

Detection of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Living Rat Trigeminal Caudal Neurons

Hae In Lee and Sang Woo Chun*

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

(received May 29, 2015; revised Jun 14, 2015; accepted Jun 15, 2015)

Growing evidence suggests that mitochondrial reactive oxygen species (ROS) are involved in various pain states. This study was performed to investigate whether ROS-induced changes in neuronal excitability in trigeminal subnucleus caudalis are related to ROS generation in mitochondria. Confocal scanning laser microscopy was used to measure ROS-induced fluorescence intensity in live rat trigeminal caudalis slices. The ROS level increased during the perfusion of malate, a mitochondrial substrate, after loading of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), an indicator of the intracellular ROS; the ROS level recovered to the control condition after washout. When pre-treated with phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) and 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), malate-induced increase of ROS level was suppressed. To identify the direct relation between elevated ROS levels and mitochondria, we applied the malate after double-loading of H₂DCF-DA and chloromethyl-X-rosamine (CMXRos; MitoTracker Red), which is a mitochondria-specific fluorescent probe. As a result, increase of both intracellular ROS and mitochondrial ROS were observed

simultaneously. This study demonstrated that elevated ROS in trigeminal subnucleus caudalis neuron can be induced through mitochondrial-ROS pathway, primarily by the leakage of ROS from the mitochondrial electron transport chain.

Key words: trigeminal caudal neurons, electron transport complex, mitochondrial ROS, confocal microscopy

서론

삼차신경 척수감각핵은 구강 악안면 영역으로부터의 무수 신경섬유(C섬유)와 직경이 얇은 유수 신경섬유(A δ 섬유)의 구심성 신호를 받고 있어서 유해성 정보를 전달하는데 1차적 중계역할을 하는 곳으로 알려져 있으며, 척수후각(spinal dorsal horn)과 유사한 점을 많이 가지고 있어 연수후각(medullary dorsal horn)이라고도 표현한다 [1,2].

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 과산화수소(H₂O₂), superoxide 음이온(O₂⁻), 수산화기(hydroxyl radical; ·OH), 산화질소(NO), 과산화질산염(peroxynitrite; ONOO⁻) 등을 포함하는데 조직손상이나 증가된 유해반응과 관련된 다[3-6]. 활성산소는 superoxide dismutase나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화 활성에 의해 정밀하게 조절 된다[7]. 그러나 활성산소의 생성이 증가하거나 항산화 방어가 감소하면 산화자극을 유발하게 되고 [8], 이는 세포내 단백질, DNA, 지질 등의 손상을 초래 한다[9,10].

*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

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.

신경조직에서 ROS는 다양한 경로를 통해서 얻어지는데 미토콘드리아의 산화적 인산화반응 과정에서 O_2^- 의 생성, xantine dehydrogenase에서 xantine oxidase로의 전환, NO synthase 활성화에 의한 NO 생성 등으로부터 얻어진다[11,12]. 이 과정 중에서 가장 대표적인 경우는 미토콘드리아의 전자전달계(electron transport complex;ETC) 과정 중 complex I과 III에서 O_2^- 를 방출하는 것이다[13].

척수후각 뉴론의 미토콘드리아에서 발생된 ROS가 통증 조절에 관여한다는 연구가 최근에 보고되고 있는데, 척수신경을 절찰하여 신경병증성 통증을 유발시킨 흰쥐와[14] 피부내 capsaicin 투여로 통증을 유발시킨 생쥐에서[15] 척수후각 뉴론의 미토콘드리아에서 superoxide가 증가됨이 관찰되었고, 척수에 전자전달계 억제제 투여에 의해 superoxide의 증가와 통증 행동반응의 증가를 나타냈다[12]. 또한 superoxide dismutase (SOD) 유사물질인 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) 처치에 의해 몇 가지 만성통증 모델에서 통증을 감소시켰는데 [16-18], 이는 척수후각 뉴론으로부터 발생된 O_2^- 가 만성통증을 발생시키는데 주요한 발생원이며 그것의 감소가 통증을 억제시켰다고 생각할 수 있다.

