

Streptozotocin에 의해 유도된 당뇨병성 통증시 Nitric Oxide의 역할

충남대학교 의과대학 생리학교실, *마취과학교실, †해부학교실, †수의과대학

최진정 · 전병화 · 윤석화* · 이영호† · 김무강† · 김광진

= Abstract =

Role of Nitric Oxide on the Neuropathic Pain in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Jin-Jung Choi, M.D., Byeong-Hwa Joen, M.D., Seok-Hwa Yoon, M.D.*
Young-Ho Lee, M.D.†, Moo-Gang Kim, Ph.D.†, and Kwang-Jin Kim, Ph.D.

Departments of Physiology, *Anesthesiology and †Anatomy, College of Medicine,
†College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: It is controversial whether the change in nitric oxide (NO) expression in the dorsal root ganglia (DRG) may be responsible for development and/or maintenance of painful diabetic neuropathy. The aim of this study was to clarify the role of NO in the pathogenesis of painful diabetic neuropathy.

Methods: The effect of L-nitroarginine methylester (L-NAME) or sodium nitroprusside (SNP) on allodynia was measured in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. NO concentration was measured in the cerebrospinal fluid (CSF) and plasma of the diabetic rats. NADPH-diaphorase (NADPH-d) histochemistry was performed on the DRG and spinal cords of the STZ-induced diabetic rats.

Results: L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, alleviated allodynia, while SNP, a nitric oxide donor, aggravated allodynia in diabetic rats. Plasma NO level in the diabetic rats was significantly decreased compared with control rats. NO level in the CSF of diabetic rats did not differ from that of the control rats. NADPH-d positive cells were decreased in the DRG of diabetic rats. However, NADPH-d histochemistry in the diabetic spinal cord was not different from that of the control rats.

Conclusions: Downregulation of NO expression in the diabetic rats may not be causally related to the development and/or maintenance of painful diabetic neuropathy.

Key Words: Diabetic, L-nitroarginine methylester (L-NAME), Nitric oxide, Sodium nitroprusside (SNP), Streptozotocin

책임저자 : 이영호, 대전시 중구 문화동 6번지
충남대학교 의과대학 해부학교실
우편번호: 301-131
Tel: 042-580-8203, Fax: 042-586-4800
E-mail: yhlee@cnu.ac.kr

본 연구는 보건복지부 뇌의약학연구사업(과제번호 HMP-98-N-2-0006) 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

서 론

당뇨병성 신경병증은 자발통, 이질통 (allodynia) 및 통각과민 등 다양한 이상각각이 나타나지만, 그 기전이 아직 밝혀지지 않고 있으며, 당뇨병성 만성통증의 치료는 imipramine과 mexiletine 또는 metaxalone과

piroxican등을 사용하는 일반적인 마취방법이 제시되고 있다.^{1,2)} 이러한 당뇨병성 만성통증의 이질통은 척수의 글루타민 경로와 관련되어 있으며,²⁾ 물리적 자극에 대한 과민반응은 중추신경의 Neurokinin 1 (NK1) 수용체가 관여한다고 보고되었다.³⁾ 또한 후근신경절(dorsal root ganglia, DRG)에서 neuronal nitric oxide synthase-cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (nNOS-cGMP)계의 감소가 당뇨병성 만성통증에 중요한 역할을 한다고 보고되었으나,⁴⁾ 당뇨병성 통증백서에서 나타나는 통증은 nitric oxide (NO) 합성억제제에 의하여 변화되지 않는다는 다른 결과가 발표되었다.⁵⁾

본 연구에서는 streptozotocin (STZ)으로 유도된 당뇨백서에서 신경병증성 통증시 NO관련 약제에 대한 반응과, DRG, 척수에서 감각신경세포의 흥분성과 직접 관련될 수 있는 nitric oxide synthase (NOS) 발현을 관찰하고, 척수액 및 혈중에서 NO의 양을 측정함으로써 당뇨병성 통증에서의 NO의 역할을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

250-300 g 내외의 Sprague-Dawley 백서를 사용하였으며 표준 실험환경을 만들어 주었고 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. STZ를 50 mg/kg 체중의 용량으로 정맥주사하여 당뇨를 유발시켰다. 혈중 당농도가 400 mg/dl 이상인 쥐만을 당뇨백서로 사용하였으며, 혈당측정은 만성통증에 대한 행동검사시에도 확인하였다.

