ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2013 Vol. 23. No. 2. 157~166 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2013.23.2.157

Contribution of Nociceptin to Alterations in Cerebral Blood Flow Regulation Following Postnatal Exposure to Ethanol in Rats

Dong Hwan Cho and Won Suk Lee*

Department of Pharmacology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Received January 16, 2013 / Revised January 24, 2013 / Accepted January 24, 2013

This study aimed to investigate whether nociceptin contributes to the alterations in cerebral blood flow (CBF) regulation following postnatal exposure to ethanol in Sprague-Dawley rats. Animals received ethanol twice a day, 2 hr apart, on postnatal 6, 7 and 8 days. The changes in regional CBF (rCBF) in response to the changes in mean arterial blood pressure were determined at 4-, 8-, and 12-week of age by laser-Doppler flowmetry. Hypotension was induced by the gradual withdrawal of blood from arterial catheter, and the reversal of blood pressure was produced by the reinfusion of blood. Expression of nociceptin-like immunoreactivity was determined in dura mater and cerebral cortex using immunohistochemistry. Postnatal exposure to ethanol almost abolished the autoregulation of rCBF in all age groups. Pretreatment with nociceptin but not with [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2, a selective competitive nociceptin receptor antagonist, 5 min prior to ethanol administration preserved the autoregulation of rCBF in all age groups. Postnatal exposure to ethanol markedly increased the expressions of nociceptin-like immunoreactivity in the dura mater and cerebral cortex, both of which were significantly inhibited by pretreatment with 7-nitroindazole monosodium salt as well as aminoguanidine 5 min prior to ethanol administration in all age groups. The values of arterial blood gas analysis were not significantly different from the basal levels in all groups. These results suggest that nociceptin deeply contributes to the compensatory mechanisms for the nitric oxide-dependent alterations in CBF autoregulation following postnatal exposure to ethanol.

Key words : Cerebral blood flow, ethanol, nitric oxide, nociceptin, rat

서 론

알코올 남용은 뇌 발달에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 태아기에 알코올에 노출되면 출생 후의 중추신경계 발달에 변동이 초래된다[39, 55]. 특히 태아가 자궁 내에서 에탄올에 노출되면 신경독 증후군인 태아알코올증후군(fetal alcohol syndrome)이 초래된다[7, 29]. 태아알코올증후군은 대표적인 뇌기능 발달장애로서 뇌성마비, 정신지체 및 학습장애 등과 함께 다양한 행동장애를 초래한다[54]. 실제로 이러한 질환의 발생 원인은 다양하나 뇌손상이 초래되는 것은 동일한 현상이며 단지 손상된 뇌 부위에 따라 초래되는 기능장애에 차이가 있을 것이라고 추정되고 있고[19, 50], 태아기, 출생전후기 또는 신생아기의 뇌 발달 시기에 뇌가 손상을 받아 발생한다고 생각되고 있다[9].

뇌순환계는 말초 순환계와는 달리 특징적으로 뇌혈류 자가조절 기능을 가지고 있어, 혈관 관류압이 일정 범위 내에서는 어떻게 변동되더라도 일정한 혈류를 유지하도록 하는데 중요한 기여를 하고 있다[33]. 만약 뇌혈류 자가조절 기능에 손상이 초래되면 정상적인 뇌기능을 발휘하기 위한 적절한 혈류가 유지되지 못하게 된다.

일찍이 Richardson 등[49]은 임신한 양에게 에탄올을 주입하였을 때 태아의 대뇌에서 산소 섭취의 감소와 함께 뇌혈류가 유의하게 감소됨을 관찰하였고, 만약 이러한 현상이 지속된다면 대뇌에서의 산화성 대사의 감소는 뇌 발달에 크게 영향을 미치게 되어 출생 후 중추신경계의 성장 장애와 기능장애에 관여할 것이라고 보고함으로써 뇌기능 발달장애 질환에 있어서 뇌혈류의 중요성을 주장하였다. Gleason 등[15]은 임신 초기 3주 동안 에탄올에 노출된 모체로부터 태어난 신생양에서 저산소혈증에 대한 뇌혈관 확장 반응과 뇌혈관 저항의 감소가 현저히 약화됨을 관찰 보고하였다. 따라서 오늘날 뇌기능 발달장애의 병태생리학에서는 비정상적인 뇌혈류 조절이 중요한 문제가 될 것으로 생각되고 있다. 그러나 뇌기능 발달장애에 관련된 뇌혈류 조절 기능의 손상의 발생 기전은 잘 모르고 있다.

한편, nociceptin은 내인성 아편유사펩티드인 dynorphin이나 α-neoendorphin과 아미노산 배열은 유사하지만[37, 40], μ-, δ- 및 κ-아편유사물질수용체에 대한 친화력이 아주 낮고[13,

*Corresponding author
Tel : +82-51-510-8062, Fax : +82-51-510-8068
E-mail : wonslee@pusan.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

32], 그 분포와 생체 효과에 있어서 아편유사제와 다르므로 기존의 내인성 아편유사펩티드보다 더 다양한 생리 작용을 가지고 있는 것으로 인식되고 있다[23, 36]. Nociceptin은 대뇌 허혈 손상에 대하여 중요한 역할을 할 것이라고 추정되고 있는데, 그 가능성으로서 허혈성 뇌손상 유발의 주된 물질인 glutamate의 유리를 억제하고[44, 45], glutamate에 의한 흥분성 신경전도를 억제하며[11, 59], 전압-의존성 Ca^{2+} 통로를 억제한다[8, 42]는 점들이다.

최근에 nociceptin은 출생전후기 허혈-저산소증에 대하여도 밀접한 관련을 하는 것으로 주목받고 있는데, Gu 등[21]은 임신한 흰쥐의 자궁혈관들을 결찰함으로써 출생전후기 허혈-저산소증을 유발하고 이들 모체로부터 태어난 신생 흰쥐의 시상하부와 말초혈액 내 nociceptin의 농도가 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있음을 보고하였다. 그러나 뇌 발달기에 알코올에의 노출에 의한 뇌기능 손상에 대한 nociceptin의 역할에 대하여는 아직 알려진 바가 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 뇌기능 발달 장애의 일반적인 증상 발현의 기전을 밝히는 연구의 일환으로서 최근에 뇌손상이 확실하게 발생된다고 입증된 출생 초기 알코올 투여법[28]을 응용하여 흰쥐의 발달 시기의 뇌에 손상을 일으키고, 이로 인한 출생 초기 알코올 투여가 성장 후의 뇌혈류 자가조절 기능에 미치는 영향과 이에 관한 nociceptin의 관여를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 알코올 투여

Sprague-Dawley계 신생 숫쥐(체중 10.1~15.7 g)에게 Ikonomidou 등[28]의 방법을 응용하여 생후 6, 7 및 8일의 3일간에 걸쳐 0.9% 생리식염수에 희석한 20%(w/v) 에탄올(2.5 g/kg)을 2시간 간격으로 1일 2회 피하주사하였다. 대조군에게는 0.9% 생리식염수를 에탄올 투여군과 동일한 방법으로 투여하였다. 알코올 주사 후 체온 저하를 방지하기 위하여 실험동물을 백열등 아래에서 의식을 완전히 회복할 때까지 보온시켜 주었다가 모체가 들어 있는 사육상자 내로 옮겼다. 이들을 사육장(실내 온도 22~25℃) 내에서 물과 사료를 제한 없이 섭취하게 하면서 사육하다가 생후 4, 8 및 12주령 때 실험에 사용하였다.

