

## Ryanodine Receptor-mediated Calcium Release Regulates Neuronal Excitability in Rat Spinal Substantia Gelatinosa Neurons

Areum Park and Sang Woo Chun\*

Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant, Wonkwang University, Iksan 570-749

(received December 1, 2015; revised December 15, 2015; accepted December 15, 2015)

**Nitric Oxide (NO) is an important signaling molecule in the nociceptive process. Our previous study suggested that high concentrations of sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, induce a membrane hyperpolarization and outward current through large conductances calcium-activated potassium ( $BK_{Ca}$ ) channels in substantia gelatinosa (SG) neurons. In this study, patch clamp recording in spinal slices was used to investigate the sources of  $Ca^{2+}$  that induces  $Ca^{2+}$ -activated potassium currents. Application of SNP induced a membrane hyperpolarization, which was significantly inhibited by hemoglobin and 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide potassium salt (c-PTIO), NO scavengers. SNP-induced hyperpolarization was decreased in the presence of charybdotoxin, a selective  $BK_{Ca}$  channel blocker. In addition, SNP-induced response was significantly blocked by pretreatment of thapsigargin which can remove  $Ca^{2+}$  in endoplasmic reticulum, and decreased by pretreatment of dantrolene, a ryanodine receptors (RyR) blocker. These data suggested that NO induces a membrane hyperpolarization through  $BK_{Ca}$  channels, which are activated by intracellular  $Ca^{2+}$  increase**

**via activation of RyR of  $Ca^{2+}$  stores.**

**Key words: substantia gelatinosa neuron, nitric oxide, calcium release, ryanodine receptor, patch clamp**

### 서 론

산화질소(nitric oxide; NO)는 세포막을 확산으로 쉽게 이동할 수 있는 기체성 신경전달물질이며[1], 포유류 신경계에서 통증조절을 비롯한 여러 생리적 조절과정에 관련되는 중요한 신호분자이다[2-4]. 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)의 일종인 NO의 통증조절에 대한 작용은 확실치 않으며, 통증을 유발하는 효과와 진통효과가 같이 보고되어 있다[5-7]. 예를 들면, 신경손상, 조직의 염증 등으로 유발된 과민성 반응은 NOS 억제제의 척수 내 투여, 또는 nNOS 유전자를 제거한 생쥐에서 감소하는 효과를 나타냈으며[6,7], NOS가 척수세포에서 만성통증 발생에 중요한 작용을 한다고 보고되었다[8,9]. 반면에 일부의 다른 연구는 NO donor의 통증억제 효과를 보고하였는데 L-arginine과 3-morpholinosydnoimine (SIN-1)을 뇌실에 주입하여 진통효과를 유발한다는 결과를 보고하였다[10].

본 연구실의 이전 연구에서는 고농도 SNP 투여로 발생한 NO가 통증전달에 1차적 중계역할을 하는 척수후각의 아교질세포에서 막전압의 과분극을 유도하였고, 이러한 반응은 칼슘의존성 포타슘 통로 특히, 전도가 큰 칼슘의존성 포타슘 통로 ( $BK_{Ca}$ )를 활성화함으로써 과분극을 일으킴을 보고하였다[11].  $BK_{Ca}$  통로는 세포내 칼

\*Correspondence to: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-Dong, Iksan 570-749, Korea.  
Tel.: +82-63-850-6932  
E-mail: [physiol@wonkwang.ac.kr](mailto:physiol@wonkwang.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.

숨의 증가에 의해 활성화되어 포타슘의 세포외 유출을 일으킨다[12]. 신경세포에서 BK<sub>ca</sub> 통로의 주된 작용은 안정막 전압의 유지와 복원이며, 일반적으로 신경흥분성의 감소를 유발하고[13], 신경전달물질의 분비와 같은 칼슘 의존적 과정에 중요한 역할을 한다[14]. 또한, BK<sub>ca</sub> 통로의 활성화는 막을 통하여 발생하는 전압에 의해 조절되며, 세포내 칼슘농도에 의존적이다[15].

세포내 칼슘은 주로 세포내 칼슘저장소인 내형질세망(endoplasmic reticulum; ER)으로부터 ryanodine 수용체 (RyR)와 inositol 1,4,5-trisphosphate 수용체 (IP<sub>3</sub>R)를 통해 방출된다. 특히, RyR은 NO가 세포내에서 작용하는데 주요표적이며[16], RyR을 통해 세포내로 유리된 칼슘은 시냅스 말단에서 신경전달물질의 분비를 일으키는데 관련이 되거나, 세포 기능을 조절하는 이차전달자 역할을 한다[17,18].