당뇨병을 유발시킨 후 8주 경과 시 뒷발의 물리적 자극에 의한 통증을 측정하였다. 백서를 급속수물로 바닥이 되어 있는 위에 올려놓고 8.4 mN에서 186.7 mN의 von Frey filaments (8.4, 13.5, 24.5, 54.4, 100.5 및 186.7 mN)로 발바닥을 자극하였다. von Frey filament를 양쪽 뒷다리 발바닥에 각각 10회 자극하여 자극에서 회피하는 회수를 기록했으며, 다리를 드는 빈도는 백분율로 나타내었다([다리를 들은 회수 ÷ 총 시도횟수] × 100). Acetone은 피부에 닿았을 때 증발하면서 피부의 온도를 떨어뜨리기도 하지만 냉수와는 구별된 반응양상을 나타내는 화학적 물질이다. 이러한 화학적 자극은 von Frey test후에 acetone 용액으로 뒷다리 발바닥에서 실시하였다. Acetone은 5분 간격으로 5번 시행하여 acetone으로 자극한 다음

발을 급작히 회피하는 회수를 기록하였고, 그 빈도는 백분율로 나타내었다([다리를 들은 회수 ÷ 총 시도횟수] × 100). 행동검사가 끝난 백서는 NOS 억제제인 L-nitroarginine methyl ester (L-NAME, 20 mg/kg) 또는 NO donor인 sodium nitroprusside (SNP, 0.3 mg/kg)를 복강 내 투여하였다. 이러한 약제를 투여한 후 30분 후에 다시 위와 동일한 방법으로 행동검사를 실시하여 약제 투여전과 후의 통증에 대한 반응 변화를 관찰하였다.

정상백서와 통증 측정에 사용한 당뇨백서에서 혈장 및 척수내에서 nitrite의 농도를 측정하였다. 혈장은 백서를 개복한 후 복부대동맥에서 동맥혈액을 채취하였으며, 척수액은 복부대동맥을 절단하여 실험시킨 후 대조(cisterna magna)를 노출시켜 채취하였다. 동맥혈액은 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)가 포함된 시험관에 채취해 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장 및 척수액내 nitrite (NO₂)와 nitrate (NO₃)의 농도는 nitrate를 nitrite로 변환시킨 후 nitrite의 농도를 측정하였다. 혈장은 혈장내 단백질을 제거하기 위하여 microcentrifuge filter (Millipore)를 통하여 초여과하였다. 여과액 50 μl에 nitrate reductase와 β-NADPH를 넣고 3시간 동안 상온에서 반응시켜 nitrate를 nitrite로 변화시킨 후 β-NADPH를 제거하기 위해 glutamate dehydrogenase와 ammonium chloride를 넣어 37°C에서 5분간 반응시켰다. NO의 농도를 간접적으로 나타내주는 nitrite 농도는 Griess reaction을 이용한 상용화된 kit (Promega)를 이용하여 측정하였다. Nitrite 농도는 540 nm에 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 표준곡선과 비교하여 농도를 환산하였다.

DRG 및 척수에서 NADPH-d 조직화학염색을 실시하기 위하여 37°C 식염수를 좌심실을 통하여 관류하여 혈액을 제거한 후, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 4% paraformaldehyde를 더한 고정액(4°C)으로 관류고정을 한 다음 24시간 같은 고정액에 후고정한 후 0.1 M phosphate buffered saline (PBS)에 30% sucrose를 더한 용액에 24시간 담가 두었다. 30% sucrose용액에 담가둔 DRG 및 척수 조직을 30 μm 두께로 동결절편을 만들어 0.1 M PBS로 수세 후 0.1 M PBS에 1 mM β-NADPH, 0.1 mM nitro blue tetrazolium chloride (NBT) 및 0.3% Triton X-100을 더한 용액에 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 증류수로 수세 후 슬라이드에 붙인 다음 관찰하

였다.

von Frey filament 및 acetone test 결과는 당뇨백서에서 L-NAME 또는 SNP투여 전과 투여 후 30분 후의 통증 변화를 백분율로 나타내어 paired t-test를 실시하였다. L5 DRG는 무작위로 한 마리당 세 절편을 택한 다음 200배의 시야에서 촬영 후 몽타주 사진을 제작한 다음 무작위로 반쪽을 택하여 계수하였고, 척수의 경우는 한 마리당 세 절편을 무작위로 선택하여 100배 시야의 사진을 촬영한 다음 후각의 양성 세포 수를 모두 계수한 후 t-test를 실시하였다. 통계적 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

본 실험에 사용된 당뇨백서의 일반적인 특징을 Table 1에 도시하였다. Table 1에 기술된 바와 같이 STZ로 유도한 당뇨백서는 정상백서에 비하여 체중은 현저히 감소되었다. 당뇨백서의 수축기 혈압 및 심박수는 정상백서와 유의한 차이를 보이지 않았으나 혈당은 현저히 증가되었다.

