

척수 아교질 신경세포의 흥분성에 대한 활성산소종의 역할

최정희⁺ · 김재효¹⁺ · 임성준 · 박병림² · 권강범³ · 천상우^{*}

원광대학교 치과대학 구강생리학교실, 1: 한의과대학 경혈학교실, 2: 의과대학 생리학교실, 3: 한의과대학 생화학교실

Roles of Reactive Oxygen Species on Neuronal Excitability in Rat Substantia Gelatinosa Neurons

Jeong Hee Choi⁺, Jae Hyo Kim¹⁺, Sung Jun Lim, Byung Rim Park², Kang Beom Kwon³, Sang Woo Chun^{*}

Department of Oral Physiology, College of Dentistry, 1: Department of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, 2: Department of Physiology, College of Medicine, 3: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Reactive oxygen species (ROS) are toxic agents that may be involved in various neurodegenerative diseases. Recent studies indicate that ROS are also involved in persistent pain through a spinal mechanism. In the present study, whole cell patch clamp recordings were carried out on substantia gelatinosa (SG) neurons in spinal cord slice of neonatal rats to investigate the effects of ROS on neuronal excitability and excitatory synaptic transmission. In current clamp condition, tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH), an ROS donor, induced a electrical hyperexcitability during t-BuOOH wash-out followed by a brief inhibition of excitability in SG neurons. Application of t-BuOOH depolarized membrane potential of SG neurons and increased the neuronal firing frequencies evoked by depolarizing current pulses. Phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN), an ROS scavenger, antagonized t-BuOOH induced hyperexcitability. In voltage clamp conditions, t-BuOOH increased the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). In order to determine the site of action of t-BuOOH, miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded. t-BuOOH increased the frequency and amplitude of mEPSCs, indicating that it may modulate the excitability of the SG neurons via pre- and postsynaptic actions. These data suggest that ROS generated by peripheral nerve injury can induce central sensitization in spinal cord.

Key words : ROS, substantia gelatinosa neuron, excitability, pain

서 론

통증은 조직 손상으로부터 신체를 보호하기 위한 일종의 초기 경고 신호로 작용하여 유해한 환경에서 생명체가 생존하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 동시에 무해한 자극에 대해 감각 과민을 일으킴으로써 손상된 조직의 회복에도 중요한 생리학적 역할을 담당하고 있다¹⁾. 이러한 통증은 일차적으로 일차 구심성 신경 말단에 존재하는 동통 수용기의 활성화로 발생되지만, 임상에서 발견되는 염증성 통증 (inflammatory pain), 신경병증성 통증 (neuropathic pain) 등 통증의 유발 원인과 발생기전은

매우 다양하다.

최근의 연구에 의하면 만성 혹은 지속성 통증 (염증이나 신경 손상과 관련)의 기전이 급성통증과 근본적으로 다르다는 것이 알려졌다^{2,4)}. 급성통증에서는 해로운 자극이 유해 수용기에 의해 감지되고 그 정보가 뇌로 전달된다. 지속성 통증의 경우에는 말초감작 (peripheral sensitization)과 중추감작 (central sensitization)의 발생과 관련된다. 말초 감작은 유해 수용기에 의해 나타나는데 역치가 넘은 자극에 대해서 정상적인 경우보다 더 강하게 반응하며 역치하 자극에 대해서도 반응하는 경향을 보인다. 중추감작은 중추신경계 특히 척수후각의 통증 전달 신경 세포에서 일어나는 유사한 현상이다^{4,6)}.

