

Effects of Reactive Oxygen Species and Nitrogen Species on the Excitability of Spinal Substantia Gelatinosa Neurons

Joo Young Park, Areum Park, and Sang Woo Chun*

Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant, Wonkwang University, Iksan 570-749
(received September 06, 2016; revised September 13, 2016; accepted September 14, 2016)

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) are both important signaling molecules involved in pain transmission in the dorsal horn of the spinal cord. Xanthine oxidase (XO) is a well-known enzyme for the generation of superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$), while S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) is a representative nitric oxide (NO) donor. In this study, we used patch clamp recording in spinal slices of rats to investigate the effects of $O_2^{\cdot -}$ and NO on the excitability of substantia gelatinosa (SG) neurons. We also used confocal scanning laser microscopy to measure XO- and SNAP-induced ROS and RNS production in live slices. We observed that the ROS level increased during the perfusion of xanthine and xanthine oxidase (X/XO) compound and SNAP after the loading of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$), which is an indicator of intracellular ROS and RNS. Application of ROS donors such as X/XO, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and 3-morpholinopyridone (SIN-1) induced a membrane depolarization and inward currents. SNAP, an RNS donor, also induced membrane depolarization and inward currents.

*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
ORCID : 0000-0001-8083-0124

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.

X/XO-induced inward currents were significantly decreased by pretreatment with phenyl N-tert-butyl nitron (PBN; nonspecific ROS and RNS scavenger) and manganese(III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP; superoxide dismutase mimetics). Nitro-L-arginine methyl ester (NAME; NO scavenger) also slightly decreased X/XO-induced inward currents, suggesting that X/XO-induced responses can be involved in the generation of peroxynitrite (ONOO $^-$). Our data suggest that elevated ROS, especially $O_2^{\cdot -}$, NO and ONOO $^-$, in the spinal cord can increase the excitability of the SG neurons related to pain transmission.

Key words: substantia gelatinosa neuron, superoxide, nitric oxide, excitation, patch clamp

서론

척수 아교질 신경세포(substantia gelatinosa, SG)는 신체의 유해한 통각정보를 A δ -섬유와 C-섬유 같은 일차 감각 신경섬유를 통해 전달받고, 이웃하는 lamina I 과 IV등의 투사신경세포(projection neuron)를 통하여 상위중추로 정보를 전달한다[1,2]. 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 H_2O_2 , superoxide ($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl radical, nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO $^-$)을 포함하는데, 이 중에서 NO, ONOO $^-$ 는 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)로 분류하기도 한다. 신경조직에서 ROS는 미토콘드리아에서 전자전달 과정 중에 $O_2^{\cdot -}$ 가 방출되거나, NO synthase (NOS) 활성화에 의한 NO 생성, NO와 $O_2^{\cdot -}$ 의 결합으로 인한 ONOO $^-$ 의 생성 등으로부터 얻어진다[3,4].

ROS는 정상 이상의 농도에서는 세포손상을 일으킬 수 있으나, 세포내 항산화계의 작용으로 적정량이 유지되면 세포내 신호전달물질로 작용한다. ROS가 통증의 발생과 조절에 관여한다는 연구는 척수신경 결찰에 의해 신경병증성 통증을 유발시킨 흰쥐와[5], 피부에 capsaicin 투여로 통증을 유발시킨 생쥐에서[6] 척수후각 뉴론의 미토콘드리아에서 O_2^- 가 증가됨이 관찰되었고, 척수에 전자전달계 억제제 투여에 의해 O_2^- 의 증가와 통증 행동반응의 증가[4] 등이 보고되었다. 이러한 연구는 척수후각 뉴론에서 발생된 O_2^- 가 통증을 발생시키는 데 중요하며 O_2^- 의 감소가 통증을 억제시키는 요인이라고 생각할 수 있다.

