

Alterations in Cerebrovascular Reactivity by Trigeminovascular System Injury in Rats

Sang June Park¹, Chang Hwa Choi¹ and Won Suk Lee^{2†}

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

²Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea

Trigeminovascular system plays an important role for the cerebral hemodynamics. The aim of this study was to investigate the alterations in cerebrovascular reactivity by trigeminovascular system injury in rats. Trigeminovascular system of male Sprague-Dawley rats was injured by either denervation of nasocilliary nerve or neonatal capsaicin treatment. Trigeminovascular system was stimulated by controlled hemorrhagic hypotension or somatosensory (whisker) stimulation. Changes in regional cerebral blood flow (rCBF) and pial arterial diameter were continuously measured by laser-Doppler flowmetry and videomicroscopy, respectively. Nitric oxide synthase (NOS) activity in cerebral cortex was determined by measuring the conversion of L-³H-arginine to L-³H-citrulline. Cyclic GMP levels in cerebral cortex and pial artery were determined using the cyclic GMP ¹²⁵I scintillation proximity assay system. rCBF autoregulation was impaired or almost abolished by trigeminovascular system injury. rCBF response to whisker stimulation was significantly attenuated by trigeminovascular system injury. NOS activity as well as cyclic GMP level in cerebral cortex and pial artery were significantly reduced in the group of trigeminovascular system injury. These results suggest that trigeminovascular system injury causes prominent alterations in cerebrovascular reactivity, and that NO, which is generated by neuronal NOS in the trigeminovascular system, is implicated in the regulation of rCBF.

Key Words: Trigeminovascular system, Regional cerebral blood flow, Nitric oxide synthase activity, Cyclic GMP, Rat

서 론

정상적인 뇌혈류 조절 기능을 유지하기 위해서는 뇌혈관의 내피세포가 견제해야 하는 바 (Gotoh et al., 1987; Harder, 1987; Katusic et al., 1987) 오늘날 많은 관심의 대상이 되고 있는 산화질소 (nitric oxide, NO)도 여러 혈관 활성 물질들 (prostacylin, endothelium-derived relaxing factor, endothelium-derived hyperpolarizing factor, endothelium-derived contracting factor 등)과 함께 혈관 내피세포에서 생성 유리되어 혈관 운동성과 혈류 조절에 매우 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이다.

NO는 혈관 내피세포 뿐만 아니라, 신경세포, 신경교, 대식세포, 그리고 기타 세포 조직들에서도 생성되어 국소 혈류 조절에 있어서 아주 중요한 신호 전달 조정 물질로 관여하는

데 (Dawson et al., 1992), 신경세포 또는 신경교에서 생성된 것이든 혈관 (혈관 주위 신경 또는 내피세포)에서 생성된 것이든 뇌순환 조절에 있어서 결정적으로 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 그러나 그 관련 정도나 정확한 기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 적다. 특히 뇌혈류와 NO의 상관관계에 있어서 NO의 합성, 유리 및 대사 과정이 현재로서는 극히 제한적으로만 밝혀져 있다.

삼차신경혈관계 (trigeminovascular system)의 신경섬유가 흥분되면 capsaicin-민감성 지각신경인 혈관 주위의 구심성 민말이집감각신경섬유 (afferent unmyelinated sensory nerve fiber)에서 많은 신경펩티드 (substance P, calcitonin gene-related peptide 및 neurokinin A 등)가 유리되는데, 특히 substance P는 혈관 내피세포에 직접적인 영향을 미침으로써 혈관 투과성을 증가시킬 뿐만 아니라 (Lembeck et al., 1979; Ghabriel et al., 1999) 혈관 확장 작용을 매개한다고 알려져 있다 (Onoue et al., 1994; Petersson et al., 1995; Tsutsui et al., 2000). 그러나 뇌혈류 조절 기전에 있어서 삼차신경혈관계의 역할에 관하여는 아직 자세히 밝혀지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 뇌혈류 조절이 어떠한 기전에 의하여 유지되는지를 밝히고자 하는 일련의 실험의 일부로서 삼

*는 문 접 수: 2005년 5월 3일

수정재접수: 2005년 5월 19일

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

Tel: 051-240-7729, Fax: 051-244-1036

e-mail: wonslee@pusan.ac.kr

Table 1. Physiological variables in each experimental group

Group		pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
Control (n=13)	Before	7.410±0.016	106.1±11.5	37.6±2.7
	During	7.408±0.020	113.2±14.7	38.0±3.2
	After	7.407±0.021	112.8±14.6	38.0±2.9
NCNX (n=13)	Before	7.408±0.012	108.2±12.4	37.9±2.4
	During	7.398±0.014	112.6±13.3	38.0±2.8
	After	7.401±0.015	110.7±12.7	38.1±3.0
Neonatal capsaicin (n=12)	Before	7.405±0.020	107.7±13.6	38.5±2.9
	During	7.401±0.018	111.0±12.2	39.1±3.1
	After	7.399±0.023	110.6±14.1	39.4±3.3

Values are means ± SEM. There were no significant differences among the variables before, during and after experiments in three groups. n, number of animals; NCNX, nasociliary nerve denervation