이 연구에서는 통증전달에 1차적 중계역할을 하는 척수의 후각세포에서 고농도의 SNP 투여로 발생한 NO가 BK<sub>ca</sub> 통로를 활성화하여 과분극을 유발한 이전 연구결과를 토대로, BK<sub>ca</sub> 통로를 활성화하는 칼슘이 어디에서 유래하는가를 밝히고, 그것이 어떤 통로를 통하여 이동하는지를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 척수절편 제작

생후 12-17일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인을 얻었다(WKU09-076). 흰쥐를 ether로 마취한 후 25% urethane (2 ml/Kg)을 복강 내 투여하였다. 흉추에서 천추까지 척추제거술(laminectomy)로 척수를 노출한 후 요척수 팽대부에서 1 cm 정도 길이로 척수를 절단하였다. 조직절편기(vibratome 752M, Campden, GB)의 고정대에 agar block을 고정한 후 척수절편을 위치시켰다. 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>를 공급하면서 두께 350 μm의 척수절편을 얻었는데, 절단 중 용액의 온도를 1-2 °C 정도로 낮게 유지시켰다. 척수절편은 32 °C의 인공 뇌척수액에 1시간 정도 보관하여 정상적인 상태로 회복시켰고, 이후에 실험을 진행하였다. 기록은 척수절편을 현미경(BX50WI, Olympus, Japan) 위의 기록용기(1 ml)에 옮긴 후 시행하였고, 실험과정 동안 계속해서 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, France)를 이용하여 관류시켰다(2-3 ml/min).

### 실험용액

척수절편 제작을 위해 사용했던 절단용액의 조성(mM)은

252 Sucrose, 2.5 KCl, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 등으로 구성되었으며, 막전압을 기록하기 위한 세포외 용액의 조성은 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose 이었고 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>를 공급하여 pH를 7.4 상태로 유지하였다. 세포내 용액 (electrode-filling solution)은 150 K-Glu, 10 HEPES, 5 KCl, 0.1 EGTA, 5 MgATP, 0.3 Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 이용하여 7.3으로 조정하였다.

실험에 사용된 sodium nitroprusside (SNP), hemoglobin, 2-(4-Carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazol-1-yloxy-3-oxide potassium salt (c-PTIO), charybdotoxin, tetraethylammonium (TEA), thapsigargin, dentrolene, 2-aminoethyl diphenylborane (2APB)는 Sigma사 (USA)에서 구입하였다.

Thapsigargin, dentrolene, 2APB는 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma)에 일차적으로 녹인 후 최종농도로 세포외 용액과 혼합하여 사용하였고, 그 외의 다른 약물은 실험 전에 세포외 용액에 녹여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용방식은 증력을 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, USA)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

### 전기생리학적 기록방법

막전압의 기록을 위하여 whole cell patch clamp를 사용하였다. 기록전극은 미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, Japan)를 이용하여 외경 1.5mm의 유리미세관(TW150-3, WPI, USA)을 저항이 5-8 MΩ이 되도록 제작하였다. 10배의 대물렌즈로 관찰하였을 때 밝은 띠를 형성하고 있는 척수 아교질 부위를 확인한 후 양압을 가하면서 미세 전극조절기(ROE-200, Sutter, USA)를 이용하여 세포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 피펫의 저항이 순간적으로 급증하는 것으로 세포에 근접하였음을 확인한 후 양압을 풀고 음압을 주어 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. 다시 짧은 음압을 가하여 whole cell을 만든 후 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 상태에서 기록을 시작하였다. 전압측정에는 Axopatch 200B 증폭기(Axon, USA)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon, USA) AD변환기를 통해 컴퓨터에 연결하였다. pCLAMP software (version 9.0, Axon, 미국)를 사용하여 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 발생된 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

