

도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNAs의 발현에 미치는 카페인의 영향

김근양 · 신지혜 · 김명옥*

경상대학교 자연과학대학 생명과학부 생물학전공, 대학원 응용생명과학부

Influence of Caffeine on Dopamine D₁ and D₂ Receptor mRNAs Expression in Rat Brain

Kun Yang Kim, Jee Hye Shin and Myeong Ok Kim*

Division of Life Science and Applied Life Science, College of Natural Science, GyeongSang
National University, Jinju 660-701, KOREA

Abstract

The caffeine intake causes a local or wide ranges of convulsion and it is associated with release of dopamine (DA) receptors into the brain striatum. However, the effect of caffeine addiction on expression of DA receptors gene in the rat caudate-putamen (CPu), nucleus accumbens (NAc), and olfactory tubercle (OTu) has not been elucidated. In this study, we examined the influence of caffeine addiction on DA D₁ and D₂ receptor mRNAs after the treatment of caffeine for four weeks. Using the specific antisense ribo-probes for DA D₁ and D₂ receptor cDNAs, *in situ* hybridization was performed on the CPu, NAc, and OTu of the adult male Sprague Dawely rats. In caffeine-treated group, DA D₁ and D₂ receptor mRNAs were highly increased in CPu, NAc, and OTu. The expression density of DA D₁ receptor mRNAs were 2.52 ± 1.40 (CPu), 2.78 ± 1.69 (NAc), and 3.91 ± 1.28 (OTu) in control group and 7.76 ± 2.09 (CPu), 4.2 ± 1.85 (NAc), and 8.21 ± 1.72 (OTu) in caffeine-treated group. The expression density of DA D₂ receptor mRNA was 2.32 ± 1.52 (CPu), 2.63 ± 2.11 (NAc), and 3.61 ± 1.43 (OTu) in control group, and 6.41 ± 1.82 (CPu), 6.89 ± 1.32 (NAc), and 6.82 ± 1.18 (OTu) in caffeine-treated group. DA D₁ receptor mRNA was higher expressed than DA D₂ receptor mRNA in CPu and NAc. These results suggest that caffeine reacts as a upregulator of the expression of DA D₁ and D₂ receptor mRNA among the neurotransmitters.

Key words – Caffeine, dopamine receptor, mRNA, *in situ* hybridization, rat brain

서 론

카페인의 과다 복용은 뇌에서 국소적이고 광범위한 경련을 일으킨다[17]. 폭넓게 소비되는 카페인은 원인을 알

수 없는 혼란, 노여움이나 우울증을 가진 환자들에게 증상을 더 악화시킨다[1,9]. 카페인의 복용으로 인해 체내의 허용치 이상의 농도로 흡수될 때 methylxanthine은 아데노신 수용체에 길항제로써 반응한다[5,6,18]. 아데노신 A₁과 도파민 D₁ 수용체, 아데노신 A₂와 도파민 D₂ 수용체들 사이의 길항적 반응은 뇌의 기부 신경절에서 많이 발견되고 그러한 반응은 아데노신 촉진제의 운동계 쇠퇴효과와 아

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-751-5955, Fax: 055-754-0086
E-mail : mokm@nongae.gsnu.ac.kr

데노신 길항제의 운동계 활성화효과와 관련된 반응을 일으킨다. 또한 카페인인 도파민의 흑색질선조체 경로에서 6-hydroxydopamine이 손상된 흰쥐에 카페인으로 분별 자극효과를 주었을때 자가 투여와 같은 행동변화를 증가시킨다[11,17].

신경전달물질 중 하나인 도파민은 포유동물에서 신경내분비 조절에 중요한 역할을 하고 있으며 도파민 수용체 아형에 의해 그 기능이 조절됨이 보고되었다[19,20,23]. 최근에 도파민 수용체 아형을 분자 클로닝하여[15,25] 5가지 도파민 수용체 아형 D₁, D₂, D₃, D₄, D₅으로 분류하였는데, D₁과 D₅는 D₁-type에, 그리고 D₂, D₃, D₄는 D₂-type에 속한다. D₁-type은 adenylyclase(AC)의 활성을 증가시켜 세포 내 cAMP의 농도를 증가시키고, D₂-type은 AC의 활성을 억제시켜 세포 내 cAMP의 농도를 감소시킨다[3,21].