차신경혈관계의 흥분에 의하여 야기되는 뇌혈관 확장 (Goadsby, 1993; May and Goadsby, 1999) 및 뇌혈류 증가 (Sakas et al., 1989; Goadsby et al., 1997)는 뇌연막동맥에서 생성 유리되는 NO 뿐만 아니라 뇌실질 및 신경세포에 존재하는 산화질소합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)의 활성화에 의하여 생성되는 NO도 함께 중요한 매개 작용을 할 것이라는 가설을 설정하였다. 이를 구명하기 위하여 삼차신경혈관계에 손상을 일으킨 실험동물 모델에서 뇌연막동맥의 자율 운동성 변동과 국소 뇌혈류 조절의 변동을 관찰하고, 이를 뒷받침할 수 있는 생화학적 증거로서 뇌 및 뇌연막동맥 내의 NOS 활성도와 cyclic GMP 양을 측정함으로써 삼차신경혈관계의 활성화와 뇌혈류 조절에 있어서의 NO의 관련성 및 그 역할을 증명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250~300 g의 Sprague-Dawley계 숫쥐를 사육장 (실내 온도 20~25℃) 내에서 물과 사료를 제한없이 섭취하게 하면서 사육하였다. 실험에 사용된 실험동물의 수는 대조군 27마리와 삼차신경혈관계 손상군 49마리 (코섬모체신경 절단군 25마리 및 신생기 capsaicin 처리군 24마리)로서 총 76마리이었다.

2. 일반 수술 조작

실험동물을 urethane (1 g/kg)으로 복강내 주사하여 마취시키고, 체온을 37℃로 유지시키기 위하여 소동물용 자동 보온 전기방석 (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 (683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA.)를

사용하여 체중을 기준으로 분당 50~60회의 호흡을 유지시켰다. 양측 대퇴동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽입하고 이를 통하여 혈액 가스 및 pH를 측정하여 (STAT Profile 3, Nova Biochemicals, Boston, MA, USA) 전 실험 기간 동안 PaCO₂의 변화가 3~4 mmHg 이내에서 이루어지도록 호흡을 조절하여 유지시켰다 (Table 1).

3. 혈압 변동 측정

진신 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 자료 자동 저장 분석 시스템 (data acquisition system)에 기록하였다.

4. 폐쇄 두개창 설치

일반적인 수술 조작이 끝난 후 실험동물의 체위를 복와위로 변경시키고 두부를 정위기구 (stereotaxic apparatus, 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 정중선을 따라 두피를 절개한 후 두개골의 관상 봉합의 미측에 위치한 두정골에 saline-cooled drill (395, Dremel, Racine, WI, USA)을 사용하여 개두술 (5×5 mm)을 행하고, 뇌경막과 지주막을 절개하여 뇌연막 표면을 노출시켰다. 그 후 Morii 등 (1986)의 방법에 따라 개두술 주변의 두정골에 dental acrylic mount를 만들고, 그 속에 관류 (superfusion)용 polyethylene 관 2개를 심었다. Dental acrylic dam 위에 직경 12 mm의 cover glass를 놓고 cyanoacrylate를 사용하여 즉시 밀봉시켰다. 그 후 미리 37℃로 가온한 인공 뇌척수액 (mock cerebrospinal fluid)을 Slow Infusion Pump (50-4001, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 사용하여 관류시키면서 두개 내압을 5~8 mmHg로 유지시켰다. 사용한 인공 뇌척

수액의 조성은 다음과 같다: Na⁺ 156.5 mEq/L, K⁺ 2.95 mEq/L, Ca²⁺ 2.5 mEq/L, Mg²⁺ 1.33 mEq/L, Cl⁻ 138.7 mEq/L, HCO₃⁻ 24.6 mEq/L, dextrose 66.5 mg/dL, urea 40.2 mg/dL (pH 7.4).

5. 개방 두개창 설치

폐쇄 두개창 설치시와 동일한 과정으로 개두술을 행하고 뇌경막과 지주막은 온전하게 보존시킨 채 미리 37°C로 가온한 인공 뇌척수액을 관류시켰다.

6. 국소 뇌혈류량 변동 측정

실험동물의 두부를 정위기구에 고정시키고, 개방 두개창을 통하여 laser-Doppler flowmeter (BLF21, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) 용 needle probe (type NS, Transonic Systems Inc.)를 대뇌 피질 표면에 수직이 되도록 정위 미세조작장치 (stereotactic micromanipulator)를 사용하여 뇌연막동맥에 조심스럽게 접근시켰다. 일정 시간 동안 안정시킨 후 실험 protocol에 따라 국소 뇌혈류량을 측정하였다. Laser-Doppler flowmeter에 의하여 측정된 국소 뇌혈류량의 변동은 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 자료 자동 저장 분석 시스템에 기록하였다.

7. 뇌혈관 반응 (직경 변화) 관찰

뇌연막동맥 (안정시의 직경 약 35~45 μm)의 직경 변화를 폐쇄 두개창을 통한 video microscopy 방법과 width analyzer (C3161, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)를 사용하여 실험 protocol 동안 계속 측정하면서 TV monitor에 나타나는 혈관 영상을 video cassette recorder (S-VHS, Mitsubishi, Japan)에 녹화 보존하였다.

8. 코섬모체신경 절단

실험동물을 thiopental sodium (40 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 Suzuki 등 (1990)의 방법에 따라 내측 안와벽 상부의 두피를 곡선으로 절개하고 안구를 외측으로 견인시켜 별집뼈구멍 (ethmoidal foramen)을 노출시킨 다음, 사골공 내에 존재하는 코섬모체신경 (nasociliary nerve)을 전기소작 및 절단시켜 제거시켰다. 수술 후 penicillin G (10,000 unit/kg, i.m.)를 투여하고 사육장으로 되돌려 보내어 최소한 2주 동안 수술로부터 회복시켰다가 실험에 사용하였다.

