大韓藥理學雜誌 : 第20卷 第2號
Korean J. of Pharmacology
Volume 20, Number 2, 1984

백서 뇌내 Endorphin의 일주기 변동에 관한 연구

전북대학교 의과대학 약리학교실 및 전남대학교 의과대학 마취과학교실*

정 창 영*·김 기 원·조 규 박

=Abstract=

A Study on the Diurnal Variation of Endorphin in Rat Brain

Chang-Young Jung*, Ki-Won Kim and Kyu-Park Cho

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

Contents of immunoreactive β-endorphin and maximum of ^{3}H-morphine binding was measured in the rat midbrain homogenates from different subgroups at 24 hour interval over 24 hours. Animals were adapted to the light-dark cycle(L:D, 12:12) or constant darkness (D:D, 12:12) for 3 weeks. After the adaptation, 0.5 ml of physiologic saline or drug was administered twice a day for 2 weeks.

A highly significant circadian rhythm with the peak(94.8±7.7 fmole/mg protein) at 06:00 and the nadir (27.6±2.4 fmole/mg protein) at 18:00 was observed in control group. Constant dark or treatment of reserpine, pargyline, imipramine, amphetamine and chlorpromazine modified the diurnal rhythm in the time of peak and nadir, shape, phase amplitude and 24 hour mean of β-endorphin contents. Opiate receptor binding by ^{3}H-morphine also showed highly significant diurnal change in control and constant dark adapted rats. Statistical analysis by one-way analysis of variance and two-way analysis of variance indicates that there are highly significant differences between the diurnal change of β-endorphin in control and those constant dark adapted and drug treated groups. However diurnal change of maximum ^{3}H-morphine binding is closely related to the change of β-endorphin contents.

The results are interpreted with regard to the circadian rhythm of beta-endorphin contents, its modification by psychoactive drugs and possible mechanism of diurnal change of opiate receptor in brain.

서 론

1973년 처음으로 뇌조직내에는 specific opiate binding site가 존재함이 확인되었으며[1~3]. 이어 뇌조직 추출물과 뇌척수액내에는 opiate receptor binding에 경쟁적으로 작용하거나 또는 적출표본에서 morphine의 효과를 나타내는 내재성 물질이 존재함이 발견되었다[4~6]. 그후 Hughes 등[7]은 morphine 작용을 나타내는 이 물질이 pentapeptide인 methionine-enkephalin과 leucine-enkephalin으로 되있으며, methionine-enkephalin은 그 구조가 뇌하수체 hormone의 하나인 beta-lipotropin(beta-LPH) 61~65분획과 동일함을 알게 되었다. 곧 이어 Guillemin 등[8], Li와 Chung 등[9], Bradbury 등[10], 그리고 Graf 등[11]은 beta-LPH의 다른 분획들도 opiate와 같은 성질을 갖고 있음을 확인하였으며, 이를 alpha-endorphin(beta-LPH 61~76),

gamma-endorphin(beta-LPH 61~77) 및 beta-endorphin(beta-LPH 61~91)이라 명명하였다. Enkephalin을 포함하여 이들 endorphins는 뇌내의 specific neuronal pathway내에 함유되어 뇌의 항상성 기전에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 그 중에서도 beta-endorphin은 그 약리작용이 가장 강력하여 이를 측뇌실내에 투여하면 각종 행위의 변화와 더불어 antinociception, hypothermia 또는 심할 때에는 muscular rigidity까지도 일으킨다[12~16].

한편 circadian rhythm(circa-diem)은 생체의 기능이 대략 24시간을 주기로 규칙적인 변동을 일으킴을 말하며[17], 약력학면에서는 약물의 효과, 특성, 흡수, 분포, 대사 및 배설 등이 명암주기에 따라 24시간을 주기로 변동됨이 잘 알려져 있다[18~22]. 최근 Freidman과 Walker[23], Hanin 등[24], Scheving 등[25] 및 Simon과 George 등[26]은 흰쥐의 뇌내 acetylcholine, norepinephrine, dopamine 또는 5-hydroxytryptamine 등 신경전도물질의 함량이 일중변동을 일으킨다 하였고, 더우기 Romero와 Axelrod[27] 그리고 Kafka 등[28]은 뇌내 adrenaline성 수용체가 Naber 등[29]은 dopamine성수용체가 일중변동을 일으킨다 하였으며, 본 교실의 이[30]는 흰쥐 뇌내 opiate수용체의 일중변동이 제종 중추신경계에 작용하는 약물에 의하여 영향을 받는다 하였다.

그러나 뇌내 endorphin함량의 일중변동에 관한 보고는 극히 적으며 또한 endorphin함량 일중변동에 미치는 psychoactive drugs의 영향과 opiate수용체의 일중변동기전에 대해서는 거의 알려진 바 없다. 따라서 저자는 명암주기 또는 지속적인 암주기에 적응시킨 흰쥐에서 수종 중추신경계에 작용하는 약물을 처리한 후 시간별 뇌내 endorphin함량을 측정하고 이어 뇌내 endorphin함량 변동과 opiate 수용체의 일중변동과의 관계를 보고저 본 실험을 시도하였다.

실 험 방 법

실험동물로는 체중 120 gm 내외의 웅성 백서를 사용하였다. 동물 36수를 1군으로 하여 빛과 소음이 차단된 온도 22±2°C의 동물 cage 내에 넣고 3주간 08:00시부터 20:00시까지 조명을 가한 후 20:00시에서 08:00시까지 조명을 가하지 않거나(L:D, 12:12), 24시간동안 조명을 가하지 않은(D:D, 12:12) 상태에서 명암에 적응시켰다. 대조군에서는 생리적 식염수를, 그리고 실험군에서는 약물을 각각 2주간 12시간 간격으로 1일 2회 복강내로 주사하여 실험에 사용하였다. 뇌조직은 06:00시부터 매 4시간마다 백서 6수를 단두하여 약 0.5 gm의 간뇌를 채취한 다음 표본을 즉시 wet tissue gm당 glacial acetic acid 9 ml로 homogenate를 만들고, 원심(10,000g×30min.)시킨 후 supernate를 동량의 acetone과 혼합하여 다시 동일 방법으로 원침시킨 다음 supernate를 분리하여 20°C에서 air로 증발 건조시켜 beta-endorphin radioimmunoassay에 사용하였다. beta-endorphin 측정은 beta-endorphin (I-125) radioimmunoassy kit(New England Nuclear Co.)를 사용하였다. 즉 0.1 M phophate buffer로 건조된 supernate를 희석한 다음, ice water bath내에서 5 ml용량의 siliconized tube에 assay buffer, 희석된 supernate, beta-endorphin(I-125)(beta-endorphin tracer) 그리고 beta-endorphin에 대한 rabbit antiserum을 넣어 mixer로 2~5초 섞은 후 4°C에서 24시간 incubation한 후 ice water bath에서 charcoal suspension을 stirring시키면서 0.5 ml씩 tube에 넣고 잘 혼합한 후 냉동 원심 분리기(I.E.C.)로 4°C, 2,400 rpm으로 10 분간 원심시켜 얻은 supernate의 radioactivity를 gamma counter(Packard)로 측정하였다. Radioactivity의 정량적인 환산은 동시에 행한 beta-endorphin의 표준곡선으로부터 구하였다.