일반 수술 조작

실험동물을 urethane (1 g/kg, i.p.)으로 마취시키고 체온을 37℃로 유지시키기 위하여 소동물용 자동 보온 전기방석(homeothermic blanket system, Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) 위에 놓고 앙와위로 고정하였다. 기관절개술을 행하여 14G catheter로 기도를 확보하고 gallamine (3~5 mg/kg, i.m.)을 투여하여 골격근을 마비시켰다. 동물용 호흡기(683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 사용하여 체중을 기준하여 분당 50~60 회의 호흡을 유지시켰다. 양측 대퇴동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽입하고 이를 통하여 혈액 가스 및 pH를 측정하였다(i-STAT Portable Clinical Analyzer, i-STAT Corporation, East Windsor, NJ, USA).

혈압 변동 측정

전신 혈압의 변동을 관찰하기 위하여 실험동물의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene 관에 연결된 압력변환기(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.

출혈-저혈압 유도 및 혈액 재주입

실험동물의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene 관을 통하여 동맥혈 0.5 ml를 1분에 걸쳐 출혈시켜 혈액저장고 속에 저장하면서 평균동맥혈압을 안정시의 값에 비하여 적어도 20~25%까지 낮추었다가 이 혈액을 다시 동일한 대퇴동맥 내로 같은 속도로 재주입하였다. 이때 사용한 혈액저장고인 플라스틱 주사기의 내벽은 헤파린 25 U/ml로 미리 코팅시켰고, 각 단계마다 변동된 평균동맥혈압을 1분 동안 유지시켰다.

두개창 설치

일반적인 수술 조작이 끝난 후 실험동물의 체위를 복와위로 변경시키고 두부를 뇌정위기구(model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 정중선을 따라 두피를 절개한 후 우측 두정골에 개두술(5×5 mm)을 행하고 미리 37℃로 가온한 인공 뇌척수액을 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).

국소 뇌혈류 측정

실험동물의 두정골에 설치한 두개창을 통하여 laser-Doppler flowmeter (Laserflo BPM^2, Vasamedics, St. Paul, MN, USA)용 Trimflo parenchymal probe (Vasamedics)를 뇌정위기구용 미세조작 기구를 사용하여 연막동맥 직상부에 조심스럽게 근접시켰다. 일정 시간 동안 안정시킨 후 단계적 출혈-저혈압 및 혈액 재주입에 따른 국소 뇌혈류의 변동을 측정하였다. Laser-Doppler flowmeter에 의하여 측정된 국소 뇌혈류의 변동은 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 data acquisition system에 기록하였다.

관류고정 및 조직처리

실험동물의 흉곽을 열어 심장을 노출시키고, 좌심실에 주사침을 삽입한 후 우심방을 절개하여 혈액이 흘러나오도록 한 다음 주사침에 주입펌프를 연결하여 분당 4 ml의 속도로 약 200 ml 정도의 0.02 M phosphate buffered saline (PBS)를 관류시켜 혈액을 제거한 다음 250~300 ml의 4% paraformaldehyde/PBS로 관류 고정을 시행하였다. 두부 전체를 적출한 후 동일 고정액에 넣고 4℃ 냉장고에 12시간 동안 후고정(postfixation)을 하였으며, 경막과 전체 뇌를 분리한 후 6시간 동안 한 번 더 고정하였다. 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하고 20% sucrose/PBS에 8시간 동안 침전시켜 동결 시 일어나는 빙정(ice crystal)을 방지하였다. 이후 경막은 실란(silane)이 입혀져 있는 슬라이드글라스(Muto Pure Chemicals Ltd, Tokyo, Japan) 위에 온조직 표본으로 부착시키고, 적출 뇌조직은 전두엽 끝으로부터 2 mm 간격으로 얻은 7개의 절편 중 5개(3번째부터 7번째)의 절편들을 냉동박편절단기(HM560 MV Cryo-Star, Microm, Walldorf, Germany)를 사용하여 10 μm 두께의 조직박편을 만들어 슬라이드글라스(Muto Pure Chemicals Ltd) 위에 부착시켰다. 그 후 상온에서 1일간 말린 후 -20℃에서 15분 동안 차가운 acetate에 담구어 고정시켰다가 상온에서 2시간 동안 말린 후 염색 전까지 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

면역조직화학

내인성 peroxidase의 반응을 제거하기 위해 조직을 0.3% 과산화수소수에 넣어 20분간 실온에 방치하였다. 그 후 조직을 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척한 후에 비특이적인 면역반응(nonspecific immune reaction)을 방지하기 위해 2% bovine serum albumin (blocking antibody)을 사용하여 humidified chamber에서 30분 동안 반응시켰다. Blocking antibody를 제거한 뒤 1차 항체인 rabbit anti-nociceptin (Millipore Biosciences, Temecula, CA, USA)을 1:1,500으로 희석한 후, 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이때 희석액은 0.02 M PBS에 0.5% bovin serum albumin이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 실온에서 0.02 M PBS로 15 분간 3회 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응이 끝난 후에 0.02 M PBS로 5분간 3회 세척한 후 3차 반응 용액인 avidin-biotin complex (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories) 용액으로 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하고 diaminobenzidine substrate kit(Vector Laboratories)를 이용하여 광학현미경(Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)으로 확인하면서 착색반응을 시행하였다. 반응이 끝난 후 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하여 반응을 중지시키고, 알코올과 xylene으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)으로 봉입하여 cover glass를 씌운 후 광학현미경으로 nociceptin-유사 면역반응력(nociceptin-like immunoreactivity)을 관찰하였다. Nociceptin-유사 면역반응력의 발현에 대한 분석은 디지털 영상 처리 소프트웨어(AxioVision 4.2, Carl Zeiss)를 사용하여 조사면 당 발현 개수를 측정하였다.

사용 약물

본 연구에 사용된 주요 약물은 nociceptin, nociceptin 수용체에 선택적 경쟁적 길항제인 [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2, 신경세포성 nitric oxide (NO) 합성효소 억제제인 7-nitroindazole monosodium salt (7-NINA) (이상 Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, Bristol, UK) [51]와 유도성 NO 합성효소 억제제인 aminoguanidine hydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) [20]이다. 이들 약물의 전처치는 에탄올 투여 5분 전에 각각 복강 내로 주사하였다.

통계 처리

모든 측정치는 평균±평균의 표준오차로 표시하였다. 평균동맥혈압의 변동에 대한 국소 뇌혈류의 변동은 비직선 회귀분석법으로 분석하였고, nociceptin-유사 면역반응력의 변동은 Student's unpaired *t*-test와 분산분석법으로 분석한 후 각 군 사이의 유의성 검정을 Dunnett의 다중비교법으로 사후 검정하여 p 값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

국소 뇌혈류의 변동

단계적 출혈-저혈압 및 혈액 재주입에 따른 국소 뇌혈류의 변동을 laser-Doppler flowmetry 방법으로 측정하였다.