9. 신생기 백서의 capsaicin 처치

일차구심성 신경섬유를 전반적으로 손상시키기 위하여 Jancso 등 (1977)의 방법에 따라 출생 48시간 이내의 신생 백서에게 capsaicin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 mg/kg을 피하주사하여 무수감각신경섬유를 파괴하고 약 2개월 후 실험에 사용하였다. 실험을 시작하기 전에 소량의 capsaicin (1

μM)을 각막에 국소 투여하여 붉은으로써 이 자극에 대한 반응의 소실 유무를 확인하고 동공 변화가 있을 때 그 백서는 실험에서 제외시켰다.

10. 출혈 및 재주입

대퇴동맥에 삽입된 cannula를 통하여 2분 간격으로 1 ml 씩 20초에 걸쳐 주사기내에 채혈하였다가 2분 경과 후 1 ml 씩 20초에 걸쳐 2분 간격으로 재주입하였다.

11. 몸감각 자극 (somatosensory stimulation)

모든 수술 조작을 마치고 실험동물의 두부를 정위기구에 고정시킨 후 혈압이 안정되고 각막 반사와 tail pinch 반응이 소실되었음을 확인하였다. 그 후 Cox 등 (1993)의 방법을 응용하여 두개창이 설치된 반대측 안면의 수염 (whiskers)을 camel hair brush로 자극하면서 국소 뇌혈류량의 변동을 관찰하였다. 자극은 1분 동안 4 Hz로 하면서 3분 간격으로 3회 반복하였다.

12. 대뇌 피질내 NOS 활성도 측정

대뇌 피질내의 NOS 활성도는 Brecht와 Snyder (1989)의 방법에 따라 ³H-arginine이 ³H-citrulline으로 전환되는 양을 측정하였다. 두개창 직하의 대뇌 피질 (약 100 mg tissue wet weight)을 적출 직후 액체질소에 담구어 급냉시켜 보관하였다가 homogenizing buffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) 0.5 ml에 균질화시켜 냉장 원심분리기에서 1,000 ×g로 30분간 원침시킨 후 상청액을 구하였다. 이 상청액 25 μl와 reaction buffer (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NADPH 1 mM, Ca²⁺ 1 mM, pH 7.4) 0.1 ml 및 희석 ³H-arginine (Amersham, UK) 25 μl를 0.5 ml Eppendorf tube 내에 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 미리 차게 한 stop solution (HEPES 20 mM EDTA 2 mM, pH 5.5) 2 ml을 가하여 반응을 중지시켰다. 이것을 Na⁺형으로 미리 전환시킨 AG50W-X8 resin (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) column으로 통과시켜 얻게 되는 용출액을 scintillation vial에 수집하고 여기에 liquid scintillation cocktail (Opti-Fluor, Packard Instrument Company, Inc., Meriden, CT, USA) 15 ml을 가하여 혼합시킨 후 liquid scintillation spectrophotometer (Tri-Carb 2100TR, Packard Instrument Company)에서 방사능을 측정하였다. 각 시료의 단백질 농도는 Bradford (1976)의 방법에 의거하여 측정하였다 (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories Inc.).

13. 뇌연막동맥내 cyclic GMP 생성량 측정

실험동물로부터 적출한 뇌를 즉시 급냉시키고 얼음판 위에서 뇌연막동맥을 적출한 후 Edwards 등 (1991)의 방법을 약간 변형시켜 뇌연막동맥내 cyclic GMP 생성량을 측정하였

Table 2. Changes in slopes of linear regression-lines during controlled stepwise hemorrhagic hypotension and reversal of blood pressure

Group	Hypotension	P Value	Reversal of blood pressure	P Value
Control (n=7)	-1.166±0.232	-	-0.836±0.210	-
NCNX (n=6)	-0.175±0.183	0.008	-0.353±0.154	0.099
Neonatalcapsaicin (n=6)	-0.022±0.052	0.001	-0.217±0.128	0.035

Changes in pial arterial diameter were plotted as a function of changes in mean arterial blood pressure observed during hypotension and reversal of blood pressure. The slopes were calculated from the linear regression lines. Baseline diameters were measured 10 to 20 minutes before the procedure for hypotension

다. 적출 뇌연막동맥을 얼음판 위에 놓여 있는 0.5 ml Eppendorf tube 내에 넣고 25 μ l의 저장성 용액 (hypotonic medium: Tris 8.0 mM, MgCl₂ 1.0 mM, EDTA 0.25 mM 및 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4)에서 1~2분 동안 처치하고 액체질소에서 냉동 및 해동 과정을 2회 반복 처리하였다. 적출 뇌연막동맥을 항온 완충액 (incubation buffer; Tris 100 mM, MgCl₂ 4.0 mM, EDTA 0.25 mM, 3-isobutyl-1-methylxanthine 1.0 mM, ATP 0.3 mM, GTP 0.1 mM, phosphocreatine 20 mM 및 creatine kinase 200 unit/ml 함유, pH 7.4) 25 μ l에 넣고 30°C에서 30분간 항온처리시킨 다음 0.2 N HCl 50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 즉시 급냉시켰다. 0.2 N NaOH 50 μ l와 assay buffer (0.01% sodium azide를 함유한 50 mM acetate buffer, pH 5.8) 1 ml를 가하고 cyclic GMP ¹²⁵I scintillation proximity assay system (RPA 540, Amersham, UK)을 사용하여 cyclic GMP 양을 측정하였다. 측정이 끝난 뇌연막동맥을 종축으로 개방하여 실체현미경 (SV6, Carl Zeiss, Germany)에 연결된 비디오 칼라 프린터 (CVP-G7, Sony, Japan)로 사진을 찍고, 각 혈관 표본의 면적을 면적계 (Type KP-21, Koizumi, Japan)로 측정하여 단위 면적당의 cyclic GMP 양 (fmol/cm²)을 계산하였다.