**실험자료의 분석**

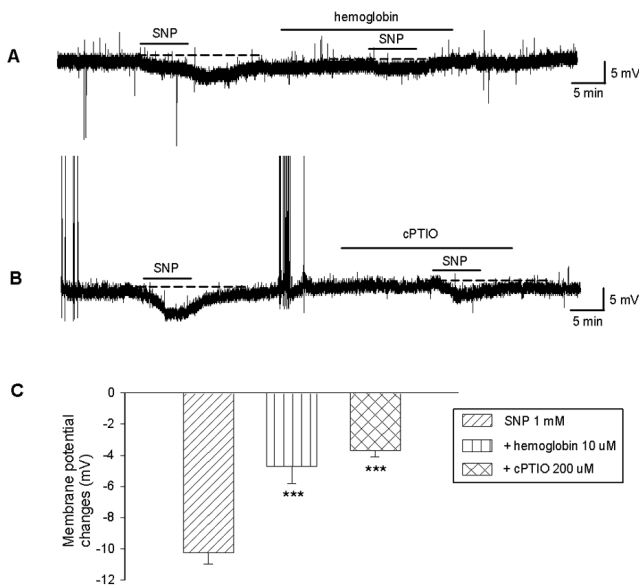
막전압 분석은 Clampfit (version 9.0, Axon, USA)를 이용하였으며 각 약물처리 전후에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 independent t-test를 이용하였고,  $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균값±표준오차(mean±SEM)로 표시하였다.

**연구성적**

**척수 아교질 세포의 흥분성에 대한 SNP의 효과**

NO donor인 SNP 투여에 의하여 척수 아교질 세포의 흥분성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 patch clamp 방법으로 막전압을 기록하였다.

전류 기록법으로 막전압을 기록하면서 SNP 1 mM을 5분간 관류하였을 때 대부분의 세포에서 약물 주입 후 1분 이내부터 -10 mV 크기의 과분극이 관찰되었다(-10.2±0.7 mV, n=56). 이러한 과분극의 반응이 SNP에 의해 발생된 NO의 효과인지 확인해 보기 위하여 NO scavenger가 포함된 용액을 전처리한 후 SNP를 투여하였다. NO에 선택적으로 작용하는 항산화 물질인 hemoglobin (Hb) 10 µM과



**Fig. 1.** Effects of SNP on membrane potential of substantia gelatinosa (SG) neurons. (A) Application of SNP (1 mM) for 5 min caused a reversible membrane hyperpolarization, and pretreatment of hemoglobin (10 µM) decreased the SNP-induced hyperpolarization. (B) Pretreatment of c-PTIO (200 µM) effectively antagonized the SNP-induced hyperpolarization. (C) SNP-induced membrane potential changes under control condition and pretreatment of antioxidants. \*\*\*: Values are significantly different from the control by independent t-test ( $p < 0.001$ ). Means ± SEM.

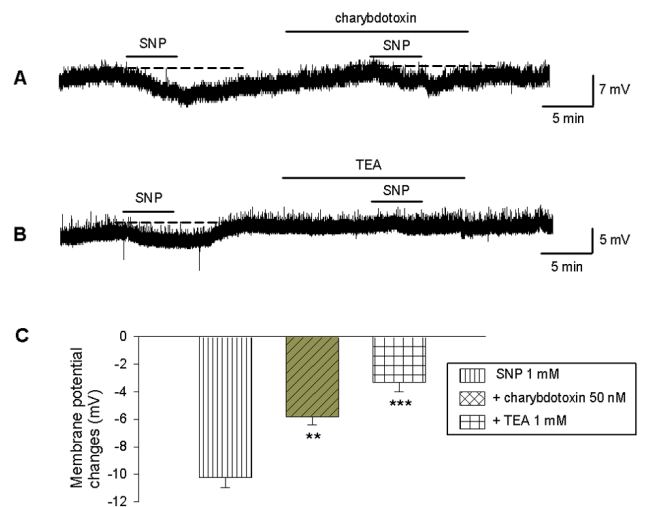
c-PTIO 200 µM을 전처리한 후 SNP를 투여하였을 때 SNP를 단독으로 투여하여 관찰된 과분극보다 유의하게 억제되는 것을 관찰하였다(-4.7±1.1 mV, n=7,  $P < 0.001$ ; -3.7±0.4 mV, n=8,  $P < 0.001$ )(Fig. 1A, B, C).

