

Pre- and Postsynaptic Actions of Reactive Oxygen Species and Nitrogen Species in Spinal Substantia Gelatinosa Neurons

Areum Park and Sang Woo Chun*

Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

(received December 4, 2018; revised December 16, 2018; accepted December 18, 2018)

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) are involved in cellular signaling processes as a cause of oxidative stress. According to recent studies, ROS and RNS are important signaling molecules involved in pain transmission through spinal mechanisms. In this study, a patch clamp recording was used in spinal slices of rats to investigate the action mechanisms of $O_2^{\cdot -}$ and NO on the excitability of substantia gelatinosa (SG) neuron. The application of xanthine and xanthine oxidase (X/XO) compound, a ROS donor, induced inward currents and increased the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) in slice preparation. The application of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), a RNS donor, also induced inward currents and increased the frequency of sEPSC. In a single cell preparation, X/XO and SNAP had no effect on the inward currents, revealing the involvement of presynaptic action. X/XO and SNAP induced a membrane depolarization in current clamp conditions which was significantly decreased by the addition of thapsigargin to an external calcium free solution for blocking synaptic transmission. Furthermore, X/XO and

SNAP increased the frequency of action potentials evoked by depolarizing current pulses, suggesting the involvement of postsynaptic action. According to these results, it was established that elevated ROS and RNS in the spinal cord can sensitize the dorsal horn neurons via pre- and postsynaptic mechanisms. Therefore, ROS and RNS play similar roles in the regulation of the membrane excitability of SG neurons.

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

서론

척추후각 표층의 척추 아교질 신경세포(substantia gelatinosa, SG; lamina II)는 말초로부터 일차 감각신경섬유를 통해 직접 정보를 전달받고 이를 통합한다. 신체에 유해한 통각정보는 얇은 수초를 가진 Aδ 섬유와 무수 섬유인 C 섬유와 같은 감각신경섬유를 통해 척추의 아교질로 전달되며 이곳에 이웃하는 투사신경세포를 통하여 시상으로 통각정보를 전달한다[1].

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 과산화수소(H_2O_2), superoxide 음이온($O_2^{\cdot -}$), 수산화기(hydroxyl radical; $\cdot OH$), 산화질소(NO), 과산화질산염(peroxynitrite; ONOO $^-$)을 포함하는데, 이러한 활성산소는 조직손상이나 유해반응과 긴밀히 관련되며[2,3], 또한 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 세포조절물질로서의 역할이 추가적으로 알려져 있다[4,5].

ROS가 통증발생과 유지에 관여된다는 최근의 연구가

*Correspondence to: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-Dong, Iksan 54538, Republic of Korea
Tel: 82-63-850-6932
E-mail: physio1@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.

보고되었는데, H₂O₂의 피하투여로 인한 통증유발 연구를 비롯하여 항산화제의 투여로 인한 진통효과가 보고되었다[6]. 또한 피부 내 capsaicin 투여로 통증을 유도시킨 생쥐에서 척수후각 뉴런의 미토콘드리아 O₂^{·-}가 증가되는 결과는[7] 척수후각 뉴런에서 발생된 O₂^{·-}가 통증을 발생시키는 데 중요한 발생 원인이라고 생각할 수 있다.

활성질소종 (reactive oxygen species; RNS)의 한 종류인 NO가 통증에 미치는 역할은 통증 유발효과와 진통효과가 상반되게 같이 보고되어 있다. 예를 들면, 신경손상이나 조직염증에 의해 유발된 통각과민성은 NOS 억제제를 척수 내로 투여하거나 nNOS 유전자를 삭제한 생쥐에서 감소한 것으로 보고되었으며[8,9], 척수세포에서 발생된 NOS가 만성통증 발생에 중요하게 작용한다고 보고되었다[10]. 이와는 반대로 또 다른 연구에서는 NO donor인 sodium nitroprusside (SNP)를 발바닥에 주입하면 오히려 진통효과가 유발되었다고 보고되었다[11].

최근 ROS의 통증조절에 대한 역할을 규명하기 위하여 본 실험실에서는 여러 가지 ROS donor가 척수 아교질 세포의 흥분성에 어떠한 효과를 미치는지에 관한 연구를 진행하였다. Hypochlorite를 발생시키는 NaOCl을 투여하면 아교질 세포의 막전압의 변화와 세포내 칼슘농도의 증가를 보고하였고[12], NO donor인 SNP인 경우에는 고농도와 저농도에 따른 막전압에 대한 효과가 서로 다른 것을 규명하였으며[13], 최근에는 ·OH를 발생시키는 tert-butylhydroperoxide를 척수에 주입하여 통각과민을 유도한 실험동물에서 아교질 세포의 흥분성 시냅스후 전압의 증가를 확인하였다[14].