그러나 NO의 통증에 대한 역할은 확실하지 않은데, 통증 유발효과와 진통효과가 같이 보고되어 있다. 예를 들면, 신경손상에 의해 유발된 과민성은 NOS 억제제의 투여나 nNOS 유전자를 제거한 생쥐에서 감소하였으며[7-9], 다른 연구에서는 L-arginine과 O_2^- donor인 SIN-1을 같이 뇌실에 투여하거나[10], sodium nitroprusside를 발바닥 피부에 주입하여 진통효과를 유발함이 보고되었다[11].

본 연구실에서는 ROS의 통증조절에 대한 역할을 추구하기 위하여 여러 가지 ROS donor의 척수 아교질 세포의 흥분성에 미치는 영향에 관한 연구를 진행하였다. Hypochlorite (HOCl)을 발생시키는 NaOCl에 의해 아교질 세포의 막전압의 변화와 세포내 칼슘농도의 증가를 확인하였고[12], NO donor인 SNP에 의해 농도에 따라 다른 막전압에 대한 효과와 이와 관련된 이온전류를 규명하였으며[13], 최근에는 hydroxyl radical (OH)을 발생시키는 tert-buthylhydroperoxide (t-BOOH)를 척수에 주입하여 통각과민을 유발하였고 아교질 세포의 흥분성 시냅스후 전압의 증가를 보고하였다[14].

이 연구에서는 ROS의 한 종류인 O_2^- 와 대표적 RNS인 NO가 통증전달에 1차적 중계역할을 하는 척수후각 세포의 신경 흥분성에 어떻게 작용하는지를 알아보고 그 효과에 차이가 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 흰쥐에서 척수후각 세포의 흥분성에 대한 X/XO와 SNAP의 효과를 patch clamp 방법으로 조사하였으며, 또한 X/XO와 SNAP가 세포내에서 실제로 ROS 농도를 증가시키는지를 공초점 현미경을 이용하여 확인하였다.

재료 및 방법

척수절편 제작

생후 12-17일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정을 준

수하였다. 흰쥐를 ether로 마취한 후 25% urethane을 복강내 투여하였다. 흉추에서 천추까지 laminectomy로 척수를 노출한 후 요천수 팽대부에서 1 cm 정도의 척수를 절단하였다. 조직절편기(vibratome 752M, Campden, GB)를 이용하여 용액의 온도를 1-2 °C 정도로 낮게 유지하고 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하면서 두께 300 μ m의 척수절편을 절단하였다. 척수절편은 32 °C의 인공 뇌척수액에 1시간 정도 보관하여 정상적인 상태로 회복시켰고, 이후에 실험을 진행하였다. 기록은 척수절편을 현미경(BX50WI, Olympus, Japan) 위의 기록용기에 옮긴 후 시행하였고, 실험과정 동안 95% O_2 -5% CO_2 가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, France)를 이용하여 관류시켰다.

실험용액

막전압과 전류를 기록하기 위한 세포외 용액의 조성은 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 1.2 NaH_2PO_4 , 25 $NaHCO_3$, 11 glucose이었고 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하여 pH를 7.4 상태로 유지하였다. 유리전극 내에 주입하는 세포내 용액은 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 xanthine, xanthine oxidase (XO), S-nitroso-N-acetyl -DL-penicillamine (SNAP), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 3-morpholinomimine (SIN-1), N-tert-butylnitron (PBN), Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Manganese (III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP)는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였고 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA), dihydroethidium (DHE)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. MnTBAP는 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 적용은 증력을 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, USA)를 이용하여 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압과 전류의 기록을 위하여 whole cell patch clamp 방법을 이용하였다. 기록전극은 미세전극 제조기(PP-830, Narishige, Japan)를 이용하여 외경 1.5 mm의 유리관(TW150-3, WPI, USA)을 저항이 5-9 $M\Omega$ 이 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 세

포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 저항의 변화로 세포에 근접함을 확인한 후 음압을 주어 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. Whole cell을 만든 후 5-10분 정도 기다려 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 상태에서 기록을 시작하였다. 전압과 전류측정에는 Axopatch 200B 증폭기(Axon, USA)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1322 (Axon, USA) AD변환기를 통해 컴퓨터에 연결하였다. pCLAMP software (version 9.0, Axon, USA)를 사용하여 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

형광이미지 측정

세포내 활성산소 생성 정도는 H_2DCF -DA, DHE assay로 측정하였다. $150\ \mu\text{m}$ 의 척수절편은 H_2DCF -DA, DHE dye를 넣은 32°C 의 세포외 용액에서 각각 10-30분간 loading하였다. 이후 척수절편은 공초점 레이저 형광현미경 (LSM 510, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 $\times 400$ 배율로 관찰 하였으며, excitation 파장은 $488\ \text{nm}$ (argon laser), emission 파장은 $505\ \text{nm}$ 이었다.