카페인의 운동계 자극효과에서 내성은 도파민 D₁과 D₂ 수용체 아형들에 의해 중재되며[11], 카페인인 세포 밖에서 칼슘과는 독립적으로 도파민 방출에 있어서 도파민 D₁과 D₂ 수용체 촉진제의 복용량에 따라 증가한다[10]. Pallidus c-fos mRNA 발현을 증가시키는 카페인의 능력은 도파민 D₂와 D₃ 수용체 촉진제 quinpirole에 의해 증대되고 도파민 D₂와 D₃ 수용체에 대한 길항제 raclopride는 효과가 없다고 알려져 있다[6,22]. 카페인에 의한 선조체 (striatum)에서 아데노신 수용체를 차단하는 효과는 도파민 수용체가 활성화 된 이후에 작용하며, 만성적 카페인 흡수 때문에 가져오는 pallidus c-fos mRNA 발현이 카페인의 반복투여로 감소된다는 사실은 운동계 자극에서의 내성발달과 관련이 있음을 시사한다[22].

따라서 본 연구에서는 4주 동안 카페인을 투여한 흰쥐의 뇌에서 특히, 도파민 수용체가 많이 존재하는 선조체인 CPu, NAc, OTu에서 카페인에 의한 운동계 활성화 및 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA의 발현을 riboprobe를 이용한 *in situ* hybridization으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직의 준비

본 연구에서는 성숙한(250 gm) Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 카페인 재제(sigma)를 수돗물에 40 mg/kg 기준으로 하루에 총 10 mg씩 섭취되게 물에 타서 4주

Table 1. Quantitative analysis of the DA D₁ receptor mRNAs. 5 sections from each animal of each group (control and caffeine) were hybridized with each probe. The sections were made through 1.00 mm from the bregma, and 10.00 mm from the interaural line

| | Dopamine D ₁ receptor | | |
|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|
| | CPu | NAC | OTu |
| Control group | *2.52±1.40 | 2.78±1.69 | 3.91±1.28 |
| Caffeine treated group | 7.76±2.09 | 8.42±1.85 | 8.21±1.72 |

*Silver grains for DA D₁ receptor mRNAs were counted in the whole area of the CPu, NAc, and OTu using the densitometric scanning program (Photoshop 4.0) and were expressed in the mean ± SEM (n=5).

CPu, caudate putamen, NAc; nucleus accumbens, OTu; olfactory tubercle.

Table 2. Quantitative analysis of the DA D₂ receptor mRNAs. 5 sections from each animal of each group (control and caffeine) were hybridized with each probe. The sections were made through 1.00 mm from the bregma, and 10.00 mm from the interaural line

| | Dopamine D ₂ receptor | | |
|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|
| | CPu | NAC | OTu |
| Control | *2.32±1.52 | 2.63±2.11 | 3.61±1.43 |
| Caffeine treated group | 6.41±2.23 | 6.89±1.32 | 6.82±1.18 |

*Silver grains for DA D₂ receptor mRNAs were counted in the whole area of the CPu, NAc, and OTu using the densitometric scanning program (Photoshop 4.0) and were expressed in the mean ± SEM (n=5).

CPu; caudate putamen, NAc; nucleus accumbens, OTu; olfactory tubercle.

동안 먹게 하였고, 정상 대조군은 4주 동안 물만 먹게 하였다. *In situ* hybridization을 위하여 흰쥐를 마취 한 후 대동맥을 통해 saline 용액 100 ml을 주입한 후, 4% neutral buffered paraformaldehyde 용액 200 ml을 관류시켜 뇌 조직을 고정하였다. 3일간 후고정을 한 후, 20% sucrose에 1일간 침전시켰고, O.C.T compound로 포매시켜 냉동 절편기를 사용하여 15 μm 두께로 뇌조직을 관상(coronary)단면의 연속 절편을 만들어 probe on plus slide위에 mount하여 -75℃에 보관하였다.