이 연구에서는 ROS인 O₂^{·-}를 발생시키기 위하여 xanthine (X)과 xanthine oxidase (XO)를 복합투여 하였고, RNS인 NO를 발생시키기 위하여 S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)을 투여하였다. 발생된 O₂^{·-}와 NO가 통증전달에 1차적 중계역할을 하는 척수후각 세포에서 어떠한 기전을 통하여 흥분성에 영향을 미치는지를 확인하고, 그 효과와 기전에 차이가 있는지를 patch clamp 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

척수절편 제작

생후 12-17일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 실험동물 처치에 관한 사항은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정을 준수하였다. 흰쥐를 ether로 먼저 마취한 후 25% urethane (4 ml/Kg)을 복강 내 투여하였다. 요추부위를 척추제거술(laminectomy)로 척수를 노출하고 요천수 팽대부에서 1 cm 정도 길이로 척수를 절단하였다. 조직절

편기(vibratome 752M, Campden, GB)를 이용하여 95% O₂-5% CO₂를 공급하는 상태에서 두께 300 μm의 척수절편을 절단하였다. 척수절편은 32 °C의 인공 뇌척수액에 30분 이상 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에 실험을 진행하였다. 척수절편을 현미경(BX50WI, Olympus, Japan) 위의 기록용기에 옮긴 후 기록을 시작하였고, 실험과정 동안 지속적으로 95% O₂-5% CO₂를 공급한 용액을 관류 펌프(Minipuls 3, Gilson, France)를 이용하여 순환시켰다.

단일 세포 분리

단일세포에서 전류의 기록은 척수후각 세포에서의 기록이 성공률이 낮아 척수후각과 같은 기능을 하는 것으로 알려진 연수후각 부위를 이용하였다. 먼저 조직절편기를 이용하여 400 μm 두께로 횡단면 절단하여 뇌절편을 만들었다. 뇌절편은 단백분해 효소인 protease (Sigma, 0.2 mg/ml)로 35°C에서 30-50분 동안 처리하고, thermolysin (Sigma, 0.2 mg/ml)에 같은 온도로 15분간 처리하였다. 효소처리가 끝난 후 연수후각 부위는 21G 주사침을 이용하여 분리하였고, 이를 지름 1 cm의 유리판 위에서 작은 피펫속으로 흡입, 분출하는 과정을 반복하여 단일세포로 분리하였다.

실험용액

실험에 필요한 세포외 용액의 조성은 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 11 glucose 이었고 95% O₂-5% CO₂를 공급하여 pH를 7.4 상태로 유지하였다. 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(X), xanthine oxidase (XO), S-nitroso-N-acetyl -DL-penicillamine (SNAP), thapsigargin, glutamate, capsaicin은 Sigma (USA)에서 구입하였다. Thapsigargin은 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma)에 일차적으로 녹인 후 최종농도로 세포외 용액과 혼합하여 사용하였고, 그 밖의 다른 약물은 실험 전에 세포외 용액에 녹여 사용하였다. 실험용액의 관류는 중력을 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, USA)를 이용하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압과 전류의 기록을 위하여 whole cell patch clamp의 전류고정법과 전압고정법을 각각 사용하였다. 미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, Japan)를 이용하여 외경 1.5 mm의 유리관(TW150-3, WPI, USA)을 저항이 5-8 MΩ이 되도록 미세전극을 제작하였다. 저배율 렌즈로 관찰하였을 때 밝은 띠를 형성하는 척수 아교질 부위를 확인한 후 양압을 가하면서 미세 전극조절기(ROE-200,

Sutter, 미국)를 이용하여 세포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 피펫의 저항이 순간적으로 급증하는 것으로 세포에 근접하였음을 확인하고 음압을 가하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. 다시 짧은 음압을 가하여 whole cell을 만들었으며 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 상태에서 기록을 시작하였다. 전압과 전류측정은 Axopatch 200B 증폭기(Axon, USA)를 사용하였으며, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon, USA) AD변환기를 통해 컴퓨터와 연결하였다. pCLAMP software (version 9.0, Axon, USA)를 사용하여 데이터의 저장 및 분석을 시행하였으며 발생한 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