활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 알츠하이머 병, 파킨슨병, 축삭 경화증 혹은 노화와 뇌손상과 같은 퇴행성 신경질환과 연관되어 있다⁷⁻¹²⁾. 일반적으로 ROS의 생성과 생물학적

* 교신저자 : 천상우, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학

· E-mail : physio1@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6932

· 접수 : 2007/02/16 · 채택 : 2007/03/23

+ These two authors contributed equally to this work

반응성은 superoxide dismutase나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화 활성에 의해 정밀하게 조절된다¹³⁾. 그러나 free radical의 생성이 증가하거나 항산화 방어가 감소하면 산화자극을 유발하게 되고¹⁴⁾, 이는 세포내 단백질, DNA, 지질 등의 손상을 초래 한다^{15,16)}. 이전에 산화자극은 주로 세포의 죽음이나 변성 등에서 강조 되었으나 최근에는 통증 유발에 대한 역할에 관심이 증가하고 있다.

최근의 연구에서 ROS가 염증성 통증이나 신경병증성 통증과 같은 상태에서 통증 발생에 관여되어 있다고 보고 되었다. 흰 쥐의 후지에 carrageenan을 피부 내에 투여하여 유발된 염증성 통증에서 superoxide dismutase 유사물질인 M40403을 전신 투여하여 통증을 감소시켰다고 하였고^{17,18)}, 척수신경 결찰 모델 (spinal nerve ligation; SNL)에 의한 통증에 대하여 대표적 항산화제인 phenyl N-tert-butyl nitrone (PBN)과 5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide (DMPO)의 전신투여와 척수 내 투여에 의해 수 시간동안 지속되는 진통효과가 나타남이 보고 되었으며¹⁹⁾, 현재 실생활에서 많이 쓰이는 항산화제의 하나인 비타민 E를 이용한 연구에서도 비타민 E가 인산화된 NMDA 수용체의 1 소단위 (pNR1)를 감소시키고 척수후각 뉴런의 반응성을 감소시켜 척수에서의 중추감작을 감소시킴에 의해 진통효과를 나타낸다고 하였다²⁰⁾.

따라서 이 연구에서는 여러 가지 항산화제가 척수에 작용하여 중추감작을 감소시킴에 의하여 진통작용을 나타냈을 것이라는 선행 연구결과를 토대로 실제로 ROS가 척수에 작용하여 중추감작을 일으켜 통증을 유발할 수 있는지 확인하고자 patch clamp 방법을 이용하여 통증전달에 일차적 중계 역할을 하는 척수 아교질 뉴런의 흥분성과 시냅스 전도에 대한 ROS의 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 척수절편 제작

생후 11일-20일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였다. 흰쥐를 ether로 마취한 후 20% urethane (2 ml/Kg)을 복강 내 투여하였다. 흉추에서부터 천추까지 척추제거술 (laminectomy)을 하여 척수를 노출한 후 요천수 팽대부 (lumbosacral enlargement)에서 1 cm 정도 길이의 척수를 후근이 부착된 상태로 절단하였다. 조직절편기 (vibratome 752M, Campden, 영국)의 고정대에 agar block을 먼저 고정한 후 순간 접착제를 이용하여 척수절편을 고정하였다. 95% O₂:5% CO₂를 공급하면서 두께 250 μm의 척수절편을 얻었는데, 조직 주위에 얼린 절단용액을 넣어 절편의 온도를 가능한 낮추었으며 절단 중 계속 온도 조절기(model 765, Campden, 영국)를 이용하여 용액의 온도를 1-2 °C 정도로 낮게 유지 시켰다. 이때 진동속도는 최대 그리고 칼날의 진행속도는 최저 (1-0.5)로 하여 조직이 칼날에 밀리지 않도록 하였다. 척수절편은 32 °C의 인공 뇌척수액 용액에 1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에는 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 척수절편을 현미경 (BX50WI,

Olympus, 일본) 위의 기록용기 (1 ml)에 옮긴 후 치실로 만든 그물로 움직이지 않도록 고정한 후 시행하였고, 실험기간 동안 계속해서 95% O₂:5% CO₂가 포함된 용액을 관류펌프 (Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 관류시켰다 (2-3 ml/min).