출생 후 6, 7 및 8일째에 0.9% 생리식염수를 처치한 sham군은 주령에 관계없이 평균동맥혈압의 변동에 대한 국소 뇌혈류의 반응을 정상적으로 나타내었다(Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3). 그러나 2.5 g/kg의 에탄올을 매일 2시간 간격으로 2회 피하주사한 군은 출혈-저혈압시 4주령(p<0.05, Fig. 1), 8주령(p<0.05, Fig. 2) 및 12주령(p<0.05, Fig. 3)에서 뿐만 아니라 혈액 재주입시 4주령(p<0.05, Fig. 1), 8주령(p<0.05, Fig. 2) 및 12주령(p<0.05, Fig. 3) 모두에서 뇌혈류 자가조절 기능이 소실 또는 현저히 약화되었다.

출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래된 뇌혈류 자가조절 기능의 손상은 에탄올 투여 5분 전의 nociception (0.138 μg/kg, i.p.) 전처치에 의하여 출혈-저혈압 시 4주령(p<0.001, Fig. 1), 8주령(p<0.01, Fig. 2) 및 12주령(p<0.001, Fig. 3)에서 뿐만 아니라 혈액 재주입시 4주령(p<0.05, Fig. 1), 8주령(p<0.05, Fig. 2) 및 12주령(p<0.01, Fig. 3) 모두에서 유의하게 차단되어 뇌혈류 자가조절 기능이 정상적으로 유지되었다. 그러나 nociceptin 수용체 길항제인 [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2

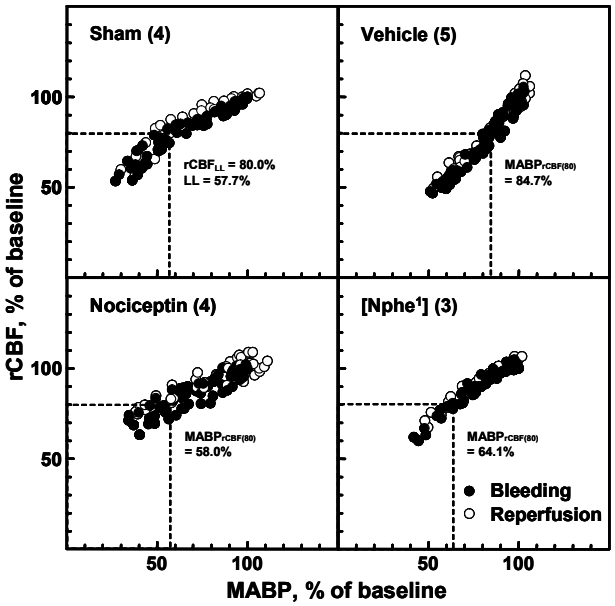

Fig. 1. Changes in regional cerebral blood flow (rCBF) in response to changes in mean arterial blood pressure (MABP) of 4-week old rats. Animals were subcutaneously treated with ethanol (2.5 g/kg) twice a day, 2 hr apart, on postnatal days of 6, 7 and 8. Nociceptin (0.138 μg/kg) or [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2 ([Nphe^1], 1.38 μg/kg) was administered intraperitoneally 5 min prior to ethanol treatment. Numbers in parentheses indicate the numbers of animals. LL=lower limit of MABP for CBF autoregulation. $rCBF_{LL}$=rCBF at LL. $MABP_{rCBF(80)}$= MABP needed to maintain 80% of baseline rCBF of sham group.

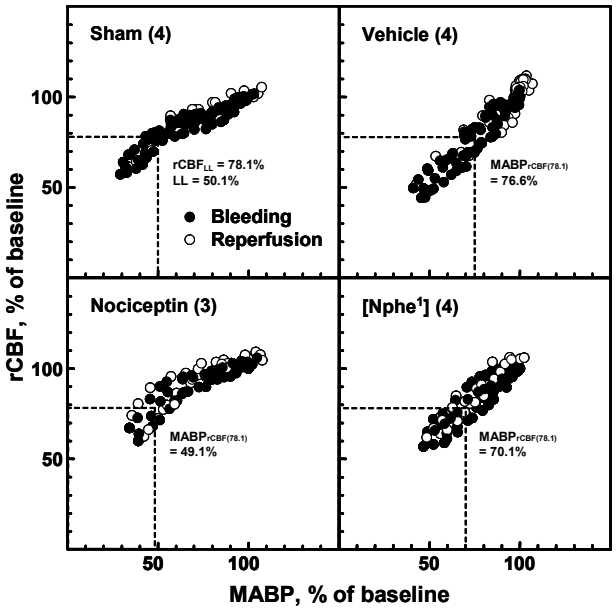

Fig. 2. Changes in rCBF in response to changes in MABP of 8-week old rats. $MABP_{rCBF(78.1)}$=MABP needed to maintain 78.1% of baseline rCBF of sham group. Others are same as in Fig. 1.

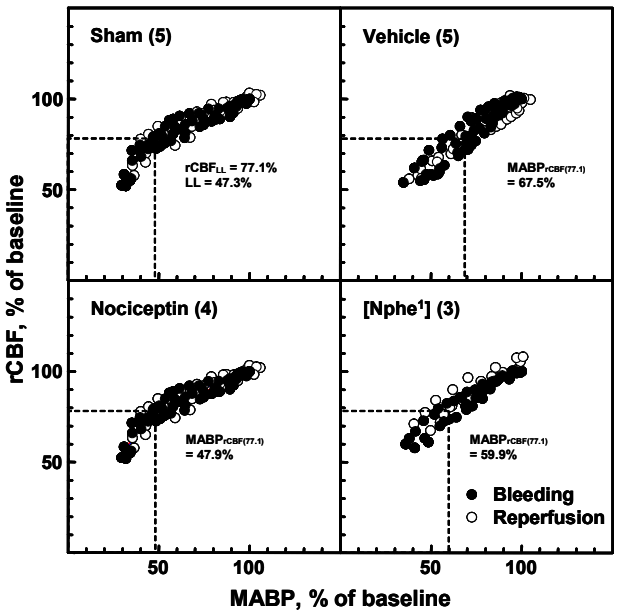

Fig. 3. Changes in rCBF in response to changes in MABP of 12-week old rats. $MABP_{rCBF(77.1)}$=MABP needed to maintain 77.1% of baseline rCBF of sham group. Others are same as in Fig. 1.

전처치는 에탄올에 의한 뇌혈류 자가조절 기능의 손상을 차단하지 못하였다.

뇌혈류 자가조절의 하한점(lower limit)의 이동을 보기 위하여 Yamamoto 등[58]의 방법에 따라 자가조절지수[autoregulatory index; 평균동맥혈압이 10% 저하될 때마다 초래되는 뇌혈류 변동치의 백분율, 즉 (Δ% 뇌혈류)/(10% 평균동맥혈압 저하)]를 구하여 자가조절지수가 -7인 때의 평균동맥혈압을 뇌혈류 자가조절의 하한점으로 정하였다.

대조군의 자가조절 하한점은 4주령의 경우 기저 평균동맥혈압의 약 57.7%(Fig. 1), 8주령의 경우 약 50.1%(Fig. 2), 그리고 12 주령의 경우 약 47.3%이었다(Fig. 3). 그러나 출생 초기 에탄올 투여군에서는 자가조절 하한점이 4주령과 8주령의 경우 소실되었고, 12주령의 경우 기저 평균동맥혈압의 약 83.0%로서 현저히 우측으로 이동되었다. 각 군에서 대조군의 자가조절 하한점에서의 뇌혈류와 동일한 수준의 뇌혈류를 유지하는데 필요로 하는 평균동맥혈압(4주령, 기저 평균동맥혈압의 80.0%; 8주령, 기저 평균동맥혈압의 78.1%; 12주령, 기저 평균동맥혈압의 77.1%)을 비교하여 보았을 때 모든 연령군에서 초기 에탄올 투여군은 대조군보다 높은 평균동맥혈압을 필요로 하였고, nociceptin 전처치군은 대조군과 유사한 평균동맥혈압을 필요로 하였으나, [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2 전처치군은 여전히 대조군보다 높은 평균동맥혈압을 필요로 하였다.