실험자료의 분석

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

연구성적

척수 후각세포에서 X/XO, SNAP 투여에 의한 활성산소량 변화

Xanthine과 xanthine oxidase (X/XO), SNAP 투여가 실제로 척수 후각 아교질 세포내 활성산소를 생성하는지를 확인하기 위하여 공초점 레이저 형광현미경으로 광범위한 ROS에 반응하는 H_2DCF -DA와 $O_2^{\cdot-}$ 에 특이적으로 반응하는 DHE의 형광강도를 측정하였다. H_2DCF -DA ($10\ \mu\text{M}$)와 DHE ($20\ \mu\text{M}$)로 loading된 척수절편에 5분간 X/XO ($300\ \mu\text{M}/30\ \text{mU}$)를 관류하였을 때 각각 $158.6 \pm 6.2\%$ ($n=12$, $p < 0.001$), $145.7 \pm 8.6\%$ ($n=12$, $p < 0.01$)로 형광강도가 유의하게 증가하였고, 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 원래 상태로 회복되었다. H_2DCF -DA로 loading된 척수절

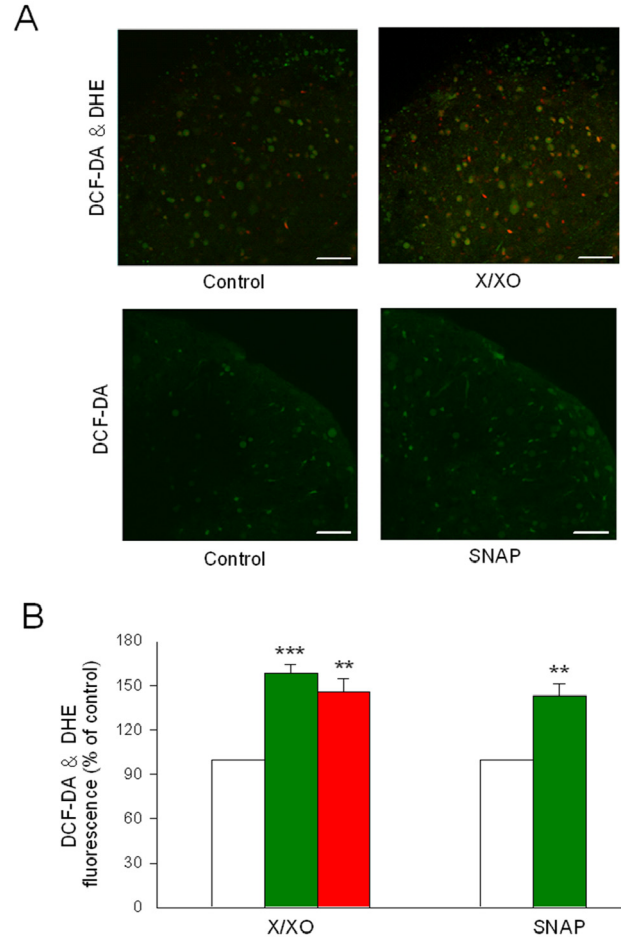


Fig. 1. X/XO- and SNAP-induced ROS and RNS production in the substantia gelatinosa (SG). (A) Fluorescence intensity in DCF-DA (green) and DHE-loaded (red) SG neurons was increased by application of X/XO (upper). DCF-DA fluorescence intensity was increased by application of SNAP (lower) (scale bars: $100\ \mu\text{m}$). (B) The results were quantitatively analyzed as percent units of DCF-DA & DHE fluorescence of the control. ***: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p < 0.001$). **: $p < 0.01$. Means \pm SEM.