뇌내 opiate수용체의 일중변동은 06:00시부터 매 4시간마다 백서 6수를 단두하여 약 0.5 gm의 간뇌를 채취한 다음 표본을 즉시 얼음으로 냉각시킨 50 mM tris-HCl buffer 15 ml로 homogenate를 만든 다음 homogenate에 대한 ^{3}H-morphine의 saturable binding을 측정함으로써 관찰하였다. ^{3}H-morphine의 saturable binding은 Godstein 등[31]의 방법에 따랐다. 즉 tris-HCl buffer 0.7 ml에 non-labelled morphine 0.75 ml와 0.05μCi의 ^{3}H-morphine(specific activety, 60 Ci/ml)를 혼합하여 37°C 수조에서 5분간 incubation한 후 이어 0.5 ml의 homogenate를 혼합하여 동일 조건에서 15분간 incubation한 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 용해시킨 후 counting cocktail 10 ml를 가하여 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다. Specific binding은 total binding으로부터 non-labelled morphine 10 μM 존재하에서 얻어진 non-specific binding치를 제하여 산출하였다. Opiate

receptor에 대한 ^{3}H-morphine binding의 Bmax는 Akera와 Cheng의 방법[32]에 따라 산출하였다. 단백질은 Lowry 등[33]의 방법으로 측정하였으며 결합된 ^{3}H-morphine의 양은 pmole/mg protein으로, 조직내 beta-endorphin 함량은 fmole/mg protein으로 표시하였다. 얻어진 실험성적은 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance)과 이원 배치 분산분석(two-way analysis of variance)으로 분석하였으며 시간별 측정치간의 유의성은 q ratio로 검정하였다.

사용한 약물은 beta-endorphin(I-125)(New England Nuclear Co.), reserpine(아주약품), pargyline (Sigma), imipramine(영풍제약), amphetamine(Sigma), chlorpromazine HCl(삼성제약) 및 morphine HCl(삼성제약)이었다.

실 험 성 적

1) 대조군에서의 실험

동물을 3주간 L:D, 12:12에 적응시키고 동일조건하에서 생리적 식염수(0.9% NaCl) 0.5 ml를 1일 2회 처리한 대조군에서 명암주기에 따른 뇌내 beta-endorphin 함량을 관찰하였다. 즉 24시간 평균 beta-endorphin 함량은 46.7±3.6 fmole/mg protein이었으며, 일중 최고의 함량은 94.8±7.7 fmole/mg protein으로 암기말기인 02 : 00시에 관찰되었다. 명기에는 뇌내 beta-endorphin 함량이 초기에 급격히 감소한 다음 지속적으로 감소되어 명기말기인 18 : 00시에 최하로 27.6±2.4 fmole/mg protein(진폭 : −40%)을 보였다 (Table 1,2, Fig. 1). 이들 성적의 일원배치 분산분석은 각 시간에 따른 뇌내 beta-endorphin 함량에는 유의한 차이가 있음을 보여주며($F=5.23$, $p<0.05$), 동시에 산출한 q ratio로써 02 : 00시의 치가 여타의 치보다 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다. 이상 실험성적은 흰 쥐의 뇌내 beta-endorphin 함량이 유의하게 일중변동을 일으키고 있음을 가리킨다.

2) 지속적인 암적응이 뇌내 beta-endorphin 함량의 일중변동에 미치는 영향

Fig. 2는 3주간 지속적인 암적응을 시킨 후 동일조건에서 2주간 생리적 식염수(0.5 ml)를 1일 2회 투여한 군에서의 뇌내 beta-endorphin 함량을 관찰한 것이다. 본 표본에서 24시간 평균 beta-endorphin 치는 35.9±3.1 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 감소되었다($p<0.05$)(Table 2). 또한 지속적인 암적응으로 beta-endorphin 일중 변동곡선은 그 shape, phase 그리고 최고 및 최저함량 등이 대조군에서와는 현저히 다름을 볼 수 있었다. 즉 beta-endorphin 함량치는 14 : 00에 64.2±5.7 fmole/mg protein으로 최고로 증가한 후 점차 감소하여 02 : 00시에 최저 22.6±2.1 fmole/mg protein까지 감소하였다. 일원배치 분산분석 결과 지속적인 암적응을 시킨 표본에서 시간에 따른 beta-endorphin 함량변동은 유의하게 변동함을 알 수 있으며($F=4.28$, $p<0.05$), 이들 상호간의 q ratio로써 14 : 00시와 18 : 00시의 함량치가 여타에서의 치보다 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었다($p<0.05$)(Table 3). 약물처리 및 시간에 따른 대조군과의 차이를 보기 위하여 이원배치 분석을 행하였던 바 지속적인 암적응에 의한 F치가 3.79($p<0.05$)이었으며 시간변동에 따른 F가 4.31($p<0.05$)로써 암적응 표본에서의 beta-endorphin 함량 일중변동 곡선이 대조군

Table 1. Diurnal rhythms of immunoreactive beta-endorphin in control and its modification by constant darkness and various drugs in the rat midbrain homogenates. Total immunoreactive beta-endorphin was measured at 6 points of 4 hour interval throughout the day. Each value represents the mean with S.E.M. from 6 experiments

(f mole/mg protein)

Time	control	constant darkness	reserpine	pargyline	imipramine	amphetamine	chlorpromazine
2 hr	38.3±2.5	20.8±1.9	41.3±3.6*	77.2±7.4	83.3±8.1#	71.7±6.2	33.5±2.8
6 hr	94.8±7.7#	24.7±2.1	63.4±6.2	33.5±3.2	63.8±5.6	53.5±4.6	47.3±3.2
10 hr	51.8±3.8	39.5±4.0	105.6±9.5	11.2±0.9*	15.7±1.0	95.1±8.8#	74.5±7.0#
14 hr	39.3±3.1	64.2±5.7#	88.2±8.0#	21.6±1.8	7.9±0.6*	59.8±5.4	22.0±2.1
18 hr	27.6±2.4	44.1±4.3	59.6±5.1	46.7±4.2	41.7±4.2	20.3±1.6*	8.4±0.4*
22 hr	28.0±1.5*	22.6±2.1*	53.1±4.7	23.1±2.0	21.6±1.8	29.3±2.1	21.0±1.8

#: Peak *: Nadir

Table 2. 24 hour mean of total immunoreactive beta-endorphin and amplitude of peak and nadir in constant darkness, reserpine, pargyline, imipramine, amphetamine and chlorpromazine treatment in the rat midbrain homogenates

Treatment	24 hour mean	Amplitude	
	pmole/mg protein	peak(%)	nadir(%)
control	46.7±3.6	+ 81.9	−40.9
constant darkness	35.1±3.1*	+ 78.8	−42.1
reserpine	68.5±5.4*	+105.4	−39.7
pargyline	35.5±2.8*	+117.5	−79.6
imipramine	38.7±2.2*	+116.5	−68.5
amphetamine	55.1±4.3*	+ 74.4	−63.2
chlorpromazine	34.1±2.8*	+119.1	−75.4

*: Significantly different from control value($p<0.05$)
Amplitude denotes % change from 24 hour mean.