**SNP에 의한 과분극과 세포내 칼슘의 관련성**

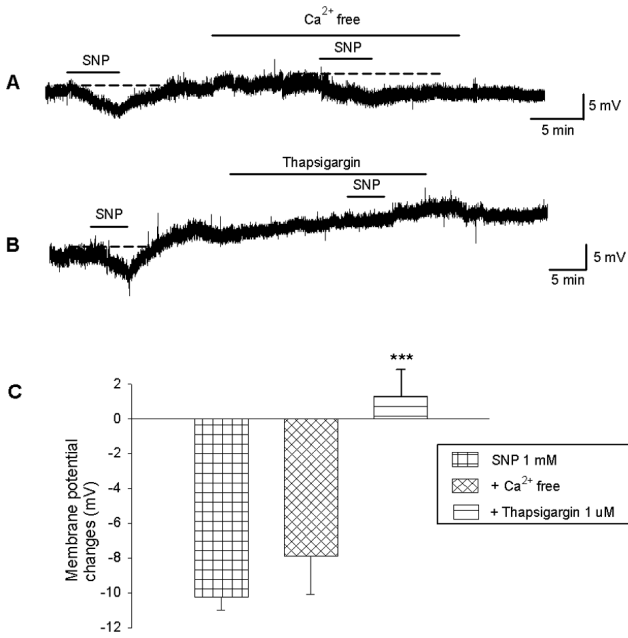
SNP에 의한 과분극이 어떤 통로의 활성을 통해서 발생하는지 확인하고자 BK<sub>ca</sub> 통로 억제제인 charybdotoxin 50 nM과 TEA 1 mM을 전처리한 후 기록하였다. SNP 투여에 의한 과분극은 두 가지 약물의 전처리에 의해 모두 억제되었다(-5.8±0.6 mV, n=5,  $P < 0.01$ ; -3.3±0.7 mV, n=10,  $P < 0.001$ )(Fig. 2A, B, C).

BK<sub>ca</sub> 통로를 활성화하는 세포내 칼슘의 증가가 어디에서 유래하는지를 알아보기 위하여 먼저 세포 외의 칼슘양을 변화시켜 SNP의 반응을 관찰하였다. 세포외 용액에서 칼슘을 제거한 후 칼슘 chelator인 EGTA 1 mM을 첨가한 후 SNP 1 mM을 투여하였을 때 -7.9±2.2 mV (n=5)의 과분극이 발생하여 대조군과 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3A, C). ER의 칼슘을 reuptake 하는 과정을 차단하여 칼슘저장소내의 칼슘을 고갈시키는 작용을 하는 thapsigargin 1 µM을 15분 이상 전처리하고 SNP를 투여 하였을 때는 1.3±1.6 mV (n=6)의 탈분극이 발생하였다( $P < 0.001$ ) (Fig. 3B, C).

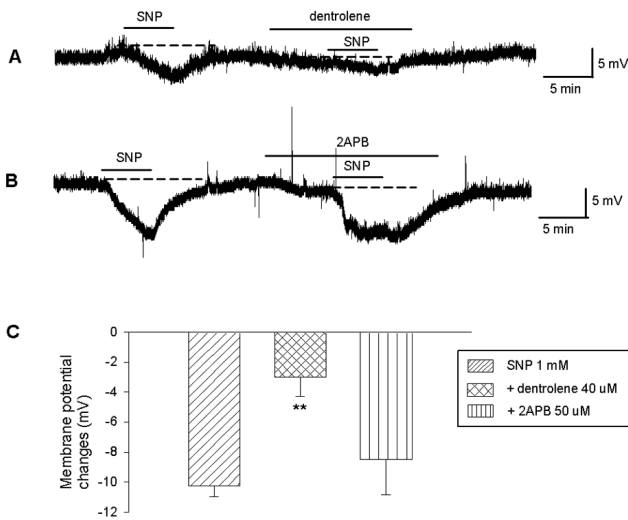
ER에서의 칼슘방출에는 ryanodine 수용체(RyR)와 inositol



**Fig. 2.** Involvement of BK<sub>ca</sub> channel in SNP-induced membrane hyperpolarization. (A, B) SNP-induced hyperpolarization decreased by pretreatment of charybdotoxin (50 nM) and TEA (1 mM), BK<sub>ca</sub> channel blockers. (C) SNP-induced membrane potential changes under control condition and pretreatment of BK<sub>ca</sub> channel blockers. \*\*: Values are significantly different from the control by independent t-test ( $p < 0.01$ ). \*\*\*:  $p < 0.001$ . Means ± SEM.



