

Expression of Nociceptin within Dura Mater in Response to Electrical Trigeminal Ganglion Stimulation in Rats

Jeong Hee Kim and Won Suk Lee[†]

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

This study aimed to investigate whether nociceptin is implicated in the trigeminovascular responses to electrical stimulation of trigeminal ganglion in rats. An open cranial window was prepared on the right parietal bone of male Sprague-Dawley rats. Trigemino-vascular system was stimulated by electrical stimulation of trigeminal ganglion (ETS; 5 ms, 5 Hz, 3 V). Neonatal capsaicin treatment was performed with subcutaneous administration of capsaicin (50 mg/kg) within the first 24 hours after birth. Changes in regional cerebral blood flow were continuously measured through the cranial window by laser-Doppler flowmetry, and the expression of nociceptin-like immunoreactivity was determined by immunohistochemistry. ETS caused increases in regional blood flow of pial arteriole in a voltage-dependent manner. ETS markedly and voltage-dependently increased the expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater ipsilateral rather than contralateral to ETS. The nociceptin-like immunoreactivity was markedly reduced by pretreatments with calcitonin gene-related peptide(8-37) (CGRP₈₋₃₇, a CGRP₁ receptor antagonist), L-733060 (a NK₁ receptor antagonist), and [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ (a selective and competitive nociceptin receptor antagonist) as well as by neonatal capsaicin treatment. These results suggest that the electrical stimulation of trigeminal ganglion causes prominent expression of nociceptin within dura mater, in which not only neuropeptides including substance P and CGRP but also nociceptin are implicated in the trigeminovascular responses to electrical trigeminal ganglion stimulation.

Key Words: Trigemino-vascular system, Nociceptin, Neuropeptide, Dura mater

서 론

삼차신경혈관계 (trigemino-vascular system)는 삼차신경의 감각신경세포와 두개내 혈관 사이를 통합하여 일컫는 부위로서 자극을 받게 되면 뇌막혈관 주위에 있는 통각수용성들 신경섬유에서 substance P와 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 같은 신경펩티드가 유리되고 이들에 의하여 뇌경막내에 혈관 확장과 염증이 유발된다고 알려져 있다 (Moskowitz, 1992; Williamson et al., 1997a, b).

뇌경막 (dura mater)은 동통에 민감한 수용체를 고밀도로 가지고 있으며, 여기에 존재하는 동통-민감성 신경섬유는 동통 신호를 뇌 내의 통각중추로 보낼 뿐만 아니라 신경성 염증 발생을 매개하기도 한다. 뇌경막은 친공성 모세혈관과 내피세포를 가진 혈관들을 가지고 있고 (Andres et al., 1987),

신경펩티드를 함유하는 삼차신경과 위목감각신경섬유의 분포를 받고 있으며, 비만세포를 많이 가지고 있어 (Steiger et al., 1982; Mayberg et al., 1984) 신경성 염증의 발생에 필요한 최소한의 요건을 모두 갖추고 있으므로 두통의 중요한 원천지라고 여겨지고 있다 (Moskowitz and Buzzi, 1991; Edvinsson, 2001).

한편 최근에 발견된 내인성 opioid 펩티드인 nociceptin은 다른 opioid 펩티드와는 달리 N-말단의 첫 아미노산이 tyrosine 대신에 phenylalanine으로 시작하고 (Meunier et al., 1995), μ -, δ - 그리고 κ -opioid 수용체에 대한 친화력이 매우 낮은 뿐만 아니라 (Reinscheid et al., 1995) 체내 분포와 효과도 다르므로 새로운 펩티드로 인식되고 있다 (Fukuda et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Mollereau et al., 1996).

Nociceptin과 그 수용체는 중추신경계와 말초신경계에 널리 분포하고 있으면서 다양한 반응에 관여하는데 (Anton et al., 1996; Ikeda et al., 1998; Calo' et al., 2000) 그 중에서도 통각 전달에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 즉 nociceptin을 뇌실 내로 척수 상부에 투여하면 opioid와는 달리 통각과민 (hyperalgesia)이 초래되고 (Grisel and Mogil, 2000), 척수강내 또는 말초에 투여하면 저용량에서는 통각과민을

* 논문 접수: 2005년 8월 23일
수정재접수: 2005년 9월 20일

[†] 교신저자: 이원석 (우) 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10, 부산대학교 의과대학 약리학교실
Tel: 051-240-7729, Fax: 051-244-1036
e-mail: wonslee@pusan.ac.kr

일으키지만 고용량에서는 진통 효과를 나타낸다고 한다 (Yamamoto et al., 1999; Xu et al., 2000).