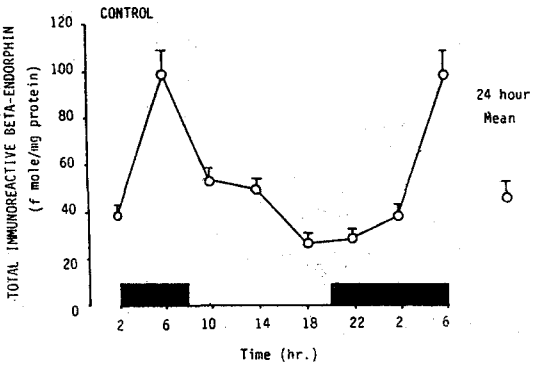

Fig. 1. Diurnal variation of beta-endorphin in control rat midbrain homogenates. Animals were adjusted to the light-dark cycle(L: D, 12:12) for 5 weeks and 0.5 ml of physiological saline was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean±SEM from 6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

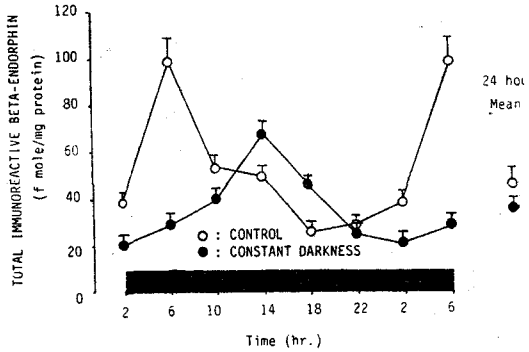

Fig. 2. Diurnal variation of beta-endorphin and its modification by constant dark condition in the rat midbrain homogenates. Animals were housed in constant dark state(D:D, 12:12) for 5 weeks and 0.5 ml of physiological saline was injected twice a day for 2 weeks before the experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean ±SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=4.28(p<0.05)$, q ratio; 14, 18 2, 6, 10, 22 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and constant dark-group shows significant change over time($F=5.68$, $p<0.05$) and adaptation($F=6.41$, $p<0.05$).

에 있어서와는 현저히 다름을 알 수 있다(Table 4).

3) 뇌내 beta-endorphin 함량에 미치는 수종 psychoactive drugs의 영향

제종 중추신경계에 작용하는 약물이 내인성 물질의 합성·유리·대사 또는 체내 함량 등의 일중변동에 영향을 미침이 알려져 있으므로[23~26] 본 실험에서는 L:D, 12:12 cycle에 3주간 적응시킨 표본에서 2주간 약물을 처리하여 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동에 미치는 영향을 관찰하였다.

Reserpine의 영향 : Reserpine은 중추 및 말초 교감신경 neuron에서의 norepinephrine을 고갈시키고

Table 3. Statistical analysis of circadian rhythm of total immunoreactive beta-endorphin in the rat midrain homogenates

Treatment	One-way analysis of variance		q ratio test
	F	p	(p<0.01)
control	5.23	p<0.05	6>2.10,14,18,22
constant darkness	4.28	p<0.05	14,18>2,6,10,22
reserpine	18.43	p<0.01	14>2,6,10,18,22
pargyline	7.63	p<0.05	2>6,10,14,18,22
imipramine	12.74	p<0.01	2,6>10,14,18,22
amphetamine	5.49	p<0.05	2,10>6,14,18,22
chlorpromazine	5.86	p<0.05	10>2,6,14,18,22

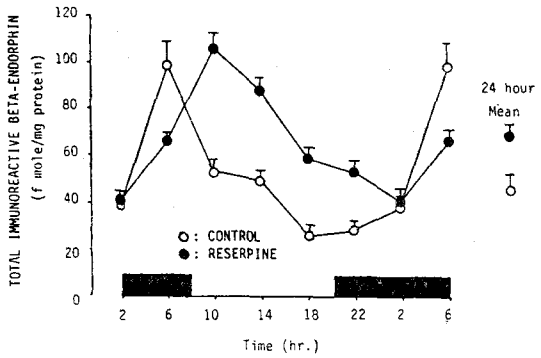

Fig. 3. Diurnal variation of beta-endorphin and its modification by reserpine in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 1mg/kg of reserpine was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean±SEM from 6 experiments. Statitistical analysis: One-way analysis of variance; F=18.43 (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=12.97, p<0.01) and treatment (F=18.45, p<0.01).

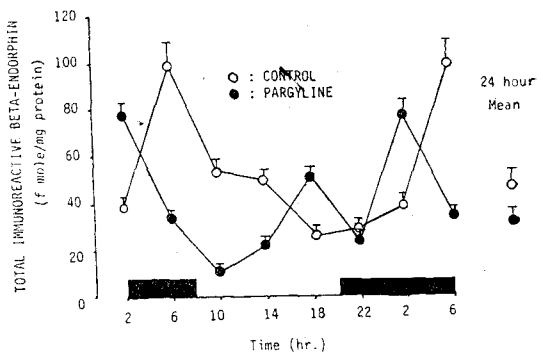

Fig. 4. Diurnal variation of beta-endorphin and its modification by pargyline in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 5mg/kg of pargyline was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean±SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way variance; F=7.63(p<0.01), q ratio; 2 6,10,14,18,22(p<0.01). Two-way analysis of variance comparing control and pargyline-treated group shows significant change over time(F=4.31, p<0.05) and treatment (F=3.79, p<0.05).

뇌내 5-hydroxytryptamine 함량을 감소시킴이 잘 알려져 있다. Reserpine 1 mg/kg을 1일 2회 2주간 처리한 표본에서 24시간 평균 뇌내 beta-endorphin 함량은 68.5±5.4 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 증가하였고, 최고의 함량은 대조군에서와는 달리 명기초기인 10 : 00시에 88.2±8.0 f mole/mg protein(진폭 : +105.4%)까지 증가한 후 점차 감소하여 암기중간인 02 : 00시에 최하로 41.3±3.6 fmole/mg protein(진폭 : −39.7%)까지 감소하였다(Fig. 3, Table 1,2).