당뇨백서의 신경병적 통증에 미치는 NO의 영향을 알아보기 위하여 NOS 억제제인 L-NAME (20 mg/kg)을 복강내 주입하고 물리적 자극 및 화학적 자극에 의한 통증의 변화를 측정하였다(Fig. 1). Fig. 1에 도시된 바와 같이 당뇨백서에서 물리적 자극에 의한 통증은 정상백서에서 보다 현저하였다(23.8 ± 3.2% vs 58.0 ± 7.7%, P < 0.001). L-NAME을 복강 내 투여한 30분 후에 물리적 자극에 의한 통증의 변화를 측정할 결

Table 1. General Characteristics of Control and STZ-induced Diabetic Rats

	Control (n = 15)	Diabetic (n = 15)
Body weight (g)	469 ± 16*	295 ± 10*
Systolic blood pressure (mmHg)	110.0 ± 2.4	113.6 ± 3.4
Heart rate (beats/min)	344 ± 6	337 ± 9
Blood glucose (mg/dl)	109 ± 5 [†]	445 ± 16 [†]

All data are mean ± SE. Systolic blood pressure was measured with Tail-cuff methods.

*,[†]Statistically significantly different (P < 0.001).

과, 정상백서에서는 L-NAME에 의하여 영향받지 않았으나 (23.8 ± 3.2% vs 17.5 ± 3.7%, P = 0.25) 당뇨백서에서 유의하게 감소되었다 (58.0 ± 7.7% vs 44.0 ± 9.3%, P < 0.01). 또한 화학적 자극에 의한 통증은 두 군 모두에서 L-NAME 투여에 의하여 영향받지 않았다 (12.5 ± 3.7% vs 15.0 ± 5.0% for control rats, P = 0.6; 56.0 ± 4.9% vs 52.0 ± 9.0% for diabetic rats, P = 0.66). L-NAME 투여시 화학적 자극에 의한 통증반응이 감소하지 않은 것은 acetone 으로 발바닥을 자극할 때 화학적 자극 및 acetone 기화로 인한 냉자극이 동시에 가해져 통증 반응의 감소가 잘 나타나지 않은 것으로 보나 정확한 기전에 대한 세밀한 연구가 필요하다.

NO donor인 SNP (0.3 mg/kg)를 복강내 주입하고 물리적 자극 및 화학적 자극에 의한 통증의 변화를 측정하였다(Fig. 2). Fig. 2에 도시된 바와 같이 SNP를 복강내 투여한 30분 후에 물리적 자극에 의한 통증의 변화를 측정할 결과, 정상백서 및 당뇨백서에서 모두 SNP투여에 의하여 통증이 유의하게 증가되었다(33.8 ± 6.5% vs 47.5 ± 6.2% for control rats, P < 0.05; 46.6 ± 5.0% vs 67.7 ± 5.2% for diabetic rats, P < 0.05). 또한 당뇨백서에서 화학적 자극에 의한 통증은 SNP 투여에 의하여 유의한 증가를 보

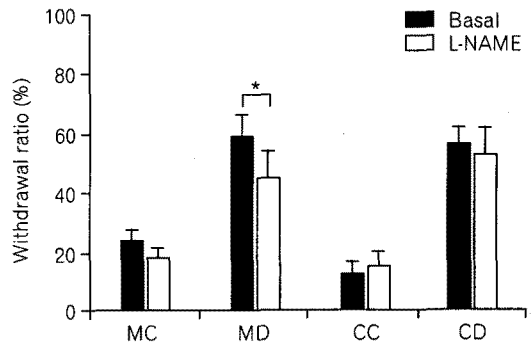


Fig. 1. The changes of paw withdrawal responses to von Frey filaments (mechanical test) and acetone (chemical test) 30 min after intraperitoneal administration of L-NAME (20 mg/kg, ip) in control (n = 5) and STZ-induced diabetic (n = 5) rats. Error bars represent the standard error of the mean. *Statistically significantly different (P < 0.01). MC: mechanical test in control rats, MD: mechanical test in diabetic rats, CC: chemical test in control rats, CD: chemical test in diabetic rats.