실험자료의 분석

막전압과 전류의 분석은 Clampfit (version 9.0, Axon, USA)를 사용하였으며, 흥분성 시냅스후 전류의 분석은 Mini Analysis program (Synaptosoft, 미국)을 이용하였다. 시냅스 전류 빈도 확인은 10-15 pA 이상의 크기를 가진 전류의 97% 이상이 포함되게 하였다. 약물처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는지의 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

X/XO, SNAP 투여에 의한 시냅스 전달에 대한 작용

X/XO와 SNAP 투여에 의해 발생한 ROS가 시냅스 전 뉴런의 신경전달물질 분비에 영향을 주는지 혹은 시냅스 후 뉴런에 직접 작용하는지를 알아보았다. 이를 위하여 자발적 흥분성 시냅스후 전류(sEPSCs)에 대한 효과, 단일 세포 상태에서의 반응, 시냅스 전달을 차단하기 위한 칼슘통로 억제제의 처리 등의 상황에서 약물효과를 확인하였다.

sEPSCs에 대한 X/XO와 SNAP의 효과를 관찰하기 위하여 유지전압을 -70 mV로 고정하고 지속적으로 시냅스 전류를 기록하였다. 발생한 시냅스 전류는 하향파형이 기록되었는데, X/XO (300 μ M/30 mU)를 투여하였을 때 약물투여 전에 비하여 sEPSCs의 빈도가 증가됨이 관찰되었고 (0.48 \pm 0.05 Hz vs. 0.71 \pm 0.09 Hz, $n=10$, $p < 0.01$), 크기에서는 유의한 변화가 없었다(13.0 \pm 1.1 pA vs. 14.5 \pm 1.3 pA, $n=10$) (Fig. 1).

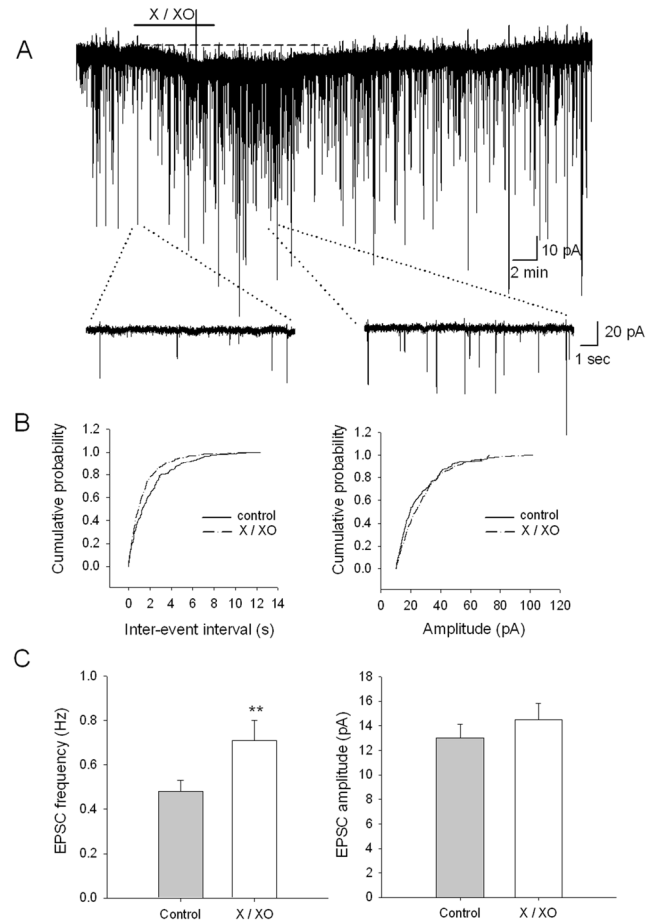


Fig. 1. Effects of X/XO on excitatory synaptic transmission.

(A) A continuous chart recording of glutamatergic sEPSCs in a SG neuron show that X/XO (5 min) increased the frequency of sEPSCs. The lower traces show sEPSCs at an expanded time scale before and during the application of X/XO. (B) Normalized cumulative distribution analysis of sEPSCs amplitude and frequency showed that X/XO caused a significant shift toward higher frequency (left). (C) Average sEPSCs frequency (left) and amplitude (right). **: Values are significantly different from the control by paired t-test ($p < 0.01$). Means \pm SEM.