Reserpine처리 표본에서 시간별 각 beta-endorphin 함량 변수의 일원배치 분산분석 결과 유의한 차이가 있었고(F=18.3, p<0.05), q ratio로써 10 : 00시의 치가 여타의 치보다 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다(p<0.05)(Table 3). 대조군과 reserpine처리군에

Table 4. Statistical analysis of the influences of time and various drugs on the total immunoreative beta-endorphin 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	6.41	$p<0.05$	5.68	$p<0.05$
reserpine	18.45	$p<0.01$	12.97	$p<0.01$
pargyline	3.79	$p<0.05$	4.31	$p<0.05$
imipramine	5.13	$p<0.05$	3.98	$p<0.05$
amphetamine	8.36	$p<0.01$	7.28	$p<0.01$
chlorpromazine	5.92	$p<0.05$	6.44	$p<0.05$

서 시간에 따른 차이와 약물처리로 인한 차이를 이원배치 분산분석으로 검토해본 결과 시간에 따른 F치는 12.79이었고 약물처리로써의 F는 18.45($p<0.005$)로 reserpine처리군에서의 beta-endorphin 함량 일중변동곡선이 대조군에서와는 현저한 차이가 있음을 볼 수 있었다(Table 4).

Pargyline의 영향 : MAO inhibitor는 정신과 영역에서 항우울제로 사용될 뿐만 아니라 교감신경 neuron 내 pseudoneurotransmitter의 함량을 증가시킨다. 또한 이들 MAO inhibitor는 흰쥐에서 monoamine 대사 및 일중변동에 영향을 미침이 알려져 있다[34~35]. Fig. 4는 pargyline 5mg/kg을 1일 2회 2주간 처리후의 뇌내 beta-endorphin 함량의 일중변동을 본 것이다. Pargyline처리군에서 24시간 평균 beta-endorphin 함

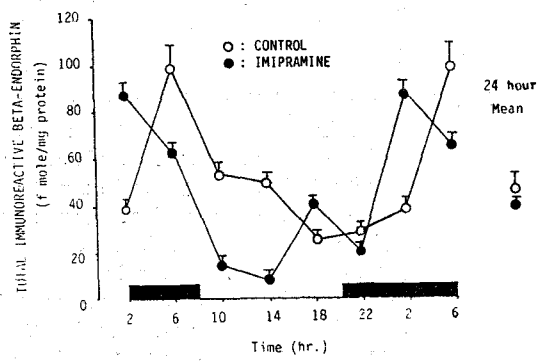

Fig. 5. Diurnal variation of beta-endorphin and its modification by imipramine in the rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 10 mg/kg of imipramine was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes mean ±SEM from 6 experiments. Statistical analysis: One-way analysis of variance; $F=12.74$ ($p<0.01$), q ratio; 2,6 10,14,18, 22($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and imipramine treated group shows significant change over time ($F=3.98$, $p<0.05$) and treatment($F=5.13$, $p<0.05$).

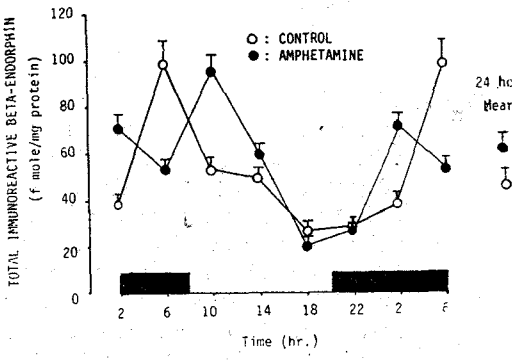

Fig. 6. Diurnal rhythm of beta-endorphin and its modification by amphetamine in the midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 5mg/kg of amphetamine was injected twice a day 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each pointes denotes the mean± SEM from 6 experiments. Statistical analysis of variance; One-way analysis of variance; $F=5.49$ ($p<0.05$), q ratio; 2,10 6,14,18,22($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and amphetamine-treated group shows significant change over time($F=7.28$, $p<0.01$) and treatment($F=8.36$, $p<0.01$).

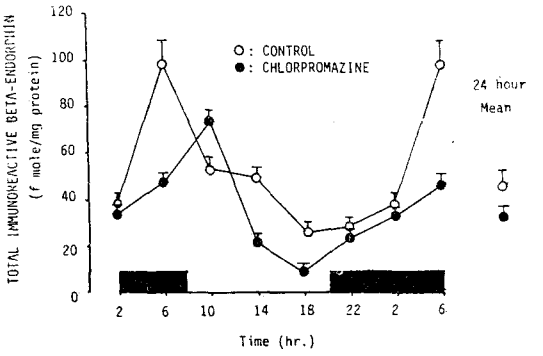

Fig. 7. Diurnal rhythm of beta-endorphin and its modification by chlorpromazine in rat midbrain homogenates. Animals were adapted to L:D, 12:12 cycle for 5 weeks and 10 mg/kg of chlorpromazine was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Each point denotes the mean±SEM from 6 experiments. Statistical analysis; One-way analysis of variance; $F=5.86(p<0.05)$, q ratio; 10 2, 6, 14, 18, 22 ($p<0.01$). Two-way analysis of variance comparing control and chlorpromazine-treated group shows significant change over time($F=6.44$, $p<0.05$) and treatment ($F=5.92$, $p<0.05$).

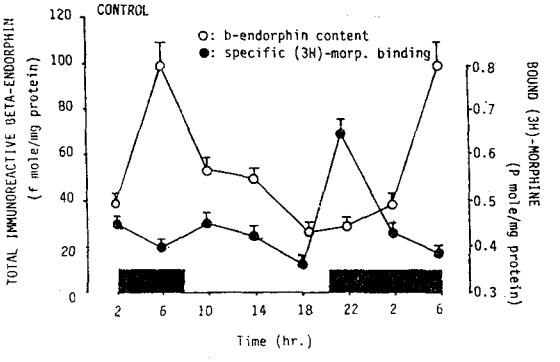

Fig. 8. Diurnal variation of beta-endorphin and ^{3}H-morphine binding in control rat midbrain homogenates. Animals were adjusted to the light-dark cycle(L:D, 12:12) for 5 weeks and 0.5 ml of saline was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Specific ^{3}H-morphine binding was measured in the same preparation in which the beta-endorphin was assayed. Each point denotes the mean± SEM from 6 experiments. The shaded area indicates the dark phase of light-dark cycle.

량은 35.5±2.8 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 감소되었으며(Table 2), beta-endorphin 함량 일중변동곡선도 그 shape, phase, 진폭 및 최고 또는 최저함량 시기 등에 있어서도 대조군에 있어서와는 달랐다. 즉 beta-endorphin 함량은 명기 말기인 18 : 00시에 증가하였다가 암기 초기에는 감소한 후 다시 증가하여 최고의 함량은 77.2±7.4 fmole/mg protein(진폭 : +117.5%)으로 암기말기인 02 : 00에 볼 수 있었으며 최하의 함량은 명기초기인 10 : 00시에 11.2±0.9 fmole/mg protein(진폭 : −68.4%)을 보였다(Fig. 4, Table 1, 2).

