

## Cerebroprotective Effect of Nociceptin on Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats

Seung Yoon Lee<sup>1</sup>, Won Suk Lee<sup>2</sup> and Chang Hwa Choi<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea

This study aimed to investigate the cerebroprotective effect of nociceptin on transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats by determining the changes in regional cerebral blood flow (rCBF) and the infarct size. Right middle cerebral artery (MCA) was occluded for 2 hours, and thereafter was followed by reperfusion by an intraluminal monofilament technique. An open cranial window was made on the right parietal bone for determination of continuous changes in rCBF by laser-Doppler flowmetry. The infarct size was morphometrically determined using the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride technique. In normal rats, nociceptin (0.01~100 nmol/kg, i.v.) increased rCBF and decreased cerebral arterial resistance in a dose-dependent manner. Systemic arterial blood pressure was little affected by nociceptin at the doses of 0.01 and 0.1 nmol/kg, but dose-dependently reduced at the doses of 1 nmol/kg or more. In transient cerebral ischemic rats, nociceptin (0.01~0.1 nmol/kg, i.p.) significantly attenuated the postischemic cerebral hyperemia, and progressively increased rCBF. The improving effect of nociceptin on the postischemic rCBF response was markedly blocked by pretreatment with [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> (1 nmol/kg, i.p.), a selective nociceptin receptor antagonist, but not by naloxone (3 μmol/kg, i.p.), a selective opioid receptor antagonist. The cerebral infarct size was significantly reduced by nociceptin (0.01~0.1 nmol/kg) administered i.p. 5 min after MCA occlusion in transient cerebral ischemia of 2-hour MCA occlusion and 22-hour reperfusion. It is suggested that nociceptin improves the postischemic cerebral hemodynamics and thereby has a cerebroprotective effect in transient focal cerebral ischemia.

**Key Words:** Nociceptin, Transient focal cerebral ischemia, Rat

### 서 론

Nociceptin은 prepronociceptin이라는 전구물질에서 유래되는 17개의 아미노산으로 구성되어 있는 근래에 발견된 펩티드로서 그 생리학적 기능과 병적인 상태에서의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Prepronociceptin은 enkephalin과 dynorphin 등의 내인성 아편유사펩티드의 전구물질인 preproenkephalin 및 preprodynorphin과 그 구조가 유사하고 (Houtani et al., 1996; Mollereau et al., 1996; Nothacker et al., 1996; Ikeda et al., 1998; Neal et al., 1999), dynorphin 또는 α-neoendorphin 등과 아미노산 배열이 유사하다고 밝혀졌다 (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Mollereau et al.,

1996). 또한 nociceptin이 결합하는 수용체 역시 μ, δ 그리고 κ 수용체와 C-말단 부위에서 약 60%의 동질성을 갖고 있어서 아편유사제와 비슷한 작용을 할 것으로 기대되었다 (Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1994; Wick et al., 1994; Lachowicz et al., 1995). 그러나 N-말단의 첫 아미노산이 tyrosine으로 시작하는 다른 아편유사펩티드와는 달리 phenylalanine으로 시작되고, μ, δ 그리고 κ 수용체에 대하여 친화력이 아주 낮으며 (Fukuda et al., 1994; Lachowicz et al., 1995), 그 분포와 생체 효과에 있어서 아편유사제와 다르므로 새로운 펩티드로 인식되고 있다.

Nociceptin은 척수 상부 동통과민 또는 통증 유발 (Reinscheid et al., 1995; Hara et al., 1997), 척수 진통 (King et al., 1997), 자발운동 감소 (Reinscheid et al., 1995), 항불안 (Jenck et al., 2000), 학습 억제 (Yu et al., 1997; Noda et al., 2000) 등을 유발한다고 알려져 있지만, nociceptin과 nociceptin 수용체의 분포가 대뇌와 척수에 광범위하게 이루어지고 있어 보다 다양한 생리 작용을 가지고 있을 것으로 여겨지고 있다 (Henderson and McKnight, 1997; Meunier, 1997; Taylor and Dic-

\*논문 접수: 2005년 5월 3일

수정재접수: 2005년 5월 19일

†교신저자: 최창화, (우) 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지, 부산대학교 의과대학 신경외과학교실

Tel: 051-240-7254, Fax: 051-244-0282

e-mail: chwachoi@pusan.ac.kr

kenson, 1998).

한편 대뇌 허혈에 의한 뇌손상에 있어서  $\beta$ -endorphin이나 dynorphin 등의 아편유사제가 관련되어 있음은 잘 알려져 있다. 즉 인간의 뇌경색시 뇌척수액 내에  $\beta$ -endorphin이 증가되어 있고 (Avery et al., 1983; Baskin et al., 1986), 선택적인 아편유사물질 수용체 길항제인 naloxone에 의하여 뇌혈류 증진 (Baskin and Hosobuchi, 1981; Faden et al., 1982; Turner et al., 1984; Choi and Rothman, 1990; Baskin et al., 1994), 신경학적 기능 개선 (Hosobuchi et al., 1982; Levy et al., 1982; Furui et al., 1984; Hariri et al., 1986; Hara et al., 1993), 경색 부위의 크기 감소 (Miller and Perry, 1989) 및 생존율의 향상 (Zabramski et al., 1984) 등과 같은 효과를 얻을 수 있음이 보고되었다. 또한 U50,488과 같은  $\kappa$ -수용체 효능약물은 허혈을 일으키기 전 뿐만 아니라 일으킨 후에 투여하여도 대뇌 허혈 손상을 감소시킨다고 보고되었다 (Baskin et al., 1994).