SNAP (500 μ M)를 투여하였을 때에도 약물투여 전에 비하여 sEPSCs의 빈도가 증가됨이 관찰되었고(0.52 \pm 0.06 Hz vs. 0.69 \pm 0.07 Hz, $n=9$, $p < 0.05$), 크기에서는 유의한 변화가 없었다(12.1 \pm 0.8 pA vs. 13.2 \pm 1.3 pA, $n=9$) (Fig. 2).

시냅스의 영향을 완전히 배제하기 위한 방법으로 단백질 분해 효소 처리에 의해 단일 세포로 분리한 후 X/XO와 SNAP를 투여하였다. 효소처리에 의해 분리된 연수후각 세포의 크기는 15 μ m에서 25 μ m까지 다양 하였으며, 형태는 구형과 타원형이 많이 관찰 되었다. X/XO의 투여에 의해 기록한 7개의 세포에서 모두 내향성 전류를 기록하지 못하였고, SNAP에 의해서는 기록한 8개의 세포에서 2개의 세포에서만 5 pA 정도의 내향성 전류가 기록되었다.

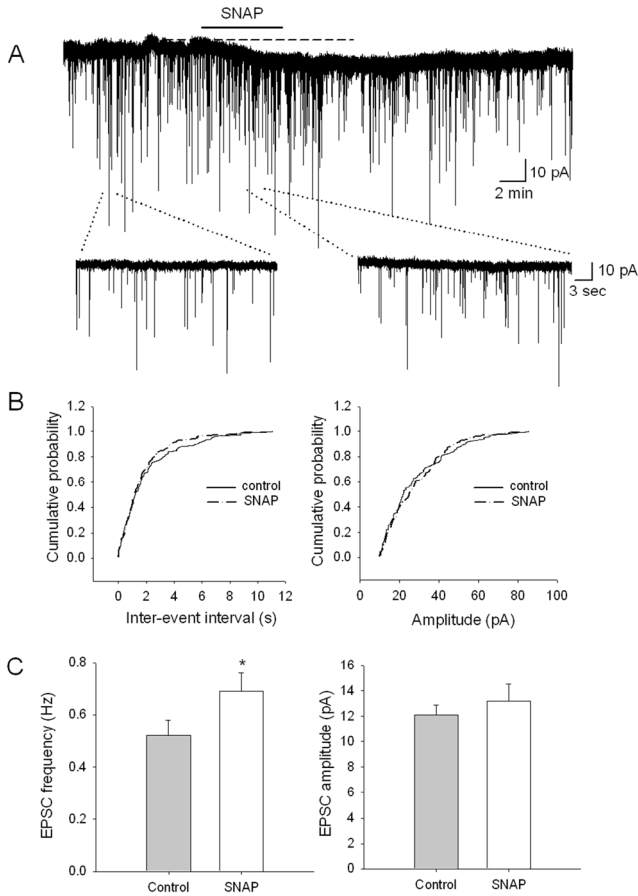


Fig. 2. Effects of SNAP on excitatory synaptic transmission. (A) A continuous chart recording of glutamatergic sEPSCs in a SG neuron show that SNAP (5 min) increased the frequency of sEPSCs. The lower traces show sEPSCs at an expanded time scale before and during the application of SNAP. (B) Normalized cumulative distribution analysis of sEPSCs amplitude and frequency showed that SNAP caused a significant shift toward higher frequency (left). (C) Average sEPSCs frequency (left) and amplitude (right). *: Values are significantly different from the control by paired t-test ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

단일세포로 분리한 세포가 약물에 잘 반응하는지 확인하기 위하여 흥분성 신경전달 물질인 glutamate를 투여하였을 때 기록한 모든 세포에서 내향성 전류가 확인되었고 (18.2 ± 2.5 pA, $n=5$), capsaicin 처리에 의해서는 4개의 세포에서 모두 전류가 기록되지 않았다(Fig. 3).