한편, 혈액 가스 분석 결과는 4주령의 경우 Table 1에서 보

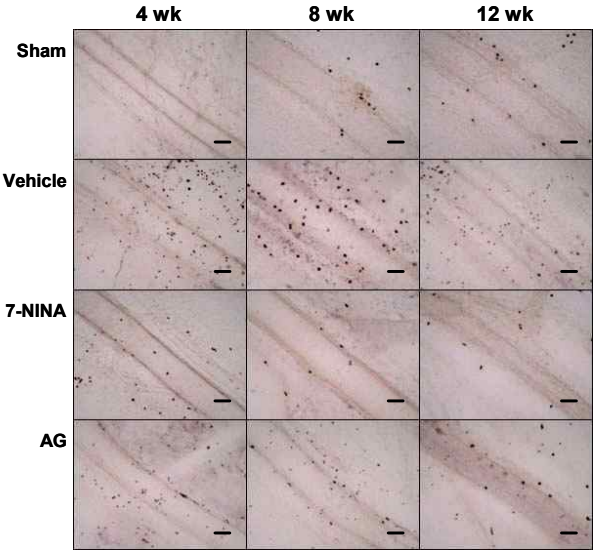

Fig. 4. Representative photomicrographs for expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater of 4-, 8- and 12-week old rats. Animals were subcutaneously treated with ethanol (2.5 g/kg) twice a day, 2 hr apart, on postnatal days of 6, 7 and 8, respectively. 7-Nitroindazole monosodium salt (7-NINA, 50 mg/kg) or aminoguanidine (AG, 1 mg/kg) was administered intraperitoneally 5 min prior to ethanol treatment. Scale bar=100 μm.

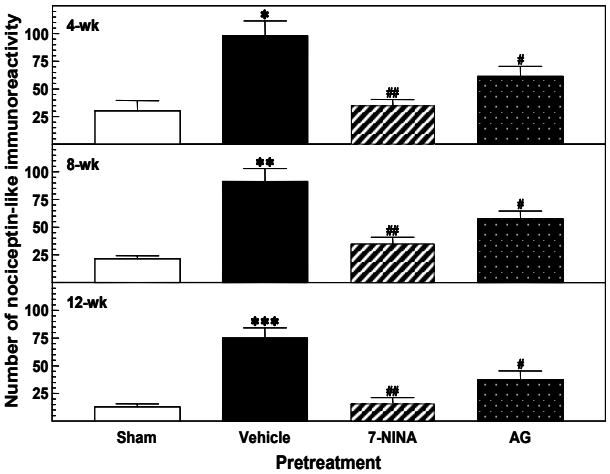

Fig. 5. Inhibition by nitric oxide synthase inhibitors of expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater of 4-, 8- and 12-week old rats. The number of animal is 4 in each group. $^{*}p<0.01$; $^{**}p<0.005$; $^{***}p<0.001$ vs. sham group. $^{\#}p<0.05$; $^{\#\#}p<0.001$ vs. vehicle group.

는 바와 같이 실험 전, 중 및 후에 유의한 차이를 보이지 아니하였다. 8주령과 12주령의 경우에 있어서도 혈액가스 분석 결과는 실험 전, 중 및 후에 유의한 차이를 보이지 아니하였다(결과 미제시).

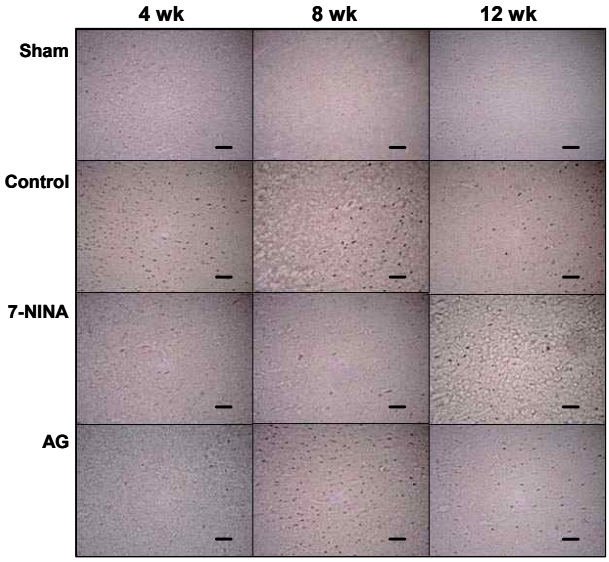

Fig. 6. Representative photomicrographs for expression of nociceptin-like immunoreactivity in cerebral cortex of 4-, 8- and 12-week old rats. Scale bar=100 μm.

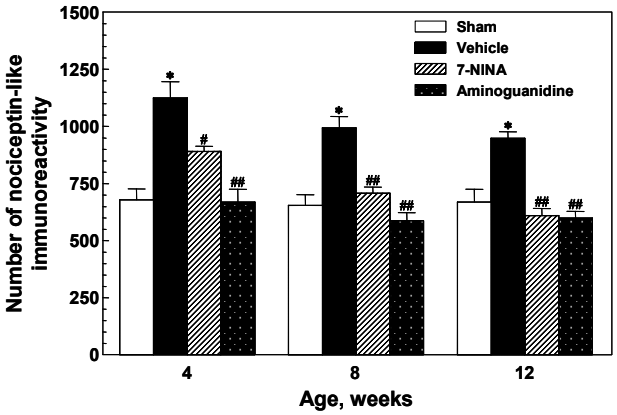

Fig. 7. Inhibition by nitric oxide synthase inhibitors of expression of nociceptin-like immunoreactivity in cerebral cortex of 4-, 8- and 12-week old rats. Nociceptin-like immunoreactivity was determined by summation of individual immunoreactivity from 5 consecutive slices at a 2-mm interval from frontal pole to occipital lobe of brain. The number of animal is 4 in each group. $^{*}p<0.005$ vs. sham group. $^{\#}p<0.05$; $^{\#\#}p<0.001$ vs. vehicle group.

경막 내 nociceptin-유사 면역반응력 발현

실험동물의 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력은 Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 정상군에서는 뇌막혈관 주위에서 소량 발현되었다(4주령, 30.0±9.5 개/조사면; 8주령, 21.3±3.0 개/조사면; 12주령, 12.8±2.8 개/조사면). 그러나 출생 초기 에탄올 투여 군에서는 Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력이 모든 주령에서 현저히 증가하였다(4주령, 98.1±13.4 개/조사면, $p<0.01$; 8주령, 91.3±11.7

Table 1. The values of arterial blood gas analysis of 4-week old rats in determination of regional cerebral blood flow

		pH	$PaCO_2$ (mmHg)	PaO_2 (mmHg)
Sham (n=4)	Before	7.401±0.038	43.5±3.4	95.1±2.3
	During	7.400±0.035	42.0±3.6	95.0±3.3
	After	7.402±0.037	42.1±3.5	95.8±2.9
Vehicle (n=5)	Before	7.388±0.037	43.1±3.4	94.5±2.2
	During	7.413±0.035	42.6±4.1	94.6±2.2
	After	7.412±0.032	42.9±4.3	93.9±3.3
Nociceptin (n=4)	Before	7.403±0.032	43.2±4.4	96.1±2.8
	During	7.401±0.035	42.8±4.0	97.2±2.5
	After	7.403±0.036	42.6±4.1	96.1±2.6
[Nphe[1]] (n=3)	Before	7.398±0.030	43.1±3.3	94.4±3.1
	During	7.402±0.030	39.9±3.7	93.5±3.4
	After	7.403±0.032	41.1±3.1	93.7±3.5

Data are means±SEM. Before, basal values before hemorrhagic hypotension. During, values during hypotension. After, values after blood reperfusion. Others are same as in Fig. 1.