최근에 Hou et al. (2003)은 사람의 삼차신경절 내에서 nociceptin-유사 면역반응 (nociceptin-like immunoreactivity)과 nociceptin 수용체의 mRNA가 발현되고, nociceptin은 CGRP, substance P, nitric oxide synthase 및 pituitary adenylate cyclase activating peptide와 공존함을 보고하였다. 이와 같이 nociceptin이 삼차신경절 내에서 발현될 뿐만 아니라 삼차신경혈관계의 반응에 있어서 중요한 매개물질인 CGRP 및 substance P와 공존하고 있다는 것으로부터 nociceptin은 삼차신경성 감각 전달에 있어서 추측과 같은 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 그러나 삼차신경절의 자극에 의한 삼차신경혈관계의 반응에 있어서 nociceptin의 관여에 대하여는 아직 자세히 밝혀져 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 삼차신경절 전기자극에 의한 삼차신경혈관계의 반응에 있어서 nociceptin의 관여를 구명하는 연구의 일환으로서 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌경막 내 nociceptin의 발현을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250~300 g의 Sprague-Dawley계 수컷을 사육장 (실내 온도 20~25°C) 내에서 물과 사료를 마음껏 섭취하게 하면서 사육하였다가 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 실험동물의 수는 대조군 6 마리, 삼차신경절 전기자극군 19 마리, 신생기 capsaicin 처리군 5 마리, CGRP₁ 수용체 차단제인 CGRP₈₋₃₇ 전처리군 6 마리, NK₁ 수용체 차단제인 L-733060 전처리군 5 마리 및 nociceptin 수용체에 선택적이면서 경쟁적 차단제인 [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ 처리군 6 마리로서 총 47 마리가었다. 이들 중 6 마리는 뇌혈류 측정에 사용되었고, 나머지 41 마리는 nociceptin-유사 면역반응 측정에 사용되었다.

2. 신생기 capsaicin 처리

일차신경성염증을 전반적으로 손상시키기 위하여 Jancso 등 (1977)의 방법에 따라 출생 24 시간 이내의 신생 백서에 capsaicin 50 mg/kg을 피하주사하여 전신의 민말이집감각 신경성염증을 파괴하고 약 2 개월 후 실험에 사용하였다. 실험을 시작하기 전에 소량의 capsaicin (1 µM)을 각막에 국소 투여하여 붉으로써 이 자극에 대한 반응의 소실 유무를 확인하고 동공 변화가 있을 때 그 백서는 실험에서 제외시켰다.

3. 일반 수술 조작

실험동물을 urethane (1 g/kg, i.p.)으로 마취시키고 소동물용

자동보온 전기방석 (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) 위에 바로 눕힌 채 고정하여 체온을 37°C로 유지시켰다. 기관절개술을 시행하여 14G catheter로 기도를 확보하고 gallamine (3~5 mg/kg, i.m.)을 투여하여 골격근을 마비시킨 다음 동물용 호흡기 (683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 사용하여 체중에 따라 분당 50~60 회의 호흡을 유지시켰다. 양측 대퇴동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽관하고 이를 통하여 동맥혈 내 O₂ 분압과 CO₂ 분압 및 pH를 혈액가스분석기 (i-STAT Portable Clinical Analyzer, i-STAT Corporation, East Windsor, NJ, USA)로 측정하여 전 실험기간 동안 PaCO₂의 변화가 기저치의 3~4% 이내에서 이루어지도록 호흡을 조절하여 유지시켰다.

4. 개방 두개창 설치

일반적인 수술전 조작이 끝난 후 실험동물의 체위를 복와위로 변경시키고 머리를 정위기구 (900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 두피를 정중선을 따라 절개하여 양측으로 벌린 후 입체현미경 (Stemi SV6, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) 하에서 관상봉합의 미측에 위치한 우측 두정골에 saline-cooled drill (395, Dremel, Racine, WI, USA)을 사용하여 개두술 (5×5 mm)을 시행하고 뇌경막과 지주막을 온전하게 보존시켰다. 그 후 미리 37°C로 가온한 인공 뇌척수액을 관류시켰다. 사용한 인공 뇌척수액의 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. 삼차신경절 전기자극

실험동물을 정위기구 (900, David Kopf Instruments)의 수평선에서 1.5 mm 하방에 incisor bar로 고정하고, 두피를 정중선을 따라 절개하여 양측으로 벌린 후 두개관을 노출시켰다. 정수리점 (bregma)으로부터 3.7 mm 후방의 위치이면서 시상봉합 (sagittal suture)으로부터 양측 3.2 mm인 지점에 직경 2 mm의 머리뼈뚫개구멍을 뚫고, 여기를 통하여 두극전극 (50 mm shaft, Rhodes Medical Instruments, Woodland Hills, CA, USA)를 9.5 mm 깊이에 있는 삼차신경절에 설치하였다. 오른쪽 삼차신경절을 전기자극기 (SI-10, Narco Bio-Systems, Houston, Texas, USA)를 사용하여 5 ms, 5 Hz, 3 V로 5 분 동안 자극하였다. 이때 왼쪽 삼차신경절은 전기자극을 하지 않고 그대로 두었다.