이와 같이 통증과 미토콘드리아에서 발생하는 ROS와의 밀접한 관련성이 있음에도 불구하고 현재까지는 주로 항산화제나 미토콘드리아 억제약물을 사용하여 그 작용기전을 탐구하는 연구가 주로 시행되었으며, 직접적으로 미토콘드리아에서 ROS 발생을 확인하는 연구는 드문 실정이었다. 따라서 이 연구에서는 미토콘드리아 전자전달 복합체의 기질이 실제로 ROS를 발생시키는가를 확인하고 이것이 통증을 유발하는지를 알아보고자 약안면 통각전달에 일차적 중계역할을 하는 삼차신경 척수감각핵 미측소핵 세포에서 전자전달계 작용약물의 반응을 patch clamp방법과 공초점 현미경을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

뇌절편 제작

생후 13일-18일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였으며, 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인을 얻었다. 흰쥐를 ether로 마취한 후 단두하여 소뇌와 뇌간부위를 적출하여 0-4°C의 Na^+ 의 농도를 낮춘 절단용액에 넣은 다음 순간접착제 (cyanoacrylate adhesive)를 이용하여 뇌조직을 고정시켰다. 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하면서 조직절편기 (vibratome 752M, Campden,

UK)를 이용하여 삼차신경 척수감각핵 미측소핵 부위를 150-350 μm 두께로 관상면 절단하여 뇌절편을 만들었다. 절단 중 계속 온도 조절기(model 765, Campden)를 이용하여 용액의 온도를 1-2 °C 정도로 낮게 유지 시켰다. 뇌절편은 32°C의 인공 뇌척수액 용액에 1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 뇌절편을 현미경위의 기록용기(1 ml)에 옮긴 후 치실로 만든 그물로 움직이지 않도록 고정된 후 시행하였고, 실험기간 동안 계속해서 95% O_2 -5% CO_2 가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, France)를 이용하여 관류시켰다(2-3 ml/min).

실험용액

뇌절편 제작에 사용했던 절단용액의 조성은 252 mM Sucrose, 2.5 mM KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 26 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM NaH_2PO_4 등으로 구성되었으며, 막전압을 기록하기 위한 세포외 용액의 조성은 117 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 11 mM glucose 이었고 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 세포내 용액은 150 mM K-Glu, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 5 mM MgATP, 0.3 mM Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 첨가하여 7.3으로 조정하였다.

실험에 사용한 malate, succinate, *N*-tert-butylnitron (PBN), 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) 등은 Sigma 사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCF -DA), dihydroethidium (DHE), MitoTracker Red CMXRos는 Molecular Probes 사 (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 중력을 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압과 전류의 기록은 whole cell patch clamp 방법을 사용하였다. 미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, Japan)와 microforge (MF-830, Narishige)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연질 유리미세관(TW150-3, WPI, Sarasota, FL, USA)을 저항이 5-8 M Ω 이 되도록 기록전극을 제작하였다. 10배의 대물렌즈로 삼차신경 척수감각핵 미측소핵 부위를 확인한 후 전극에 양압을 가하면서 미세 전극조절기 (ROE-200, Sutter, Novato, CA, USA)를 이용하여 30° 경사를 유지하면서 세포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 피펫의 저항이 순간적으로 증가하는 것

으로 세포에 근접함을 확인한 후 양압을 풀고 음압을 가하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. Gigaohm seal을 이룬 후 10-20분 경과하여 막전압이 -45 mV 이하로 안정되었을 때 기록을 시작하였다. 전압 측정에는 Axopatch 200B 증폭기(Axon, Foster City, CA, USA)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (version 9.0, Axon)를 사용하여 실험수행의 명령과 얻어진 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 발생한 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실험실에서 시행하였다.