**Fig. 3.** Effects of intracellular  $Ca^{2+}$  store depletion and a removal of extracellular  $Ca^{2+}$  on SNP-induced hyperpolarization. (A) SNP-induced hyperpolarization was not blocked by pretreatment with  $Ca^{2+}$  free solution. (B) SNP-induced hyperpolarization was completely decreased by  $Ca^{2+}$  ATPase inhibitor thapsigargin ( $1 \mu M$ ). (C) SNP-induced hyperpolarization in control and pretreated with  $Ca^{2+}$  free solution and thapsigargin. \*\*\*: Values are significantly different from the control by independent t-test ( $p < 0.001$ ). Means  $\pm$  SEM.



**Fig. 4.** Effects of RyR and  $IP_3R$  blockers on SNP-induced hyperpolarization. (A) SNP-induced hyperpolarization was significantly blocked by pretreatment with dentrolene ( $40 \mu M$ ). (B) SNP-induced hyperpolarization was not blocked by pretreatment with 2APB ( $50 \mu M$ ). (C) SNP-induced hyperpolarization in control and pretreated with RyR and  $IP_3R$  blockers. \*\*: Values are significantly different from the control by independent t-test ( $p < 0.01$ ). Means  $\pm$  SEM.

1,4,5-trisphosphate 수용체( $IP_3R$ )가 관여한다. SNP에 의한 과분극이 세포내 칼슘저장소의 고갈에 따라 억제되는 것을 확인하였으므로 다음에는 이러한 변화가 RyR과  $IP_3R$  중 어느 수용체를 통하여 발생하는지 알아보았다. RyR 차단제인 dentrolene을 전처리한 후 반응을 관찰한 결과 SNP의 과분극이 억제되었으나( $-3.0 \pm 1.3 mV, n=5, P < 0.01$ )(Fig. 4A, C),  $IP_3R$  차단제인 2APB의 전처리에 의해서는 SNP의 과분극에 큰 변화를 보이지 않았다( $-8.5 \pm 2.3 mV, n=10$ )(Fig. 4B, C).

### 고찰

산화질소 (NO)는 세포내에 존재하는 기체성 신경전달 물질로 여러 가지 정상적 생리작용에 관여하거나 암세포의 사멸, 상처치유 등의 생체방어 작용에도 관여한다 [19]. 또한 NO는 유해자극을 전달하는 과정에 관여하는데 중추신경계에서 통증억제 작용과 통증유도 작용 모두에 관련된다고 보고되었다[20].

예를 들면, Li와 Qi[21]는 낮은 농도의 L-arginine을 척수내 주입하였을 때 formalin에 의해 유발된 통증을 억제하였으며, 높은 농도로 투여하였을 때는 증가시켰다. 반면에, Kawabata 등[22]은 낮은 농도의 L-arginine은 통증반응을 증가시켰고, 높은 농도에 의해서는 억제되었음을 보고하였고, Park 등[11]도 척수후각 뉴런에서 낮은 농도의 SNP는 탈분극을 발생시키고 높은 농도는 과분극을 발생시켜 농도 의존적으로 다른 결과가 발생됨을 보고하였다.

이전의 몇몇 연구에서 생체 내에서 생산된 고농도 산화질소는 숙주세포의 파괴, 쇼크에 의한 혈관확장, 조직의 상해, 세포 독성 등 유해한 성질을 보이는 것으로 보고하였으나[23,24], Park 등[11]의 연구에서와 같이 이 연구에서도 높은 농도 (1 mM)의 SNP가 척수후각 뉴런에서 가역적인 막전압의 과분극을 유발하였다. 이와 같은 결과가 NO의 발생에 의한 것인지를 알아보기 위하여 NO 억제제인 hemoglobin과 c-PTIO를 처리하여 SNP에 의해 발생된 과분극이 억제됨을 관찰하였다(Fig. 1).

NO는 혈관과 기도의 평활근에서 cGMP에 의존적인 단백질 키나아제를 자극하여  $BK_{Ca}$  통로를 활성화시켜 근이완을 유발하며[25], 결장 평활근 세포에서는 세포막을 직접 s-nitrosylation 시킴에 의해  $BK_{Ca}$  통로의 활성을 증가시켰다[26]. 또한 뇌하수체 후엽의 신경말단에서도 NO가  $BK_{Ca}$  통로의 활성을 조절한다고 보고되었다[27]. 이 연구에서도  $BK_{Ca}$  차단제인 charybdotoxin과 TEA 1 mM을 전처리하였을 때 두 차단제 모두 SNP의 과분극을 유의하게 억제하여 SNP에 의해 유발된 NO는 주로

BK<sub>Ca</sub> 통로에 작용하여 막전압을 과분극 시켰음을 확인하였다(Fig. 2).