6. 혈압 변동 측정

전신혈압의 변동을 관찰하기 위하여 실험동물의 대퇴동맥에 삽입되어 있는 polyethylene 관을 압력변환기 (pressure transducer: Statham P23D, Gould, Cleveland, OH, USA)에 연결

하고, MacLab (4s, ADInstruments, Castle Hill, Australia)과 Macintosh computer (Power Macintosh 7500/100, Seoul, Korea)로 구성된 자료획득시스템 (data acquisition system)에 기록하였다.

7. 국소 뇌혈류 변동 측정

실험동물의 머리를 정위기구에 고정시키고, 개방 두개창을 통하여 laser-Doppler flowmeter (BLF21, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)용 needle probe (type NS)를 정위 미세 조작장치 (stereotactic micromanipulator)를 사용하여 대뇌질질 표면에 수직이 되도록 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 자료획득시스템에 기록하였다.

8. 관류고정 및 조직처리

삼차신경절 전기자극 종료 1 시간 후에 실험동물의 가슴을 열어 심장을 노출시켰다. 좌심실에 주사침을 삽입하고 혈액이 흘러나오도록 우심방을 절개한 후 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 관류고정을 시행하였다. 머리 전체를 적출한 후 동일 고정액에 넣고 4°C 냉장고에 12 시간 동안 후고정 (postfixation)을 하였으며 뇌경막을 분리한 후 6 시간 동안 한 번 더 고정하였다. 0.02 M PBS로 15 분간 3 회 세척하고 20% sucrose/PBS에 8 시간 동안 침전시켜 동결 시 일어나는 결빙 과립 (ice crystal)을 방지하였다. 이후 뇌경막을 silane이 입혀져 있는 슬라이드글라스 (Muto Pure Chemicals Ltd, Tokyo, Japan) 위에 부착시킨 후 상온에서 1 일간 말린 후 -20°C에서 15 분 동안 차가운 acetate에 담구어 slide를 고정시켰다. 상온에서 2 시간 동안 말린 후 염색 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

9. 면역조직화학

내인성 과산화효소의 반응을 제거하기 위해 조직을 0.3% 과산화수소수에 넣어 20 분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 0.02 M PBS로 15 분간 3 회 세척한 후에 비특이면역반응을 방지하기 위해 2% bovin serum albumin (차단항체)을 사용하여 가슴실에서 30 분 동안 반응시켰다. 차단항체를 제거한 뒤 일차항체인 rabbit anti-nociceptin (Chemicon international, Temecula, CA, USA)을 1:1500으로 희석한 후, 4°C에서 12 시간 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 3 회 세척하였다. 이차항체인 anti-rabbit Igs, biotinylated goat (InnoGenex, San Ramon,

CA, USA)를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이차항체 반응이 끝난 후에 0.02 M PBS로 5 분간 3 회 세척한 후 삼차반응 용액인 avidin-biotin complex (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 용액으로 넣어 실온에서 1 시간 반응시킨 후 0.02 M PBS로 15 분간 3 회 세척하고 diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector Laboratories)를 이용하여 광학현미경 (Axioskop 40, Carl Zeiss) 하에서 확인하면서 착색반응을 시행하였다. 반응이 끝난 후 0.02 M PBS로 15 분간 3 회 세척하여 반응을 중지시키고, 알코올과 xylene으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)으로 봉입하여 cover glass를 씌운 후 광학현미경으로 nociceptin-유사 면역반응을 관찰하였다. Nociceptin-유사 면역반응의 발현에 대한 분석은 Video Test-Master (Video Test Ltd, St. Petersburg, Russia)를 사용하여 측정하였다.

10. 사용 약물

본 연구에서 사용한 주요 약물은 capsaicin, CGRP₈₋₃₇ (이상 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), L-733,060 및 [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂; 이상 Tocris Cookson Ltd., Langford, Bristol, UK) 등이었다. Capsaicin은 에탄올 : Tween 80 : 0.9% 생리식염수 (1 : 1 : 8 v/v) 혼합용액에 용해하여 0.9% 생리식염수로 희석하였다.

11. 통계 처리

모든 측정치는 평균 ± 평균의 표준오차로 표시하였다. 실험성적들은 통계프로그램인 Prism (version 3.03, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 Student's unpaired *t*-test로 통계학적 유의성을 검정하거나, 또는 분산분석법으로 분석한 후 각 군 사이의 유의성을 검정하기 위한 사후 검정법으로 Dunnett의 다중비교법을 사용하였다. *P* 값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 뇌연막동맥혈류 변동

삼차신경절 전기자극에 있어서 적절한 전기자극 조건을 찾기 위하여 두개창이 설치된 같은쪽의 삼차신경절을 5 ms, 5 Hz의 상태에서 1, 3, 5 및 10 V의 전압으로 각각 2 분간 전기자극 하였다. 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌연막동맥의 국소 혈류는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 전압-의존적으로 증가하였고, 전기자극을 마친 후에는 서서히 기저치 수준으로 회복되었다.