14. 통계 처리

모든 측정치는 평균±평균의 표준오차로 표시하였다. 뇌혈류 반응의 결과는 회귀직선 분석법으로 분석하였고, 나머지 결과들은 분산분석법으로 분석하였다. 각 군 사이의 유의성 검정을 위하여 Dunnett의 다중 비교법을 사용하여 P 값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 평균 동맥압 변화에 대한 뇌혈관 직경 변화

출혈 및 주입에 의한 평균 동맥압의 변화에 대한 뇌연막동맥의 직경 변화를 관찰한 결과 평균 동맥압의 감소에 따른 뇌혈관 확장 반응은 Fig. 1과 Table 2에서 보는 바와 같이 출혈성 저혈압시의 직경 변화의 기울기가 대조군에서는 -1.166±0.232이던 것이 코섬모체신경 절제군에서는 -0.175±0.183, 그리고 신생기 capsaicin 처치군에서는 -0.022±0.052로 변동

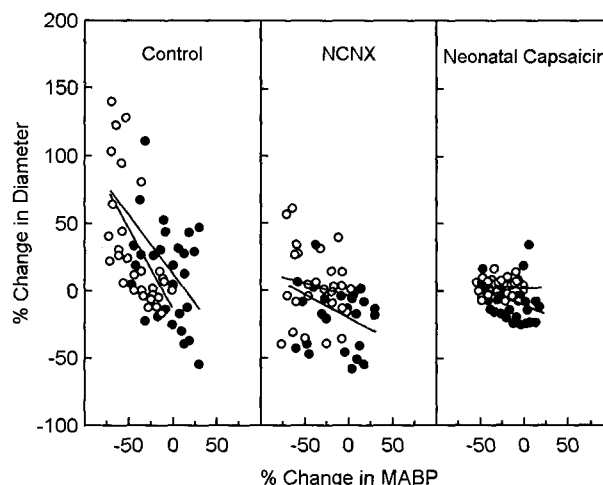


Fig. 1. Scattered plot showing pial arterial responses to changes in mean arterial blood pressure (MABP). Changes in pial arterial diameter were plotted as a function of changes in MABP. Significant differences were shown among MABP-diameter relations of control, NCNX and neonatal capsaicin treatment groups. Open circles, controlled stepwise hemorrhagic hypotension; closed circles, stepwise reversal of blood pressure.

되었다. 혈액 재주입에 의한 평균 동맥압의 증가에 따른 뇌혈관 직경 변화는 대조군의 경우 기울기가 -0.836±0.210이던 것이 코섬모체신경 절제군에서는 -0.353±0.154로, 그리고 신생기 capsaicin 처치군에서는 -0.217±0.128로 변동되었다.

2. 평균 동맥압 변화에 대한 국소 뇌혈류량의 변화

출혈 및 재주입에 의한 평균 동맥압의 변화에 대한 국소 뇌혈류량의 변화를 laser-Doppler flowmetry로 관찰한 결과 뇌혈류 자가조절 기능의 하한점이 대조군의 경우에는 안정시 평균 동맥압의 -24.62±2.12%이던 것이 코섬모체신경 절제군에서는 -5.74±1.12% (P<0.0001) 그리고 신생기 capsaicin 처치군에서는 -3.35±1.03% (P<0.0001)로 현저히 상향 이동되었다 (Fig. 2).

3. 몸감각 자극에 대한 뇌연막동맥의 반응

삼차신경혈관계를 흥분시키는 몸감각 자극에 대한 국소

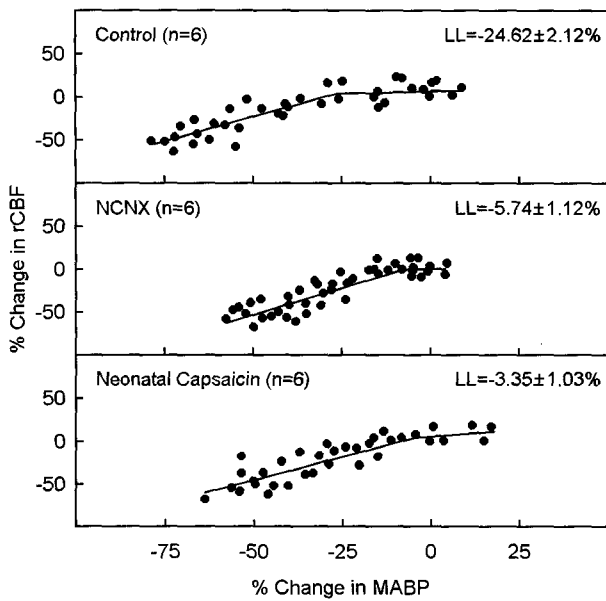


Fig. 2. Alterations in cerebral autoregulation by trigeminovascular injury. Significant differences in lower limit (LL) of cerebral autoregulation were identified in NCNX ($P < 0.0001$) and neonatal capsaicin treatment groups ($P < 0.0001$) compared with control group. rCBF, regional cerebral blood flow.

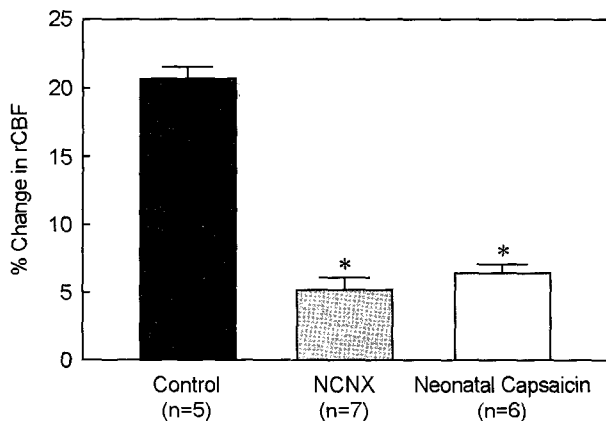


Fig. 3. rCBF response to whisker stimulation. rCBF response to whisker stimulation was significantly attenuated by trigeminovascular system injury. $*P < 0.0001$ compared with control group.

