in the rat. Commun. Psychopharmacol.*, 1:29-37, 1977.
- 20) Nagayama, H., Takagi, A., Sakurai, Y., Nishiwaki, K. and Takahashi, R.: *Chronopharmacological study of neuroleptics. Circadian susceptibility to haloperidol. Psychopharmacology*, 63:131-135, 1979.
- 21) Romero, J.A. and Axelrod, J.: *Pineal β -adrenergic receptor. Diurnal variation in sensitivity. Science*, 184:1091-1092, 1974.
- 22) Kafka, M.S., Wirz-Justice, A. and Naber, D., Moore, R.Y. and Benedito, M.A.: *Circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. Federation Proceedings*, 42:2796-2801, 1982.
- 23) Naber, D., Wirz-Justice, A., Kafka, M.S. and Wehr, T.A.: *Dopamine receptor binding in rat striatum: Circadian rhythm and its modification by chronic imipramine. Psychopharmacology*, 68:1-5, 1980.
- 24) Daugherty, K.: *The effects of biological rhythms on diurnal variation of pain. Indiana Univ. Press*, 1980.
- 25) Procacci, P.: *Rhythmic changes of the cutaneous pain threshold in man. Chronobiologia*, 77-96, 1974.
- 26) Davis, G.C., buchsbaum, M.S. and Bunney, W.E. Jr.: *Naloxone decreases diurnal variation in pain sensitivity and somatosensory evoked potentials. Life Sci.*, 23:1449-1460, 1978.
- 27) 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.
- 28) Akera, T. and Cheng, V.K.: *A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies. Biochimica et Biophysica*, 470:412-423, 1977.
- 29) Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.: *Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- 30) Wirz-Justice, A., Kafka, M., Naber, D., Campbell, I.C., Marangos, P.J., Tamarkin, L. and Wehr, T.A.: *Clorgyline delays the phase position of circadian neurotransmitter receptor rhythms. Brain Research*, 241:115-122, 1982.
- 31) Campbell, I.C., Robinson, D.S., Lobenberg, W. and Murphy, D.L.: *The effects of chronic regimens of clorgyline and pargyline in monoamine metabolism in the rat brain. J. Neurochem.*, 32:49-55, 1979.
- 32) Moore, K.E.: *The actions of amphetamine on neurotransmitter. A brief review. Biol. Psychiatry*, 12:451-462, 1977.
- 33) Wesche, D.L. and Frederickson, R.C.A.: *Diurnal differences in opioid levels correlated*

- with nociceptive sensitivity. *Life Sci.*, 24: 1861-1868, 1979.
- 34) Frederckson, R.C.A., Burgis, V. and Edwerds, J.D.: *Hyperalgesic induced by naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. Science*, 198:756-758, 1977.
- 35) Pollman, L. and Harris, P.H.P.: *Rhythmic changes in pain sensitivity in teeth. Int. J. Chronobiol.*, 5:459-464, 1978.
- 36) Nagayama, H. Takagi, A., Tateishi, T. and Takahashi, R.: *Circadian susceptibility to neuroleptics: Tetrabenazine. Psychopharm.*, 55: 61-66, 1977.
- 37) Schaumann, W.: *Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the guinea pig ileum. Brit. J. Pharmacol.*, 15:29, 1975.
- 38) Kosterlitz, 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.
- 39) Sewell, R.D.E. and Spencer, P.S.: *The role of biogenic agents in the actions of centrally-acting analgesics. Prog. Med. Chem.*, 14:249-283, 1977.
- 40) Iwamoto, E.T. and Way, E.L.: *Opiate action and catecholamines. Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 20:357-407, 1979.
- 41) Wirz-Justice, A., Wehr, T.A., Goodair, F.K., Kafka, M.S., Naber, D., Marangos, P.J. and Cambel, I.C.: *Antidepressants drugs slow circadian rhythms in behavior and brain neurotransmitter receptors. Psychopharm. Bull.*, 16: 45-47, 1980.
- 42) Rosenblatt, J.E., Pert, C.B., Tallman, J.F., Pert, A. and Bunney, W.E. Jr.: *The effect of imipramine and lithium on alpha and beta-receptor binding in rat brain. Brain Research.*, 160:186-191, 1979.
- 43) Bunney, W.E. Jr.: *Psychopharmacology of the switch process in affective illness. In: Psychopharmacology: A generation of progress. M.A. Lipton, A. Dimascio, K.F. Killam eds. pp. 1249-1259, New York: Raven., 1978.*
- 44) Ayd, F.J.: *Toxic somatic and psychopathological reaction to antidepressant drugs. J. Neuropsychiatry*, 2:119-122, 1961.
- 45) Bunney, W.E. Jr., van Kammen, D.P., Post, R.M. and Garland, B.L.: *A possible role for dopamine in*
- 46) McKinney, W.T., Moran, E.C., Kraemer, G.W. and Prange, A.J. Jr.: *Long-term chlorpromazine in Rhesus monkey: production of dyskinesias and changes in social behavior. Psychopharmacol.*, 72:35-39, 1980.