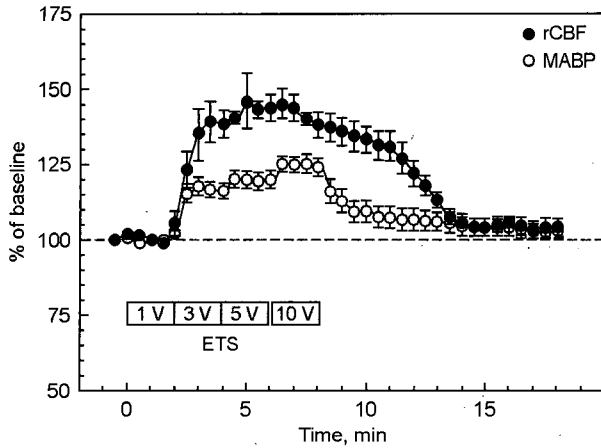


Fig. 1. Changes in regional cerebral blood flow (rCBF) and mean arterial blood pressure (MABP) in response to electrical stimulation of trigeminal ganglion (ETS). The right trigeminal ganglion was stimulated consecutively at an interval of 2 min (5 ms, 5 Hz, 1, 3, 5 and 10 V, respectively). The number of animal is 6.

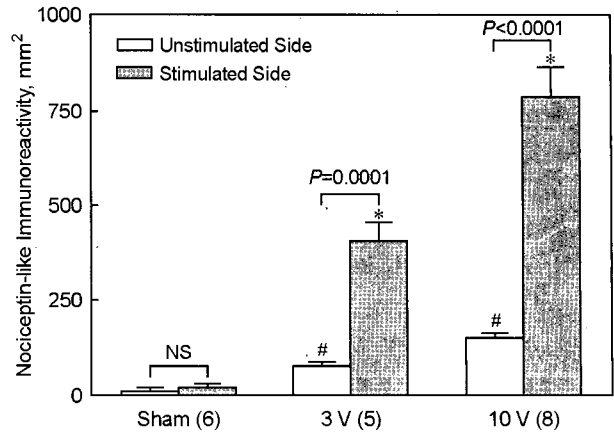


Fig. 3. Expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater by electrical trigeminal ganglion stimulation. The numbers in parentheses represent the numbers of animals. NS, no significance. # $P < 0.01$ vs. corresponding unstimulated side of sham group. * $P < 0.01$ vs. corresponding stimulated side of sham group.

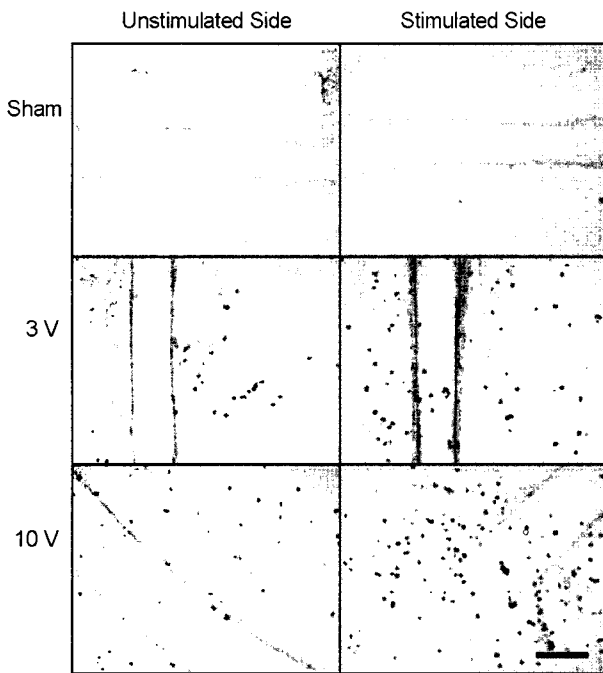


Fig. 2. Representative microphotographs showing the expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater. The right trigeminal ganglion was stimulated for 5 min (5 ms, 5 Hz) with different voltage of 0, 3 or 10 V. Scale bar = 50 μ m.

2. 뇌경막 내 nociceptin-유사 면역반응

1) 삼차신경절 전기자극 효과

삼차신경절 전기자극에 의한 삼차신경혈관계의 반응에 대한 nociceptin의 관여를 보기 위하여 뇌경막 내의 nociceptin-유사 면역반응의 발현을 면역조직화학법으로 관찰하였다.