대뇌 허혈에 있어서 nociceptin이 유의한 역할을 할 것이라는 가능성으로는 nociceptin이 허혈성 뇌손상 유발의 주된 물질인 glutamate의 유리를 억제하고 (Nicol et al., 1996), glutamate에 의한 흥분성 신경전도를 억제하며 (Faber et al., 1996; Liebel et al., 1997; Yu et al., 1997; Shu et al., 1998; Yu and Xie, 1998) 뇌손상에 직접 관여하는 전압-의존성  $Ca^{2+}$  통로를 억제한다 (Connor et al., 1996; Abdulla and Smith, 1997; Connor and Christie, 1998; Morikawa et al., 1998)는 점들을 바탕으로 추론할 수 있다. 그러나 nociceptin이 국소 뇌허혈시 어떠한 역할을 하는지에 관하여는 보고된 바가 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 실험동물에게 일과성 국소 뇌허혈을 일으키고 그 이후에 초래되는 뇌혈류역학의 변동과 뇌조직 손상에 대한 nociceptin의 효과를 검토함으로써 대뇌 허혈시 nociceptin의 역할을 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 300~350 g의 Sprague-Dawley계 숫쥐를 사육장 (실내 온도, 20~25°C) 내에서 물과 사료를 마음대로 섭취하게 하면서 사육하였다가 실험에 사용하였다.

### 2. 일반 수술 조작

실험동물을 urethane (1 g/kg)으로 복강내 주사하여 마취시키고, 체온을 37°C로 유지시키기 위하여 소동물용 자동 보온 전기방식 (homeothermic blanket system, Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) 위에 놓고 양와위로 고정하였다. 기관 절개술을 행하여 14G catheter로 기도를 확보하고 gallamine (3~5 mg/kg, i.m.)을 투여하여 골격근을 마비시켰다. 동물용 호흡기 (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)

를 사용하여 분당 50~60회의 호흡을 유지시켰다. 양측 대뇌 동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽관하고 이를 통하여 혈액 gas 및 pH를 측정하여 (STAT Profile 3, Nova Biochemicals, Boston, MA, USA)  $PaCO_2$ 가 33~45 mmHg가 되도록 호흡을 조절한 후 이를 유지시켰다.

### 3. 혈압 측정

전신 혈압의 변동을 관찰하기 위하여 실험동물의 대뇌동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer (Statham P23D, Gould, Cleveland, OH, USA)를 통하여 혈압을 측정하여 MacLab (4s, ADInstruments, Castle Hill, Australia)과 Macintosh computer (Power Macintosh 7500/100, Seoul, Korea)로 구성된 data acquisition system에 기록하였다.

### 4. 개방 두개창 설치

일반적인 수술 조작이 끝난 후 실험동물의 체위를 복와위로 변경시키고 두부를 뇌정위기구 (stereotaxic apparatus, model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 정중선을 따라 두피를 절개한 후 우측 두정골에 saline-cooled drill (model 395, Dremel, Racine, WI, USA)을 사용하여 두개절제술 (5×5 mm)을 행하고 미리 가온한 인공 뇌척수액 (37°C)을 관류하였다. 사용한 인공 뇌척수액의 조성은 다음과 같다:  $Na^+$  156.5 mEq/L,  $K^+$  2.95 mEq/L,  $Ca^{2+}$  2.5 mEq/L,  $Mg^{2+}$  1.33 mEq/L,  $Cl^-$  138.7 mEq/L,  $HCO_3^-$  24.6 mEq/L, dextrose 66.5 mg/dL, 그리고 urea 40.2 mg/dL (pH 7.4).

### 5. 국소 뇌혈류 및 뇌동맥 저항 측정

실험동물의 두부를 stereotaxic apparatus에 고정시키고, 개방 두개창을 통하여 laser-Doppler flowmeter (BLF21, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)용 needle probe (type NS, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)를 대뇌 피질 표면에 수직이 되도록 stereotactic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 접근시켰다. 일정 시간 동안 안정시킨 후 국소 뇌혈류량을 측정하였다. Laser-Doppler flowmeter에 의하여 측정된 국소 뇌혈류량의 변동은 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 data acquisition system에 기록하였다. 한편 뇌동맥의 저항은 평균 동맥압을 국소 뇌혈류로 나누어 줌으로써 계산하였다.

### 6. 일과성 국소 뇌허혈

뇌경색의 실험동물 모델로서 널리 사용하는 중간 대뇌동맥 (middle cerebral artery, MCA) 폐쇄는 Longa 등 (1989)의 방법에 따라 시행하였다. 실험동물의 복측 정중선을 따라 경부를 절개하고, 우측 외경동맥의 분지들을 전기소작시켜 절단하고, 내경동맥의 분지인 익구개동맥의 기시부를 7~0 나

일론 봉합사로 결찰하여 총경동맥의 분지 중 두개 외에 존재하는 것은 오로지 내경동맥만이 남아 있도록 하였다. 그 후 외경동맥의 기시부 주위를 6~0 견봉합사로 느슨하게 묶은 다음 총경동맥을 6~0 견봉합사로 결찰하고 내경동맥에 미세혈관용 클립을 장치하여 혈류를 차단시키고, 미세수술용 가위로써 외경동맥에 작은 구멍을 만들어 그 내강을 통하여 말단부를 등글게 만든 길이 약 2 cm의 3~0 단선조 나일론 봉합사를 내경동맥 내로 삽입하였다. 출혈을 방지하기 위하여 혈관 내의 나일론 봉합사 주위를 외경동맥 기부 주위에 느슨하게 있던 견봉합사로 졸라맨 후 미세혈관용 클립을 제거하였다. 나일론 봉합사를 천천히 진입시켜 그 끝이 MCA의 기시부에 도달되도록 하여 MCA를 폐쇄하였다. MCA 폐쇄를 2시간 동안 유지시켰다가 내경동맥 내에 삽입되어 있는 단선조 나일론 봉합사를 제거해 줌으로써 혈액 재관류를 시행하였다. MCA의 폐쇄 및 혈액 재관류의 성공 여부는 검안경 (ophthalmoscope)을 사용하여 실험동물의 허혈 동측의 안저동맥을 관찰함으로써 확인하였다. 그 후 경부의 절개 부위를 봉합하고 마취가 깰 때까지 보온상자 내에서 회복토록 한 후 일반 사육상자 내로 옮겨 실온에서 사료와 물을 마음대로 섭취하도록 하였다.