도파민 D₁ 및 D₂ 수용체의 subcloning

본 실험에 사용할 probe를 위하여 도파민 D₁ 수용체는 pGEM 3Z vector(promega)에 cloning된 흰쥐 도파민 D₁ 수용체 cDNA가 2 kb로 *HindIII-EcoRI*이 삽입되어 있었는데 그 중 C-terminal 부분에서 500 bp cDNA segment로 subcloning 하였다. 도파민 D₂ 수용체는 pGEM-3Z vector에 cloning된 흰쥐 도파민 D₂ 수용체 cDNA가 2 kb로 *EcoRI-ApaI*이 삽입되어 있었는데 그 중 C-terminal 부분에서 309 bp cDNA segment로 subcloning 하였다. Quiagen plasmid midi kits를 이용하여 많은 양의 도파민 D₁과 D₂ 수용체 cDNA가 삽입된 Plasmid DNA를 얻었다. 그 뒤 도파민 D₁ 수용체는 *EcoRI*(antisense)과 *HindIII*(sense)로 소화시켜 probe용 cDNA를 회수하였고, 도파민 D₂ 수용체는 *ApaI*(antisense)과 *EcoRI*(sense)으로 소화시켜 probe용 cDNA를 회수하였다.

Probe 준비

RNA probe의 *in vitro* 합성에 사용할 template DNA는 *EcoRI*, *HindIII*, *ApaI* 제한절단 부위에 흰쥐 도파민 D₁과 D₂ 수용체 cDNA clones이 삽입된 pGEM-3Z(promega)였다. 제한효소를 사용하여 template DNA plasmid를 선형으로 만든 후, SP6 또는 T7 RNA polymerase로 전사시켜서 α -³⁵S-UTP에 의해 방사표지된 antisense와 sense RNA probe (1.3×10^9 cpm/ μ l)를 얻었다. 4.0 μ l의 5 \times transcription buffer (200 mM Tris-HCl(pH 7.9), 30 mM MgCl₂, 10 mM spermidine), 2 μ l의 100 mM DTT, 0.33 μ l의 10 mM RNasin (60 units/ μ l, BM), 1 μ l의 10 mM NaCl, 1 μ l의 10 mM GTP, 1 μ l의 10 mM CTP, 2.4 μ l의 100 M UTP, 0.2 μ g의 linearized DNA template, 0.3 μ l의 SP6 혹은 T7 RNA polymerase(15 units/ μ l, BRL), 5.0 μ l의 α -³⁵S-UTP(10 mCi/ μ l)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 DNA template를 제거하기 위해 92 μ l의 distilled water(DW), 5 μ l의 1M Tris-HCl(pH 8.0), 1 μ l의 1M MgCl₂, 1 μ l의 yeast tRNA(10 mg/ μ l), DNase I(10 μ g/ μ l)을 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. Antisense 및 sense RNA probe는 Sephadex G-50 Nick column(Pharmacia)으로 각각 분리하였다.

In situ hybridization

Deep freezer에 보관되어 있던 카페인 투여한 군과 정

상 흰쥐 뇌 조직절편을 phosphate buffered saline(PBS, 0.1M, pH7.4)으로 세척한 후 0.001% proteinase K로 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 TE buffer(pH 8.0 10mM Tris, 1mM EDTA)로 2분간 처리한 후 0.025% acetic acid에서 10분간 반응시켰다. 0.2 \times SSC(1 \times SSC: 150mM NaCl, 15mM Na citrate, pH7.0)로 세척한 다음 실온에서 1시간 동안 prehybridization step을 거치고 이어서 prehybridization buffer [65% deionized formamide, 10% 5M NaCl, 1% 50 Denhardt's solution, 0.5% 1M Tris(pH 8.0), 0.1% 0.5M EDTA(pH 8.0), 23%의 Dextran sulfate 0.4% 1M DTT, 1% yeast tRNA(10mg/ μ l)]에 준비된 RNA probe(1×10^5 cpm/slide)를 첨가하여 조직절편 위에 직접 점적시켜 cover glass를 덮고 습윤 상자에 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 post hybridization 과정을 시행하였는데 4 \times SSC, 0.5 \times SSC에 DTT가 함유되게 한 후 각각 20분씩 세척하였다. 그 후 RNase A (20 μ l/ μ l)를 1시간 처리한 후 65 $^{\circ}$ C에서 2 \times SSC로 30분간 세척하고 탈수과정을 거친 후 autoradiography X-ray film(amersham)으로 1주일 동안 감광 시킨 후 현상시켰다. 그 후 autoradiographic emulsion(NTB2, Kodak)으로 coating시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 14일 동안 표지된 probe의 방사선이 감광되도록 노출시켰다. 그 후 D-19 developer로 현상시키고 rapid fixer로 고정한 후 광학현미경과 암시야현미경에서 관찰하였다.