전류고정법으로 막전압의 변화를 기록하면서 시냅스 차단 효과를 관찰하였다. 정상 세포외용액에서 X/XO 투여에 의한 탈분극을 기록하고 세포외 용액에서 Ca^{2+} 를 제거하고 세포막 칼슘통로를 억제할 수 있는 Cd^{2+} 를 첨가시킨 용액에서 X/XO에 투여에 의한 탈분극과 비교하였을 때 유의한 변화를 보이지 않았다 (7.3 ± 0.5 mV, $n=14$ vs. 5.2 ± 1.0 mV, $n=6$) (Fig. 4A, D). 세포내 Ca^{2+} 은 세포내 칼슘저장소인 내형질세망(endoplasmic reticulum; ER)으로

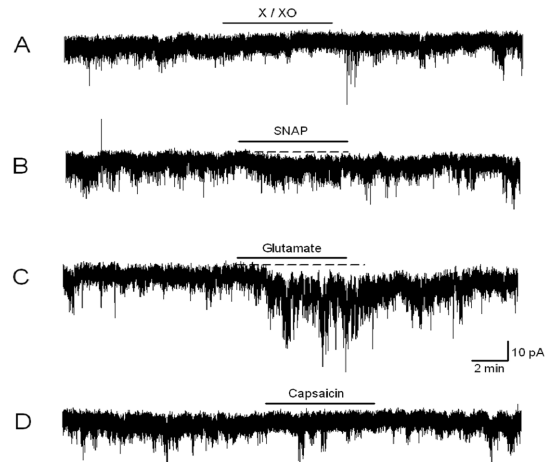


Fig. 3. Effects of X/XO and SNAP on membrane currents in a single cell preparation of the medullary dorsal horn. (A) X/XO did not induce inward currents. (B) SNAP induced small inward currents in the minority of cells. (C) Glutamate induced inward currents. (D) Capsaicin did not induce inward currents.

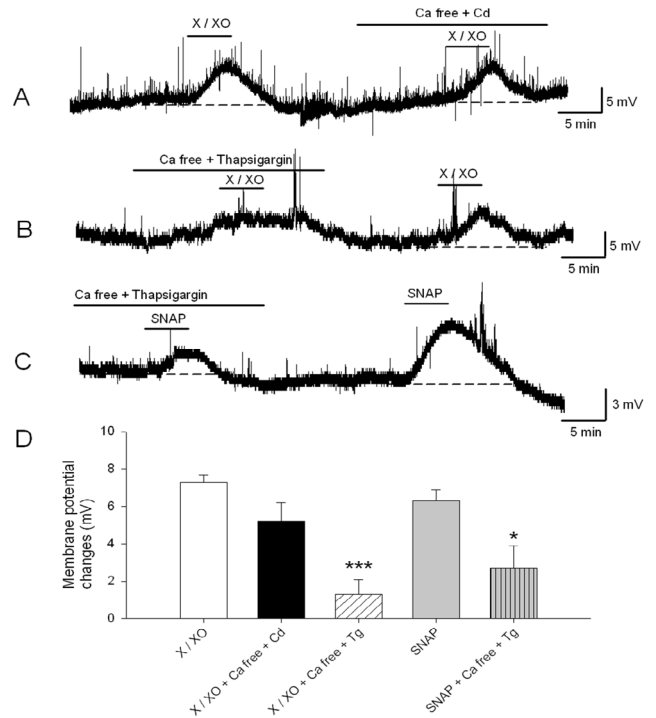


Fig. 4. Blockade of synaptic transmission decreased X/XO- and SNAP-induced membrane depolarization. (A) X/XO-induced membrane depolarizations were not significantly reduced by a combination of $CdCl_2$ and calcium free solution. When membrane potential was recorded in an extracellular calcium free solution with thapsigargin, X/XO-induced depolarization was markedly decreased (B), and SNAP-induced depolarization was significantly decreased (C). (D) Mean X/XO- and SNAP-induced depolarization in control and in neurons pretreated with Ca^{2+} free plus thapsigargin. ***: Values are significantly different from the control by independent t-test ($p < 0.001$). Means \pm SEM.

부터 증가될 수 있으므로 ER의 Ca^{2+} ATPase 억제제인 thapsigargin을 세포의 Ca^{2+} 제거용액에 첨가하여 저장소내 칼슘을 고갈시킨 후 X/XO를 투여 하였을 때는 X/XO에 의한 탈분극이 유의하게 억제됨이 관찰되었다(1.3 ± 0.8 mV, $n=7$, $p<0.001$) (Fig. 4B, D). 세포의 Ca^{2+} 제거용액에 thapsigargin을 첨가한 용액에서 SNAP를 투여 하였을 때에도 SNAP 단독 투여에 의한 탈분극에 비해 유의하게 억제됨이 관찰되었다(6.3 ± 0.6 mV, $n=14$ vs. 2.7 ± 1.2 mV, $n=7$, $p<0.05$) (Fig. 4C, D).