삼차신경절 전기자극 (0, 3 및 10 V)에 의한 뇌경막 내 nociceptin-유사 면역반응의 발현은 Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 전기자극과 같은쪽에서 전기자극 반대쪽에 비하여 현저히 증가하였다 (3 V, $P = 0.0001$; 10 V, $P < 0.0001$). 이러한 nociceptin-유사 면역반응의 발현은 전기자극과 같은쪽 및 반대쪽 모두에서 전기자극의 전압에 의존적으로 증가하였지만 (같은쪽, $F_{(2,16)} = 42.265$, $P < 0.0001$; 반대쪽, $F_{(2,16)} = 53.541$, $P < 0.0001$), 전기자극과 같은쪽에서 더욱 현저하게 증가하였다 ($P < 0.0001$).

2) 신생기 capsaicin 처치 및 각종 펩티드 수용체 차단제 전처리 효과

삼차신경절을 3 V로 전기자극 하였을 때 전기자극과 같은쪽의 뇌경막 내에 초래되는 nociceptin-유사 면역반응의 발현은 신생기에 capsaicin 처치를 하거나 ($P < 0.01$), CGRP₁ 수용체 차단제인 CGRP₈₋₃₇ (1 μ M, $P < 0.01$), NK₁ 수용체 차단제인 L-733060 (0.1 μ M, $P < 0.01$), 그리고 nociceptin 수용체 차단제인 [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ (1 nM, $P < 0.01$)의 전처치에 의하여 현저히 약화되었다 ($F_{(4,22)} = 26.953$, $P < 0.0001$, Fig. 4, Fig. 5).

한편, 전기자극 반대쪽의 뇌경막 내에서의 nociceptin-유사 면역반응의 발현은 신생기 capsaicin 처치, CGRP₈₋₃₇, L-733060 등의 전처치에 아무런 영향을 받지 아니하였으나, [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ 전처치에 의하여 유의하게 약화되었다 ($P < 0.01$).

고 찰

본 연구를 통하여 삼차신경절 전기자극은 뇌경막 내 noci-

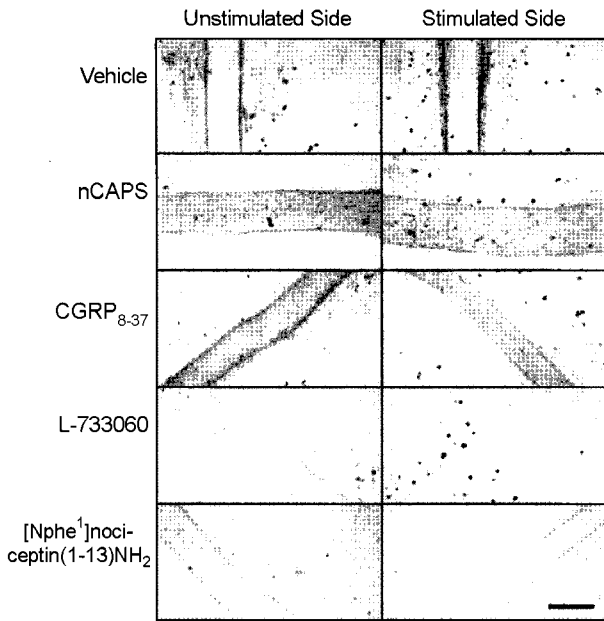


Fig. 4. Representative microphotographs showing the expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater. The right trigeminal ganglion was stimulated for 5 min (5 ms, 5 Hz, 3 V). nCAPS, Rats were treated with capsaicin (50 mg/kg, s.c.) within the first 24 hours of life. CGRP₈₋₃₇ (1 μM), L-733060 (0.1 μM) and [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ (1 nM) were topically administered on the dura mater 5 min before and during electrical trigeminal ganglion stimulation, respectively.

ceptin의 발현을 증가시키고, 여기에는 삼차신경혈관계 내의 신경펩티드가 중요하게 관여함을 관찰하였다.

두개강 내의 통증에 민감한 조직들은 삼차신경절과 일부 위목신경절 (superior cervical ganglion)로부터의 신경 지배를 받고 있는데, 삼차신경이 자극을 받으면 삼차신경 말단 부위에 있는 신경전달물질인 substance P, CGRP, neurokinin A 등의 신경펩티드가 유리되어 혈관을 확장시키고 혈장 단백질을 혈관 밖으로 유출시켜 무균성 염증을 초래함으로써 감각신경 자극으로 인한 통증을 야기한다 (Moskowitz, 1992; Williamson et al., 1997a, b). 이러한 신경성 염증 (neurogenic inflammation)의 발생은 편두통 (migraine)이나 군발두통 (cluster headache) 같은 혈관성 두통의 발병기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Moskowitz et al., 1989).