Pargyline처리군에서 일원 배치 분산분석 결과 F치는 7.63($p<0.05$)으로 시간에 따른 각 변수에 유의한 차이가 있음을 볼 수 있었으며, q ratio로써 02 : 00시에서의 함량치가 특히 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다($p<0.05$)(Table 3). 또한 이원배치 분산분석 결과는 약물처리로써($F=4.31$, $p<0.05$), 그리고 시간에 따라($F=4.31$, $p<0.05$) pargyline처리군의 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동이 대조군에서와는 현저히 다름을 보여준다(Table 4).

Imipramine의 영향 : Antidepressant는 교감신경 절후섬유 말단에서 norepinephrine의 재흡수를 억제할 뿐만 아니라 adrenergic receptor의 감수성을 변형시킴이 알려져 있다[28,29]. Fig. 5는 imipramine 10mg/kg를 1일 2회 2주 처리 흰쥐에서 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동을 관찰한 것이다. Imipramine처리 흰쥐에서 24시간 평균 *beta-endorphin* 함량은 38.7±2.2 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 감소되었으며(Table 2), beta-endorphin 함량 일중변동 곡선은 대조군과 차이가 있었다. 즉 최고의 beta-endorphin 함량치는 암기 말기인 02 : 00시에 83.8±8.1 fmole/mg protein(진폭 : +116.5%)까지 증가하나 명기에는 급속히 감소하여 14 : 00시에는 최하 7.9±0.6 fmole/mg protein(진폭 : −79.6%)까지 감소하나 명기 말기에서 약간 상승하였다(Fig. 5, Table 1, 2).

Imipramine처리군에서의 일원 배치 분산분석으로 시간별 각 측정치는 유의한 차이를 갖고 있음을 알 수 있었으며($F=12.74$, $p<0.01$), q ratio는 02 : 00시와 06 : 00시의 치가 여타의 치보다 증가되어 있음을 나타내었다($p<0.05$)(Table 3). 이원 배치 분산분석은 imipramine처리군에서의 beta-endorphin 함량 일중변동이 대조군과는 imipramine처리로써 ($F=5.13$, $p<$

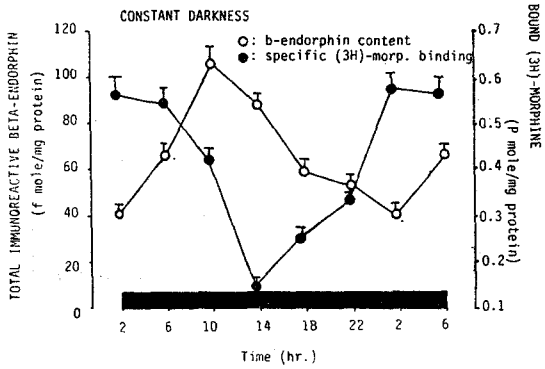

Fig. 9. Diurnal variation of beta-endorphin and ^{3}H-morphine binding in dark adjusted rat midbrain homogenates. Animals were adjusted the dark-dark cycle(D:D, 12:12) for 5 weeks and 0.5 ml of saline was injected twice a day for 2 weeks before experiments intraperitoneally. Specific ^{3}H-morphine binding was measured in the same preparation in which the beta-endorphin was assayed. Each point denotes the mean ±SEM from 6 experiments. The shaded area indicates the dark phase of dark-dark cycle.

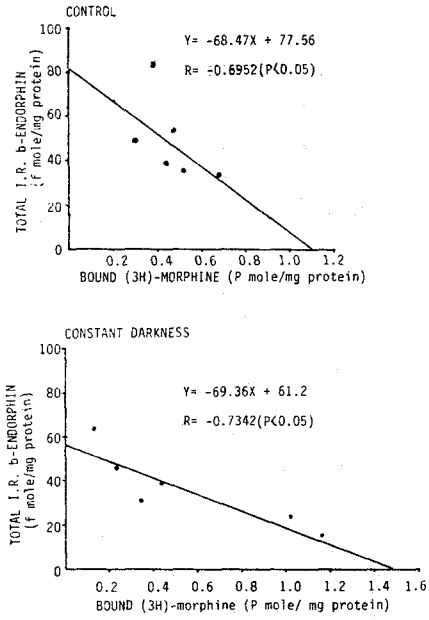

Fig. 10. Correlation belween beta-endorphin and specific ^{3}H-morphine binding in control (upper) and dark adapted group(lower). Regression line for beta-endorphin versus specific ^{3}H-morphine binding.

0.05), 그리고 시간에 따라($F=3.98$, $p<0.05$) 대조군과 차이가 있음을 보이고 있다(Table 4).

Amphetamine의 영향 : Evans 등[36]과 Kuribara 등[37]은 amphetamine의 약리작용이 일중변동을 일으킴을 보고하였다. Fig. 6은 amphetamine 5mg/kg 1일 2회 처리군에서 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동을 관찰한 것이다. Amphetamine 처리군에서 24시간 평균 beta-endorphin 함량은 55.1±4.3 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며(Table 2), 1일중 최고의 함량은 명기초기인 10 : 00시에 96.1±8.8 fmole/mg protein(진폭 : +74.4%)이었으며 점차 감소하여 명기말기인 18 : 00시에 최하 20.3±1.6 fmole/mg protein(진폭 : −63.1%)까지 감소하였다가 암기중간인 02 : 00에서 제 2의 peak를 볼 수 있었다(Fig. 1, Table 1, 2).

Amphetamine 처리군에서 시간별 변수간의 일원 배치 분산분석 성적은 유의한 차이가 있음을 보여주었으며 ($F=5.49$, $p<0.05$)는 02 : 00시와 10 : 00시의 치가 현저히 증가되었음을 나타내었다($p<0.05$)(Table 3). 또한 이원 배치 분산분석 결과는 대조군과 amphetamine 처리군에서의 beta-endorphin 함량 일중변동 간에 약물처리로써($F=8.36$, $p<0.01$), 그리고 시간에 따라($F=6.44$, $p<0.05$) 현저한 차이가 있음을 나타내었다(Table 4).

Chlorpromazine의 영향 : Fig. 7은 chlorpromazine 10mg/kg을 1일 2회 2주간 처리한 표본에서의 beta-endorphin 함량을 측정한 것이다. 본 표본에서 24시간 평균 beta-endorphin 함량은 34.1±2.8 fmole/mg protein으로 대조군에 비하여 현저히 감소하였으며 (Table 2), 최고의 함량은 명기초기인 10 : 00에 74.5±7.0 fmole/mg protein(진폭 : +119.1%)이었고 점차 감소하여 명기 말기인 18 : 00에 최하로 8.4±0.4 fmole/mg protein(진폭 : −75.3%)에 이르렀다.