개/조사면, $p<0.005$; 12주령, 74.9±9.3 개/조사면, $p<0.001$).

출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래된 이러한 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력 발현의 증가에 있어서 NO의 관련성을 살펴보기 위하여 신경성 NO 합성효소 억제제인 7-NINA와 유도성 NO 합성효소 억제제인 aminoguanidine 전처치 효과를 관찰하였다.

출생 초기 에탄올 투여에 의한 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력 발현의 증가는 7-NINA 전처치(4, 8 및 12주령 모두 $p<0.001$)에 의하여 뿐만 아니라 aminoguanidine 전처치(4, 8 및 12주령 모두 $p<0.05$)에 의하여 모든 주령에서 유의하게 억제되었다(Fig. 4와 Fig. 5).

한편 aminoguanidine과 7-NINA 자체는 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력에 큰 영향을 미치지 아니하였다(결과 미제시).

대뇌피질 내 nociceptin-유사 면역반응력 발현

전두엽 끝으로부터 2 mm 간격으로 얻은 7개의 뇌 절편 중 5개(3번째부터 7번째)의 절편들에서 발현되는 nociceptin-유사 면역반응력을 합산하였다. 대뇌피질에서의 nociceptin-유사 면역반응력은 Fig. 6과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정상군에서는 소량 발현되었다(4주령, 677.7±48.5 개/조사면; 8주령, 654.0±46.5 개/조사면; 12주령, 669.1±55.8 개/조사면). 그러나 출생 초기 에탄올 투여 군에서는 Fig. 6과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 대뇌피질 내 nociceptin-유사 면역반응력이 모든 주령에서 현저히 증가하였다(4주령, 1124.0±71.8 개/조사면, $p<0.005$; 8주령, 993.0±49.7 개/조사면, $p<0.005$; 12주령, 948.6±27.9 개/조사면, $p<0.005$).

출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래된 이러한 대뇌피질 내 nociceptin-유사 면역반응력 발현의 증가는 7-NINA 전처치(4주령, $p<0.05$; 8 및 12주령, $p<0.001$) 뿐만 아니라 aminoguanidine 전처치(4, 8 및 12주령 모두 $p<0.001$)에 의하여 모든 주령에서 유의하게 억제되었다(Fig. 6과 Fig. 7).

한편 7-NINA와 aminoguanidine 자체는 대뇌피질 내 nociceptin-유사 면역반응력에 큰 영향을 미치지 아니하였다(결과 미제시).

고 찰

본 연구는 흰쥐에서 출생 초기의 에탄올 투여는 성장 후 뇌혈류 자가조절 기능에 현저한 변동을 초래하고, 이에 대한 보상기전으로서 nociceptin의 발현이 증가하며, 여기에는 NO가 깊이 관여하고 있음을 관찰하였다.

뇌기능 발달장애 질환인 뇌성마비, 정신지체 및 학습장애는 태아기, 출생전후기 또는 신생아기의 뇌 발달 시기에 어떠한 원인에 의해서든 뇌가 손상을 받아서 발생한다[9]. 이에 대한 연구를 위하여 출생전후기 저산소-허혈 유발이 실험동물에서 많이 시도되어 왔다.

출생 전후기의 질식에 의하여 이차적으로 초래되는 저산소-허혈성 뇌증은 뇌기능 발달장애의 가장 흔한 위험인자이다. 출생전후기 동안의 질식은 뇌순환계에 중대한 영향을 미치는데, 초기에는 1) 심박출량의 많은 부분이 뇌로 가게 되어 태아 순환계의 변동이 일어나고, 2) 전체 뇌혈류와 국소 뇌혈류의 증가가 일어나고, 3) 뇌혈관에서의 뇌혈류 자가조절 기능이 소실되며, 후기에는 4) 전신 저혈압의 발생과 함께 심박출량의 감소 및 5) 뇌혈류의 감소가 일어나게 된다[2, 6, 18, 35]. 실제로 질식 후기에 초래되는 부가적인 순환장애가 그 이후의 뇌 발달에 심각한 영향을 미친다고 알려져 있다. Volpe 등[53]은 질식 상태로 출생한 영아들에서 시상옆의 뇌혈류량이 감소되어 이 부위의 혈류량이 실비우스 피질(sylvian cortex)의 혈류량보다 25~50%나 낮음을 관찰하였고, Taudorf와 Vorstrup [52]는

전산화 단층 촬영상에서 정상 소견을 가진 뇌성마비 환아들의 뇌혈류의 평균은 정상 수준이었으나, 미숙아에서는 대뇌 후반부에서, 만삭 분만아에서는 대뇌의 전방과 후방에서 저관류 소견을 보였다고 보고하였다. 또한 뇌성마비 환아에서 경두개 도플러(transcranial Doppler)로 측정한 뇌혈류 속도가 매우 감소되어 있거나[5, 14] 국소 뇌혈류가 감소되어 있었다고 보고된 바 있다[57].

뇌 발달 시기에 저산소증에 노출되면 노출시기에 따라 손상받는 뇌부위가 다르게 나타난다고 알려져 있다[34]. 임신 3기의 전반기에 노출되면 뇌간과 시상에 손상이 주로 나타나고, 임신 3기의 중반에 노출되면 뇌간과 시상뿐 아니라 기저핵의 렌즈핵(lentiform nucleus)에 손상이 나타나고, 임신말기에 노출되면 복외측 시상(ventrolateral thalamus)과 후렌즈핵(posterior lentiform nucleus), 롤란도 피질주변(perirolandic cortex)이 손상되며, 외측무릎핵(lateral geniculate nucleus)과 시각부챗살(optic radiation)이 손상받기도 한다.

태아알코올증후군은 임신 기간 동안 만성적으로 알코올을 섭취한 산모로부터 출생한 영아에서 산전 성장과 형태 발생의 변화가 나타나는 증후군으로서 태아알코올증후군을 가진 소아는 정신지체, 학습부진, 심한 행동장애 등으로 일생 동안 고통을 받는다[31]. 뇌에 대한 알코올의 신경독작용은 뇌가 급성장하는 시기, 즉 신경세포접합이 형성되는 시기에 특히 민감하게 나타난다고 하는데, 이 시기는 사람에서는 임신 말기에 해당하고 쥐에서는 출생 후 초기에 해당한다[10, 16]. 사람의 대뇌피질에서 신경세포접합 형성은 임신 3개월에 나타나기 시작하여[41] 생후 24개월까지 활발히 이루어져 최고도에 이르다가 그 이후 서서히 감소된다[27]. 쥐의 경우 생후 7일의 뇌는 뇌 발달기에 있어서 조직학적으로 사람의 임신 32~34주 또는 신생아 때의 것과 유사하여 대뇌피질 신경세포의 계층화가 완성되고, 배아 기질(germinal matrix)이 복잡하게 뒤엉키게 되며, 백질은 아직 수초화가 거의 진행되지 않은 상태로 있다고 한다[48]. 따라서 신생기 쥐에게 에탄올을 투여하면 태아알코올증후군에서 나타나는 뇌 크기의 전반적인 감소, 소뇌와 해마에서의 신경세포의 소실 등이 초래된다[17, 56]. 그러나 알코올에 의한 뇌기능 발달장애에 대한 연구를 위한 적합한 동물실험 모델의 개발은 매우 부진할 뿐만 아니라 그 병태생리학적 기전도 아직 불확실한 실정이다.