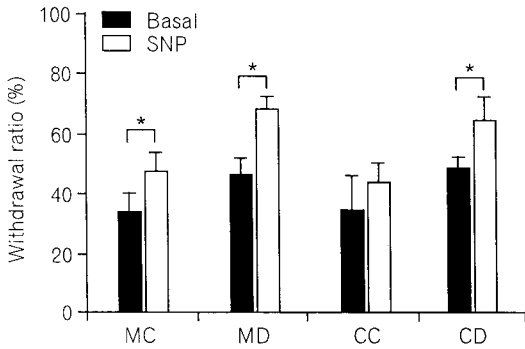


Fig. 2. The changes of paw withdrawal responses to von Frey filaments (mechanical test) and acetone (chemical test) 30 min after intraperitoneal administration of SNP (0.3 mg/kg, i.p.) in control (n = 5) and STZ-induced diabetic (n = 5) rats. Error bars represent the standard error of the mean. *Statistically significantly different (P < 0.05). MC: mechanical test in control rats, MD: mechanical test in diabetic rats, CC: chemical test in control rats, CD: chemical test in diabetic rats.

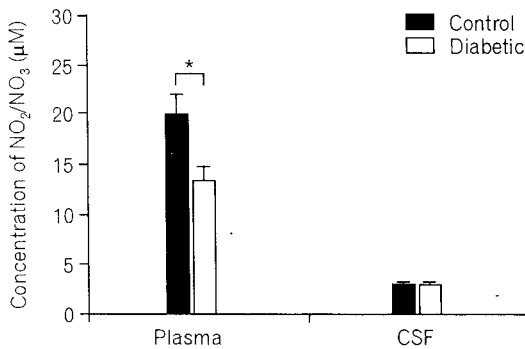


Fig. 3. Concentration of NO in the plasma and CSF of control and STZ-induced diabetic rats. Nitrite and nitrate (NO₂/NO₃) levels were measured with modified Griess reaction. Nitrate was converted to nitrite using nitrate reductase. Error bars represent the standard error of the mean. *Statistically significant different (P < 0.01).

였으나 (48.8 ± 3.7% vs 64.4 ± 7.5%, P < 0.05). 정상백서에서는 증가되었으나 유의한 차이는 보이지 않았다 (35.0 ± 3.7% vs 43.8 ± 6.5%, P = 0.47).

정상대조군에서 물리적 자극 및 화학적 자극시 12%에서 35%에 이르는 통증반응이 나타났다. 정상 쥐에 STZ를 투여할 당시에 통증반응이 10% 이상

Table 2. Comparison of NADPH-d Positive Cells in the DRG between Control (n = 5) and STZ-induced Diabetic (n = 5) Rats

	Control	Diabetic
DRG	83.4 ± 7.6*	32.6 ± 5.9*
Spinal cord	14.2 ± 3.5	12.7 ± 4.6

All data are mean ± SEM.

*Statistically significantly different (P < 0.001).

나타난 쥐는 본 실험에서 제외하였지만, 정상대조군의 쥐도 8주 동안에 매주 1회씩 통증 검사를 실시하여 반복 통증 검사에 대한 적응 또는 스트레스 반응으로 통증반응이 나타났다고 본다.

당뇨백서에서 나타나는 통증과 혈중 및 척수액내의 NO농도의 관계를 알아보려고 하였다. Fig. 3에 도시된 바와 같이 정상백서의 혈장 및 척수액의 NO 농도는 각각 20.1 ± 2.1 µM, 3.0 ± 0.2 µM이었으며, 당뇨백서에서 각각 13.4 ± 1.5 µM, 3.0 ± 0.3 µM으로서 당뇨백서의 혈중 NO농도는 정상백서에 비하여 유의한 차이로 감소되었으나(P < 0.01) 척수액의 NO 농도는 유의한 차이가 없었다.