### 7. 뇌경색 크기 측정

MCA 폐쇄 24시간 후에 과량의 마취제를 투여한 후 단두치사시키고, 전체 뇌를 두개골로부터 적출하였다. 적출한 뇌를 뇌주형 (RBM-4000C, ASI, USA) 위에 놓고, 전두엽 말단에서부터 후방으로 2 mm 간격으로 절단하여 7개의 연속 관상 뇌절편을 만들고, Bederson 등 (1986)의 방법에 따라 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 담구어 실온에서 30분간 처치한 후 10% 중성 formalin 완충액으로 고정시켰다. 고정된 뇌조직 절편의 배측면을 실체현미경 (SV6, Carl Zeiss, Germany)에 연결된 비디오 컬러 프린터 (Model CVP-G7, Sony, Japan)로 사진을 찍고, 각 절편에 생긴 뇌경색 부위의 면적을 면적계 (KP-21, Koizumi, Japan)로써 측정하였다.

### 8. 사용 약물

본 연구에 사용된 약물은 nociceptin (Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, CA, USA), [ $Nphe^1$ ]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> (Tocris Cookson Ltd, Avonmouth, Bristol, UK) 및 naloxone (Sigma, Natick, MA, USA)이다. 모든 시약들은 일단 0.9% 생리식염수에 용해시켰다가 투여 경로에 따라 0.9% 생리식염수 또는 인공 뇌척수액으로 희석하여 사용하였다.

### 9. 통계 처리

모든 측정치는 평균 ± 평균의 표준오차로 표시하였다. 각

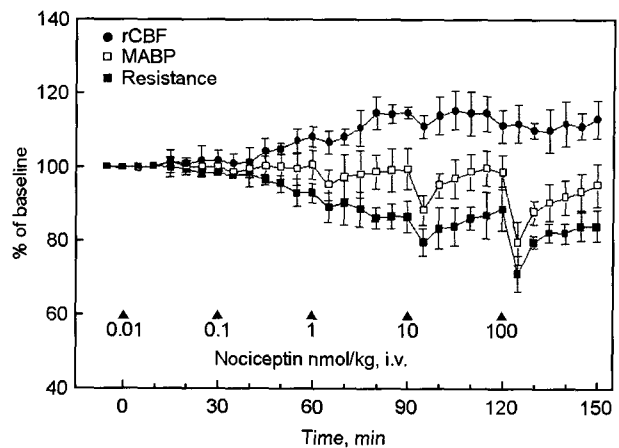


Fig. 1. Effects of nociceptin on the cerebral hemodynamics in normal rat. Nociceptin (0.01~100 nmol/kg) was administered i.v. at a 30-min interval. The number of animals was five. Arrow heads indicate the time of bolus injection of nociceptin. rCBF, regional cerebral blood flow; MABP, mean arterial blood pressure.

군 사이의 유의성 검정은 반복측정 이원배치 분산분석법으로 분석한 후 Dunnett의 다중 비교법으로 사후 검정하여  $P$  값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

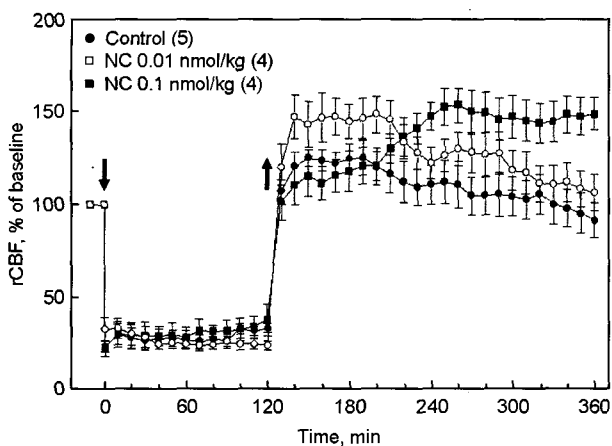
### 1. Nociceptin이 뇌혈류역학에 미치는 효과

정상 실험동물에게 nociceptin (0.01~100 nmol/kg)을 30분 간격으로 정맥내 투여한 후 시간 경과에 따라 초래되는 국소 뇌혈류, 평균 동맥압 및 뇌동맥 저항 등의 변동을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 nociceptin은 국소 뇌혈류를 용량-의존적으로 증가시켰다 ( $P<0.0001$ ). 반면 nociceptin은 0.1 nmol/kg 이하의 용량에서는 평균 동맥압 (기저치 평균 동맥압,  $86.30 \pm 8.92$  mmHg)에 별 영향을 미치지 아니하였지만, 1 nmol/kg 이상의 용량에서는 평균 동맥압을 용량-의존적으로 감소시켰다 ( $P=0.001$ ). 한편 평균 동맥압을 국소 뇌혈류로 나누어 줌으로써 얻은 뇌동맥의 저항은 nociceptin 0.1 nmol/kg에서부터 용량-의존적으로 감소되었다 ( $P<0.001$ ). 따라서 본 연구에서는 nociceptin 0.01 및 0.1 nmol/kg을 적정 용량으로 선택하여 실험에 사용하였다.

### 2. 일과성 국소 뇌허혈로 인한 국소 뇌혈류 변동에 미치는 효과

뇌허혈-재관류 동안의 국소 뇌혈류의 변동을 laser-Doppler flowmetry 법으로 측정된 결과 대조군의 경우 국소 뇌혈류는 뇌허혈 기간 동안 거의 차단되었고, 혈액 재관류와 함께 초래된 반응성 뇌충혈 상태를 약 1.5시간 동안 보이다가 시간 경과에 따라 점차 감소되었다 (Fig. 2). 그러나 nociceptin

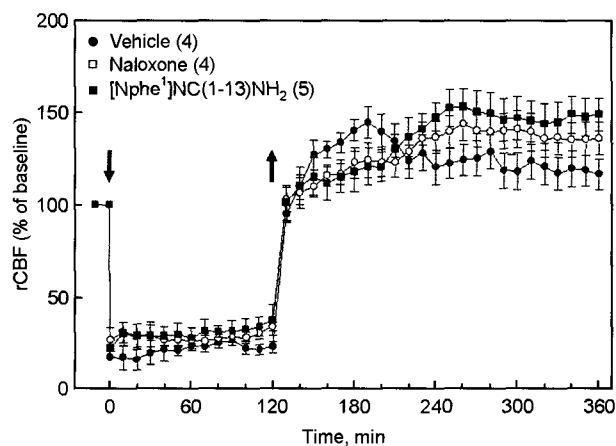
처치군에서는 혈액 재관류 직후의 반응성 뇌혈류 상태를 현저히 억제시켰고 ( $P < 0.0001$ ; nociceptin 0.01 nmol/kg의 경우  $P < 0.0001$ ; nociceptin 0.1 nmol/kg의 경우  $P < 0.0001$ ), 그 이후 nociceptin 0.01 nmol/kg의 경우 더 이상의 유의한 변동을 보이지 않다가 시간 경과에 따라 점차 감소되었고, nociceptin 0.01 nmol/kg의 경우 완만한 증가를 보이다가 재관류 2시간 이후부터는 증가된 상태를 유지하였다.