Chlorpromazine 처리군에서의 일원 배치 분산분석 결과 시간별 함량간에는 유의한 차이가 있으며($F=5.86$, $p<0.05$), q ratio로써 10 : 00의 치가 여타의 치보다 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었다($p<0.05$) (Table 3).

4) 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동이 opiate receptor binding 일중변동에 미치는 영향

자율신경계에 신경전도물질의 유리에 변동을 일으키면 수용체가 상향조절 또는 하향조절됨이 잘 알려져 있다. 본 실험은 명암주기(L:D, 12:12)에 적응시킨 대조군과 지속적인 암적응(D:D, 12:12)을 시킨 동물에서 beta-endorphin 함량을 측정한 동일 표본에서 maximum ^{3}H-morphine binding을 측정한 것이다. Fig. 8은 대조군에서의 beta-endorphin 함량 일중변동과 더불어 이에 따른 maximum ^{3}H-morphine binding 변동을 나타낸 것이다. 즉 maximum ^{3}H-morphine binding은 beta-endorphin 함량에 있어서와는 달리 암기초기인 22 : 00시에 0.85±0.06 fmole/mg protein이었으며, 최하의 binding치는 명기말기인 18 : 00시에 0.35±0.04 fmole/mg protein이었다. 시간에 따른 각 변수의 일원배치 분산분석결과 F치는 3.65($p<0.05$)로 유의함을 보였으며 q ratio로써 22 : 00시의 치가 여타의 치보다 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었다. 즉 이는 ^{3}H-morphine binding도 고유한 일중변동을 일으킴을 말해 준다. Fig. 9는 상술한 실험과 동일한 방법으로 지속적인 암적응을 시킨 표본에서 maximum ^{3}H-morphine binding의 일중변동을 본 것이다. 최고의 binding은 암기중간인 02 : 00에 볼 수 있었고(0.56±0.06 p mole/mg protein), 최저의 binding은 명기중간인 14 : 00시에 볼 수 있었다(0.16±0.02 pmole/mg protein). 이들 성적의 일원배치 분산분석($F=5.25$, $p<0.01$), 이원배치 분산분석(time dependent: $F=15.8$, $p<0.05$; drug dependent: $F=6.4$, $p<0.05$) 및 q ratio 검정(02 : 00, 06 : 00, 10 : 00>14 : 00, 18 : 00, 22 : 00)으로써 지속적인 암적응 표본에서의 opiate receptor binding 일중변동은 대조군에서와는 다름을 알 수 있었다. Fig. 10은 상술한 대조군과 지속적인 암적응을 시킨 표본에서 beta-endorphin 함량 일중변동과 maximum ^{3}H-morphine 일중변동간의 상관관계를 검토한 것으로 양자간에는 역 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

고 안

본 실험에서 L:D, 12:12에 적응시킨 흰쥐의 뇌내 beta-endorphin 함량은 암기말기에 최고에 달하고 명기말기에 최저에 달하는, 생리적으로 매우 특이한 일중변동을 보였다. 인체를 포함하여 많은 실험동물에서 24시간을 1주기로 하는 생리적 기능, 생화학적 측정치 및 행동양식 등이 주기적인 변동을 일으킴은 잘 알려져 있다. 예를들면 흰쥐를 12시간 간격으로 명암조건을 교대하여 적응시키면 명기에는 음식물의 섭취량, 운동수행 능력 등이 저하되고 암기에는 현저히 증가됨을 볼 수 있다. 이러한 생물학적 rhythm은 운동수행능력에서 뿐만 아니라 체온, 수면, mood, 감각 등 생리적인 현상과 기관별로는 뇌, 혈액, 간장, 신장 등 거의 모든 장기에서 관찰되고[36~38], 약리학적 측면에서는 이들 rhythm이 약물의 효력, 독성 등에 영향을 줄 수 있음이 보고되어 있으며[8~22], 특히 뇌내 acetylcholine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine 및 dopamine 등 신경전도 물질의 합성, 유리, 대사 및 함량 등도 일중변동을 일으킴이 보고되어 있으며, 이는 신경생리학적인 면에서도 대단히 중요한 의의를 갖고 있다. 한편 beta-endorphin은 중추에 투여하였을 때 morphine과 같은 효과를 나타내는 내인성 peptide의 하나로 이를 측뇌실내 투여하면 각종 행위의 변동뿐만 아니라 antinociception, hypothermia, muscular rigidity 등을 일으킬 수 있으며[11~15], Babbi와 Davis[39] 그리고 Segal 등[40]은 morphine 또는 beta-endorphin에 의한 이들 효과가 naloxone으로 소실됨을 관찰하여 그 효과가 opiate 수용체를 통한 작용임을 시사하였다. Opiate 수용체는 각종 신경 조직에 존재함으로써 이 수용체를 통하여 뇌의 항상성기전에 중요한 역할을 할 수 있음을 쉽게 추측할 수 있다.

본 실험의 지속적인 암적응을 시킨 표본에서 beta-endorphin 함량은 L:D, 12:12에 적응시킨 표본에서와는 달리 14 : 00시에 최고, 그리고 02 : 00시에 최저에 이르는 단상성의 일중변동을 보였다. 지속적인 암주기나 또는 지속적인 명주기는 주기적인 외적 환경의 변동이 없는 상태이므로 이 상태에서 뇌내 beta-endorphin 함량이 24시간을 주기로 변동됨은 뇌내 beta-endorphin 함량의 circadian rhythm이 내인성 임을 의미하는 것으로 이와 같은 사실은 Kafka 등[28]이 흰쥐의 뇌내 adrenergic receptor를 포함하여 수종 수용체에 있어서도 보고한 바 있다.

본 실험의 reserpine처리 표본에서 24시간 평균 뇌내 beta-endorphin 함량은 대조군에 비하여 현저히 증가하였고, beta-endorphin 함량 일중변동도 최고 및 최저 함량의 시기, 양상 및 진폭 등에 있어 대조군에서와는 현저한 차이가 있었다. 중추에서 reserpine의 주 약리 작용은 norepinephrine, dopamine 그리고 5-hydroxytryptamine 등 biogenic amines의 함량을 저

하시켜 그 작용을 나타냄은 잘 알려져 있다. 즉 Quinine 등[43]과 Chan 등 [4]은 reserpine 또는 tetrabenazine의 진정작용이 뇌내 norepinephrin 과 5-hydroxytryptamine 함량[45] 및 대사와 밀접한 관계가 있다 하였으며, 더 나아가서 Nagayama 등은 tetrabenazine의 진정효과가 1일을 주기로 달라지며 이는 뇌내 5-hydroxytryptamine의 합성 및 유리와 밀접한 관계가 있다 하였다. 본 실험만으로써 reserpine, beta-endorphin 함량을 증대시키는 기전은 알 수 없으나 본 성적은 reserpine의 진정효과에 일부 reserpine처리에 의한 beta-endorphin 함량증대가 관여할 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. 한편 opiate 수용체는 중추의 자율신경조직에 존재하고, opiate agonist는 이 수용체를 통하여 신경기능을 조절함이 잘 알려져 있다. 따라서 reserpine처리로 인한 뇌내 biogenic amines의 함량저하가 beta-endorphin 함량증대와 어떤 연관성을 갖고 있을 것으로 추측된다. 이에 관해서는 pargyline 또는 imipramine처리군에서의 성적이 reserpine처리군에서의 성적과는 대조적인 점으로도 추측할 수 있다.