뇌혈류량의 변화를 관찰하였다. 대조군에서는 몸감각 자극에 반응하여 국소 뇌혈류량이 $20.68 \pm 0.95\%$ 증가하였으나, 비모양체 신경 절제군 ($5.13 \pm 0.95\%$ 증가, $P < 0.0001$)과 신생기 capsaicin 처치군 ($6.44 \pm 0.61\%$ 증가, $P < 0.0001$)에서는 몸감각 자극에 대한 국소 뇌혈류량 증가가 현저히 감소하였다 (Fig. 3).

4. 대뇌 피질내 NOS 활성도의 변동

출혈성 저혈압 (안정시 평균 동맥압의 50%)을 10분간 유

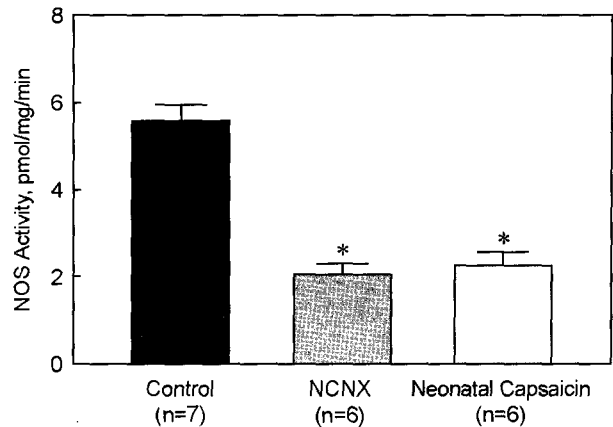


Fig. 4. Effect of trigeminovascular injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in rat cerebral cortex. Animals were subjected to hemorrhagic hypotension (50% of resting MABP) for 10 minutes, and thereafter cerebral cortices were dissected. The NOS activity in cerebral cortex was significantly reduced in the group of trigeminovascular system injury. $*P < 0.001$ when compared with control group.

Table 3. Cyclic GMP levels in cerebral cortex and pial artery of rats

Group	Cerebral cortex		Pial artery	
	Cyclic GMP (fmol/mg)	P Value	Cyclic GMP (fmol/cm ²)	P Value
Control	229.14 ± 25.90 (n=5)	-	29.94 ± 2.99 (n=7)	-
NCNX	59.71 ± 10.97 (n=5)	<0.001	20.20 ± 2.15 (n=6)	0.027
Neonatal capsaicin	64.03 ± 12.95 (n=5)	<0.001	18.08 ± 2.26 (n=6)	0.011

Cyclic GMP levels in cerebral cortex and pial artery were markedly reduced by trigeminovascular injury

지시킨 후 실험동물을 단두 치사시키고 적출해 낸 대뇌 피질내의 NOS 활성도를 측정하였다. 코섬모체신경 절제군과 신생기 capsaicin 처치군의 대뇌 피질내 NOS 활성도는 모두 대조군에 비하여 유의하게 ($P < 0.001$) 감소되었다 (Fig. 4).

5. 대뇌 피질 및 뇌연막동맥내 cyclic GMP 생성량의 변동

대뇌 피질내 cyclic GMP 생성량은 코섬모체신경 절제군 및 신생기 capsaicin 처치군 모두에서 대조군에 비하여 유의하게 ($P < 0.001$) 감소되었다 (Table 3). 뿐만 아니라 뇌연막동맥내 cyclic GMP 생성량도 코섬모체신경 절제군 및 신생기 capsaicin 처치군에서 대조군에 비하여 유의하게 ($P < 0.05$) 감소되었다 (Table 3).

고 찰

본 연구에서 코섬모체신경을 절제하거나 출생 직후에 capsaicin을 처치함으로써 삼차신경혈관계에 손상을 야기하였을 때 뇌혈류 자가조절 기능이 변동 또는 거의 소실되고, 대뇌 피질의 NOS 활성도가 감소되며, 뇌연막동맥내 cyclic GMP 양이 감소됨을 관찰하였다. 이러한 결과들은 정상적인 뇌혈관 운동성과 뇌혈류 자가조절 기전 유지에 삼차신경혈관계가 중요하게 관여하며, 여기에 존재하는 NO-cyclic GMP 경로가 뇌혈관 확장 반응을 매개함을 시사한다.

뇌혈액순환은 중추 신경계에 대한 외인성 및 내인성 경로에 의하여 영향을 받는다고 알려져 있다. 외인성 경로는 자율신경절에서 기시하여 혈관 주위에 신경총을 형성하면서 직경 50~100 μm 에 달하는 뇌동맥 및 정맥들에 분포하는 반면, 내인성 경로는 중추신경계에 위치한 신경세포들로부터 기시하며 이들의 활성에 따라 뇌혈류가 조절된다 (Bleys and Cowen, 2001).

본 연구에서 신생기 capsaicin 처치 또는 코섬모체신경 절제에 의한 삼차신경혈관계 손상시 뇌혈류 자가조절 기능이 변동되거나 또는 거의 소실되었다는 결과는 뇌혈류 조절 기전에 있어서 삼차신경혈관계가 깊이 관여한다는 것을 보여주고 있다.