산화질소 합성효소에는 세 종류의 동종 효소가 있으며, 기능적으로 구성분형(constitutive form)과 유도형(inducible form)으로 나눈다[28]. 구성분형은 혈관의 내피세포, 신장 세뇨관의 상피세포 등에 있는 내피세포형 산화질소 합성 효소 (endothelial NOS; eNOS)와 중추신경계와 말초신경계의 신경세포에 있는 신경세포형 산화질소 합성 효소 (neuronal NOS; nNOS)로 구분되며 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin 의존성이기 때문에 세포질내의 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의해 자극된다[29]. Ca<sup>2+</sup>의 증가는 세포외부로부터 전압 의존성 칼슘 통로를 통하여 세포내로 유입되거나 NMDA 수용체를 통하여 증가되며[30], 세포내 Ca<sup>2+</sup> 저장소인 ER로부터 방출되어 조절되기도 한다[31].

SNP에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가의 근원지는 Ca<sup>2+</sup>을 제거한 세포외 용액과 세포질 내 ER의 Ca<sup>2+</sup>을 고갈시키는 thapsigargin으로 확인하였다. 세포외 Ca<sup>2+</sup>을 제거한 용액에서는 SNP에 의한 과분극이 여전히 발생하였으며, thapsigargin을 전처리하고 SNP를 투여하였을 때는 SNP에 의한 과분극이 발생하지 않는 것으로 보아 NO에 의한 과분극은 세포내 ER로부터 방출된 Ca<sup>2+</sup>에 의존적임을 확인하였다 (Fig. 3). 특히, thapsigargin 전처리 후 SNP는 오히려 탈분극을 유발하였는데, 이 결과는 저농도의 SNP에 의해 탈분극을 유발하는 이전의 연구결과 [11]와 관련되어 있다. 즉, NO가 보통 과분극을 유발하는 통로와 탈분극을 유발하는 통로에 동시에 작용하고 있으며, 과분극을 유발하는 통로의 억제에 의해 탈분극이 발생되었다고 추측할 수 있다.

ER로부터 유리되는 Ca<sup>2+</sup>은 RyR과 IP<sub>3</sub> 수용체를 통하여 방출된다. SNP에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가가 두 수용체중 어떤 수용체를 통하는지 확인하기 위하여 RyR과 IP<sub>3</sub>R 차단제를 전처리한 후 SNP 투여 효과를 관찰하였다. 결과적으로 RyR 억제제인 dantrolene은 SNP의 과분극을 유의하게 억제하였으나 IP<sub>3</sub>R 차단제인 2APB는 막전압에 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4). ER에서 RyR은 세포내에서 칼슘의 양을 조절하는 칼슘채널로 시냅스 가소성을 포함하여 여러 신경세포의 기능조절에 관여하고 근 수축에 필수적이며 세포내 산화작용과 질산화작용에 민감하게 반응하여 이러한 작용의 감지기로서의 역할을 한다 [32,33]. 또한, NO에 의한 RyR의 Ca<sup>2+</sup> 분비는 NO 작용기전의 대표적인 표적으로 알려진 soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor에 유의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며[34], 이러한 결과는 sGC-cGMP 기전과 독립적인 NO의 또 다른 기전으로 알려진 RyR 단백질의 s-nitrosylation에 의한 것이라고 추측할 수 있다.

요약하면 이 연구에서 고농도의 SNP는 통증전달에 일차적 중계역할을 하는 척수후각의 아교질 세포에서 RyR에 의존적인 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 통하여 BK<sub>Ca</sub> 통로를 활성화시키고 막전압을 과분극 시켰다. 이러한 작용은 고농도의 NO가 신경세포 흥분성을 감소시켜 통증을 억제하는 효과가 있음을 의미한다.