시냅스후 뉴런의 흥분성에 대한 작용

X/XO와 SNAP가 시냅스 전달에 작용하는 것 외에 시냅스후 뉴런에 직접 영향을 미치는지 확인하기 위하여 아

교질 세포에 양전류를 가하여 활동전압을 발생시킨 후 X/XO와 SNAP를 투여하였다.

척수 아교질 신경세포는 지속적인 양전류를 가하여 탈분극시켰을 때 발생하는 활동전압의 순응정도에 따라 두 가지로 구분한다[15,16]. 아교질 세포에 25-50 pA의 양전류를 기록전극을 이용하여 단계적으로 자극하였을 때 활동전압이 기록되었는데, 이를 1-3 초의 자극기간 동안 활동전압의 빈도가 감소하는 adapting firing neuron (AFN)과 자극기간 동안 지속적이고 반복적인 활동전압을 보이는 tonic firing neuron (TFN)으로 구분하였다. Adapting firing neuron은 발생하는 활동전압의 빈도가 높지 않아 이 연구에서는 tonic firing neuron만 실험에 사용하였다. X/XO 처리에 의해서 25, 50 pA 자극에서 각각 6.8 ± 1.5 Hz vs. 9.2 ± 1.1 Hz ($n=9$, $p<0.05$), 16.4 ± 2.1 Hz vs. 18.2 ± 1.8 Hz ($n=9$)로 증가하였고, SNAP 처리에 의해서도 25, 50 pA 자극에서 각각 7.3 ± 1.6 Hz vs. 10.7 ± 1.8 Hz ($n=8$, $p<0.05$), 18.2 ± 2.2 Hz vs. 21.4 ± 1.5 Hz ($n=8$, $p<0.05$)로 증가하였다 (Fig. 5).

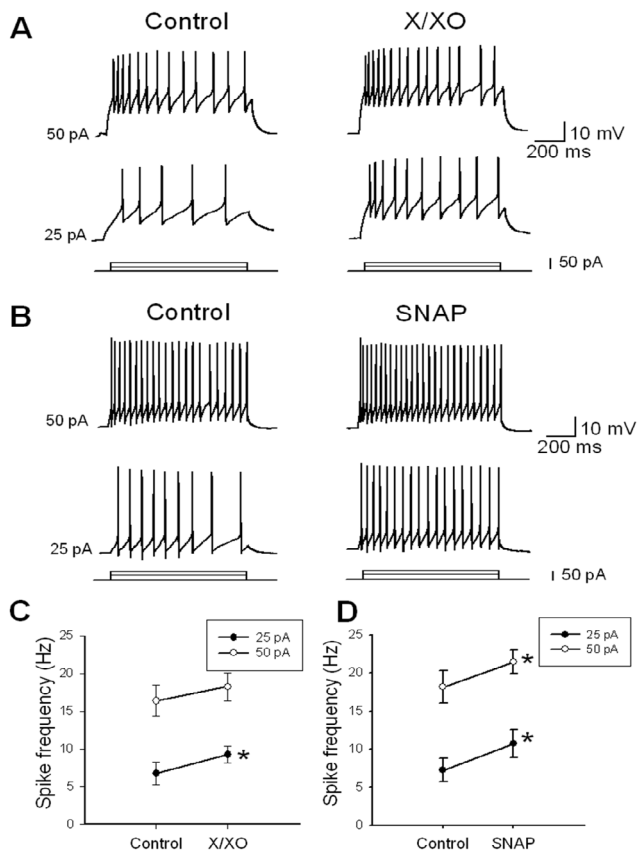


Fig. 5. Effects of X/XO and SNAP on neuronal excitability of the SG neurons.

(A) Recordings of action potentials generated in a tonic-firing neuron (TFN). Action potentials were evoked by direct intracellular injections of current pulses (25 pA steps). After X/XO treatment, the frequency of action potentials was increased by current pulse of 25 pA and 50 pA. (B) After SNAP treatment, the frequency of action potentials was increased by current pulse of 25 pA and 50 pA. Average firing rate measured by step current pulses (25, 50 pA) after X/XO treatment (C) and SNAP treatment (D). *: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p<0.05$). Means \pm SEM.