편에 5분간 SNAP ($500\ \mu\text{M}$)을 관류하였을 때는 $143.2 \pm 8.5\%$ ($n=11$, $p < 0.01$)로 형광강도가 유의하게 증가하였다 (Fig. 1).

척수 후각세포 흥분성에 대한 X/XO, SNAP 투여의 효과

활성산소종과 활성질소종이 척수 후각세포의 흥분성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 patch clamp 방법을 이용하여 막전압과 전류를 기록하였다. Whole cell이 되었을 때 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 세포만을 결과분석에 이용하였다. 전류고정법을 이용하여 지속적으로 막전압을 기록하면서 superoxide ($O_2^{\cdot-}$)를 발생시키는 것으로 알

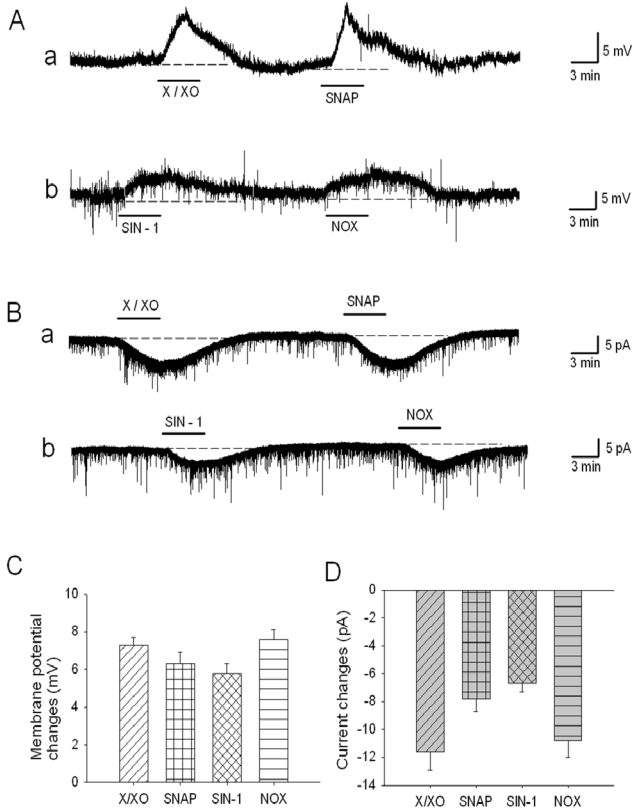


Fig. 2. ROS and RNS induced membrane depolarization and inward currents. (A) X/XO (300 μ M/30 mU), SNAP (500 μ M), SIN-1 (1 mM) and NADPH(NOX; 100 μ M) elicited a membrane depolarization, respectively. (B) X/XO, SNAP, SIN-1 and NOX elicited inward current, respectively. (C) Bar graph showed that the membrane potential changes by application of ROS and RNS. (D) Bar graph showed that the current changes by application of ROS and RNS. Means \pm SEM.

려진 X/XO (300 μ M/30 mU), SIN-1 (1 mM), NADPH oxidase (NOX, 100 μ M)을 각각 투여 하였을 때 7.3 \pm 0.5 mV (n=18), 5.8 \pm 0.5 mV (n=6), 7.6 \pm 0.7 mV (n=8)의 탈분극이 관찰되었고, 산화질소(NO)를 발생시키는 SNAP (500 μ M)의 투여에 의해서는 6.3 \pm 0.6 mV (n=14) 크기의 탈분극이 관찰되었다 (Figs. 2A, C). 전압고정법을 이용하여 지속적으로 전류를 기록하면서 X/XO, SNAP, SIN-1, NOX를 각각 투여 하였을 때 -11.6 \pm 1.2 pA (n=31), -7.8 \pm 0.9 pA (n=28), -6.7 \pm 0.6 pA (n=7), -10.8 \pm 1.2 pA (n=7) 크기의 내향성 전류가 관찰되었다 (Figs. 2B, D).