## 감사의 글

이 논문은 2013년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## References

1. Cheng LZ, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ. Ryanodine receptors contribute to the induction of nociceptive input-evoked long-term potentiation in the rat spinal cord slice. *Mol Pain*. 2010;6:1-12. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1744.8069.6.1.
2. Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends in Neurosci*. 2002;25:510-517. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0166.2236(02)02254.3.
3. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev*. 2007;8:766-775. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrn2214.
4. Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide*. 2011;25:243-254. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.004.
5. Guan Y, Yaster M, Raja SN, Tao YX. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain*. 2007;3:29-39. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1744.8069.3.29.
6. Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, Ono H. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacol*. 2009;56:702-708. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.12.003.
7. Chu YC, Guan Y, Skinner J, Raja SN, Johns RA, Tao YX. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's

- adjuvant-induced persistent pain. *Pain*. 2005;119:113-123. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2005.09.024.
- 8.Coderre TJ, Yashpal K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur J Neurosci*. 1994;6:1328 - 1334. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1460.9568.
  - 9.Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neurosci*. 1994;60:367 - 374. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0306.4522.
  - 10.Chung E, Burke B, Bieber AJ, Doss JC, Ohgami Y, Quock RM. Dynorphin-mediated antinociceptive effects of L-arginine and SIN-1 (an NO donor) in mice. *Brain Res Bull*. 2006;3:245-250. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.05.008.
  - 11.Park AR, Lee HI, Semjid D, Kim DK, Chun SW. Dual effect of exogenous nitric oxide on neuronal excitability in rat substantia gelatinosa neurons. *Neural Plas*. 2014; 10:1155-1165. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014.628531.
  - 12.Wu BN, Chen CF, Hong YR, Howng SL, Lin YL, Chen IJ. Activation of BKCa channels via cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases by eugenosedin-A in rat basilar artery myocytes. *Br J Pharmacol*. 2007;152:374-385. doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707406.
  - 13.Gribkoff VK, Starrett JEJ, Dworetzky SI. Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist*. 2001;7:166 - 177. doi:http://dx.doi.org/10.1177/107385840100700211.
  - 14.Salkoff L, Butler A, Ferreira G. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:921-931. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrn1992.
  - 15.McManus OB. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J Bioenerg Biomembr*. 1991;23:537 - 560. doi:http://dx.doi.org/10.1007/BF00785810.
  - 16.Lu YF, Hawkins RD. Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol*. 2002;88:1270-1278. doi:http://dx.doi.org/10.1152/jn.01036.2001.
  - 17.Galante M, Marty A. Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse. *J Neurosci*. 2003;23:11229-11234.
  - 18.Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev*. 2005;85:201-279. doi:http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00004.
  - 19.Coskun S, Karatas F, Acarturk F, Olmus H, Selvi M, Erbas D. The effect of L-NAME administrations after oral mucosal incision on wound NO level in rabbit. *Mol Cellular Biochem*. 2005;278:65-69. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11010.005.6628.6.
  - 20.Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxidized on nociception. *Brain Res*. 2001;897:9-19. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006.8993(01)01995.3.
  - 21.Li K, Qi WX. Effects of multiple intrathecal administration of L-arginine with different doses on formalin-induced nociceptive behavioral responses in rats. *Neurosci Bull*. 2010;26:211-218. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s12264.010.0127.9.
  - 22.Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br J Pharmacol*. 1994;112:547-550. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1476.5381.
  - 23.Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994;9:1199-206. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140.6736(94)92405.8.
  - 24.Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288:481-487. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003.9861(91)90224.7.
  - 25.Savaria D, Lanoue C, Cadieux A, Rousseau E. Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *Am J Physiol*. 1992;262:327-336.
  - 26.Lang RJ, Watson MJ. Effects of nitric oxide donors, S-nitroso-L-cysteine and sodium nitroprusside, on the whole-cell and single channel currents in single myocytes of the guinea-pig proximal colon. *Br J Pharmacol*. 1998; 123:505-517. doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701605.
  - 27.Ahern GP, Hsu SF, Jackson MB. Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial K<sup>+</sup> channels. *J Physiol*. 1999; 520:165-176. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469.7793.1999.00165.
  - 28.Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Muread F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88: 1788-1792. doi:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.5.1788.
  - 29.Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:213-233. doi:http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.001241.
  - 30.Marty A. Ca-dependent K<sup>+</sup> channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*. 1981; 291:497-500. doi:http://dx.doi.org/10.1038/291497a0.
  - 31.Rizzuto R. Intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11:306-311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0959.4388(00)00212.9.
  - 32.Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sup>2</sup> sensor and NO signaling functions. *Cell*. 2002;102:499-509. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092.8674(00)00054.4.
  - 33.Pessah IN, Kim KH, Feng W. Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Front Biosci*. 2002;7:72 - 79. doi:http://dx.doi.org/10.2741/pessah.
  - 34.Galione A. CyclicADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;98:125-131. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0303.7207(94)90130.9.