고찰

ROS는 조직손상이나 유해반응에 의하여 세포내에서 증가하며 세포독성을 일으킴으로서 세포사 유도에 영향을 미친다. 또한, 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 여러 가지 생리적인 기능을 조절할 수 있는 세포조절물질로서의 역할도 보고되었다[5,17]. 최근에는 ROS가 통증발생에 직접적으로 관여되어 있다고 보고되었는데 예를 들면 척수의 ROS 양이 감소함에 따라 통증행동 반응이 감소되었고[18], ROS 양이 증가함에 따라 그에 따른 통증 반응이 비례적으로 증가됨이[19,20] 보고되었다. 특히 척수 미토콘드리아의 superoxide dismutase (SOD) 양에 영향을 받으며[20], tirilazad[21], PBN[6], vitamin E[22] 같은 다양한 항산화제를 전신투여 혹은 척수내로 투여함으로써 진통효과가 나타나는 것이 보고되었다. 이러한 결과들은 척수에서 작용하는 활성산소가 통증의 발생과 유지 및 전달에 중요하게 관여하고 있음을 시사한다.

이 연구에서는 ROS를 발생시키기 위해 X와 XO를 혼합하여 투여하였다. XO는 X을 산화시켜 uric acid로 만드는 과정에서 O_2^- 을 발생시키는 것으로 알려져 있고 이것은 세포 내 SOD에 의해 H_2O_2 로 변환된다. 이 연구결과에서 X/XO에 의한 ROS는 척수후각 뉴런에서 내향성 전류와 탈분극을 유발하고 활동전압의 빈도수 증가를 발생시켰다. Sato 등[23]과 Hawkins 등[24]은 X/XO 투여에 의해 약물투여 직후부터 O_2^- 가 발생되기 시작하여 3분에서 최

고치를 보이고 5분정도 경과하면 SOD에 의해 H_2O_2 로 전환된다고 하였으며, Zhou 등[25]도 X/XO 투여는 즉각적이고 일시적인 변화를 보이지만 H_2O_2 투여는 느리고 지속적인 변화를 보인다고 하였다. 이 연구에서도 X/XO는 약물 투여 후 1분 이내부터 즉각적인 내향성 전류와 탈분극이 관찰되었으며 이는 이전에 보고한 H_2O_2 투여에 의해 발생하는 작고 느린 반응과는 차이가 있었다[26].

이 연구에서는 약물적용 시간을 5분으로 하였는데 이는 $O_2^{\cdot-}$ 가 SOD에 의해 H_2O_2 로 전환되기 충분한 시간으로 X/XO의 투여는 $O_2^{\cdot-}$ 외에 H_2O_2 도 발생시켜 세포에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 다른 연구에서도 H_2O_2 는 세포막을 쉽게 확산으로 통과하여 막전압을 변화시킬 수 있다고 보고하였는데[19,27], transient receptor potential (TRP) 통로를 활성화하거나[28], ATP 민감성 K^+ (K_{ATP}) 통로의 열림을 조절하여[29] 막전압을 변화시킨다고 하였다.

이 연구에서 전압조정법으로 시냅스전류를 기록하면서 X/XO와 SNAP를 투여 하였을 때 내향성 전류와 흥분성 시냅스후 전류의 빈도 증가가 발생되었다. 척수 아교질 세포에서 ROS가 시냅스 신호전달을 조절하는 것에 관한 연구는 Takahashi 등[30]이 H_2O_2 가 GABA 작동성 미세 억제성 시냅스후 전류(miniature inhibitory postsynaptic potential; mIPSC)를 증가시킨다고 하였고, 반대로 Yowtak 등[31]은 $\cdot OH$ donor인 t-BOOH가 IPSC를 감소시킨다고 보고하였을 뿐 흥분성 시냅스후 전류에 대한 결과는 보고되고 있지 않다. 그러나 해마의 신경세포와 대뇌피질의 신경세포에서 과산화수소 투여에 의해 세포의 glutamate 농도가 증가됨이[32] 확인되었고, 흰쥐 척수에서 과도한 glutamate의 축적은 지속적으로 glutamate 수용체의 과활성을 초래하여 자발적인 통증반응을 보인다고 하였다[33]. 이 연구에서 X/XO에 의한 $O_2^{\cdot-}$ 와 SNAP에 의한 NO가 신경말단에서 glutamate를 증가시키고 내향성 전류를 유발할 수 있음은 흥분성 시냅스후 전류의 빈도가 증가한 결과와 단일세포에서 내향성 전류가 발생하지 않은 결과 등을 통하여 확인하였다.