결과처리

실험결과로 나온 X-ray 필름을 adobe photoshop 5.5을 사용하여 색의 농도값을 평균하고 표준편차를 구한 후 도표를 그렸다. 통계처리는 Student's t-test와 ANOVA-test를 사용하였으며, image 분석은 X-ray 필름을 adobe photoshop을 사용하여 비교하였다.

결 과

본 연구에서는 4주간 카페인을 투여한 흰쥐 뇌의 선조체 부위에서 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA 발현을 ³⁵S-labelled ribo-probe를 이용하여 *in situ* hybridization 방법으로 조사하였다. X-ray film에 나타난 발현을 농도차이를 분석하였고, 세포학적 mRNA 발현을 확인하였다. 카페인을 투여한 흰쥐 뇌의 CPu, NAc, OTu에서 도파민 D₁과

D₂ 수용체의 발현을 대조군과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

도파민 D₁ 수용체 mRNA의 발현

도파민 D₁ 수용체 mRNA의 발현을 caudate putamen (CPu), nucleus accumbens (NAc), olfactory tubercle (OTu) 부위에서 정상 대조군과 카페인 투여한 군에서의 농도를 각각 측정하였다. 카페인 투여군에서 도파민 D₁ 수용체는 정상 대조군에 비해 각각 CPu에서 5.24 ± 1.52 ($p < 0.001$), NAc에서 5.77 ± 1.56 ($p < 0.001$), OTu에서 4.52 ± 1.68 ($p < 0.001$)만큼 증가하였다. 도파민 D₁ 수용체가 카페인 투여군에서 정상 대조군에 비해서 더 높은 농도로 발현되었다(Fig. 1, Fig. 3, and Table 1).

도파민 D₂ 수용체의 발현

도파민 D₂ 수용체 mRNA의 발현을 정상 대조군과 카페인 투여군에서의 농도를 CPu, NAc, OTu 부위에서 각각 측정하였다. 카페인 투여군의 도파민 D₂ 수용체 mRNA는 정상 대조군에 비해 각각 CPu에서는 4.18 ± 1.64 ($p < 0.001$), NAc에서는 4.26 ± 1.46 ($p < 0.001$), OTu에서는 3.42 ± 1.68 ($p < 0.001$)로 증가하였다. 도파민 D₂ 수용체 mRNA는 카페인을 투여한 군에서 정상 대조군 보다 더 높은 농도로 발현되었다(Fig. 2, Fig. 4, and Table 2).

도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA 발현의 비교

도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA를 양적으로 분석한 결과 CPu, NAc, OTu에서 도파민 D₁ 수용체 mRNA가 도파민 D₂ 수용체 mRNA 보다 더 많이 발현되었다(Fig. 3, Fig. 4).

고 찰

일상생활에서 쉽게 접하는 카페인을 중추신경계에 작용하여 감각, 운동을 항진시키는 의존성 물질중의 하나이다. 과도한 카페인 복용은 도파민 분비에 영향을 미쳐 흥분, 불안, 초조 등 정신적 장애를 유발시킨다. 그러나 아직 시냅스 후 신경세포인 선조체 영역의 CPu, NAc, OTu에서 도파민 수용체 mRNA 발현에 대한 보고는 아직 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 도파민 수용체 아형 중 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA 발현을 *in situ* hybridization으로 조사하였다. 실험결과 흰쥐 뇌 선조체의 CPu, NAc, OTu에서 카페인을 투여한 군이 정상 대조군 보다 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA 발현이 증가됨을 보였다. 이와 같은 결과는 세포 단위에서 흰쥐의 뇌에서 도파민 수용체 mRNA의 발현장소인 CPu, OTu, NAc 부위를 정확히 알 수 있었고, 또한 밀도차이로 농도차이를 계산하여 도파민