형광이미지 측정

세포내 활성산소 생성 정도는 H₂DCF-DA, DHE assay로 측정하였고, 미토콘드리아 내 활성산소 생성 정도는 MitoTracker Red CMXRos assay로 측정하였다. 150 μm의 뇌절편은 H₂DCF-DA (10 μM), DHE (20 μM), MitoTracker Red CMXRos (100 nM) dye를 넣은 32°C의 세포외 용액에서 각각 15분, 10분, 30분간 loading 하였다. 이후 뇌절편은 공초점 레이저 형광현미경 (LSM 510, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 ×400 배율로 관찰 하였으며, excitation 파장은 488 nm (argon laser), emission 파장은 505 nm 이었다. Image time series를 이용하여 30초마다 연속이미지를 기록하였으며, 약물 투여 후 시간 경과에 따른 세포 내의 형광 강도 변화를 관찰하였다.

실험자료의 분석

막전압의 분석은 Clampfit (version 9.0, Axon)을 이용하였고, 세포내 활성산소 생성 정도는 LSM 510 image analysis software (Carl Zeiss)를 이용하였다. 약물처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 independent t-test를 이용하였고 약물처리 전후비교는 paired t-test를 이용하였으며, p<0.05에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균값±표준오차 (mean±SEM)로 표시하였다.

결 과

삼차신경 척수감각핵 미측소핵 세포 흥분성에 대한 전자전달 복합체 기질의 효과

삼차신경 척수감각핵 미측소핵 세포의 흥분성에 대한 전자전달 복합체 기질의 효과를 조사하기 위하여 patch clamp 방법을 이용하여 막전압을 기록하였다. 전류고정법으로 지속적으로 막전압을 기록하면서 복합체 I의 기질로 알려진 malate를 10 mM 투여하였을 때 4.1±0.5 mV

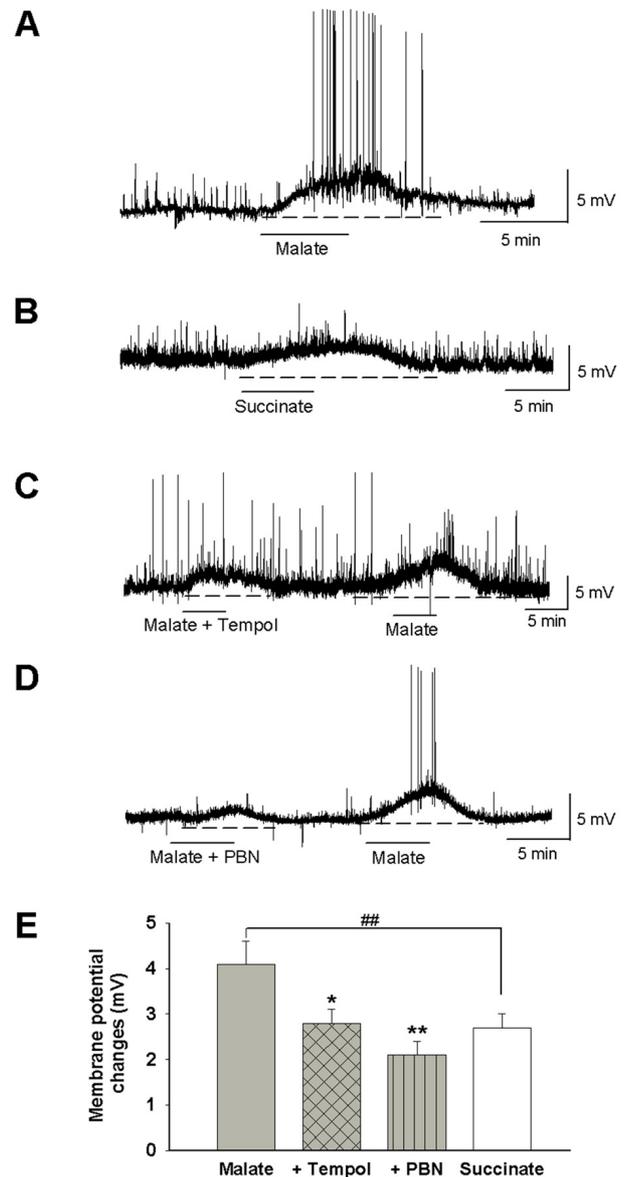


Fig. 1. Effects of mitochondrial substrates on membrane potential of trigeminal caudal neurons in patch clamp recording.