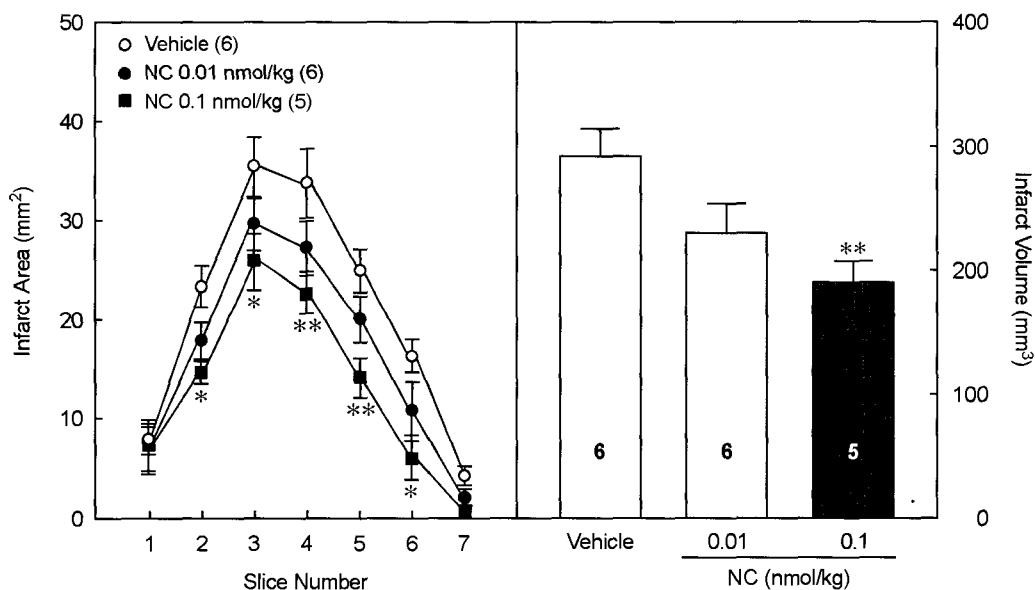
**Fig. 2.** Effect of nociceptin on the alterations of regional cerebral blood flow (rCBF) following transient focal cerebral ischemia. Nociceptin (NC) was administered i.p. 5 min after right middle cerebral artery (MCA) occlusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. ↓, MCA occlusion; ↑, reperfusion.

### 3. Nociceptin에 의한 허혈성 국소 뇌혈류 반응 개선에 대한 아편유사물질 길항제 전처치 효과

일과성 국소 뇌허혈로 인한 국소 뇌혈류의 변동이 nociceptin 0.1 nmol/kg에 의하여 호전되는 효과에 관여하는 수용체를 구명하기 위하여  $\mu$ -,  $\delta$ - 및  $\kappa$ -수용체에 대하여 모두 상경



**Fig. 3.** Blockade by pretreatment with opioid receptor family antagonists of the nociceptin-induced improvement of postischemic rCBF response. Pretreatment with [ $\text{Nphe}^1$ ]nociceptin(1-13) $\text{NH}_2$  (1 nmol/kg), naloxone (3  $\mu\text{mol/kg}$ ), and vehicle (0.9% normal saline) was undertaken i.p. 15 min before MCA occlusion, respectively. Nociceptin (0.1 nmol/kg) was administered i.p. 5 min after MCA occlusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. ↓, MCA occlusion; ↑, reperfusion.



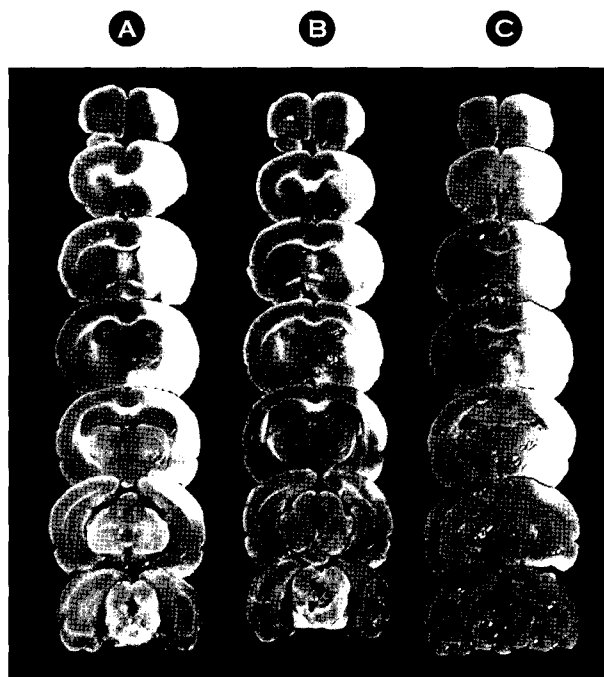
**Fig. 4.** Effect of nociceptin on the cerebral infarct size (left, infarct area; right, infarct volume) induced by transient focal cerebral ischemia. Right MCA was occluded for 2 hours and followed by reperfusion for 22 hours. Nociceptin (NC) was administered i.p. 5 min after MCA occlusion. Numbers in parentheses and columns indicate the numbers of animals. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding vehicle group.

적으로 길항작용을 하는 naloxone과 orphan opioid 수용체 (nociceptin 수용체)에 선택적으로 길항작용을 하는  $[Nphe^1]$ nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub>의 전처치 효과를 비교 관찰하였다 (Fig. 3). Nociceptin 0.1 nmol/kg에 의한 허혈성 국소 뇌혈류 반응 호전 효과는 naloxone 3  $\mu$ mol/kg 전처치에 의하여 하등의 영향을 받지 아니하였으나,  $[Nphe^1]$ nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> 1 nmol/kg 전처치에 의하여 거의 완전히 차단되었다 ( $P < 0.0001$ ).