혈관성 두통의 통각 과정에 있어서 뇌혈류가 관련 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 편두통 발작시 뇌연막혈관의 관류량의 증가에 의존하여 국소 뇌혈류가 증가하고 (Olesen et al., 1990), 고양이 (Goadsby and Duckworth, 1987)와 사람 (Tran-Dinh et al., 1992)의 삼차신경절 자극시 뇌혈류가 증가한다고 한다. 본 연구에서도 흰쥐의 삼차신경절을 전기자극하였을 때 전압에 의존하여 국소 뇌혈류가 증가하고 동시에 평균동맥혈압도 증가함을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 삼차신경

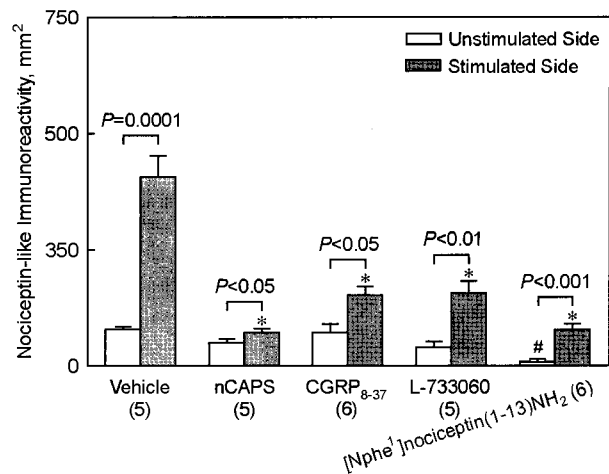


Fig. 5. Expression of nociceptin-like immunoreactivity in dura mater by electrical trigeminal ganglion stimulation. *P<0.01 vs. corresponding stimulated side of vehicle group. #P<0.01 vs. corresponding unstimulated side of vehicle group.

절 전기자극에 의하여 뇌혈류가 증가한 것이 혈압의 증가에 의한 관류량의 증가 때문인 것으로 생각할 수도 있으나 혈류와 혈압간의 관계로부터 혈관저항을 계산하여 보았을 때 전기자극의 전압에 의존적으로 혈관저항이 감소하였음을 알 수 있었다 (미제시 성적). 따라서 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌혈류의 증가 반응은 삼차신경절 전기자극시 삼차신경으로부터 유리된 신경펩티드가 뇌연막동맥을 확장시킴으로써 초래된 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서 여러 신경펩티드 수용체들에 대한 차단제를 전처리하거나 신경펩티드 생성을 억제한 후 삼차신경절 전기자극을 해 보지 않아 현재로서는 단언하기 어렵다.

Nociceptin은 최근에 발견된 내인성 opioid 펩티드로서 그 생리학적 기능과 병적인 상태에서의 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Nociceptin은 전신 투여 시 항불안 작용을 나타내고 (Jenck et al., 1997), 학습과 기억에 장애를 초래할 뿐만 아니라 (Nabeshima et al., 1999; Noda et al., 2000), 통각전달 과정에 다양한 효과를 일으켜 통각과민, 진통, 무해 자극통증 (allodynia)을 일으킨다고 알려져 있다 (Henderson and McKnight, 1997; Meunier, 1997; Taylor and Dickenson, 1998).

통각전달에 있어서 nociceptin은 중추신경계에서는 동통을 유발하여 opioid 효현제와는 반대로 작용하지만, 말초신경계에서는 nociceptin 수용체와 opioid 수용체에 모두 작용함으로써 그 효과가 상당히 중복되어 나타난다고 한다 (Taylor and Dickenson, 1998; Giuliani et al., 2000). 말초에서 nociceptin에 의하여 유도되는 통증은 일차적 통각신경의 신경 말단에서의 substance P의 유리에 의존하고 (Inoue et al., 1998), nociceptin을 피내주사하면 비만세포에서의 histamine 유리를

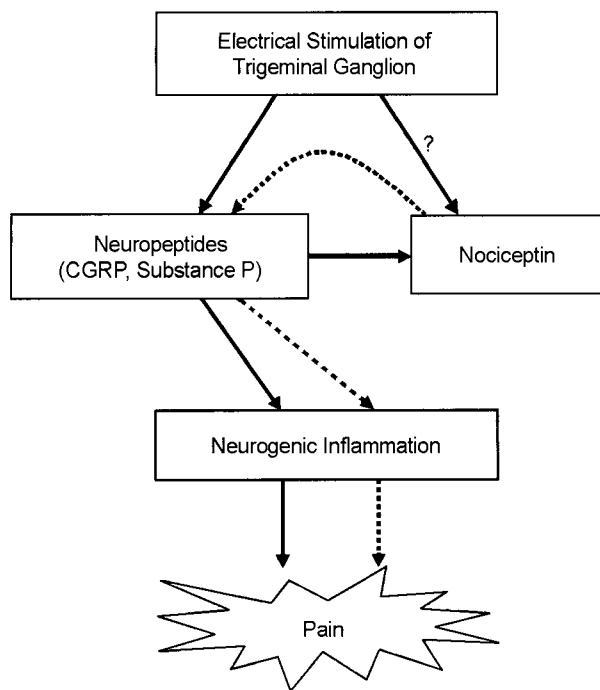


Fig. 6. Proposed relationship between neuropeptides and nociceptin in trigeminovascular system. Solid arrow, increase; dotted arrow, decrease.