(A) Application of malate (10 mM) for 5 min caused a reversible membrane depolarization and firing activity. (B) Application of succinate (10 mM) also induced membrane depolarization. (C) Addition of TEMPOL decreased the malate-induced depolarization. (D) Addition of PBN effectively antagonized the malate-induced depolarization. Dashed line indicates resting membrane potential before drug application. (E) Malate-induced depolarization under control condition and coapplication of antioxidants. *: Values are significantly different from the malate by paired t-test (p<0.05). **: p<0.01. ###: Values are significantly different from the malate by independent t-test (p<0.01). Means ± SEM.

(n=18)의 탈분극이 관찰되었고 그 중 일부의 세포에서는 약물투여 후 활동전압이 발생되었으며 이는 약물이 포함

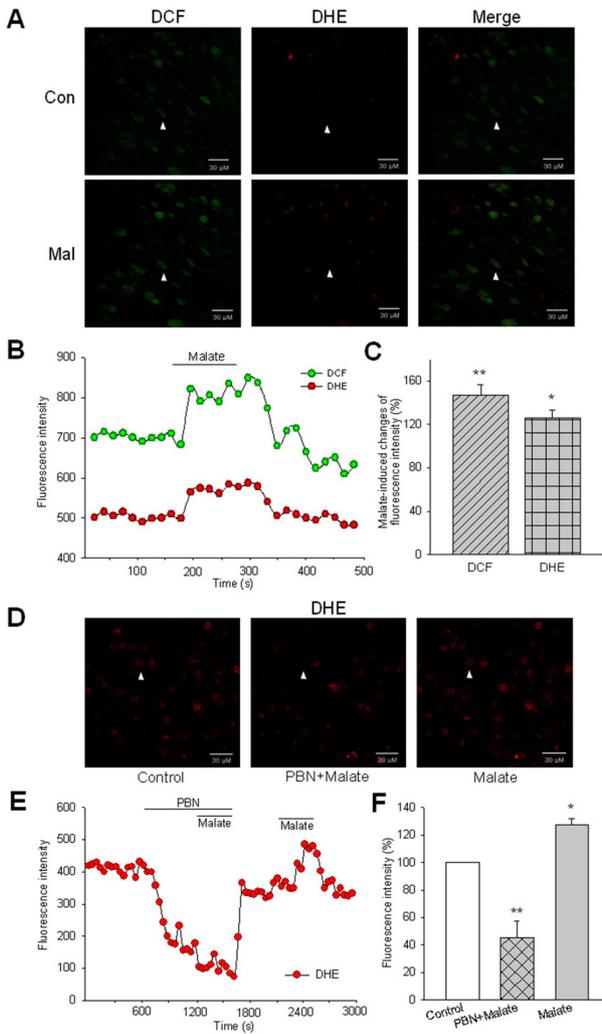


Fig. 2. Measurement of ROS using confocal microscopy and suppression of fluorescence intensity by ROS scavenger. Trigeminal caudalis slices were stained with DCF (10 μ M) and DHE (20 μ M) for 15 and 10 min, respectively, and fluorescence images of the slices were obtained by laser confocal microscopy. (A, B) Addition of malate (10 mM) increased fluorescence intensity (triangles indicate an analyzed cell in B). (C) Percent changes of fluorescence intensity. *: Values are significantly different from the control (before malate application) by paired t-test ($p < 0.05$). **: $p < 0.01$. (D, E) Pretreatment of PBN (2 mM) reduced ROS generation, and prevented malate-induced fluorescence increase (triangles indicate an analyzed cell in D). (F) Percent changes of fluorescence intensity by application of PBN and malate. Means \pm SEM.