2. 실험용액

척수절편 제작에 사용했던 절단용액의 조성 (mM)은 252 Sucrose, 2.5 KCl, 0.1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄ 등으로 구성되었으며, 막전압 및 시냅스전류를 기록하기 위한 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 7.4로 유지하였다. 미세 시냅스후 전류 기록 시에는 tetrodotoxin (TTX) 0.5 μM을 추가하여 신경전달을 차단하였다. 세포내 용액은 150 K-Glu, 10 HEPES, 5 KCl, 0.1 EGTA, 2 MgATP, 0.3 Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 첨가하여 7.3으로 조정하였다. 실험에 사용한 tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH), phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN) 등은 Sigma사 (미국)에서 구입하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 중력을 이용한 관류장치 (BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

3. 전기생리학적 기록방법

막전압 및 시냅스 전류 기록은 whole cell patch clamp 방법을 사용하였다. 미세 유리전극 제조기 (PP-830, Narishige, 일본)와 microforge (MF-830, Narishige, 일본)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연질 유리미세관 (T150, WPI, 미국)을 저항이 5-8 MΩ이 되도록 기록전극을 제작하였다. 10배의 대물렌즈로 척수 아교질 부위를 확인한 후 전극에 양압을 가하면서 미세 전극조절기 (ROE-200, Sutter, 미국)를 이용하여 30° 경사를 유지하면서 세포에 접근하였다. Seal test를 시행하면서 세포에 접근하여 피펫의 저항이 순간적으로 증가하는 것으로 세포에 근접함을 확인한 후 양압을 풀고 음압을 가하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. 전압고정에 의한 전류측정에는 Axopatch 200B 증폭기 (Axon, 미국)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon, 미국) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (Version 8.0, Axon, 미국)를 사용하여 실험수행의 명령과 얻어진 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 발생된 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였으며 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

4. 실험자료의 분석

시냅스후 전류의 분석은 Mini Analysis program (version 6.0, Synaptosoft, 미국)을 이용하였고 막전압의 분석은 Clampfit (Version 8.0, Axon, 미국)을 이용하였다. 대조군과 처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 paired t-test를 이용하였고, p<0.05에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균값 ± 표준오차 (mean ± S.E.M.)로 표시하였다.

연구성적

1. 아교질 세포의 흥분성에 대한 t-BuOOH의 효과

전류고정법에서 기록용 전극을 이용하여 세포에 양전류를 단계적으로 가하였을 때 활동전압이 발생하였고 안정막전압은 -45~-68 mV로 다양하였다 (Fig. 1). 세포에 100-200 pA의 양전류를 자극하였을 때 발생한 활동전압은 100 pA로 자극하였을 때는 9.3±0.9회의 빈도를 보였고 200 pA로 자극하였을 때는 14.7±1.1회로 유의한 증가를 보였다 (n=13)(p<0.001). t-BuOOH (2 mM)가 첨가된 용액으로 3분간 관류시킨 후 활동전압의 빈도는 200 pA로 자극했을 때 14.4±1.6회에서 11.7±1.5회로 감소하였으며 약물이 첨가되지 않은 용액으로 재관류 한 후 10분이 경과하였을 때 18.1±1.8회로 대조군에 비해 유의하게 증가 하였다 (n=7) (p<0.01). t-BuOOH 투여 후 PBN이 포함된 용액으로 관류한 군에서는 대조군 (15.5±1.7)에 비하여 PBN 투여 후 13.2±2.0회로 활동전압의 빈도가 감소하였다 (n=6) (p<0.05).