본 실험에서 pargyline처리표본의 24시간 평균 beta-endorphin 함량은 대조군에 비하여 현저히 감소하였고, beta-endorphin 함량 일중변동도 암기말기인 02 : 00시에 최고, 그리고 명기초기인 10 : 00시에 최하의 함량을 보여 그 shape, phase, 진폭, 최고 및 최저 함량시기 등이 대조군과는 현저히 달랐다. MAO억제제 처리후 morphine 등 narcotics의 작용이 강화되는데 그 기전에 대하여 Sewell과 Spencer[46] 그리고 Iwamoto와 Way 등[47]은 체내 biogenic amines 함량증가로 인한 중추의 monoaminergic tone의 증가 때문이라 하였다. 그러나 본 실험은 이들의 주장과는 달리 MAO억제제에 의한 narcotics의 작용강화기전이 일차적으로 뇌내 beta-endorphin 함량저하에 있음을 시사하는 것이라 하겠다. 한편 Wirz-Justice 등[35]은 clorgyline 또는 pargyline이 중추의 circadian pacemaker를 억제하여 흰쥐의 활동성을 변동시킨다 하였는데 pargyline의 이와같은 phase-shifting 효과는 본 실험의 beta-endorphin 함량 일중변동에서도 볼 수 있었다.

본 실험에서 imipramine, amphetamine 또는 chlorpromazine처리로 뇌내 24시간 평균 beta-endorphin 함량, 최고 및 최저 함량시기, phase 그리고 진폭 등에 변동을 일으켰다. 최근 chronopharmacology에서 제종 dopaminergic receptor에 작용하는 neuroleptics가 생리적 기능 또는 행동 등의 변화를 일으킴이 알려짐으로써 중추의 dopaminergic nervous system의 역할이 강조되고 있다. 즉 Schving 등[25]과 Evans 등[36]은 amphetamine, methamphetamine과 p-chloromethamphetanine이 흰쥐의 행동에 변동을 일으킨다 하였고, Nagayama 등[45]은 dopamine 수용체 길항제인 chlorpromazine, apomorphine으로 유발시킨 stereotypes behaviour를 억제하는 haloperidol 효과에 영향을 미친다 하였다. 더우기 Dettmar 등[48]은 중등도의 naloxone으로 amphetamine에 의한 운동성증대가 억제된다 하여 endorphin이 dopaminergic nervous system에 관여할 수 있음을 시사한 점이다. 이와 더불어 제종 tricyclics가 mania를 유발하고 schizophrenia를 악화시키는 점과 opiate agonist인 cyclazocine, nalorphine 및 pentazocine 등이 psychotomimetic effects를 나타내는 점은 이들 양자간에 밀접한 관계가 있음을 의미한다. 따라서 본 실험에서 imipramine, amphetamine 또는 chlorpromazine처리로 beta-endorphin 함량 일중변동이 변동된 점은 생리학적 및 본 실험에서 동일 표본에서 beta-endorphin 함량과 maximum ^{3}H-morphine binding을 측정하였을 때 이들 양자간에는 밀접한 역 상관관계가 있음을 볼 수 있었다. 이는 생체내에서 opiate receptor의 일중변동을 일으키는 요인은 여러가지가 있겠으나 그 중에서 특히 beta-endorphin 함량과 가장 밀접한 관계가 있음을 의미한다.

요 약

실험적으로 L:D, 12:12 또는 D:D, 12:12에 적응시킨 흰쥐의 간뇌에서 beta-endorphin 함량의 일중변동과 이에 대한 수종 중추성 약물의 효과를 검토하고 beta-endorphin 함량의 생리 및 약리학적 의의를 추구코저 ^{3}H-morphine binding을 측정하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) L:D, 12:12 cycle에 적응시킨 대조군에서 뇌내 beta-endorphin 함량은 06 : 00시에 최고에 달하고 18 : 00시에 최저인 대단히 유의한 일중변동을 일으켰고 24시간 평균 beta-endorphin 함량은 46.7±3.6 fmole/mg protein이었다.

2) D:D, 12:12에 적응시킨 표본에서 beta-endorphin 함량은 대조군에서와는 달리 14 : 00시에 최고에 이르고 02 : 00시에 최저에 이르는 일중변동을 보였으며 24시간 평균 beta-endorphin 함량도 대조군에 비하여 현저히 감소되었다.

3) 뇌내 beta-endorphin 함량 일중변동은 reserpine,

pargyline, imipramine, amphetamine 또는 chlorpromazine처리로써 변동되었다.

4) 대조군에서 ^{3}H-morphine binding은 22 : 00시에 최고에 달하는 일중변동을 보였으며, 지속적인 암적응군에서의 binding은 02 : 00최고, 그리고 14 : 00시에 최하에 이르는 일중변동을 보였다.

5) 대조군과 지속적인 암적응군에서 함량과 maximum ^{3}H-morphine binding간에는 유의한 역상관관계가 있었다.

이상의 실험성적으로 흰쥐 뇌내 beta-endorphin 함량과 수용체는 유의한 일중변동을 일으키고 opiate receptor binding의 일중변동은 beta-endorphin 함량 변동에 따른 receptor regulation에 의함을 시사하며 또한 지속적인 암적응을 포함하여 수종 중추에 작용하는 약물들이 endorphin 함량 일중변동을 변동시킬 수 있음을 보여준다.