되지 않은 용액으로 처리하였을 때 서서히 원상태로 회복되었다(Fig. 1A, E). 복합체 II의 기질인 succinate 10 mM을 투여하였을 때는 2.7 ± 0.3 mV ($n=15$)의 탈분극이 발생하였다(Figs. 1B, E).

주로 O_2^- 에 작용하여 항산화 작용을 나타내는 TEMPOL과 광범위 항산화제인 PBN을 세포외액에 전 처리한 후

malate를 투여 하였을 때는 malate에 의한 탈분극이 각각 2.8 ± 0.3 mV ($n=9$, $p < 0.05$)(Fig. 1C, E), 2.1 ± 0.3 mV ($n=7$, $p < 0.01$)(Fig. 1D, E)로 통계적으로 유의하게 억제되었다.

삼차신경 척수감각핵 미측소핵세포내 활성산소의 확인

Malate 투여가 실제로 세포내 활성산소를 생성하는지를 확인하기 위하여 공초점 레이저 형광현미경으로 광범위한 ROS에 반응하는 $H_2DCF-DA$ 와 O_2^- 에 특이적으로 반응하는 DHE의 형광강도를 측정하였다. $H_2DCF-DA$ (10 μ M)와 DHE (20 μ M)로 loading된 뇌절편에 5분간 malate (10 mM)을 관류하였을 때 각각 $147.2 \pm 9.5\%$ ($n=7$, $p < 0.01$), $125.8 \pm 7.0\%$ ($n=7$, $p < 0.05$)로 형광강도가 유의하게 증가하였고, 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 원래 상태로 회복되었다(Figs. 2A, B, C).

항산화제가 malate의 O_2^- 생성을 억제할 수 있는지를 확인하고자 DHE가 포함된 세포외 용액에서 뇌절편을 10분간 loading한 후 기록하였다. PBN을 전처리 하였을 때 형광강도는 크게 감소하였으며 전처리후 malate에 의

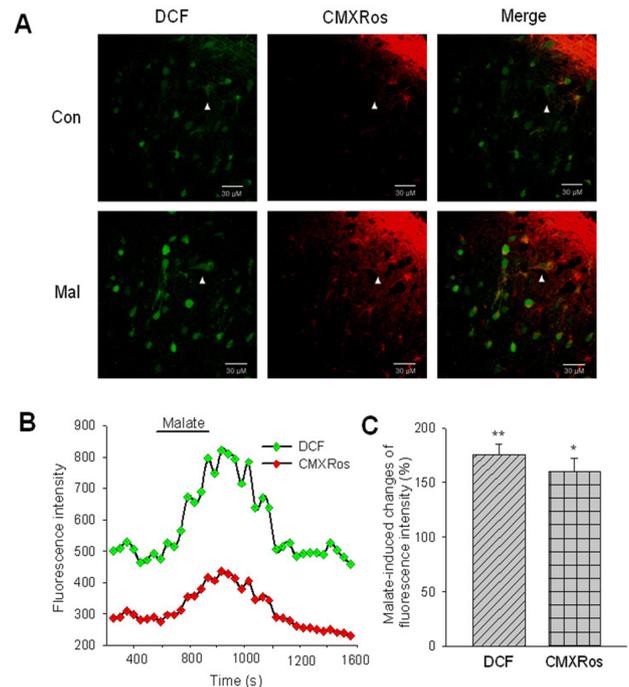


Fig. 3. Localization of ROS generation identified by DCF and CMXRos dye. Slices were double-loaded with DCF (10 μ M) and CMXRos (100 nM) for 15 and 30 min, respectively. (A, B) Addition of malate (10 mM) increased fluorescence intensity of both DCF and CMXRos (triangles indicate an analyzed cell in B). (C) Percent changes of malate-induced fluorescence increase. *: Values are significantly different from the control (before malate application) by paired t-test ($p < 0.05$). **: $p < 0.01$. Means \pm SEM.