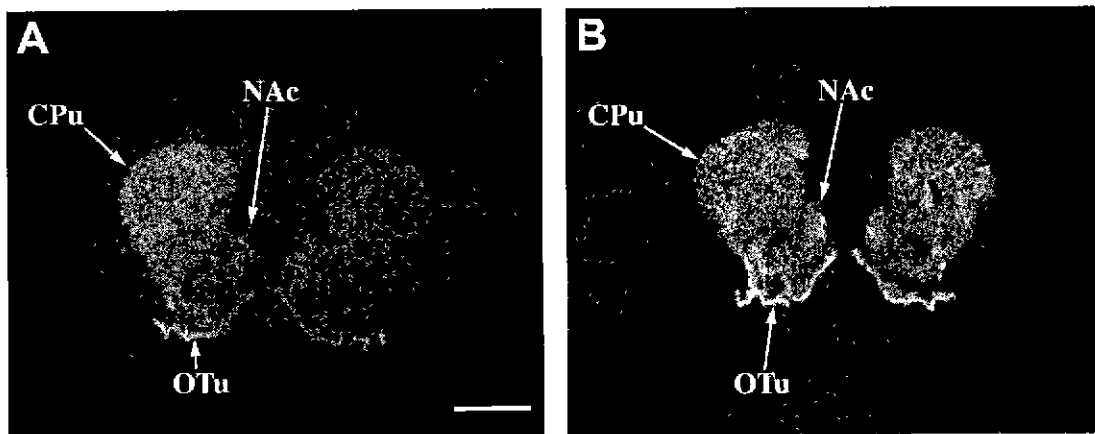


Fig. 1. Film autoradiographs on the expression of DA D₁ receptor mRNA in control (A) and caffeine (B) treated rats.

Sections were made through 1.00 mm from the interaural line. Bars represent 2 mm.

CPu; caudate putamen, NAc; nucleus accumbens, OTu; olfactory tubercle.

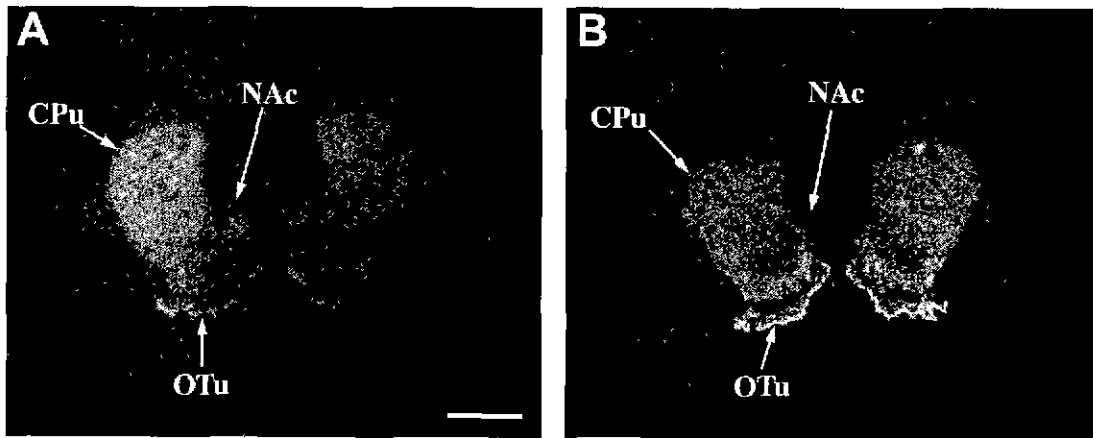


Fig. 2. Film autoradiographs on the expression of DA D₂ receptor mRNA in control (A) and caffeine (B) treated rats.

Sections were made through 1.00 mm from the interaural line. Bars represent 2 mm.
CPu; caudate putamen, NAc; nucleus accumbens, OTu; olfactory tubercle.