Capsaicin은 말초신경 말단에서 신경펩티드의 유리를 증가시키지만 (Holzer, 1991; Stretton et al., 1992), 출생 48시간 이내의 신생기에 투여하면 말초의 일차 민말이집감각신경섬유의 약 90%에서 영구적이면서도 선택적으로 변성이 일어난다 (Nagy et al., 1981; Hammond and Ruda, 1989), 성장 후 신경세포내 신경펩티드의 양이 현저히 고갈된다고 알려져 있다 (Gamse et al., 1980; Hammond and Ruda, 1989). 본 연구에서 신생기에 capsaicin을 처치한 실험동물에서 출혈성 저혈압에 대한 자가조절성 뇌혈관 확장 반응이 거의 소실된 결과는 신생기 capsaicin 처치에 의하여 급성 저혈압시의 뇌연막동맥의 이완 반응에 필요로 하는 신경펩티드가 거의 고갈되었기 때문이며, 뇌혈류 자가조절 기전에 있어서 삼차신경혈관계의 신경펩티드가 깊이 관여하는 것으로 생각된다.

뿐만 아니라 코섬모체신경을 절제한 실험동물에서도 출혈성 저혈압에 대한 자가조절성 뇌혈관 확장 반응이 대조군에 비하여 유의하게 둔화되고 뇌혈류 자가조절 기능의 하한점이 상향 이동되었다. 이러한 결과는 코섬모체신경을 통한 삼차신경성 뇌혈류 조절 기전이 정상적인 뇌혈류 조절 기능에 깊이 관여하는 것을 시사한다. 그러나 코섬모체신경이 절제되었다고 해서 뇌혈류 자가조절 기능이 완전히 소실되지는 않았다. 이는 Suzuki 등 (1989)이 코섬모체신경 절단 후 Willis 환과 그 분지의 전반부에서 신경펩티드성 신경섬유들이 소

실되었고, Willis 환의 후반부와 뇌저동맥의 전방 2/3 부분에서는 신경펩티드성 신경섬유들의 수가 감소되기는 하였지만 어느 정도 존재하였고, 내경동맥, 뇌저동맥의 미측 1/3 부분 그리고 추골동맥에서는 영향을 받지 아니하였다고 한 보고로써 설명이 가능하다.

뇌혈액순환의 신경성 조절에 있어서 NO의 관련성에 관한 여러 증거들이 근래에 보고되었다. 적출 뇌동맥을 전기자극하였을 때 야기되는 혈관 확장은 NOS 억제제나 혈색소, 즉 세포의 NO를 포획하는 헴단백질 (hemoprotein)에 의하여 약화되고 내피세포를 제거하더라도 지속되었으며 tetrodotoxin에 의해서야 소실되었다는 보고 (Toda and Okamura, 1990; Gonzales and Estrada, 1991; Lee and Sarwinsky, 1991)에 의하면 뇌혈관 주위의 신경섬유가 NO의 공급원이 된다고 추론할 수 있다. 이러한 가설은 Toda and Okamura (1991)가 적출 뇌혈관에서 내피세포를 제거하고 전기자극하였을 때 이들 혈관내 cyclic GMP 양이 증가되었고, 반면 tetrodotoxin이나 NOS 억제제들에 의하여 감소되었다고 보고한 연구로써 뒷받침되고 있다.

뇌혈관 주위에 분포하는 신경섬유는 뇌동맥의 외층과 중층의 경계 부위에 위치해 있으면서 신경세포성 NOS를 가지고 있고 (Bredt et al., 1990), 주로 나비입천장신경절 (sphenopalatine ganglion)에서 기시하여 (Iadecola et al., 1993; Nozaki et al., 1993) 사골공을 통과하는 안신경분지의 코섬모체신경이며, 일부는 귀신경절 (otic ganglion) 및 속목소신경절 (internal carotid miniganglion)에서 기시한다고 알려져 있다 (Suzuki et al., 1989, 1993). Morita-Tsuzuki 등 (1993)의 보고에 의하면 접형구개신경절을 전기자극하였을 때 신피질 (neocortex) 부위의 뇌혈류가 증가하였고, NOS 억제에 의하여 감소되었으며, 후자의 효과는 L-arginine 투여에 의하여 일부 반전되었다고 한다. 이러한 사실들은 NOS를 함유하고 있는 혈관 주위 신경섬유가 흥분하면 NO가 유리되고 이 NO는 혈관 평활근에 작용하여 cyclic GMP 양을 증가시키게 되어 혈관 확장이 일어난다는 것을 강력히 시사해 준다.

뇌혈액순환에 있어서 NO가 유일한 혈관 확장 매개 물질은 아니겠지만 일부 기능적 활성이나 신경성 뇌혈관 확장과 같은 반응에 있어서는 직접 혈관 평활근에 작용하여 혈관 이완을 일으키며 (Toda and Okamura, 1996), 고탄산혈증 (hypercapnia)시에는 직접적으로 혈관 이완을 일으키지는 않지만 완전한 혈관 확장이 일어나도록 하기 위하여는 NO의 존재를 필요로 하므로 (Okamoto et al., 1997) NO는 뇌혈관 조절에 있어서 혈관 반응에 따라 각기 다른 역할을 담당하리라고 보고 있다. 한 가지 해결되어야 할 근본적인 과제로서 NOS 억제제들에 의하여 혈관 확장 반응이 감소되는 것이 혈관 확장을 초래하는 과정에 NO가 관여한다는 것을 반영하는 것인지 혹은 이들 약물에 의한 혈관 수축의 비특이적인 결과

인지는 불확실하다.