한 형광반응의 증가는 관찰되지 않았다($n=5$, $p<0.01$) (Figs. 2D, E, F).

Malate에 의한 미토콘드리아 내 활성산소의 발생

미토콘드리아 전자전달계 기질로 알려진 malate가 실제로 미토콘드리아 내 활성산소를 생성하는지 확인하기 위하여 미토콘드리아 내 활성산소를 측정하는 탐식자 CMXRos를 사용하였다. DCF (10 μ M)와 CMXRos (100 nM)로 이중형광염색을 실시하여 malate를 투여한 결과 각각 $175.7\pm 9.6\%$ ($n=6$) ($p<0.01$), $160.0\pm 11.9\%$ ($n=6$) ($p<0.05$)로 형광강도가 유의하게 증가하였고, 형광강도 증가부위가 겹치는 형태를 나타내었다(Fig. 3). 따라서 malate에 의한 흥분성의 증가는 미토콘드리아 내 전자전달 과정 중 발생된 활성산소종에 의하여 발생하였음을 확인하였다.

고 찰

ROS는 조직손상이나 증가된 유해반응에 의하여 세포 내에서 증가하여 세포독성을 일으키고 세포죽음과 관련되며, 여러 가지 생리적 기능을 조절하는 세포조절물질로서의 역할도 보고되고 있는데[19-21], 최근에는 ROS가 통증발생에 관여한다고 보고되었다[6,16]. 신경조직에서 ROS는 다양한 경로를 통해서 얻어지는데 가장 대표적인 경우는 정상적인 대사과정 동안에 미토콘드리아의 전자전달계(electron transport complex; ETC)에서 발생하는 것이다[13,22]. 미토콘드리아의 전자전달계는 I-V 복합체로 구성되는데, I 복합체는 NADH oxidoreductase라고 하고 glutamate, pyruvate, malate가 기질로 작용한다. I 복합체는 정상 생리적 기능을 유지하고 있을 때 주요한 ROS의 공급원으로 기질측에 위치한 flavin site와 막간강측에 위치한 quinone site에서 O_2^- 를 방출한다. II 복합체는 succinate dehydrogenase라고 하며 succinate가 기질로 작용한다 [23,24]. III 복합체는 ROS 발생에 가장 중요한 장소로 막간강측에 위치한 Qo center와 내막에 위치하여 기질과 접하고 있는 Qi center로 구성되며 각각 막간강과 기질에 O_2^- 를 방출한다[25,26]. IV복합체는 cytochrome C oxidase가 매개하고 전자를 전달받아 산소와 결합하여 물을 형성하며, V 복합체는 ATP synthase를 가지고 있어 막간강측에 있는 H^+ 이온이 기질로 들어올 때 ATP를 생산한다[13].

이 연구에서는 복합체 I, II의 기질인 malate와 succinate를 처리하여 전자전달계를 활성화 시켰는데 발생된 ROS는 각각 4.1 ± 0.5 mV, 2.7 ± 0.3 mV의 탈분극을 유발하였고, 탈분극은 약물제거 후 원상태로 회복되는 가역적인 반응을 보였다(Fig. 1). Malate에 의한 ROS 발생의 확인은 세

포내 활성산소를 측정하는데 일반적으로 사용되는 DCF와 O_2^- 에 특이적으로 반응하는 DHE[27-29]를 사용하였는데 malate에 의해 형광 강도가 증가되었고, 약물제거 후 원상태로 회복되었다(Fig. 2). 이는 통증에 관여하는 ROS의 작용은 영구적인 세포죽음을 일으키는 것이 아닌 정상적인 세포내 신호조절물질로써의 작용 혹은 경미한 산화 자극에 의한 일시적인 기능변화를 일으킨 상태임을 의미한다.