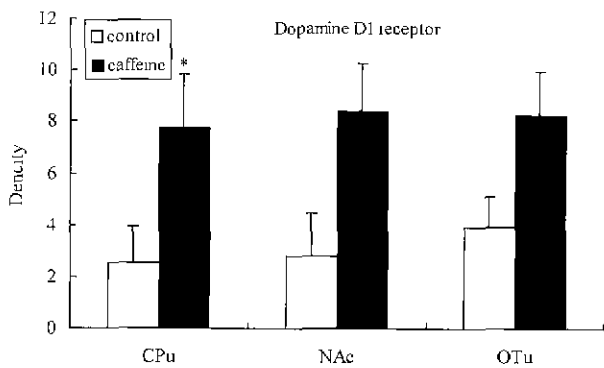


Fig. 3. Quantitative analysis of DA D₁ receptor mRNA in the CPu, NAc, OTu of the control group and caffeine treated rats (n=5).

DA D₁ receptor mRNAs were significantly increased in the caffeine treated rats (* $p < 0.001$).

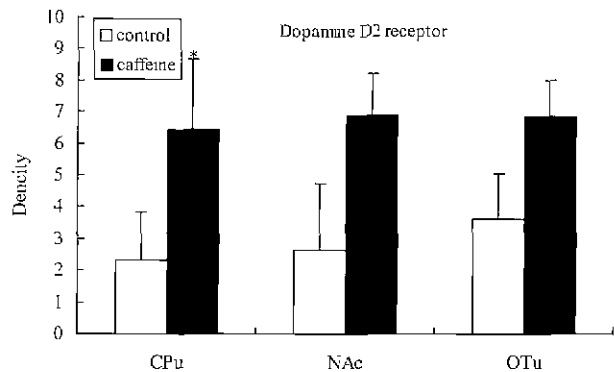


Fig. 4. Quantitative analysis of DA D₂ receptor mRNA in the CPu, NAc, OTu of the control group and caffeine treated rats (n=5).

DA D₂ receptor mRNAs were significantly increased in the caffeine treated rats (* $p < 0.001$).

D₁과 D₂ 수용체 mRNA의 양적 분포를 알 수 있었다.

카페인은 아데노신 수용체에 경쟁적 길항제로 작용하며 아데노신이 중추신경계에 미치는 효과와 상반되는 것으로 알려져 있다[16]. 본 연구 결과로 미루어 보아 카페인은 도파민 분비를 활성화시키는 것으로 이는 도파민 수용체와 함께 기능적으로 반응하는 아데노신 수용체의 경쟁적 길항제에 의한 것으로 생각된다. 그러므로 카페인은 도파민 수용체로부터 아데노신의 음성적 길항제효과를 제거함으로써 카페인의 행동적 효과를 만들 수 있다. 따라서 이와 같은 효과를 유도하기 때문에 카페인은 도파민 활

성을 자극하는 것으로 생각된다.

본 실험에서 도파민 수용체 mRNA의 발현은 도파민 D₁ 수용체가 도파민 D₂ 수용체보다 CPu, NAc, OTu에서 많이 발현되었다. 도파민 D₁ 수용체에 대한 agonist인 SKF-38393을 투여한 결과 카페인 투여한 흰쥐에서와 같이 운동계 활성이 증가되었다[10]. 따라서 카페인의 투여는 도파민 D₂ 수용체보다 도파민 D₁ 수용체에 더 도파민 분비를 촉진시킬 수 있었다. 이것은 도파민 D₁과 D₂ 수용체 모두 카페인의 투여에 의해 과잉 분비되었지만 도파민 D₁ 수용체가 D₂ 수용체보다 더 강한 upregulator로 작용

함을 알 수 있었다. 도파민 D₁-type은 AC의 활성을 증가시켜 조직내 cAMP의 농도를 증가시키는 반면 도파민 D₂-type은 AC의 활성을 억제시켜 조직내 cAMP의 농도를 감소시킨다는 보고와 일치되는 결과이다[3,21]. 또한 본 연구에서 나타난 결과로 미루어 보아 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA는 CPu, NAc, OTu 같은 부위에서 발현되어 서로 상호 조절하여 기능을 나타내지만 도파민 D₁ 수용체가 더 많이 발현됨을 알 수 있었다.