증강시키고 혈관 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Kimura et al., 2000). 그러나 사람의 들감각신경 혹은 일차염 증세포에 대한 nociceptin의 작용 방식에 관한 보고는 없다.

한편, nociceptin은 capsaicin이나 bradykinin의 투여 (Helyes et al., 1997; Habler et al., 1999) 또는 뇌막혈관 주위의 전기자극 (Bartsch et al., 2002)에 의한 들감각신경 말단으로부터의 substance P와 CGRP의 유리를 억제함으로써 역방향성 (antidromic) 혈관 확장을 억제하고 신경성 염증을 억제한다고 한다 (Helyes et al., 1997; Nmeth et al., 1998). 최근 Hou et al. (2003)의 보고에 의하면 사람의 삼차신경절 내에서 nociceptin-유사 면역반응과 nociceptin 수용체 mRNA가 발현되고, CGRP, substance P, nitric oxide synthase 및 pituitary adenylate cyclase activating peptide와 함께 nociceptin이 공존한다고 한다. 이러한 보고들로부터 nociceptin과 삼차신경혈관계의 신경펩티드 사이에는 긴밀한 상호 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 삼차신경절을 전기자극하기 전에 신생기 capsaicin 처치를 하거나, CGRP₁ 수용체 차단제 또는 NK₁ 수용체 차단제를 전처치한 후 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌경막 내 nociceptin-유사 면역반응의 발현을 관찰해 보았다. 본 연구의 결과 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌경막 내 nociceptin-유사 면역반응의 발현이 신생기 capsaicin 처치군에서 대조군에 비하여 현저히 줄었을 뿐만 아니라,

CGRP₈₋₃₇와 L-733060 전처치에 의하여도 유의하게 줄었음을 관찰하였다. 이러한 사실은 삼차신경절 전기자극에 의한 뇌경막 내 nociceptin-유사 면역반응의 발현에 있어서 삼차신경혈관계의 CGRP와 substance P 같은 신경펩티드가 매우 긴밀하게 관여함을 시사하는 것으로 생각된다. 즉, 삼차신경절 전기자극은 삼차신경혈관계에 신경펩티드를 유리시켜 뇌경막 내 신경성 염증반응을 매개함으로써 통증을 야기하는데 (Moskowitz, 1992; Williamson et al., 1997a, b), 이때 유리된 신경펩티드가 보상적으로 nociceptin의 유리를 일으키게 되고, 유리된 nociceptin은 회귀성으로 신경펩티드의 유리를 억제하게 하는 기전을 추측할 수 있다 (Fig. 6). 물론 삼차신경절 전기자극 자체에 의하여 nociceptin이 직접 유리될 가능성을 배제할 수는 없지만, 본 연구에서 신생기 capsaicin 처치, CGRP₈₋₃₇ 그리고 L-733060 전처치에 의하여 nociceptin-유사 면역반응의 발현이 모두 유의하게 감소된 결과를 감안하여 볼 때 삼차신경혈관계에서의 신경펩티드의 유리가 nociceptin-유사 면역반응의 발현에 필수적이라고 생각되고, 삼차신경절 전기자극 자체에 의한 직접적인 nociceptin의 유리 가능성은 희박한 것으로 생각된다.

나아가 본 연구에서 삼차신경절 전기자극시 뇌경막 내에서 nociceptin-유사 면역반응의 발현이 전압-의존적으로 증가하고, [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ 전처치에 의하여 nociceptin-유사 면역반응의 발현이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 삼차신경혈관계의 반응에 nociceptin이 밀접하게 관여한다는 것을 시사하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 삼차신경혈관계에서의 nociceptin 생합성 과정을 억제하거나 nociceptin을 knockout시킨 실험동물을 사용하여 더 연구해 볼 필요가 있다. 뿐만 아니라 삼차신경혈관계의 반응을 나타내기 위한 nociceptin 수용체가 뇌막혈관에 구성성으로 존재하고 있는지 또는 삼차신경혈관계의 자극에 의하여 nociceptin 수용체 mRNA가 발현되는지에 관하여는 본 실험의 결과만으로는 알 수 없고 앞으로 더 연구해 보아야 할 과제로 남는다.