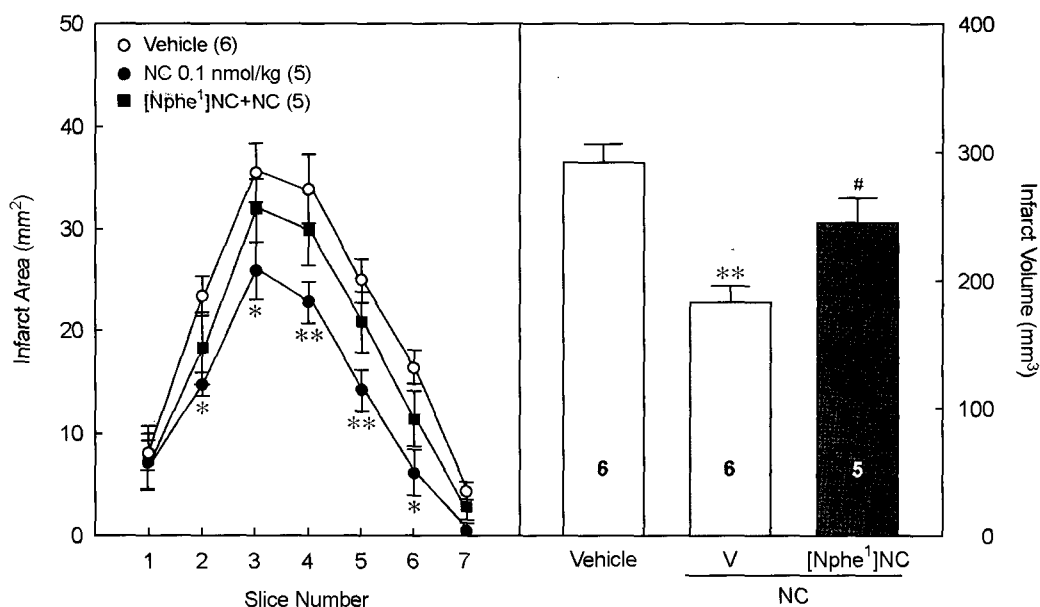
#### 4. 뇌경색 형성에 미치는 효과

일과성 국소 뇌허혈을 실험동물에게 일으키고, 전체 뇌를 적출하여 2% TTC 용액으로 염색을 해 본 결과 허혈 동측 대뇌반구의 MCA 분포 영역에 육안적으로 뚜렷이 구별되는 뇌경색이 형성되었다.

전체 뇌를 전두엽 말단에서부터 후방으로 2 mm간격으로 절단하여 얻은 7 개의 연속 관상 절편 각각의 경색 면적은 Fig. 4 및 Fig. 5에서 보는 바와 같이 nociceptin 0.1 nmol/kg 처치에 의하여 1번과 7번 절편을 제외한 나머지 절편에서 유의하게 감소되어 (2, 3 및 6번, 각각  $P < 0.05$ ; 4 및 5번,  $P < 0.01$ ) 뇌절편 전반에 걸쳐 유의하게 감소되었다 ( $P < 0.0001$ ). 나아가 뇌 전체에 형성된 뇌경색의 크기를 비교하였을 때 nociceptin 0.1 nmol/kg 처치군 ( $182.42 \pm 13.71$  mm<sup>3</sup>)의 뇌경색 크기는 대조군 ( $291.80 \pm 22.30$  mm<sup>3</sup>, 반대측 대뇌반구의  $42.67 \pm 0.05\%$ )에 비하여 현저히 감소되었다 ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 5.** Representative photographs of cerebral infarction in 2-mm thick slices of the cerebrum of transient MCA occlusion. Vehicle (A) or nociceptin (B, 0.1 nmol/kg) was administered i.p. 5 min after MCA occlusion. C, Pretreatment with  $[Nphe^1]$ nociceptin (1-13)NH<sub>2</sub> (1 nmol/kg, i.p.) 15 min before MCA occlusion and treatment with nociceptin (0.1 nmol/kg, i.p.) 5 min after MCA occlusion.



**Fig. 6.** Blockade by  $[Nphe^1]$ nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> of nociceptin effect on the cerebral infarct size (left, infarct area; right, infarct volume) in transient focal cerebral ischemia.  $[Nphe^1]$ nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> ( $[Nphe^1]$ NC, 1 nmol/kg) was administered i.p. 15 min before MCA occlusion. Nociceptin (NC, 0.1 nmol/kg) was administered i.p. 5 min after MCA occlusion. Numbers in parentheses and columns indicate the numbers of animals. V, vehicle. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding vehicle group. # $P < 0.05$  vs. V+NC group.

## 5. Nociceptin에 의한 뇌경색 크기 감소에 대한 nociceptin 수용체 길항제 전처치 효과

일과성 국소 뇌허혈로 인한 뇌경색 형성이 nociceptin에 의하여 감소되는 효과가 허혈성 국소 뇌혈류 변동에 대한 실험 (Fig. 3)에서 본 바와 같이 [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> 전처치에 의하여 차단되는지를 관찰하였다.

MCA를 폐쇄시키기 15 분전에 [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> 1 nmol/kg을 복강내 처치하였을 때 nociceptin 0.1 nmol/kg에 의한 각 뇌절편의 경색 면적 및 뇌 전체 경색의 크기 감소 효과는 Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이 [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> 처치에 의하여 유의하게 차단되었다 (경색 면적  $P < 0.01$ ; 경색 크기  $P < 0.05$ ).

## 고 찰

본 연구에서는 일과성 국소 뇌허혈을 일으킨 실험동물에서 nociceptin이 뇌허혈 후에 초래되는 뇌혈류역학의 변동을 개선시키고 뇌경색의 크기를 감소시키는 역할을 관찰되었다.