도파민 D₁과 D₂ 수용체에 대한 agonist를 흰쥐에 동시 투여하였을 때 운동계 활성화에 관한 상승효과가 있었으나 이 agonist에 대한 내성은 거의 생성되지 않았다[11]. 카페인에 대한 운동계 자극 효과에서의 내성은 도파민 D₁ 수용체 아형에 의해 중재됨을 보여 주는 것이다.

결론적으로 카페인은 도파민 D₁과 D₂수용체 모두에 upregulator로 작용하지만 도파민 D₁ 수용체에 더 upregulator로 작용함을 알 수 있었다.

요 약

카페인의 과다 복용은 뇌에서 국소적이고 광범위한 경련을 일으키는데 뇌의 선조체에서 아데노신 수용체에 길항제로 작용하여 흥분을 야기시켜 도파민 수용체의 분비 조절에 밀접한 관련이 있다. 그러나 카페인 투여로 인한 선조체와 측좌핵(nucleus accumbens, NAc), 후각결절(olfactory tubercle, OTu)에서 도파민 D₁과 D₂수용체 mRNA의 발현에 대한 연구는 아직 없다. 본 연구에서는 성숙한 수컷 흰쥐에 카페인을 4주간 투여하여 흰쥐 뇌의 선조체 부위인 CPu, NAc, OTu에서 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNAs의 발현양상을 ribo-probe를 이용한 *in situ* hybridization으로 조사하였다.

도파민 D₁과 D₂ 수용체 모두 대조군에 비해서 CPu, NAc, OTu에서 높게 발현되었는데 도파민 D₁ 수용체 mRNA 발현 밀도를 측정하였을 때, 정상 대조군의 CPu에서는 2.52 ± 1.40 , NAc에서 2.78 ± 1.69 , OTu에서 3.91 ± 1.28 으로 측정되었고, 카페인을 투여한 군에서는 CPu에서 7.76 ± 2.09 , NAc에서 8.42 ± 1.85 , OTu에서 8.21 ± 1.72 로 측정되었다. 도파민 D₂ 수용체 mRNA 발현 밀도는 정상 대조군에서는 2.32 ± 1.52 , NAc에서 2.63 ± 2.11 , OTu에서 3.61 ± 1.43 로 측정되었고, 카페인을 투여한 군에서는 CPu

에서 6.41 ± 1.82 , NAc에서 6.89 ± 1.32 , OTu에서 6.82 ± 1.18 로 정상 대조군 보다 더 증가되었다. 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA의 발현 정도는 도파민 D₁ 수용체 mRNA가 도파민 D₂ 수용체 mRNA보다 많이 발현되었다. 이는 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA가 흰쥐 뇌의 선조체에서 모두 발현되나 도파민 D₁ 수용체가 더 많이 발현되는 것으로 보아 카페인이 도파민 D₁ 수용체의 운동계 활성화효과에 더 많은 상승 효과를 가짐을 증명해준다. 결론적으로 카페인의 과다 흡수는 도파민 D₁과 D₂ 수용체 mRNA 발현에 upregulator로 작용함을 알 수 있었다.

감사의 글

“이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 수행되었음(KRF-2000-015-DP0405).”

참 고 문 헌

1. Apfeldorf, W. J. and Shear. 1993. Caffeine potentiation of taste in panic-disorder patients. *Biol. Psychiatry* **33(3)**, 217-219.
2. Charuchinda, C., P. Supavilai, M. Karobath and J. M. Palacios. 1987. Dopamine D₂ receptors in the rat brain : autoradiographic visualization using a high-affinity selective agonist ligand. *J. Neurosci.* **7**, 1352-1360.
3. Civelli, D., J. R. Bunzow and D. K. Grandy. 1993. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 281-307.
4. Dawson, T. M., P. Barone, A. Sidhu, J. K. Wamsley and T. N. Chase. 1988. The D₁ dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* **26(1)**, 83-100.
5. Mechanism of action of caffeine, pp.97-150, *In* Garattini, S. (ed.), *Caffeine, Coffee, and Health*, Raven Press Ltol., New York.
6. Fredholm, B. B. 1980. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine. *Trends in Pharmacological Sciences* **1**, 129-132.
7. Freneau, R. T., G. E. Duncan, M. G. Fornaretto, A. Dearry, J. A. Gingrich, G. R. Bresse and M. G. Caron. 1991. Localization of D₁ dopamine receptor mRNA