Malate에 의해서 발생된 탈분극은 O_2^- 에 작용하여 항산화 작용을 나타내는 TEMPOL과 H_2O_2 , O_2^- , $\cdot OH$ 등 광범위한 ROS를 scavenging 할 수 있는 PBN에 의하여 유의하게 억제되었으며(Fig. 1), malate에 의해 DHE 형광강도의 증가가 PBN에 의해 유의하게 감소하는 것을 확인하였는데(Fig. 2), 이는 Gwak 등[30]의 척수손상 모델에서 ROS에 의해 상승된 DHE 형광강도가 PBN에 의해 억제된 결과와 유사하였다.

미토콘드리아 I, III 복합체는 ROS의 주 발생원으로 주로 O_2^- 를 방출한다. 그러나 O_2^- 는 세포막의 투과성이 낮아 미토콘드리아 막간강과 기질에 방출되면 세포질로의 이동이 쉽지 않아 세포에 영향을 미치기가 어렵다. O_2^- 는 superoxide dismutase에 의해 H_2O_2 로 전환되는데 이것은 세포막을 쉽게 확산으로 통과하여 막전압을 변화시킬 수 있으며[12,13,31], 다른 연구에서도 H_2O_2 가 transient receptor potential (TRP) 통로를 활성화 하거나 [32], ATP 민감성 K^+ 통로의 열림을 조절하여[33] 막전압을 변화시킨다고 보고되었다. 이 연구에서도 O_2^- 에 특이적으로 작용하는 TEMPOL에 의한 억제효과보다 광범위한 ROS를 scavenging 할 수 있는 PBN에 의한 억제효과가 더 크게 나타난 것은 O_2^- 외에도 H_2O_2 , $\cdot OH$ 등이 관여하였다는 것을 의미하며, 차후의 연구에서 H_2O_2 , $\cdot OH$ 등이 구체적으로 어떤 기전에 의해 막전압을 탈분극 시키는지 조사하고자 한다.

레이저를 이용한 공초점 현미경은 세포내 활성산소의 역할을 규명하는데 최근 많이 사용되는데 여러 가지 ROS와 RNS를 특이적으로 탐지할 수 있는 탐식자를 이용한다. 예를 들면, H_2DCF -DA는 비교적 비선택적인 탐식자로 세포질, 핵, 미토콘드리아의 활성산소와 반응하는 것으로 알려져 있다[34]. 이것은 세포내로 확산으로 이동하여 acetate group이 세포내 esterase에 의해 분해되며 2,7-dichlorofluorescein (H_2DCF)는 세포내에 남아 형광을 발현한다. 이 염료는 H_2O_2 뿐만 아니라 O_2^- , $\cdot OH$, NO, ONOO $^-$ 도 탐지한다고 보고되었다[35].

DHE는 세포 내의 O_2^- 를 측정하기 위한 선택적인 탐식자로, O_2^- 와 만나면 산화하여 ethidium bromide가 된다. 이것은 H_2O_2 에 대해 매우 낮은 민감성을 가지며

·OH, ONOO⁻ 등과도 잘 반응하지 않는다[36]. 한편, CMXRos (Mitotracker red)는 세포막을 통과할 수 있는 탐식자로 미토콘드리아에 특이적이다. 미토콘드리아는 전자전달 과정 중 O₂⁻을 방출하는데 이것은 망간 O₂⁻ dismutase (MnSOD)에 의해 H₂O₂로 전환되고 이어서 NO와 결합하여 ONOO⁻를 발생시킨다. 따라서 이 탐식자는 ROS와 RNS를 모두 탐지한다고 알려져 있다[34].

Lee 등[37]은 H₂DCF와 mitochondrial ROS marker인 CMXRos를 사용하여 미토콘드리아 내 활성산소 생성을 확인하였다. 이 연구에서도 malate가 실제로 미토콘드리아 내 활성산소를 생성하는지 확인하기 위하여 DCF와 CMXRos를 이중형광염색하여 실시하였는데, malate 처리에 의해 형광강도가 증가하였고, 형광강도 증가부위가 서로 겹치는 양상을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 malate에 의한 흥분성의 증가는 전자전달계 과정 중 발생한 활성산소종에 의하여 발생하였을 것으로 생각할 수 있다.