Nociceptin이 혈관계에 미치는 효과에 관하여는 몇몇 보고들이 나와 있는 바 Gumusel 등 (1997)은 고양이의 척출 콩팥동맥, 목동맥, 넙다리동맥에 대한 in vitro 실험에서 nociceptin은 저농도 (pmol/L 범위)에서부터 농도-의존적으로 혈관 긴장도를 감소시켰다고 하였고, Huggins 등 (2000)도 흰 쥐의 척출 대동맥의 긴장도가 nociceptin의 농도에 의존적으로 감소하였다고 보고하였다. 이들의 보고를 바탕으로 볼 때 nociceptin은 말초장기에 대하여 어떤 중요한 생물학적 작용을 가지고 있으며, 전신 혈압과 국소 혈류의 조절에 관여할 것이라고 추측되고 있다.

사람의 혈장내 nociceptin의 농도 (약 10 pg/ml)는 매우 낮아서 (Brooks et al., 1998) 생리적 조건에서는 순환혈 중의 nociceptin은 심혈관계에 대하여 말초적으로 거의 작용을 일으키지 않으나, 말초에 염증이 발생되면 일차 지각신경 특히 후근신경절에서 prepronociceptin mRNA의 발현과 nociceptin의 유리가 현저히 증가하여 염증반응으로 인한 저혈압 발생에 관여한다고 한다 (Andoh et al., 1997).

본 연구에서 nociceptin (1 nmol/kg 이상)을 정맥 내로 투여하였을 때 용량-의존적으로 혈압 하강이 초래되었다. 뿐만 아니라 동맥혈관의 저항도 용량-의존적으로 감소되었다. Nociceptin은 화학구조상 많은 양전하를 띠고 있어 혈액-뇌 장벽을 통과하지 못하므로 외부에서 정맥 내로 투여한 nociceptin에 의한 혈압 하강 현상은 중추성 기전에 의한다고 보다는 말초적으로 직접 혈관에 작용한 결과라고 생각된다.

본 연구에서 nociceptin 정맥투여에 의하여 국소 뇌혈류 변동이 용량-의존적으로 일어남을 관찰할 수 있었다. 저용량의

nociceptin (0.1 nmol/kg 미만)은 전신 동맥압과 혈관 저항 그리고 국소 뇌혈류에 유의한 변동을 일으키지 못하였지만, 0.1~1 nmol/kg에서는 전신 동맥압과 혈관 저항에 큰 변동을 일으키지 않으면서 국소 뇌혈류를 증가시켰고, 그 이상의 용량에서는 더 이상의 국소 뇌혈류 증가를 일으키지는 아니하였다. 이와 같이 고용량의 nociceptin에서 국소 뇌혈류의 증가가 더 이상 일어나지 않은 것은 nociceptin에 의하여 혈관 확장과 전신 혈압 하강 작용이 강하게 초래되었기 때문으로 생각된다. 이 결과에서 알 수 있듯이 nociceptin은 전신 동맥압에는 큰 영향을 미치지 않으면서 국소 뇌혈류에 영향을 미칠 수 있는 치료 용량의 범위가 매우 좁기 때문에 향후의 보다 깊은 연구와 임상적 응용을 위해서는 전신 혈압에는 거의 영향을 미치지 않는 nociceptin 유도체의 개발이 필요할 것으로 여겨진다.

Champion 등 (1998; 1999; 2002)의 보고에 따르면 혈관 내 피세포를 제거하거나 nitric oxide 합성효소 억제제인 N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine을 처치하여도 nociceptin의 혈관 이완작용이 여전히 존재하므로 nociceptin의 혈관 이완작용에는 내피세포에서 유래된 nitric oxide의 관련성이 배제되고, muscarine성 수용체나 naloxone-민감성 아편유사물질 수용체 또는 calcitonin gene-related peptide 수용체 등의 활성화도 관계 없고, 아드레날린성 신경 기능의 억제와도 관련이 없으며, 혈관 이완성 prostaglandin이나 ATP-민감성 K<sup>+</sup> 통로의 개구와도 관련이 없다고 한다. 본 연구의 결과 nociceptin은 허혈-재관류에 의한 국소 뇌혈류 변동을 개선시켜 주었는데, 특히 nociceptin 0.1 nmol/kg은 혈액 재관류와 함께 초래되는 반응성 뇌출혈 상태를 현저히 억제시키고 점진적으로 국소 뇌혈류를 증가시켜 주었다. 이러한 nociceptin의 작용은  $\mu$ -,  $\delta$ - 및  $\kappa$ -수용체 모두에 대하여 상경적 길항제인 naloxone 전처치에 의하여는 아무런 영향을 받지 아니하였지만 nociceptin 수용체에 대하여 효현작용이 없으면서 선택적으로 길항작용을 나타내는 [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> (Calo' et al., 2000) 전처치에 의하여 차단됨을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 nociceptin이 국소 뇌혈류를 증가시키는데 관여한 기전에 대하여 앞에서 Champion 등 (1998; 1999)이 배제시켰던 여러 기전과의 연관성 유무를 확인하지는 못하였지만 nociceptin 수용체에 매개된 기전이라는 것을 찾아낸 점은 의의가 있다고 생각되며 앞으로 세포 분자 수준에서의 자세한 기전까지 구명하여야 할 과제로 남는다.

뇌허혈은 뇌조직 혈류량의 감소로 인해 세포에 산소와 포도당의 공급이 원활치 못함으로써 세포내 ATP의 고갈을 유발하고, 이에 따라 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 등이 억제됨으로써 세포내 Ca<sup>2+</sup>과 Na<sup>+</sup> 농도를 증가시키고, 반면 세포의 K<sup>+</sup> 농도를 증가시켜 세포의 탈분극을 일으키게 된다. 이 탈분극은 glutamate성 신경세포에서 glutamate의 급격한 유리를

일으켜 흥분독성 (excitotoxicity)을 유발하게 된다 (Choi and Rothman, 1990). 유리된 glutamate는 다시 연결 후 신경에 존재하는 glutamate 수용체에 작용하여 연결 후 신경세포내  $Ca^{2+}$ 과  $Na^+$  농도 증가에 따른 탈분극을 일으켜 그 신경세포가 함유하고 있는 신경전달물질을 유리시키고, 한편 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 증가는 protein kinase C, protein kinase A, phospholipases,  $Ca^{2+}$ -activated neutral peptidase 또는 DNase 등을 활성화하여 이로 인해 세포막의 손상, DNA의 손상, prostaglandins의 유리에 따른 oxygen free radicals의 증가가 일어나고, mitochondria내  $Ca^{2+}$  과부하로 인하여 oxidative phosphorylation이 억제됨으로써 ATP 고갈이 심화되어 결국 세포의 사망이 초래되게 된다 (Hara et al., 1993).