이 연구에서는 X/XO와 SNAP에 의해 TFN에서 양전류 자극에 의해 발생하는 활동전압의 빈도가 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 5). 대부분의 TFN은 광범위 동작성 신경세포(wide dynamic neuron)와 유해 특이성 신경세포(nociceptive specific neuron)로 통증에 반응하는 세포로 구성된다[15]. 그러므로 이 연구의 결과는 X/XO와 SNAP가 주로 통증을 전달하는 세포에 작용하여 활동전압의 역치와 근접해서 활성화되는 전압의존성 통로의 활성화에 영향을 주었을 가능성이 있다. TFN에서는 전압의존성 Na^+ 통로와 지연성 정류형 K^+ (K_{DR}) 통로가 활동전압을 발생시키는데 관여하고 있으며 Ca^{2+} 활성화 K^+ 전류 (K_{CA})도 부가적으로 빈도를

조절한다[34]. 다른 세포에서도 과산화수소는 K_{DR} [35]과 K_{CA} [36] 등과 같은 전압의존성 통로에 영향을 주어 신경 흥분성을 조절함이 보고되었다.

이상의 연구결과를 종합하면 xanthine과 xanthine 산화제 투여에 의해 발생한 활성산소와 SNAP 투여에 의해 발생한 산화질소는 척수후각의 아교질 세포를 탈분극 시킴에 의해 흥분성에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 시냅스 전에 작용하여 신경전달물질의 양을 증가시키거나 시냅스후 뉴런의 이온통로에 직접 작용하여 탈분극 시킬 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Yoshimura M, Jessel TM. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1989;62:109-118. doi:10.1152/jn.1989.62.1.109
2. Liu D, Liu J, Sun D and 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. doi:10.1089/0897715041269650
3. 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
4. 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
5. 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. doi: 10.14670/HH-21.69
6. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliatalata 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:10.1016/j.pain.2004.06.008
7. 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
8. 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
 9. 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
 10. 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
 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. Lopez-Garcia JA, King AE. Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci*. 1994;6:998-1007. doi:10.1111/j.1460-9568.1994.tb00594.x
 16. Grudt TJ, Perl ER. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*. 2002;540:189-207. doi:10.1113/jphysiol.2001.012890
 17. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
 18. 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):514-24. doi:10.1016/j.pain.2008.01.029
 19. 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
 20. 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):159-68. doi:10.1523/JNEUROSCI.3792-08.2009
 21. Khalil Z, Liu T, Helme RD. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain*. 1999;79:31-37. doi:10.1016/S0304-3959(98)00143-2
 22. Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K and Chung JM. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*. 2006;122:53-62. doi:10.1016/j.pain.2006.01.013
 23. 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):173-81. doi:10.1093/jb/mvr051
 24. 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):2002-12. doi:10.1091/mbc.E06-09-0830
 25. 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
 26. 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.
 27. Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(6):1373-414. doi:10.1089/ars.2008.2331
 28. 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;26;25(43):10029-40. doi:10.1523/JNEUROSCI.2652-05.2005
 29. Avshalumov MV, Chen BT, Koos T and Rice ME. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 2005;25:4222-4231. doi:10.1523/JNEUROSCI.4701-04.2005
 30. Takahashi A, Mikami M, Yang J. Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP₃receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *European J Neurosci* 2007;25:705-716. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05323.x
 31. Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 2011;152:844-852. doi:10.1016/j.pain.2010.12.034
 32. Mailly F, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1999;73:1181-1188. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0731181.x

33. Liaw WJ, Stephens RL, Binns BC, Chu Y, Sepkuty JP, Johns RA, Rothstein JD, Tao YX. Spinal glutamate uptake is critical for maintaining normal sensory transmission in rat spinal cord. *Pain* 2005;115:60-70. doi:10.1016/j.pain.2005.02.006
34. Melnick IV, Santos SF, Szokol K, Szucs P, Saffronov BV. Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol.* 2004;91:646-655. doi:10.1152/jn.00883.2003
35. Chang DJ, Lim CS, Lee SH, Kaang BK. Hydrogen peroxide modulates K^+ ion currents in cultured *Aplysia* sensory neurons. *Brain Res.* 2003;970:159-168. doi:10.1016/S0006-8993(03)02316-3
36. Bychkov R, Pieper C, Ried M, Miloshena E, Bychkov FC, Luft L. Haller, hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation.* 1999;99:1719-1725. doi: 10.1161/01.CIR.99.13.1719