혈관 내피세포가 NO의 주요 공급원으로 강력히 인정되고 있다 (Palmer et al., 1988; Luscher, 1991). 적출 뇌동맥 표본 실험에서 NOS 억제제들은 혈관 직경을 감소시키고 cyclic GMP 양을 감소시킨다 (Kikkawa et al., 1999; Schuh-Hofer et al., 2001). 그러나 혈관 평활근 내에는 기본구성성 (constitutive) NOS가 없다 (Moncada, 1992)는 것을 감안하면 직경이 큰 혈관들의 안정시 혈관 확장에는 내피세포에서 유래한 NO는 관여하지 않는다고 볼 수 있다. 이는 laser-dye 기법으로 내피세포를 손상시켜도 이들 혈관의 안정시의 직경이 감소되지 않고, 직경이 큰 동맥과 직경이 작은 뇌연막 혈관에 있어서의 내피세포에서 유래한 NO의 역할은 다를 것이라는 Faraci (1991)의 가설로써 뒷받침된다. 따라서 내피세포가 손상된 후에는 다른 공급원으로부터 나온 NO가 내피세포성 NO의 소실에 대하여 보상작용을 해 줌으로써 안정시의 혈관 긴장도는 증가하지 않게 된다고 볼 수 있다.

혈관 주위 신경섬유에서 유리되는 신경펩티드 중 substance P 및 calcitonin gene-related peptide가 중요하게 관여함은 잘 알려져 있다 (Edvinsson, 1985; Hong 등, 1994). Petersson 등 (1995)의 보고에 의하면 substance P는 내피세포-의존성 NO의 생성을 증가시키고 혈관 평활근에 과분극을 일으킴으로써 사람의 뇌혈관을 이완시킨다고 한다.

본 연구에서 뇌연막동맥의 확장을 야기시키는 생리적 자극으로서 몸감각 자극에 대한 뇌혈관 반응을 관찰하였다. 즉, 삼차신경이 분포하는 안면의 수염을 기계적으로 자극시키면서 이때 나타나는 국소 뇌혈류량의 변동을 관찰하였다. 정상적인 신경 활성도를 가지고 있는 개체에서는 몸감각 자극에 반응하여 뇌연막동맥의 직경이 증가하고 국소 뇌혈류량도 증가한다 (Cox et al., 1993; Ngai et al., 1995). 본 연구 결과에서 본 바와 같이 코섬모체신경을 절단 제거하거나 신생기 때 capsaicin을 처치함으로써 삼차신경혈관계를 손상시킨 군에서 모두 몸감각 자극에 대한 뇌혈류 증가 반응이 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 몸감각 자극에 의한 뇌혈관 반응은 정상적으로 삼차신경혈관계를 경유하여 최종적으로 뇌혈관에서 반응을 나타내게 되는데 이때 혈관 주위 신경섬유에서의 신경펩티드 유리와 신경세포성 NOS의 활성화에 의하여 생성된 NO가 깊이 관여하는 것으로 생각된다. 이러한 가설은 최근에 Bonvento 등 (2000)이 신경세포성 NOS 억제제인 7-nitroindazole을 전처치하고 수염을 자극하였을 때 뇌혈류 반응의 증가가 지속적으로 감소되었음을 관찰하고 신경활동 증가에 의한 뇌혈류 증가 반응에는 신경세포성 NOS가 필수적인 역할을 한다고 한 보고와 일치한다.

뇌혈류와 뇌대사간의 연계성을 설명해 주는 기전은 아직 명백히 밝혀져 있지 않으나 그 매개물질로서 NO가 유력한 후보로 생각되고 있다. 그 이유로서 NO는 신경세포에서도

생성 유리되고 (Garthwaite et al., 1988; Bredt et al., 1990), 쉽게 확산할 뿐만 아니라 (Knowles and Moncada, 1992), 세포막을 자유롭게 통과하는 강력한 혈관 이완 물질 (Palmer et al. 1987)이기 때문이다. 본 연구에서 두개창 직하부의 대뇌 피질내의 NOS 활성도와 대뇌 피질 및 뇌연막동맥에서의 cyclic GMP 생성량을 측정된 결과, 삼차신경혈관계 손상군에서 대뇌 피질내 NOS 활성도와 대뇌 피질 및 뇌연막동맥내의 cyclic GMP 생성량이 대조군에 비하여 유의하게 감소되어 있었다. 이러한 사실은 삼차신경혈관계가 정상적인 기능을 발휘하기 위하여는 삼차신경계내에 NOS가 정상 수준으로 존재하고 있어야 하며 그 활성도도 정상적이어야 한다는 것을 강조하는 것으로 생각된다.

이상을 종합해 보면 삼차신경혈관계의 손상은 뇌혈관 반응성의 변화와 뇌혈류 자가조절 기능의 변동 또는 소실을 초래하는 바 정상적인 뇌혈관 운동과 뇌혈류 자가조절 반응의 기전으로서 삼차신경혈관계가 중요하게 관여하며, 여기에서 생성 유리되는 NO가 뇌혈관 확장 반응을 매개한다고 볼 수 있다.

REFERENCES

- Bleys RL, Cowen T. Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2001. 53: 106-118.
- Bonvento G, Cholet N, Seylaz J. Sustained attenuation of the cerebrovascular response to a 10 min whisker stimulation following neuronal nitric oxide synthase inhibition. *Neurosci Res.* 2000. 37: 163-166.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-254.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 9030-9033.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990. 347: 768-770.
- Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM. Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrel. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993. 13: 899-913.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992. 32: 297-311.
- Edvinsson L. Functional role of perivascular peptides in the con-