최근에 Ikonomidou 등[28]은 출생 초기(생후 7일)의 쥐에게 에탄올을 2시간 간격으로 2회 투여함으로써 세포소멸성 신경변성이 뇌에서 확실하게 발생됨을 입증하여 태아알코올증후군의 실험모델로 적합하다고 제시하였다. 본 연구의 예비실험에서 생후 7일 하루만 에탄올을 투여한 군의 국소 뇌혈류의 자가조절 기능은 4주령에서는 거의 소실되었고, 8주령 이후 12주령으로 주령이 증가함에 따라 약화되기는 하였지만 회복되기 시작하였다. 그러나 생후 7일을 전후하여 3일간 에탄올을 투여한 군에서는 주령에 관계없이 뇌혈류 자가조절 기능과 뇌연막소동맥의 자가조절성 혈관운동성이 완전히 소실 또는 현저히 약화되었다. 따라서 출생 초기 알코올 투여에 의한 뇌기능 발달장애에 관한 연구를 수행하기 위하여는 생후 7일에만 에탄올을 투여하는 것보다는 생후 6~8일에 걸쳐 3일 동안 에탄올을 투여하는 것이 뇌혈류역학에 현저한 변동을 초래하므로 뇌기능 발달장애의 동물모델로 더 적합한 것으로 판단되었다.

뇌순환계는 급격한 혈압 감소 시에는 혈관 확장이 일어나고, 혈압이 급격히 상승하게 되면 혈관 수축이 일어나 자동적으로 뇌를 관류하는 혈액량이 거의 일정하게 유지되도록 조절하는 자가조절 기능을 가지고 있다[33]. 또한 뇌의 특정부위의 활동이 증가 또는 감소하게 되면 이 부위의 뇌혈류도 증가 또는 감소하게 된다. 이와 같은 뇌실질 내 미세혈관의 운동성에 있어서 뇌 모세혈관의 내피세포와 혈관주위세포(pericyte)에 존재하는 평활근 수축성 단백[4, 43]이 중요한 역할을 해 주거나, 혈관주위세포들이 평활근 세포로 분화되어[38] 뇌실질 내 미세혈관의 운동성에 관여해 준다. 본 연구의 결과에서는 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 성장 후의 국소 뇌혈류 조절 기능에 현저한 변동이 초래되었다. 즉, 단계적 출혈-저혈압 및 혈액 재주입에 의한 평균동맥혈압의 변동에 따른 국소 뇌혈류의 변동을 관찰하였을 때 출생 초기 에탄올 투여군은 모든 주령에서 출혈-저혈압시 뿐만 아니라 혈액 재주입시의 국소 뇌혈류 자가조절 기능의 소실 또는 현저한 약화를 보였다. 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래된 이러한 뇌혈류 자가조절 기능의 손상은 nociceptin 전처치에 의하여 억제되어 뇌혈류 자가조절 기능을 모든 주령에서 정상적으로 나타내었다. 그러나 nociceptin 수용체 선택적 경쟁적 길항제인 $[Nphe^1]$nociceptin(1-13)NH_2 전처치는 아무런 효과가 없었다.

한편, NO는 뇌성마비의 위험인자인 저산소-허혈과 밀접한 관계가 있다. 성숙한 뇌에서 저산소증은 신경세포성 NO 합성효소의 mRNA와 단백질 발현을 증가시키며 NO 합성효소의 보조인자인 tetrahydrobiopterin 합성의 속도제한효소인 GTP cyclohydrolase I의 발현을 증가시킨다[22]. 발생 중인 뇌에서도 저산소-허혈에의 노출은 저산소-허혈에 민감한 뇌부위의 신경세포성 NO 합성효소를 발현하는 신경세포의 수를 증가시키며[3, 24], 반대로 신경세포성 NO 합성효소를 knock-out 시킨 생쥐에서는 저산소-허혈 손상이 경감되는 것으로 알려져 있다[12]. 특히 S100β를 고농도로 처리할 경우 별아교세포가 사망하게 되는데, 이때 NO 합성효소가 활성화되며 NO 합성효소 억제제를 처리하면 세포사망이 억제된다[26]. 따라서 NO는 발생 중인 뇌의 저산소-허혈성 손상의 중요한 매개인자의 하나이며, 신경교세포의 사망을 유도할 수도 있다.

에탄올이 뇌세포에서의 NO 합성에 미치는 영향에 대하여는 매우 다양하게 보고되고 있는데, Kimura 등[30]은 장기간 에탄올을 투여받은 기니픽 모체의 만삭 태아의 뇌 무게와 해마내 신경세포성 NO 합성효소의 활성도가 감소되었다고 하고,

Phillips 등[47]은 출생 전에 에탄올에 노출됨으로써 쥐의 위둔덕(superior colliculus)과 수도관주위회백질(periaqueductal gray) 내에 신경세포성 NO 합성효소를 가진 신경세포의 수가 감소되었다고 하는가 하면, Pantazis 등[46]과 Zou 등[60]은 NO 합성효소 억제제가 에탄올에 의한 신경독작용을 보호한다고 한다.

본 연구에서 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 경막과 대뇌피질에 nociceptin-유사 면역반응력의 발현이 현저히 증가하였는데 이 결과들은 7-NINA 및 aminoguanidine 전처치에 의하여 유의하게 감소하였다. 이러한 사실들은 출생 후 신경세포접합 형성이 왕성한 시기에 급성으로 과도하게 노출된 알코올에 의하여 초래되는 급격한 환경 변동으로 인하여 신경성 NO 합성효소가 활성화되고, 뒤이어 진행되는 염증반응과 함께 유도성 NO 합성효소가 활성화됨으로써 연속적으로 대량으로 생성되는 NO에 의하여 신경독작용이 초래되는데, 이때 NO 합성효소와 함께 공존하는 nociceptin 신경세포[25]의 흥분이 지속적으로 일어난 결과라고 생각된다. 그러나 이러한 가능성에 대하여 본 연구에서 에탄올 투여 후의 뇌내 NO의 양이나 NO 합성효소들의 활성도의 변동을 직접 측정해 보지 않아 현재로서는 확실히 알지 못하고 향후 이를 뒷받침할 연구를 더 해 보아야 할 필요가 있다.