정상 L5 DRG에서는 NADPH-d 조직화학 양성세포가 반쪽 절편당 84.4 ± 7.6개이었고, 당뇨쥐 L5 DRG에서는 양성세포 수가 32.6 ± 5.9로 감소하였다(Table 2, Fig. 4A, 4B)(P < 0.001). 정상 L5 척수 후각에서 NADPH-d 조직화학 양성세포가 절편당 평균 14.2 ± 3.5개였으며, 당뇨쥐 L5 척수 후각에서도 평균 12.7 ± 4.6개로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다.

고 찰

본 실험에서 당뇨병성 통증시 NOS 억제제는 만성 통증을 완화시키며, NO donor는 통증을 악화시킴을 확인하였고, 당뇨백서에서 혈중 NO농도는 정상대조군에 비하여 감소되어 있었다. DRG에서는 NADPH-d 즉 nNOS의 활성이 감소되었고, 척수에서는 NO 합성변화가 없음을 확인하였다.

NO는 신경계에서 특이한 신경전달물질로서 연접 소포내에 저장되어 있지 않고 필요시에 합성되어 진다. 최근 들어 NOS의 세 가지 아형(nNOS, eNOS 및 iNOS)가 발견되고 이들 유전자 및 아미노산 서열이

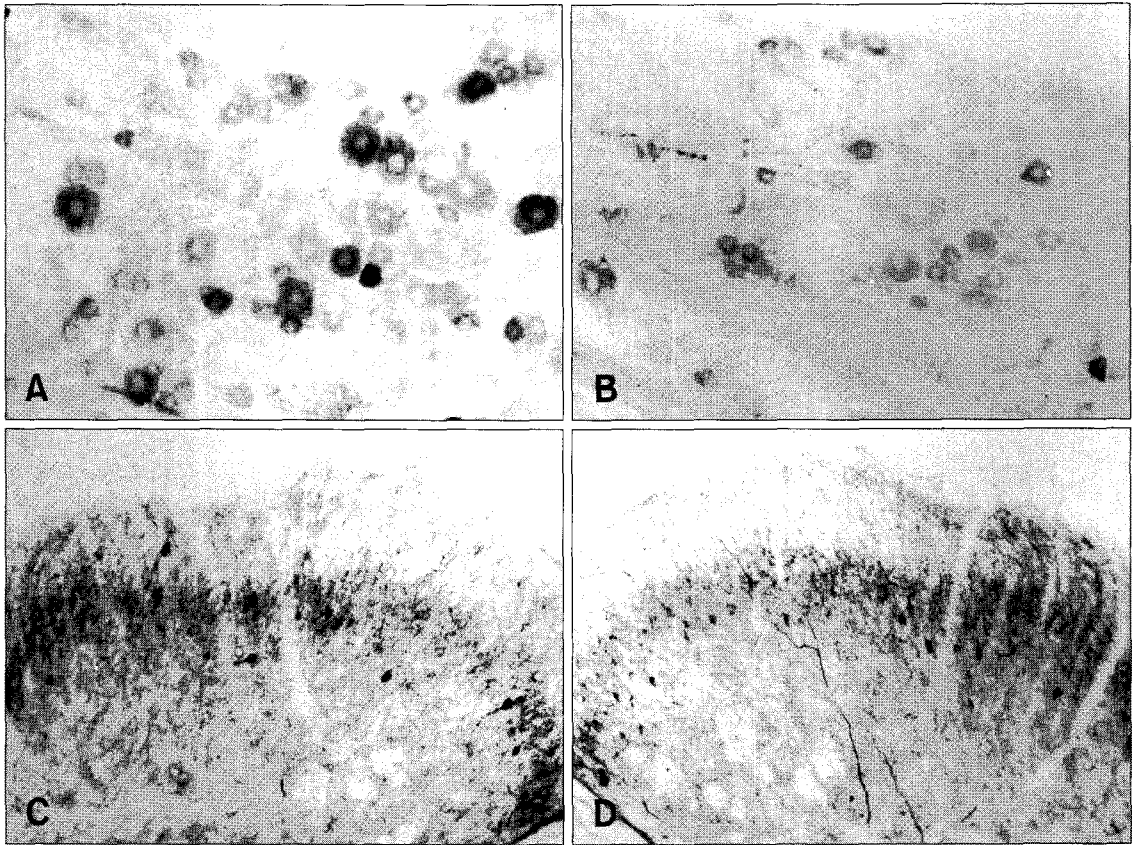


Fig. 4. NADPH-d in the DRG and spinal cord of control and STZ-induced diabetic rats. A) and B) The number of NADPH-d positive cells was decreased in the DRG of STZ-induced diabetic rats (B) compared with controls (A), $\times 200$. C) and D) There was no significant difference in the number of NADPH-d positive cells in the dorsal horn of spinal cord between control (C) and STZ-induced diabetic (D) rats, $\times 100$.