X/XO 투여에 의해 발생한 반응이 어떤 종류의 활성산소종에 의한 것인지를 알아보기와 광범위하게 ROS와 RNS에 대해 항산화 작용을 하는 PBN (2 mM)과 주로 O₂⁻에 작용하여 항산화 작용을 나타내는 MnTBAP (40 μ M), 산화질소에 대해 효과를 나타내는 L-NAME (1 mM) 등을 세포외액에 전 처리한 후 X/XO를 투여하였다. 발생한 내

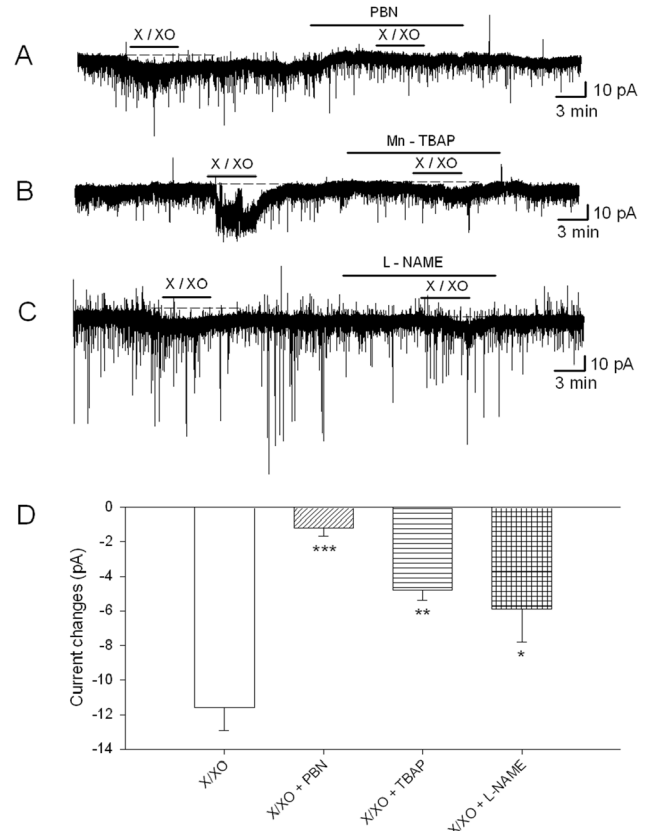


Fig. 3. Effect of ROS scavengers on X/XO-induced inward currents. (A) The pretreatment with PBN (2 mM), nonspecific ROS and RNS scavenger, significantly decreased the X/XO-induced inward currents. (B) Pretreatment with Mn-TBAP (40 μ M), superoxide dismutase mimetics, significantly decreased the X/XO-induced inward currents. (C) L-NAME (1 mM), NO scavenger, significantly decreased the X/XO-induced inward currents. (D) X/XO-induced inward currents under control condition and pretreatment with antioxidants. ***: Values are significantly different from the X/XO by independent t-test (p<0.001). Means \pm SEM.

향성 전류는 X/XO를 단독으로 투여하였을 때보다 현저히 감소하였다. PBN 전처리에 의해서는 -1.2 \pm 0.5 pA (n=6, p<0.001), MnTBAP 전처리에 의해 -4.8 \pm 0.6 pA(n=7, p<0.01), L-NAME의 전처리에 의해서도 -5.9 \pm 1.9 pA (n=6, p<0.05)로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

또한, SNAP 투여에 의해 발생한 반응에 NO 이외의 다른 활성산소종이 관여하는지를 알아보기와 L-NAME와 MnTBAP를 전 처리한 후 SNAP를 투여하였다. L-NAME 전처리에 의해서는 발생한 내향성 전류가 SNAP를 단독으로 투여하였을 때보다 현저히 감소하였으나(-1.1 \pm 0.2 pA, n=7, p<0.001), MnTBAP 전처리에 의해서는 SNAP의 반응이 대조군에 비해 차이가 없었다(-6.5 \pm 1.3 pA, n=6) (Fig. 4).