본 연구에서 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래되는 뇌혈류 자가조절 기능의 손상이 에탄올 투여 전에 전처치한 외인성 nociceptin에 의하여 유의하게 차단되어 뇌혈류 자가조절 기능이 정상적으로 유지되었다는 사실은 매우 흥미있는 결과이다. 그러나 이와 같은 외인성 nociceptin 전처치에 의한 뇌혈류 자가조절 기능의 보호 효과에 대하여 현재로서는 그 기전을 확실히는 알 수 없다. 하지만 Armstead [1]가 새끼 돼지의 적출 연막동맥 실험에서 nociceptin이 cAMP와 K^+ 통로(ATP-민감성 및 Ca^{2+}-민감성 K^+ 통로)에 의존한 기전을 통하여 확장시켰다고 한 보고와 Nelson 등[44]이 쥐의 대뇌피질 절편에 대한 급성 허혈 실험에서 nociceptin이 glutamate의 유출을 억제하여 신경보호 작용을 가진다고 한 보고들을 참조해 보면, 에탄올 투여 전에 투여한 외인성 nociceptin에 의하여 glutamate 유출이 억제됨으로써 얻어지는 신경보호 효과와 함께 cAMP 유리와 그 이후의 ATP-민감성 K^+ 통로 및 Ca^{2+}-민감성 K^+ 통로의 개구에 의한 연막동맥의 확장이 일어남으로써 적절한 뇌혈류를 유지할 수 있게 되어 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 초래되는 저산소-허혈 상태가 사전에 방지되었을 것으로 추측할 수 있다. 그러나 아직 이를 뒷받침할 만한 결과가 제대로 없어 확정하기는 힘들고 향후 더 깊이 있는 연구를 해 볼 필요가 있다.

이상의 결과들을 종합해 보면 출생 초기 에탄올 투여는 성장 후의 뇌혈류 자가조절 기능에 지속적인 손상을 초래하는데, 이에 대한 보상기전으로서 nociceptin의 발현이 증가하며, 여기에는 NO가 깊이 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Armstead, W. M. 1999. Nociceptin/orphanin FQ dilates pial arteries by K_{ATP} and K_{ca} channel activation. *Brain Res* **835**, 315-323.
2. Berger, R. and Garnier, Y. 2000. Perinatal brain injury. *J Perinat Med* **28**, 261-285.
3. Black, S. M., Bedolli, M. A., Martinez, S., Bristow, J. D., Ferriero, D. M. and Soifer, S. J. 1995. Expression of nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* **2**, 145-155.
4. Boado, R. J. and Pardridge, W. M. 1994. Differential expression of α-actin mRNA and immunoreactive protein in brain microvascular pericytes and smooth muscle cells. *J Neurosci Res* **39**, 430-435.
5. Bode, H. and Bubl, R. 1991. Brain circulation in residual cerebral damage. A Doppler ultrasound study. *Monatsschr Kinderheilkd* **139**, 144-510.
6. Cavazzuti, M. and Duffy, T. E. 1982. Regulation of local cerebral blood flow in normal and hypoxic newborn dogs. *Ann Neurol* **11**, 247-257.
7. Clarren, S. K., Alvord, E. C. Jr., Sumi, S. M., Streissguth, A. P. and Smith, D. W. 1978. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J Pediatr* **92**, 64-67.
8. Connor, M., Yeo, A. and Henderson, G. 1996. The effect of nociceptin on Ca^{2+} channel current and intracellular Ca^{2+} in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol* **118**, 205-207.
9. Dammann, O. and Leviton, A. 1997. The role of perinatal brain damage in developmental disabilities: An epidemiologic perspective. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **3**, 13-21.
10. Dobbing, J. and Sands, J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* **3**, 79-83.
11. Faber, E. S., Chambers, J. P., Evans, R. H. and Henderson, G. 1996. Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisected spinal cord preparation in vitro. *Br J Pharmacol* **119**, 189-190.
12. Ferriero, D. M., Holtzman, D. M., Black, S. M. and Sheldon, R. A. 1996. Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiol Dis* **3**, 64-71.
13. Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N., Miyata, T., Houtani, T. and Sugimoto, T. 1994. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* **343**, 42-46.
14. Fukuda, S., Kato, T., Kuwabara, S., Kato, I., Futamura, M. and Togari, H. 2005. The ratio of flow velocities in the middle cerebral and internal carotid arteries for the prediction of cerebral palsy in term neonates. *J Ultrasound Med* **24**,

149-153.
15. Gleason, C. A., Iida, H., Hotchkiss, K. J., Northington, F. J. and Traystman, R. J. 1997. Newborn cerebrovascular responses after first trimester moderate maternal ethanol exposure in sheep. *Pediatr Res* **42**, 39-45.
16. Goodlett, C. R. and West, J. R. 1992. Fetal Alcohol Effects: Rat model of alcohol exposure during the brain growth spurt, pp. 45-75. In: Zagon, I. S. and Slotkin, T. A. (eds.), *Maternal substance abuse and the developing nervous system*. Academic Press: San Diego, USA.
17. Goodlett, C. R., Marcussen, B. L. and West, J. R. 1990. A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcohol* **7**, 107-114.
18. Greisen, G. 1992. Effect of cerebral blood flow and cerebrovascular autoregulation on the distribution, type and extent of cerebral injury. *Brain Pathol* **2**, 223-228.
19. Grether, J. K., Cummins, S. K. and Nelson, K. B. 1992. The California cerebral palsy project. *Paediatr Perinat Epidemiol* **6**, 339-351.
20. Griffiths, M. J., Messent, M., MacAllister, R. J. and Evans, T. W. 1993. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* **110**, 963-968.
21. Gu, H., Hu, D., Hong, X. R., Li, W., Cui, Y., Hui, N. and Sha, J. Y. 2003. Changes of hypothalamus and peripheral orphanin in fetal rats with intrauterine ischemia and hypoxia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **38**, 683-684.
22. Guo, Y., Ward, M. E., Beasjours, S., Mori, M. and Hussain, S. N. 1997. Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged *in vivo* hypoxia. *J Neurosci Res* **49**, 89-97.
23. Henderson, G. and McKnight, A. T. 1997. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand - nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 293-300.
24. Higuchi, Y., Hattori, H., Hattori, R. and Furushom K. 1996. Increased neurons containing neuronal nitric oxide synthase in the brain of a hypoxic-ischemic neonatal rat model. *Brain Dev* **18**, 369-375.
25. Hou, M., Uddman, R., Tajti, J. and Edvinsson, L. 2003. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res* **964**, 179-186.
26. Hu, J. and Van Eldik, L. J. 1996. S100β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophysics Acta* **1313**, 239-245.
27. Huttenlocher, P. R., de Courten, C., Garey, L. J. and Van der Loos, H. 1982. Synaptogenesis in human visual cortex - evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci Lett* **33**, 247-252.
28. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., Price, M. T., Stefovska, V., Horster, F., Tenkova, T., Dikranian, K. and Olney, J. W. 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* **287**, 1056-1060.
29. Jones, K. L. and Smith, D. W. 1973. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* **2**, 999-1001.
30. Kimura, K. A., Parr, A. M. and Brien, J. F. 1996. Effect of chronic maternal ethanol administration on nitric oxide synthase activity in the hippocampus of the mature fetal guinea pig. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 948-953.
31. Kruse, J. 1984. Alcohol use during pregnancy. *Am Fam Physician* **29**, 199-203.
32. Lachowicz, J. E., Shen, Y., Monsma, F. J. Jr. and Sibley, D. R. 1995. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* **64**, 34-40.
33. Lassen, N. A. 1964. Autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res* **14/15(Suppl 1)**, 201-204.
34. Leech, R. W. and Alvord, E. C. Jr. 1977. Anoxic-ischemic encephalopathy in the human neonatal period. The significance of brain stem involvement. *Arch Neurol* **34**, 109-113.
35. Lou, H. C. 1988. The "lost autoregulation hypothesis" and brain lesions in the newborn - an update. *Brain Dev* **10**, 143-146.
36. Meunier, J. C. 1997. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* **340**, 1-15.
37. Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M. and Costentin, J. 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL_1 receptor. *Nature* **377**, 532-535.
38. Meyrick, B. and Reid, L. 1978. The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest* **38**, 188-200.
39. Miller, M. W. 1988. Effect of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I. Neuronal generation. *Alcohol Clin Exp Res* **12**, 440-444.
40. Mollereau, C., Simons, M. J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J. C. and Parmentier, M. 1996. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8666-8670.
41. Molliver, M. E., Kostovic, I. and van der Loos, H. 1973. The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus. *Brain Res* **50**, 403-407.
42. Morikawa, H., Fukuda, K., Mima, H., Shoda, T., Kato, S. and Mori, K. 1998. Nociceptin receptor-mediated Ca^{2+} channel inhibition and its desensitization in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol* **351**, 247-252.
43. Nehls, V. and Drenckhahn, D. 1993. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* **99**, 1-12.
44. Nelson, R. M., Calo, G., Guerrini, R., Hainsworth, A. H., Green, A. R. and Lambert, D. G. 2000. Nociceptin/orphanin FQ inhibits ischaemia-induced glutamate efflux from rat cerebrocortical slices. *Neuroreport* **11**, 3689-3692.
45. Nicol, B., Lambert, D. G., Rowbotham, D. J., Smart, D. and McKnight, A. T. 1996. Nociceptin induced inhibition of K^+ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol* **119**, 1081-1083.
46. Pantazis, N. J., West, J. R. and Dai, D. 1998. The nitric oxide-cyclic GMP pathway plays an essential role in both promoting cell survival of cerebellar granule cells in culture