이러한 일련의 허혈성 뇌손상의 병태생리학적 기전에 있어서 nociceptin이 어떤 역할을 수행하는지는 아직 자세히 밝혀지지 않은 채 nociceptin에 의한 glutamate의 유리 억제 (Nicol et al., 1996), glutamate에 의한 흥분성 신경전도 억제 (Faber et al., 1996; Liebel et al., 1997; Yu et al., 1997; Shu et al., 1998; Yu and Xie, 1998) norepinephrine의 유리 감소 (Schlicker et al., 1998),  $K^+$  전도도의 증가 (Vaughan and Christie, 1996; Vaughan et al., 1997; Ikeda et al., 1997) 및 전압-의존성  $Ca^{2+}$  통로 억제 (Connor et al., 1996; Abdulla and Smith, 1997; Connor and Christie, 1998; Morikawa et al., 1998) 등의 작용들을 바탕으로 대뇌 허혈에 있어서 유의한 역할을 할 것이라는 가능성만 제시되어 있는 실정이다.

본 연구에서 nociceptin이 뇌경색의 크기를 유의하게 감소시키고, 이 효과는 nociceptin 수용체 길항제인 [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub>에 의하여 길항된다는 것을 처음으로 밝힌 결과는 매우 고무적이라고 할 수 있다. 비록 nociceptin 수용체가 G 단백질에 연계되어 있고 (Chen et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1994; Lachowicz et al., 1995), 뇌내에도 존재하며 (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995), 흥분성 cyclic AMP의 축적을 억제한다고는 알려져 있지만 (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Wu et al., 1997; Okawa et al., 1998) nociceptin이 어떤 기전을 통하여 뇌보호 효과를 나타내었는지 본 연구의 결과만으로는 확실히는 알 수 없으나 아마도 혈액 재관류 직후에 일어나는 반응성 뇌출혈을 억제시켜 줌으로써 이때 동반되어 초래되는 다량의 세포독성 물질의 생성을 감소시켜 주었기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 가설을 증명하기 위하여는 앞으로 더욱 자세한 연구가 뒤따라야 할 과제로 남는다.

본 연구를 통하여 nociceptin이 뇌허혈로 인한 뇌혈류역학의 변동을 개선시키고 뇌경색을 감소시킨다는 것이 밝혀짐으로써 향후 허혈성 뇌손상의 진행을 억제하고 뇌순환 개선 효과가 큰 신약 개발과 적용 등에 대한 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대되는 바가 크다.

## REFERENCES

- Abdulla FA, Smith PA. Nociceptin inhibits T-type  $Ca^{2+}$  channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism. *J Neurosci.* 1997. 17: 8721-8728.
- Andoh T, Itoh M, Kuraishi Y. Nociceptin gene expression in rat dorsal root ganglia induced by peripheral inflammation. *Neuroreport.* 1997. 8: 2793-2796.
- Avery SF, Crockard HA, Russell RW. Improved survival following severe cerebral ischemia using naloxone. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983. 3: S331-S332.
- Baskin DS, Hosobuchi Y. Naloxone reversal of ischemic neurological deficits in man. *Lancet.* 1981. 2: 272-275.
- Baskin DS, Hosobuchi Y, Grevel JC. Treatment of experimental stroke with opiate antagonists: Effects on neurological function, infarct size and survival. *J Neurosurg.* 1986. 64: 99-103.
- Baskin DS, Widmayer MA, Browning JL, Heizer ML, Schmidt WK. Evaluation of delayed treatment of focal cerebral ischemia with three selective  $\kappa$ -opioid agonists in cats. *Stroke.* 1994. 25: 2047-2054.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986. 17: 1304-1308.
- Brooks H, Elton CD, Smart D, Rowbotham DJ, McKnight AT, Lambert DG. Identification of nociceptin in human cerebrospinal fluid: comparison of levels in pain and non-pain states. *Pain.* 1998. 78: 71-73.
- Calo' G, Guerrini R, Bigoni R, Rizzi A, Marzola G, Okawa H, Bianchi C, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D. Characterization of [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub>, a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2000. 129: 1183-1193.
- Champion HC, Bivalacqua TJ, Zadina JE, Kastin AJ, Hyman AL, Kadowitz PJ. Role of nitric oxide in mediating vasodilator responses to opioid peptides in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002. 29: 229-232.
- Champion HC, Bivalacqua TJ, Zadina JE, Kastin AJ, Kadowitz PJ. Vasodilator responses to the endomorphin peptides, but not nociceptin/OFQ, are mediated by nitric oxide release. *Ann N Y Acad Sci.* 1999. 897: 165-172.
- Champion HC, Pierce RL, Kadowitz PJ. Nociceptin, a novel endogenous ligand for the ORL1 receptor, dilates isolated resistance arteries from the rat. *Regul Pept.* 1998. 78: 69-74.

- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* 1994. 347: 279-283.
- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci.* 1990. 13: 171-182.
- Connor M, Christie MJ. Modulation of  $Ca^{2+}$  channel currents of acutely dissociated rat periaqueductal grey neurons. *J Physiol (Lond).* 1998. 509: 47-58.
- Connor M, Yeo A, Henderson G. The effect of nociceptin on  $Ca^{2+}$  channel current and intracellular  $Ca^{2+}$  in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol.* 1996. 118: 205-207.
- Faber ES, Chambers JP, Evans RH, Henderson G. Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisectioned spinal cord preparation in vitro. *Br J Pharmacol.* 1996. 119: 189-190.
- Faden AI, Hallenbeck JM, Brown CQ. Treatment of experimental stroke: comparison of naloxone and thyrotropin releasing hormone. *Neurology.* 1982. 32: 1083-1087.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* 1994. 343: 42-46.
- Furui T, Satoh K, Asano Y, Shimosawa S, Hasuo M, Yaksh TL. Increase of beta-endorphin levels in cerebrospinal fluid but not in plasma in patients with cerebral infarction. *J Neurosurg.* 1984. 61: 748-751.
- Gumusel B, Hao Q, Hyman A, Chang JK, Kapusta DR, Lipton H. Nociceptin: an endogenous agonist for central opioid like<sub>1</sub> (ORL1) receptors possesses systemic vasorelaxant properties. *Life Sci.* 1997. 60: PL141-PL145.
- Hara N, Minami T, Okuda-Ashitaka E, Sugimoto T, Sakai M, Onaka M, Mori H, Imanishi T, Shingu K, Ito S. Characterization of nociceptin hyperalgesia and allodynia in conscious mice. *Br J Pharmacol.* 1997. 121: 401-408.
- Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol.* 1993. 40: 645-670.
- Hariri RJ, Supra EL, Roberts JP, Lavyne MH. Effect of naloxone on cerebral perfusion and cardiac performance during experimental cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 1986. 64: 780-786.
- Henderson G, McKnight AT. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand - nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci.* 1997. 18: 293-300.
- Hosobuchi Y, Baskin DS, Woo SK. Reversal of induced ischemic neurologic deficit in gerbils by the opiate antagonist naloxone. *Science.* 1982. 215: 69-71.
- Houtani T, Nishi M, Takeshima H, Nukada T, Sugimoto T. Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 219: 714-719.
- Hughes SY, Champion HC, Cheng G, Kadowitz PJ, Jeter JR Jr. Vasorelaxant responses to endomorphins, nociceptin, albuterol, and adrenomedullin in isolated rat aorta. *Life Sci.* 2000. 67: 471-476.
- Ikeda K, Kobayashi K, Kobayashi T, Ichikawa T, Kumanishi T, Kishida H, Yano R, Manabe T. Functional coupling of the nociceptin/orphanin FQ receptor with the G-protein-activated  $K^{+}$  (GIRK) channel. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997. 45: 117-126.
- Ikeda K, Watanabe M, Ichikawa T, Kobayashi T, Yano R, Kumanishi T. Distribution of prepro-nociceptin/orphanin FQ mRNA and its receptor mRNA in developing and adult mouse central nervous systems. *J Comp Neurol.* 1998. 399: 139-151.
- Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM, Moreau JL, Ouagazzal AM, Martin JR, Lundstrom K, Cesura AM, Poli SM, Roever S, Kolczewski S, Adam G, Kilpatrick G. A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. 97: 4938-4943.
- King MA, Rossi GC, Chang AH, Williams L, Pasternak GW. Spinal analgesic activity of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *Neurosci Lett.* 1997. 223: 113-116.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ Jr, Sibley DR. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem.* 1995. 64: 34-40.
- Levy R, Feustel P, Severinghaus J, Hosobuchi Y. Effect of naloxone on neurologic deficit and cortical blood flow during focal cerebral ischemia in cats. *Life Sci.* 1982. 31: 2205-2208.
- Liebel JT, Swandulla D, Zeilhofer HU. Modulation of excitatory synaptic transmission by nociceptin in superficial dorsal horn neurones of the neonatal rat spinal cord. *Br J Pharmacol.* 1997. 121: 425-432.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989. 20: 84-91.
- Meunier JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 1997. 340: 1-15.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B,



- Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 1995. 377: 532-535.
- Miller LP, Perry DC. Opiate receptor subtype binding in gerbil hippocampus is altered by forebrain ischemia. *Brain Res*. 1989. 495: 367-372.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalou P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*. 1994. 341: 33-38.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93: 8666-8670.
- Morikawa H, Fukuda K, Mirra H, Shoda T, Kato S, Mori K. Nociceptin receptor-mediated  $Ca^{2+}$  channel inhibition and its desensitization in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol*. 1998. 351: 247-252.
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1999. 406: 503-547.
- Nicol B, Lambert DG, Rowbotham DJ, Smart D, McKnight AT. Nociceptin induced inhibition of  $K^+$  evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol*. 1996. 119: 1081-1083.
- Noda Y, Mamiya T, Manabe T, Nishi M, Takeshima H, Nabeshima T. Role of nociceptin systems in learning and memory. *Peptides*. 2000. 21: 1063-1069.
- Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93: 8677-8682.
- Okawa H, Hirst RA, Smart D, McKnight AT, Lambert DG. Rat central ORL-1 receptor uncouples from adenylyl cyclase during membrane preparation. *Neurosci Lett*. 1998. 246: 49-52.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 1995. 270: 792-794.
- Schlicker E, Werthwein S, Kathmann M, Bauer U. Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL1 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1998. 358: 418-422.
- Shu YS, Zhao ZQ, Li MY, Zhou GM. Orphanin FQ/nociceptin modulates glutamate- and kainic acid-induced currents in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neuropeptides*. 1998. 32: 567-571.
- Taylor F, Dickenson A. Nociceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport*. 1998. 9: R65-R70.
- Turner DM, Kassell NF, Sasaki T, Comair YG, Boarini DJ, Beck DO. Effects of naloxone on cerebral blood flow and metabolism in isoflurane/nitrous oxide-anesthetized dogs. *Neurosurgery*. 1984. 14: 688-696.
- Vaughan CW, Christie MJ. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *Br J Pharmacol*. 1996. 117: 1609-1611.
- Vaughan CW, Ingram SL, Christie MJ. Actions of the ORL1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro. *J Neurosci*. 1997. 17: 996-1003.
- Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994. 27: 37-44.
- Wu YL, Pu L, Ling K, Zhao J, Cheng ZJ, Ma L, Pei G. Molecular characterization and functional expression of opioid receptor-like1 receptor. *Cell Res*. 1997. 7: 69-77.
- Yu TP, Fein J, Phan T, Evans CJ, Xie CW. Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus. *Hippocampus*. 1997. 7: 88-94.
- Yu TP, Xie CW. Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol*. 1998. 80: 1277-1284.
- Zabramski JM, Spetzler RF, Selman WR, Roessmann UR, Hershey LA, Crumrine RC, Macko R. Naloxone therapy during focal cerebral ischemia evaluation in a primate model. *Stroke*. 1984. 15: 621-627.