결론적으로 이 연구에서 미토콘드리아에서 발생한 ROS는 삼차신경 척수감각핵 미측소핵 세포를 탈분극시키는 것으로 보아 악안면 통증전달과정에 흥분적으로 작용하며 이러한 점은 ROS가 이전의 역치하 입력신호에 대하여 더 쉽게 활동전압을 발생시킬 수 있어 통증의 전달과정에 중요하게 관여할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Dubner R, Bennett GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:381-418.
- Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:57-91.
- Levy D, Zochodne DW. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci.* 1998;10:1846-1855.
- Khalil Z, Khodr B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Rad Biol Med.* 2001;31:430-439.
- Liu D, Liu J, Sun D, Wen J. The time course of hydroxyl radical formation following spinal cord injury: the possible role of the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Neurotrauma* 2004;21:805-816.
- Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:869-878.
- Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004;237:57-89.
- McGeer EG, McGeer PL. Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharm Res.* 1999;5:821-836.
- Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parman T, Winn LM. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res.* 1997;396:65-78.
- Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med.* 1999;5:582-585.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:509-517.
- Kim HY, Chung JM, Chung K. Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett.* 2008;447:87-91. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.041.
- Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:1373-1414. doi: 10.1089/ARS.2008.2331.
- Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett.* 2006;391:108-111.
- Schwartz ES, Kim HY, Wang J, Lee I, Klann E, Chung JM, Chung K. Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. *J Neurosci.* 2008;29:159-168. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3792-08.2009.
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliatalata G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004;111:116-124.
- Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol.* 2006;548:167-173.
- Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 2007;133:9-17.
- Gonzalez C, Sanz-Alfayate G, Agapito MT, Gomez-Niño A, Rocher A, Obeso A. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;132:17-41.

20. Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. The role of ROS and RNA in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm.* 2004;10:855-866.
21. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol.* 2006;21:69-80.
22. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemiareperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1065-1089.
23. Zoccarato F, Cavallini L, Bortolami S, Alexandre A. Succinate modulation of H₂O₂ release at NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. *Biochem J.* 2007;406:125-129.
24. Verkhovskaya ML, Belevich N, Euro L, Wikström M, Verkhovsky MI. Real-time electron transfer in respiratory complex I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:3763-3767. doi: 10.1073/pnas.0711249105.
25. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;278:36027-36031.
26. Hoffman DL, Brookes PS. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J Biol Chem.* 2009;284:16236-16245. doi: 10.1074/jbc.M809512200.
27. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992;5:227-231.
28. Wang J, Li G, Wang Z, Zhang X, Yao L, Wang F, Liu S, Yin J, Ling EA, Wang L, Hao A. High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. *Neuroscience* 2012; 202:58-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.062.
29. Lee HI, Park AR, Chun SW. Effects of NaOCl on Neuronal Excitability and Intracellular Calcium Concentration in Rat Spinal Substantia Gelatinosa Neurons. *Int J Oral Biol.* 2013;38:5-12. doi: <http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2013.38.1.005>
30. Gwak YS, Hassler SE, Hulsebosch CE. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain and locomotor dysfunction via activation of CamKII in remote segments following spinal cord contusion injury in rats. *Pain* 2013;154:1699-1708. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.018.
31. Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP, Peña DM, Rice ME. Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J Neurosci.* 2003;23:2744-2750.
32. Bao L, Avshalumov MV, Rice ME. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. *J Neurosci.* 2005;25:10029-10040.
33. Avshalumov MV, Chen BT, Koos T, Rice ME. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci.* 2005;25:4222-4231.
34. Shanker G, Aschner JL, Syversen T, Aschner M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Mol Brain Res.* 2004;128:48-57.
35. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:146-159.
36. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 1994;55:253-258.
37. Lee SB, Bae IH, Bae YS, Um HD. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem.* 2006;281:36228-36235.