- in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 3772-3776.
8. Fredholm, B. B. 1995. Adenosine, adenosine receptors and the action of caffeine. *Pharmacology and Toxicology* **76**, 93-101.
 9. Gilliland and Andress. 1981. Ad lib caffeine consumption, symptoms of caffeinism and academic performance. *Am. J. Psychiatry* **138(4)**, 512-514.
 10. Garrett, B. E. and R. R. Grettiths. 1997. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **57(3)**, 533-541.
 11. Garrett, B. E. and S. G. Holtzman. 1994. Caffeine cross tolerance to selective D₁ and D₂ receptor agonists not to their synergistic interaction. *Eur. J. Pharmacol.* **262(1-2)**, 65-75.
 12. James, H. M. W., A. Mansour, D. J. Healy, R. K. Kuehn, Q. Y. Zhou, R. B. James, H. Akil, O. Civelli and S. J. Watson. 1991. Comparison of the distributions of D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurophysiopharmacology* **5**, 231-242.
 13. Levey, A. L., S. M. Hersch, D. B. Rye, R. K. Sunahara, H. B. Niznik, C. A. Kitf, D. L. Price, R. Maggio, M. R. Brann and B. J. Climax. 1993. Localization of D₁ and D₂ dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8861-8865.
 14. Mengod, G., M. Inocencia, M. Martinez-Mir, M. T. Vilaro and J. M. Palacios. 1989. Localization of the mRNA for the dopamine D₂ receptor in the rat brain by *in situ* hybridization histochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8560-8564.
 15. Monsma, F. J. Jr., L. C. Mahan, L. D. McVittie, C. R. Gerfen and D. R. Sibley. 1990. Molecular cloning and expression of a D₁ dopamine receptor linked to adenylyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 6723-6727.
 16. Okada, M., K. Mizuno and S. Kaneko. 1996. Adenosin A₁ and A₂ receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci. Lett.* **212(1)**, 53-56.
 17. Okada, M., K. Kiryu, Y. Kawata, K. Mizuno, K. Wada, H. Tasaki and S. Kaneko. 1997. Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine releases by *in vivo* microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* **321(2)**, 181-188.
 18. Ongini, E. and B. B. Fredholm. 1996. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 364-372.
 19. Sokoloff, P., B. Giros, M. P. Martres, M. L. Bouthenet and J. C. Schwartz. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor(D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146-151.
 20. Sunahara, R. K., H. C. Guan, B. F. O'Dowd, P. Seeman, S. R. Laurier, J. George, H. H. M. Van Tol and H. B. Niznik. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* **350**, : 614-619.
 21. Sibley, D. R. and F. J. Jr. Monsma. 1992. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol.* **13**, 61-69.
 22. Svenningsson, P. and B. B. Fredholm. 1997. Caffeine mimics the effect of a dopamine D_{2/3} receptor agonist on the expression of immediate early genes in globus pallidus. *Neuropharmacology* **36(9)**, 1309-1317.
 23. Van Tol, H. H. M., J. R. Bunzow, H. C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik and Civelli. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**, 610-614.
 24. Weiner, D. M., A. I. Levey, R. K. Sunahara, H. B. Niznik, B. F. O'Dowd, P. Seeman and M. R. Brann. 1991. D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1859-1863.
 25. Zhou, Q. Y., D. K. Grandy, L. Thambi, J. A. Kushner, H. H. M. Van Tol, R. Cone, D. Pribnow, J. Salon, J. R. Bunzow and O. Civelli. 1990. Cloning and expression of human and rat D₁ dopamine receptors. *Nature* **347**, 76-80.

(Received January 3, 2001; Accepted January 31, 2001)