밝혀져 각각의 기능에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다.^{6,7)} NO는 말초신경, 척수 및 상척추 위치에서 통증정보의 전달 및 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹¹⁾ 특히 척수신경손상모델에서 NO농도의 증가는 신경병적통증의 발달과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 말초신경의 절단은 동측의 DRG 세포의 NOS 활성도를 증가시키며,^{12,13)} NOS 억제제는 DRG에서 발생하는 자발적인 활성(spontaneous activity)을 감소시킨다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 또한 말초신경손상 통증모델에서 NOS 억제제의 척수내 투여는 신경병적 통증을 완화시킨다고 알려져 있으며,^{15,16)} 사람에서도 피하내, 정맥내 NO의 투여는 통증을 유발시킨다고 알려져 있어¹⁷⁾ NOS 억제제가 신경병적 통증 또는 염증성 통증에 치료제로서의 가능성이 제시되

고 있다.^{18,19)} 그러나, 최근들어 신경손상에 의한 통증시 nNOS 억제제가 통증을 완화시키지 않는다는 연구 결과가 발표되어²⁰⁾ 만성통증에서의 NO의 역할은 확실하지 않다.

당뇨병에서의 대사적인 이상²¹⁾ 및 신경의 허혈은^{22,23)} 당뇨병의 신경손상발달에 중요한 역할을 하고 있다. 당뇨병에서 sorbitol의 축적은 redox 환경을 변화시키고, NO의 합성을 감소시킨다고 알려져 있다.²⁴⁾ 따라서 당뇨병에서 혈중 NO의 감소는 당뇨병적 신경손상에 관련이 되어 있다고 알려졌으나, 당뇨병에서 나타나는 통증에서 NO의 역할에 대한 보고는 상이하다. STZ로 유도된 당뇨병성 통증시 L-NAME (100 mg/kg)을 정맥내 주사하여 통증에 대한 역치의 감소되어 즉 통증이 악화됨으로 당뇨병쥐에서 NO의 감

소가 통증의 원인 될 수 있다고 제시되었으며,⁴⁾ 당뇨병쥐에서 삼차신경절의 NADPH-d 양성세포가 감소하였으며 통증의 유발과 관계될 것이라고 보고되었다.²⁵⁾ 반면에 Fox 등은⁵⁾ 당뇨병성 통증시 L-NAME (50 mg/kg)을 복강내 주사한 경우 통증에 유의한 차이가 없다고 하였다. 본 연구에서는 NO donor인 SNP를 투여할 경우 통증이 유발되었으며 NOS 억제제인 L-NAME을 투여할 경우 통증은 감소되는 양상을 볼 수 있었다. 이는 Sasaki와는⁴⁾ 상반된 결과로 적어도 NO의 감소가 당뇨병성 통증의 원인이 될 수 없음을 보여준다. 오히려 NO가 통증을 유발시키는데 있어 당뇨병에서 특이적이지는 않았고 주요한 통증물질 또는 매개체로서 역할을 할 것이라고 사료된다.

본 연구에서 척수에서는 NADPH-d 조직화학 양성세포가 감소하지 않음을 확인하였다. 이는 당뇨병에서 말초신경은 쉽게 손상을 받지만 중추신경계는 당뇨병이 심해진 경우나 손상을 받는다는 사실은²⁶⁾ 보여준다. 당뇨병쥐의 DRG나 삼차신경절의 감각신경세포에서 NADPH-d 양성세포는 감소된다는^{4,23)} 사실은 본 연구와 일치할 하나 통증에의 역할은 상이한 결과가 나왔다. 약물투여에 의한 통증의 변화에 대한 본 연구결과는 Luo 등의²⁰⁾ 결과와 일치한다. 이러한 결과의 상이함은 약물의 투여 용량, 투여 시점 및 투여 경로 등의 차이에서 기인된 것으로 본다.