- trol of cerebral circulation. *Trends Neurosci.* 1985. 8: 126-131.
- Edwards RM, Stack EJ, Trizna W. Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and relaxes intracerebral arterioles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991. 257: 1020-1024.
- Faraci FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs. microcirculation. *Am J Physiol.* 1991. 261: H1038-H1042.
- Gamse R, Holzer P, Lembeck F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1980. 68: 207-213.
- Ghabriel MN, Lu MX, Leigh C, Cheung WC, Allt G. Substance P-induced enhanced permeability of dura mater microvessels is accompanied by pronounced ultrastructural changes, but is not dependent on the density of endothelial cell anionic sites. *Acta Neuropathol (Berl).* 1999. 97: 297-305.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation on NMDA receptors suggests an intercellular messenger in the brain. *Nature.* 1988. 336: 385-388.
- Goadsby PJ. Inhibition of calcitonin gene-related peptide by h-CGRP₍₈₋₃₇₎ antagonizes the cerebral dilator response from nasociliary nerve stimulation in the cat. *Neurosci Lett.* 1993. 151: 13-16.
- Goadsby PJ, Knight YE, Hoskin KL, Butler P. Stimulation of an intracranial trigeminally-innervated structure selectively increases cerebral blood flow. *Brain Res.* 1997. 751: 247-252.
- Gonzalez C, Estrada C. Nitric oxide mediates the neurogenic vasodilation of bovine cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991. 11: 366-370.
- Gotoh F, Fukuuchi Y, Amano T, Tanaka K, Uematsu D, Suzuki N, Kavamura J, Yamawaki T, Itoh N, Obara K. Role of endothelium in responses of pial vessels to change in blood pressure and to carbon dioxide in cats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987. 7: S275
- Hammond DL, Ruda, MA. Developmental alterations in thermal nociceptive threshold and the distribution of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P after neonatal administration of capsaicin in the rat. *Neurosci Lett.* 1989. 97: 57-62.
- Harder DR. Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent of intact endothelium. *Circ Res.* 1987. 60: 102-107.
- Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 1991. 43: 143-201.
- Hong KW, Pyo KM, Lee WS, Yu SS, Rhim BY. Pharmacological evidence that calcitonin gene-related peptide is implicated in cerebral autoregulation. *Am J Physiol.* 1994. 266: H11-H16.
- Iadecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F. Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. *Brain Res.* 1993. 606: 148-155.
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature.* 1977. 270: 741-743.
- Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol.* 1987. 252: H671-H673.
- Kikkawa K, Hoshino T, Yamauchi-Kohno R, Murata S. Characteristics of heterogeneity in the expression of vasoconstriction in response to N^G-monomethyl-L-arginine in isolated canine arteries. *Eur J Pharmacol.* 1999. 379: 167-173.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels *Trends Biochem Sci.* 1992. 17: 399-402.
- Lee TJ, Sarwinski SJ. Nitric oxidergic neurogenic vasodilation in the porcine basilar artery. *Blood Vessels.* 1991. 28: 407-412.
- Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1979. 310: 175-183.
- Luscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J.* 1991. 12(Suppl E): 2-11.
- May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999. 19: 115-127.
- Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992. 145: 201-227.
- Morii S, Ngai AC, Winn HR. Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide: with detailed description of the closed cranial window technique in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986. 6: 34-41.
- Morita-Tsuzuki Y, Hardebo JE, Bouskela E. The role of nitric oxide in the cerebrovascular response to stimulation of post-ganglionic parasympathetic nerve fibers in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13(Suppl 1): S171.
- Nagy JI, Hunt SP, Iversen LL, Emson PC. Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing

- primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*. 1981. 6:1923-1934.
- Ngai AC, Meno JR, Winn HR. Simultaneous measurements of pial arteriolar diameter and laser-Doppler flow during somatosensory stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995. 15: 124-127.
- Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993. 13: 70-79.
- Okamoto H, Hudetz AG, Roman RJ, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Neuronal NOS-derived NO plays permissive role in cerebral blood flow response to hypercapnia. *Am J Physiol*. 1997. 272: H559-H566.
- Onoue H, Kaito N, Tomii M, Tokudome S, Nakajima M, Abe T. Human basilar and middle cerebral arteries exhibit endothelium-dependent responses to peptides. *Am J Physiol*. 1994. 267: H880-H886.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988. 333: 664-666.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987. 327: 524-526
- Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, Hogestatt ED. Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 1995. 115: 889-894.
- Sakas DE, Moskowitz MA, Wei EP, Kontos HA, Kano M, Ogilvy CS. Trigeminovascular fibers increase blood flow in cortical gray matter by axon reflex-like mechanisms during acute severe hypertension or seizures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989. 86: 1401-1405.
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U. The cerebrovascular response to elevated potassium - role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett*. 2001. 306: 61-64.
- Stretton D, Belvisi MG, Barnes PJ. The effect of sensory nerve depletion on cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992. 260: 1073-1080.
- Suzuki N, Fukuuchi Y, Koto A, Nagenuma Y, Isozumi K, Matsuoka S, Gotoh J, Shimizu T. Cerebrovascular NADPH diaphorase-containing nerve fibers in the rat. *Neurosci Lett*. 1993. 151: 1-3.
- Suzuki N, Hardebo JE, Kahrström J, Owman CH. Effect on cortical blood flow of electrical stimulation of trigeminal cerebrovascular nerve fibers in the rat. *Acta Physiol Scand*. 1990. 138: 307-315.
- Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat. *Neuroscience*. 1989. 31: 427-438.
- Toda N, Okamura T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebroarterial muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. 170: 308-313.
- Toda N, Okamura T. Neurogenic nitric oxide (NO) in the regulation of cerebroarterial tone. *J Chem Neuroanat*. 1996. 10: 259-265.
- Tsutsui M, Onoue H, Iida Y, Smith L, O'Brien T, Katusic ZS. Effects of recombinant eNOS gene expression on reactivity of small cerebral arteries. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 2000. 278: H420-H427.