and protecting the cells against ethanol neurotoxicity. *J Neurochem* **70**, 1826-1838.
47. Phillips, D. E., Cummings, J. D. and Wall, K. A. 2000. Prenatal alcohol exposure decreases the number of nitric oxide synthase positive neurons in rat superior colliculus and periaqueductal gray. *Alcohol* **22**, 75-84.
48. Rice. J. E. 3rd, Vannucci, R. C. and Brierley, J. B. 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* **9**, 131-141.
49. Richardson, B. S., Patrick, J. E., Bousquet, J., Homan, J. and Brien, J. F. Cerebral metabolism in fetal lamb after maternal infusion of ethanol. *Am J Physiol* **249**, R505-R509.
50. Roland, E. H. and Hill, A. 1997. How important is perinatal asphyxia in the causation of brain injury? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **3**, 22-27.
51. Silva, M. T., Rose, S., Hindmarsh, J. G., Aislaitner, G., Gorrod, J. W., Moore, P. K., Jenner, P. and Marsden, C. D. 1995. Increased striatal dopamine efflux *in vivo* following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitro indazole. *Br J Pharmacol* **114**, 257-258.
52. Taudorf, K. and Vorstrup, S. 1989. Cerebral blood flow abnormalities in cerebral palsied children with a normal CT scan. *Neuropediatrics* **20**, 33-40.
53. Volpe, J. J., Herscovitch, P., Perlman, J. M., Kreusser, K. L. and Raichle, M. E. 1985. Positron emission tomography in the asphyxiated term newborn: parasagittal impairment of cerebral blood flow. *Ann Neurol* **17**, 287-296.
54. Wadhwa, P. D., Sandman, C. A. and Garite, T. J. 2001. The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Prog Brain Res* **133**, 131-142.
55. West, J. R., Chen, W. J. and Pantazis, N. J. 1994. Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab Brain Dis* **9**, 291-322.
56. West, J. R., Hamre, K. M. and Cassell, M. D. 1986. Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcohol Clin Exp Res* **10**, 190-197.
57. Yamada, K., Tsuzura, S. and Matsuda, H. 1995. Brain MRI and single photon emission computed tomography in severe athetotic cerebral palsy: a comparative study with mental and motor disorders. *No To Hattatsu* **27**, 269-275.
58. Yamamoto, S., Nishizawa, S., Tsukada, H., Kakiuchi, T., Yokoyama, T., Ryu, H. and Uemura, K. 1998. Cerebral blood flow autoregulation following subarachnoid hemorrhage in rats: chronic vasospasm shifts the upper and lower limits of the autoregulatory range toward higher blood pressures. *Brain Res* **782**, 194-201.
59. Yu, T. P. and Xie, C. W. 1998. Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* **80**, 1277-1284.
60. Zou, J. Y., Martinez, D. B., Neafsey, E. J. and Collins, M. A. 1996. Binge ethanol-induced brain damage in rats: effect of inhibitors of nitric oxide synthase. *Alcohol Clin Exp Res* **20,** 1406-1411.

초록 : 출생 초기 에탄올 투여 흰쥐의 뇌혈류 조절 변동에 대한 Nociceptin의 관여

조동환 · 이원석*
(부산대학교 의학전문대학원 약리학교실)

본 연구는 Sprague-Dawley계 숫쥐에서 출생 초기 에탄올에의 노출에 의한 성장 후 뇌혈류 자가조절의 변동을 관찰하고 이러한 변동에 대한 nociceptin의 관여를 관찰하고자 하였다. 실험동물에게 에탄올 2.5 g/kg을 생후 6, 7 및 8일의 3일 동안 2시간 간격으로 1일 2회 피하 주사하였다. 주령 4, 8 및 12주 시기에 단계적 출혈에 의한 저혈압 및 혈액 재주입에 의한 혈압 상승시의 평균동맥혈압의 변동에 따른 국소 뇌혈류 변동을 laser-Doppler flowmetry 방법으로 측정하였고, 경막과 대뇌피질에서 nociceptin-유사 면역반응력의 발현을 면역조직화학법으로 측정하였다. 출생 초기 에탄올 투여는 4, 8 및 12주령 모두에서 국소 뇌혈류 자가조절 기능을 거의 소실시켰다. 에탄올 투여 전에 nociceptin을 전처치한 군에서는 모든 연령군에서 국소 뇌혈류 자가조절 기능이 보존되었으나, nociceptin 수용체 선택적 경쟁적 길항제인 [Nphe^1]nociceptin(1-13)NH_2를 전처치한 군에서는 보존되지 아니하였다. 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 경막 내 nociceptin-유사 면역반응력이 모든 연령군에서 현저히 증가하였고, 7-nitroindazole (7-NINA) 전처치뿐만 아니라 aminoguanidine 전처치에 의하여 모든 주령에서 유의하게 억제되었다. 출생 초기 에탄올 투여에 의하여 대뇌피질 내 nociceptin-유사 면역반응력이 모든 연령군에서 현저히 증가하였고, 7-NINA 전처치와 aminoguanidine 전처치에 의하여 모든 주령에서 유의하게 억제되었다. 모든 실험군의 동맥혈가스분석 결과는 실험 전, 중 및 후에 유의한 차이를 보이지 아니하였다. 이상의 결과로 보아 출생 초기 에탄올 투여는 성장 후 뇌혈류 자가조절에 변동을 초래하고, 이에 대한 보상기전으로서 nociceptin의 발현이 증가하는데, 여기에는 nitric oxide가 깊이 관여하는 것으로 생각된다.