본 실험의 결과는 당뇨병 DRG에서 NADPH-d 양성세포가 정상대조군보다 감소하고 따라서 NO 합성이 감소될 것임을 보여준다. DRG에서의 NO 합성 감소가 당뇨병성 통증의 원인이라고 단정하려면 L-NAME 투여시 통증이 악화되어야 한다. 그러나, 본 연구에서는 L-NAME 투여시 당뇨병성 통증이 감소하였기 때문에 DRG에서의 NO 합성 감소가 당뇨병성 통증의 유발과 유지와는 관계가 없음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Pfeifer MA, Ross DR, Schrage JP, Gelber DA, Schumer MP, Crain GM, et al: A highly successful and novel model for treatment of chronic painful diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 1993; 16: 1103-15.
2. Calcutt NA, Chaplan SR: Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1478-82.

3. Field MJ, McCleary S, Boden P, Suman-Chauhan N, Hughes J, Singh L: Involvement on the central tachykinin NK1 receptor during maintenance of mechanical hypersensitivity induced by diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 1226-32.
4. Sasaki T, Yasuda H, Maeda K, Kikkawa R: Hyperalgesia and decreased neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neuroreport* 1998; 9: 243-7.
5. Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L: Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy. *Pain* 1999; 81: 305-16.
6. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
7. Dawson TM, Dawson VL: Nitric oxide synthase- role as a transmitter mediator in the brain and endocrine system. *Ann Rev Med* 1996; 47: 219-27.
8. Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL: L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 198-202.
9. Duarte ID, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 217: 225-7.
10. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M: Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31: 251-8.
11. Minami T, Nishihara I, Ito S, Sakamoto K, Hyodo M, Hayaishi O: Nitric oxide mediates allodynia induced by intrathecal administration of prostaglandin E2 or prostaglandin F2 alpha in conscious mice. *Pain* 1995; 61: 285-90.
12. Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T: Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11617-21.
13. Steel JH, Terenghi G, Chung JM, Na HS, Carlton SM, Polak JM: Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 1994; 169: 81-4.
14. Wiesenfeld-Hallin Z, Hao JX, Xu XJ, Hokfelt T: Nitric oxide mediates ongoing discharges in dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. *J Neurophysiol* 1993; 70: 2350-3.
15. Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ: Nitric

oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 1992; 50: 7-10.

16. 임중우, 광영섭, 정승수, 이규래, 윤덕미, 남택상: 신경병성 통증모델쥐에서 산화질소합성효소 억제제가 척수후각세포의 활성도에 미치는 영향. *대한통증학회지* 2000; 13: 19-30.
17. Holthusen H, Arndt JO: Nitric oxide evokes pain at nociceptors of the paravascular tissue and veins in humans. *J Physiol* 1995; 487: 253-8.
18. Gordh T Jr: The role of nitric oxide in neuropathic pain and neurodegeneration. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1998; 113: 29-30.
19. 이청, 최윤, 송명희, 임중우, 이동명, Raza SN: L-NAME에 의한 쥐의 발바닥에서 Freud's Complete Adjuvant에 의해 유발된 통증 억제. *대한통증학회지* 1998; 11: 194-200.
20. Luo ZD, Chaplan SR, Scott BP, Cizkova D, Calcutt NA, Yaksh TL: Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: Lack of a role in allodynia development. *J Neurosci* 1999; 19: 9201-8.
21. Kikkawa R, Hatanaka I, Yasuda H, Kobayashi N, Shigeta Y, Terashima H, et al: Effect of a new aldose reductase inhibitor, (E)-3-carboxymethyl-5-[(2E)-methyl-3-phenylpropenylidene]rhodanine (ONO-2235) on peripheral nerve disorders in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1983; 24: 290-2.
22. Dyck PJ, Hansen S, Karnes J, O'Brien P, Yasuda H, Windebank A, et al: Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2513-7.
23. Yasuda H, Dyck PJ: Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology* 1987; 37: 20-8.
24. Stevens MJ: Nitric oxide as a potential bridge between the metabolic and vascular hypotheses of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 1995; 12: 292-5.
25. Rodella L, Rezzani R, Corsetti G, Bianchi R: Nitric oxide involvement in the trigeminal hyperalgesia in diabetic rats. *Brain Res* 2000; 865: 112-5.
26. Biessels GJ, Cristino NA, Rutten GJ, Hamers FP, Erkenlens DW, Gispen WH: Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effect of insulin treatment. *Brain* 1999; 112: 757-68.