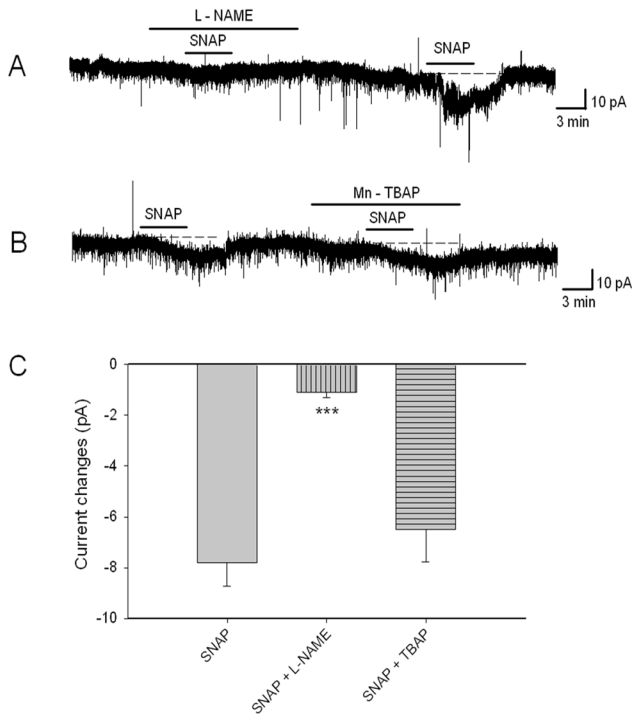


Fig. 4. Effect of NO scavengers on SNAP-induced inward currents. (A) Pretreatment with L-NAME (1 mM) almost completely blocked the SNAP-induced inward currents. (B) Pretreatment with Mn-TBAP (40 μ M) did not decrease the SNAP-induced inward currents under control condition and pretreatment with antioxidants. ***: Values are significantly different from the SNAP by independent t-test ($p < 0.001$). Means \pm SEM.

고찰

조직손상이나 증가된 유해반응에 의하여 세포내에 증가된 ROS는 세포독성을 일으키고 세포죽음과 관련되나, 세포내부의 항산화계의 조절에 의하여 적정량으로 유지되면 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 여러 가지 생리적 기능을 조절하는 세포조절물질로서 역할을 수행한다 [15-17]. 최근에는 ROS가 통증발생에 관여되어 있다고 보고되고 있는데, 특히 척수 미토콘드리아의 superoxide dismutase (SOD) 양에 영향을 받으며 [18,19], PBN [20], vitamin E [21]와 같은 다양한 항산화제의 투여에 의해 진통효과를 나타냄이 보고되었다. 이러한 결과들은 활성산소가 척수에서 통증의 발생과 전달에 중요하게 관여하고 있음을 시사한다.

공초점 현미경은 세포내 활성산소의 변화를 확인하는데 최근 많이 사용되었는데 여러 가지 ROS와 RNS를 탐지할 수 있는 탐식자를 이용한다. H₂DCF-DA는 비교적 비선택적인 탐식자로 핵, 미토콘드리아, 세포질의 활성산소와 반응

하는데 [22], 세포내로 확산으로 이동하여 acetate group이 세포내 esterase에 의해 분해되며 2,7-dichlorofluorescein (H₂DCF)는 세포내에 남아 형광을 발현한다. H₂DCF-DA는 H₂O₂ 뿐만 아니라 O₂⁻, ·OH, NO, ONOO⁻도 탐지할 수 있다 [23]. 한편, DHE는 세포 내의 O₂⁻을 측정하기 위한 선택적인 탐식자로, 이것은 H₂O₂에 대해 매우 낮게 반응하며 ·OH, ONOO⁻ 등과도 잘 반응하지 않는다 [24].