이상을 종합하여 보면 삼차신경절 전기자극은 뇌경막 내 nociceptin의 발현을 현저히 증가시키며, 여기에는 삼차신경혈관계 내의 신경펩티드가 중요하게 관여하는 것으로 생각된다.

Acknowledgment

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD) (R05-2003-000-10227-0).

REFERENCES

- Andres KH, von Düring M, Muszynski K, Schmidt RF. Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1987. 175: 289-301.
- Anton B, Fein J, To T, Li X, Silberstein L, Evans CJ. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1996. 368: 229-251.
- Bartsch T, Akerman S, Goadsby PJ. The ORL-1 (NOP1) receptor ligand nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits neurogenic dural vasodilatation in the rat. *Neuropharmacology*. 2002. 43: 991-998.
- Calo' G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol*. 2000. 129: 1261-1283.
- Edvinsson L. Sensory nerves in man and their role in primary headaches. *Cephalalgia*. 2001. 21: 761-764.
- 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.
- Giuliani S, Lecci A, Maggi CA. Nociceptin and neurotransmitter release in the periphery. *Peptides*. 2000. 21: 977-984.
- Goadsby PJ, Duckworth JW. Effect of stimulation of trigeminal ganglion on regional cerebral blood flow in cats. *Am J Physiol*. 1987. 253: R270-R274.
- Grisel JE, Mogil JS. Effects of supraspinal orphanin FQ/nociceptin. *Peptides*. 2000. 21: 1037-1045.
- Habler H, Timmermann L, Stegmann J, Janig W. Effects of nociceptin and nocistatin on antidromic vasodilatation in hairless skin of the rat hindlimb *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 1999. 127: 1719-1727.
- Helyes Z, Németh J, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br J Pharmacol*. 1997. 121: 613-615.
- Henderson G, McKnight AT. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand - nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci*. 1997. 18: 293-300.
- Hou M, Uddman R, Tajti J, Edvinsson L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res*. 2003. 964: 179-186.
- Ikeda K, Watanabe M, Ichikawa T, Kobayashi T, Yano R, Kumamishi 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.
- Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A, Ueda H. Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95: 10949-10953.
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 1977. 270: 741-743.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94: 14854-14858.
- Kimura T, Kitaichi K, Hiramatsu K, Yoshida M, Ito Y, Kume H, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K. Intradermal application of nociceptin increases vascular permeability in rats: the possible involvement of histamine release from mast cells. *Eur J Pharmacol*. 2000. 407: 327-332.
- 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.
- Mayberg MR, Zervas NT, Moskowitz MA. Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol*. 1984. 223: 46-56.
- 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.
- 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 U S A*. 1996. 93: 8666-8670.
- Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci*. 1992. 13: 307-311.
- Moskowitz MA, Buzzi MG. Neuroeffector functions of sensory fibres: implications for headache mechanisms and drug actions. *J Neurol*. 1991. 238: S18-S22.
- Moskowitz MA, Buzzi MG, Sakas DE, Linnik MD. Pain mechanisms underlying vascular headaches. *Progress Report 1989. Rev Neurol (Paris)*. 1989. 145: 181-193.

- Németh J, Helyes Z, Oroszi G, Thán M, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998. 347: 101-104.
- Nabeshima T, Noda Y, Mamiya T. The role of nociceptin in cognition. *Brain Res.* 1999. 848: 167-173.
- 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.
- Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR, Karle A. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Ann Neurol.* 1990. 28: 791-798.
- 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.
- Steiger HJ, Tew JM Jr, Keller JT. The sensory representation of the dura mater in the trigeminal ganglion of the cat. *Neurosci Lett.* 1982. 31: 231-236.
- Taylor F, Dickenson A. Nociceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport.* 1998. 9: R65-R70.
- Tran-Dinh YR, Thurel C, Cunin G, Serrie A, Seylaz J. Cerebral vasodilation after the thermocoagulation of the trigeminal ganglion in humans. *Neurosurgery.* 1992. 31: 658-662.
- Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shepherd SL. Intravital microscope studies on the effects of neurokinin agonists and calcitonin gene-related peptide on dural vessel diameter in the anaesthetized rat. *Cephalalgia.* 1997a. 17: 518-524.
- Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG, Shepherd SL. Sumatriptan inhibits neurogenic vasodilation of dural blood vessels in the anaesthetized rat - intravital microscope studies. *Cephalalgia.* 1997b. 17: 525-531.
- Xu X, Grass S, Hao J, Xu IS, Wiesenfeld-Hallin Z. Nociceptin/orphanin FQ in spinal nociceptive mechanisms under normal and pathological conditions. *Peptides.* 2000. 21: 1031-1036.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Sakashita Y, Kimura S. Nociceptin/orphanin FQ: role in nociceptive information processing. *Prog Neurobiol.* 1999. 57: 527-535.
-