참 고 문 헌

1) Terenius, L.: *Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic membrane fraction from rat brain. Acta Pharmac. Toxicol., 33:377-384, 1973.*

2) Simon, E.J., Hiller, J.M., and Edelman, I.: *Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (^{3}H)-morphine to rat brain homogenate., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 70: 1947-1949, 1973.*

3) Pert. C. and Snyder, S.H.: *Properties of opiate-receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 70:2243-2247, 1973.*

4) Terenius, L. and Wahlstrom, A.: *Morphine-like ligand for opiate receptors in human CSF. Life Sci., 16:1759-1764, 1975.*

5) Pasternak, G.W., Goodman, R. and Synder, S. H.: *An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. Proc. Natl. Acade. Sci., U.S.A., 70:2243-2247, 1973.*

6) Hughes, J.: *Isolation of endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. Brain Res., 88:295-308, 1975.*

7) Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Morris, H.R.: *Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature, 258:577-579, 1975.*

8) Guillemin. R., Ling, N. and Burgus. R.: *Endorphins. Hypothalamic and neurohypophyseal peptides with morphinomimetic activity. Isolation and primary structure of alpha-endorphin. Cr. Acad. Sci. Paris, 282:783-785, 1976.*

9) Li, C.H. and Chung, D.: *Isolation and structure of antriakonpeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73:1145-1148, 1976.*

10) Bradbury, A.F., Smith D.G., Snell, C.R., Birdsall, N.J.M. and Hulme, E.C.: *C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptor. Nature, 268:793-795, 1976.*

11) Graf, L., Ronai, A.Z., Bajuez, S., Cseh, G. and Szekely, J.I.: *Opioid agonist activity of beta-lipotropin fragments: a possible biological source of morphine-like substances in the pituitary. FEBS Lett., 64:181-184, 1976.*

12) De Wied, D., van Wimersma Greidanus, T.J.B. and Bohus, B.: *Pituitary peptides and behaviour: Influence on motivational running and memory processes. In Neurophysicophamacology Excepta. Medica Intern. Congress Series. No. 359, pp. 653-658, 1974.*

13) Graf, L., Szekely, J.I., Ronai, A.Z., Dunai-Kovacs, Z. and Bajusz, S.: *Comparative study of an analgesic effect of met-5-enkephalin and related lipotropin fragments. Nature, 263: 240-241, 1976.*

14) Feldberg, W. and Smyth, D.G.: *The C-fragment of lipotropin-a potent analgesic. J. Physiol., 260, 30-31, 1976.*

15) Holaday, J.W., Loh, H.H. and Li, C.H.: *Unique behavioral effects of beta-endorphin and their relationship to thermoregulation and hypothalamic function. Life Sci., 22:1525-1536, 1978.*

16) Bloom. F., Segal, D., Ling. N. and Guillemin, R.: *Endorphins: Profound behavioral effects in rats suggested new etiological factors in mental illness. Science, 194:638-632, 1976.*

17) Halberg, F., Halberg, E., Barnum, C.P. and Bittner J.J.: *Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lightening regimen and daily routine, in Withrow, R.B.,eds.: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. Publication No. 55 of Am. Assoc. Adv. Sci., 1959, pp. 830-878.*

18) Lutsch, E.F. and Morris, R.W.: *Light reversal of morphine-induced analgesic susceptibility rhythm in mice. Experientia (Basel), 27:428-421, 1971.*

19) Vasell, E.S.: *Genetic and environmental factors affecting hexobarbital metabolism in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci., 151:900-912, 1968.*

20) Scheving, L.E., Vedral D.F. and Pauly, J.E.: *Daily circadian rhythm in rats to d-amphetamine sulfate: Effects of blinding and continuous illumination on the rhythm. Nature(London), 219:621-622, 1968.*

21) Nair, V. and Casper, R.: *The influence of light on daily rhythm in hepatic drug metabolizing enzymes in the rat. Life Sci., 8:1231-1238, 1968.*

22) Pauly, J.E. and Scheving, L.E.: *Temporal variations in the susceptibility of white rats to pentobarbital sodium and tremorine. Int. J. Neuropharmacol., 3:651-658, 1964.*

23) Freidman, A.H. and Walker, C.A.: *The acute toxicity of drugs acting at cholinoceptive sites and 24-hour rhythm in brain acetylcholine. Arch. Toxicol., 29:39-49, 1972.*

24) Hanin, I., Masearelli, R. and Costa, E.: *Acetylcholine concentrations in rat brain. Science, 170, 341-342, 1970.*

25) Scheving, L.E., Harrison, W.H., Gordon, P. and Pauly, J.E.: *Daily fluctuations in biogenic amines of the rat brain. Am. J.P. Hysiol., 214, 166-173, 1978.*

26) Simon, M.L. and George, R.: *Diurnal variations in plasma corticotrophin and growth hormones as correlated with regional variation in norepinephrine, dopamine and serotonin content of rat brain. Neuroendocrinology, 17:125-138, 1975.*

27) Romero, J.A. and Axelrod, J.: *Pineal β-adrenergic receptor. Diurnal variation in sensitivity. Sciece, 184: 1091-1092, 1974.*

28) 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, 1983*

29) 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.*

30) Lee, M.S.: *A study on the circadian rhythm of opiate receptor in rat brain. in press.*

31) 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. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 1742, 1971.*

32) 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.*

33) 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.*

34) 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.*

35) Wirz-Justice, A., Kafka, M., Naber, D., Campbell, I.C., Marangos, P.J., Tamarkin, L. and Wejr, T.A.:*Clorgyline delays the phase position of circadian neurotransmitter receptor rhythms. Brain Research, 241: 115-122, 1982.*

36) 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.*

37) Kuribara. H. and Tadokoro, S.: *Circadian*

variathon in metamphetamine and apomorphine-induced increase in ambulatory activity in mice. Pharmacol. Biochem. and Behavior., 17: 1251-1256, 1982.

38) Kuribara, 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.*

39) Bunning, E.: *The physiological clock. Revised 2nd edit. Springer-Verlag. New York, 1967.*

40) Tadokoro, S., Kuribara, H. Shirasaka, K. and Alam, M.R.: *Automatic measurement of diurnal rhythms of naive behaviors in rats and its pharmacological applicatiosn. 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).*

41) Babbini, M. and Davis, W.M.: *Time-dose relationship for locomotor activity effects after acute or repeated treatment. Brit. J. Pharmacol., 46: 213-224, 1972.*

42) Segal, D.S., Browne, R.G., Arsten, A. and Derrington, D.C.: *Characteristics of beta-endorphin-induced behavioral activation and immobilization. Endorphin in mental health research(Usdin, E., Bunning, W.E. and Kline, N. Eds.) pp. 307-324, Macmillan, London.*

43) Quinn, G.P., Shore, D.A. and Brodie, B.B.: *Biochemical and Pharmacological Studies on Ro-1-9569 (tetrabenazine), a non-indole tranquilizing agent with reserpine like effects. J. Pharmacol. Exp. Ther., 127: 103-109, 1968.*

44) Chan, O. and Welbster, R.A.: *Effect of tetrabenazine and alpha-methyl-m-tyrosine on excitory activity and brain catecholamines in rats. Br. J. Pharmacol., 441: 691-699, 1971.*

45) Nagayama, H. Takagi, A., Tateishi, T. and Takahashi, R.: *Circardian susceptibility to neuroleptics: Tetrabenazine. Psychopharm. 55: 61-66, 1977.*

46) 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.*

47) Iwamoto, E.T. and Way, E.L.: *Opiate actions and catecholamines. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 20: 357-407, 1979.*

48) Dettmar, P.W. and Cowan, D.S.: *Naloxone antagonizes behavioral effects of d-amphetamine in mice and rats. Neuropharmacol., 17: 1041-1044, 1978.*