이 연구에서는 X/XO와 SNAP를 투여하여 실제로 척수후각 부위에서 ROS를 발생시키는지를 공초점 현미경을 이용하여 확인하였는데 X/XO에 의해 DCF-DA와 DHE 형광발현의 증가를 보였고, SNAP에 의해서는 DCF-DA의 증가를 확인하였다. 이러한 결과는 척수후각에서 DCF-DA와 DHE로 O₂⁻의 증가를 확인한 Lee와 Chun [25], Kim 등 [4]의 결과와 유사하다. Park 등 [13]은 NO에 특이적 탐식자인 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA)를 사용하여 sodium nitroprusside (SNP)에 의해 증가되는 NO를 확인하였는데, 이 연구에서는 광범위하게 ROS와 RNS를 탐지할 수 있는 DCF-DA에 의해서도 성공적으로 NO 변화를 확인하였다.

이 연구에서는 ROS를 발생시키기 위해 X와 XO를 혼합하여 투여하였는데 XO는 X를 산화시켜 uric acid로 만드는 과정에서 superoxide 음이온(O₂⁻)을 발생시키고 이것은 SOD에 의해 H₂O₂로 변환된다. Hawkins 등 [26]과 Sato 등 [27]은 X/XO 투여에 의해 투여 직후부터 O₂⁻가 발생되어 3분에서 최고치를, 5분정도 경과하면 SOD에 의해 H₂O₂로 변환된다고 하였으며, Zhou 등 [28]도 X/XO는 즉각적이고 일시적인 변화를 H₂O₂ 투여는 느리지만 지속적인 변화를 나타낸다고 하였다. 이 연구에서도 X/XO의 투여는 주입 후 1분 이내부터 빠른 탈분극과 내향성 전류가 관찰되었으며 이는 이전에 보고한 H₂O₂ 투여에 의한 작고 느린 탈분극과는 차이를 보였다 [29]. 한편, 이 연구에서는 O₂⁻를 발생시키기 위하여 X/XO 외에 추가적으로 NADPH, SIN-1 등을 사용하였는데 탈분극과 내향성 전류를 유발하여 나타난 반응은 X/XO와 유사하였다.

X/XO에 의한 반응이 어떤 종류의 활성산소에 의해서 발생하는가를 확인하기 위하여 광범위한 ROS에 작용하는 PBN, O₂⁻를 H₂O₂로 전환시킴에 의해 O₂⁻를 제거하는 SOD 유사물질 MnTBAP, NO에 특이적으로 작용하는 L-NAME 등을 사용하였다. PBN은 H₂O₂, O₂⁻, NO, ONOO⁻등의 다양한 ROS 형성을 억제한다 [30]고 알려져 있는데, 이 연구에서도 PBN을 세포의 용액에 추가하였을 때 X/XO의 반응을 거의 완전하게 억제시켰으며 O₂⁻를 특이적으로 제거하는 MnTBAP도 유의한 억제작용을 보였다.

한편, O₂⁻는 세포막의 지질층을 통과하는데 낮은 투과력을 가지고 있고 [31] 안정상태인 H₂O₂로 빠른 dismutation을

보이기 때문에[32] 세포내 신호전달물질로 작용하기는 어려울 것이라고 여겨졌다. 그러나 최근 O_2^- 가 세포내 nNOS에 의해 생성되는 NO와 결합하여 ONOO-를 만들고 이것이 세포에 여러 가지 작용을 할 수 있음이 보고되었다[33]. 이 연구에서는 X/XO에 의한 반응이 NO scavenger인 L-NAME에 의해 부분적으로 억제된 결과는 X/XO가 O_2^- 를 발생시키고 세포 내, 외에 존재하는 NO와 결합하여 ONOO-를 만들었으며 이것이 아교질 뉴런의 탈분극을 유발하는데 작용하였을 가능성을 가지고 있다고 추측할 수 있다.

결론적으로 이 연구에서는 xanthine과 xanthine 산화제 투여와 SNAP 투여에 의해 척수후각의 아교질 세포에서 활성산소를 발생시킴을 공초점 현미경으로 확인하였다. 또한 발생된 O_2^- 와 NO는 아교질 세포를 탈분극 시키거나 내향성 전류를 발생시켜 신경흥분성을 조절할 수 있는데 이 과정에서 O_2^- 와 NO의 결합에 의해 발생하는 ONOO-가 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 중추에서 ROS와 RNS가 유사한 기전으로 중추감작을 일으켜 통증을 조절할 수 있음을 시사한다.

Acknowledgements

이 논문은 2015년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2015R1D1A1A101060762).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Kumazawa T, Perl ER. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indication of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol.* 1979;177:417-434. doi:10.1002/cne.901770305
2. Yoshimura M, Jessel TM. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1989;62:109-118.
3. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):509-517. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.029
4. 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;5:447(1): 87-91. doi:10.1016/j.neulet.2008.09.041
5. 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. doi:10.1016/j.neulet.2005.08.055
6. Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain.* 2008;15:138(3):514-524. doi:10.1016/j.pain.2008.01.029
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:10.1016/j.pain.2005.09.024
8. 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. doi:10.1186/1744-8069-3-29
9. 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:10.1016/j.neuropharm.2008.12.003
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;70:245-250. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.05.008
11. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1990;186:289-293. doi:10.1016/0014-2999(90)90446-D
12. Lee HI, Park A, Chun SW. Effects of NaOCl on neuronal excitability and intracellular calcium concentration in rat spinal substantia gelatinosa neurons. *International J Oral Biol.* 2013;38:5-12. doi:10.11620/IJOB.2013.38.1.005
13. Park A, Lee HI, Semjid D, Chun SW. Dual effect of exogenous nitric oxide on neuronal excitability in rat substantia gelatinosa neurons. *Neural Plast.* 2014;2014: 628531. doi:10.1155/2014/628531
14. Kim HY, Lee IH, Chun SW, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast.* 2015;2015:293423. doi:10.1155/2015/293423
15. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
16. Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. The role of ROS and RNA in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des.* 2004;10:855-866. doi:10.2174/1381612043452866
17. Bubicic C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol.* 2006;21(1):69-80.
18. 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. doi:10.1124/jpet.103.064154
19. 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*. 2009;7; 29(1):159-168. doi:10.1523/JNEUROSCI.3792-08.2009
 20. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung J. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 2004;111:116-124. doi:org/10.1016/j.pain.2004.06.008
 21. Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K, Chung JM. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*. 2006;122: 53-62. doi:org/10.1016/j.pain.2006.01.013
 22. 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. doi:org/10.1016/j.molbrainres.2004.05.022
 23. 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. doi:org/10.1016/S0891-5849(99)00061-1
 24. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol*. 1994;55:253-258.
 25. Lee HI, Chun SW. Detection of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Living Rat Trigeminal Caudal Neurons. *International J Oral Biol*. 2015;40:103-109. doi:org/10.11620/IJOB.2015.40.2.103
 26. Hawkins BJ, Madesh M, Kirkpatrick CJ, Fisher AB. Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling. *Biol Cell* 2007;18(6):2002-2012. doi:10.1091/mbc.E06-09-0830
 27. Sato E, Mokudai T, Niwano Y, Kohno M. Kinetic analysis of reactive oxygen species generated by the in vitro reconstituted NADPH oxidase and xanthine oxidase systems. *J Biochem*. 2011;150(2):173-181. doi:10.1093/jb/mvr051
 28. Zhou X, Wen K, Yuan D, Ai L, He P. Calcium influx-dependent differential actions of superoxide and hydrogen peroxide on microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(4):H1096-107. doi:10.1152/ajpheart.01037.2008
 29. Son Y, Chun SW. Effects of hydrogen peroxide on neuronal excitability and synaptic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *International J Oral Biol*. 2007;32: 153-160.
 30. Kotake Y. Pharmacologic properties of phenyl N-tert-butyl nitron. *Antioxid Redox Signal*. 1999;1:481-499. doi:10.1089/ars.1999.1.4.-481
 31. Tanabe S, Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y. HCO₃⁻-independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2005;17; 579(2):517-522. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.020
 32. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:247-254. doi:10.1016/S0955-0674(03)00002-4
 33. Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids*. 2012;42:75-94. doi:10.1007/s00726-010-0633-0