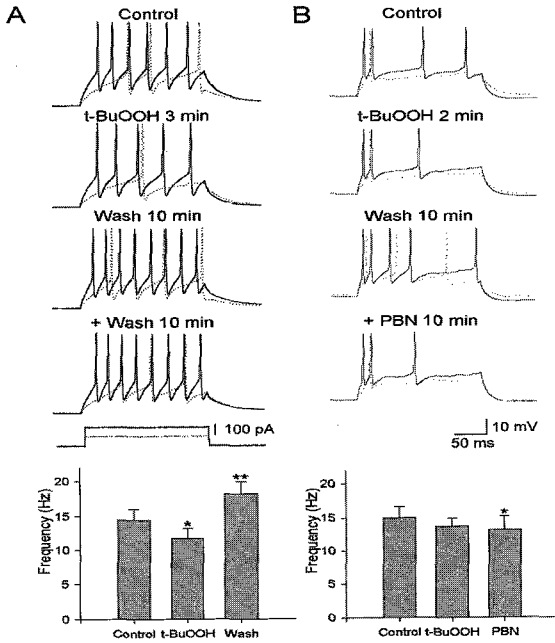


Fig. 1. Effects of t-BuOOH on neuronal excitability of the SG neurons recorded in current clamp mode. A: Action potentials were evoked by direct (through the patch electrode) intracellular injections of current pulses of increasing magnitude (100 pA steps) before, during and after t-BuOOH administration. The frequency of action potentials was increased after t-BuOOH wash-out. B: t-BuOOH induced increase of action potentials was blocked by PBN. The holding potential was corrected to -60 mV after application of t-BuOOH.

세포외 용액에 TTX 0.5 μM을 추가한 후 지속적으로 막전압을 기록하면서 t-BuOOH를 처리 하였을때 약물 주입 후 1-5분 까지 막전압의 과분극이 관찰되었으며 이후 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 5-15 mV의 탈분극이 발생되어 10분-1시간 동안 지속된 후 서서히 원상태로 회복되었다 (n=6) (Fig. 2A). t-BuOOH 처리 후 PBN이 포함되어 있는 용액으로 관류하였을 때는 6개의 세포 중 5개의 세포에서 막전압의 탈분극이 관찰되지 않았다 (Fig. 2B).

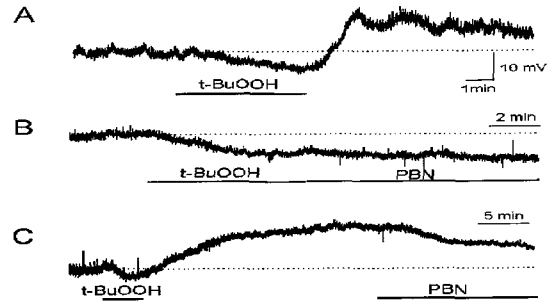


Fig. 2. Effects of t-BuOOH on the membrane potential of the SG neurons in a TTX containing solution. A: t-BuOOH (2 mM) depolarized the membrane potential of a SG neuron followed by a brief period of hyperpolarization. B: PBN (1 mM) blocked completely membrane depolarization. C: t-BuOOH induced depolarization was inhibited by PBN. Dotted lines indicate resting membrane potential of each cells.

2. 흥분성 시냅스후 전류에 대한 t-BuOOH의 효과

전압고정법으로 유지전압 -70 mV에서 지속적으로 시냅스 전류를 기록하였을 때 내향성 전류를 기록하였는데 이는 이 실험에서 사용한 용액의 이온 농도를 고려할 때 역전전압이 0 mV 부근인 흥분성 시냅스후 전류일 것으로 생각되며 억제성 시냅스후 전류는 이론적 역전전압이 -70 mV이므로 발생되지 않았을 것으로 사료된다.

자발적 흥분성 시냅스후 전류 (sEPSCs)에 대한 t-BuOOH의 효과를 관찰하기 위하여 유지전압을 -70 mV로 고정하고 지속적으로 시냅스 전류를 기록하였다 (n=12) (Fig. 3). sEPSCs에 t-BuOOH를 투여하였을 때 크기와 빈도의 감소가 관찰되었으나 유의하지 않았으며 약물이 포함되지 않은 용액으로 관류시에는 빈도와 크기가 대조군 (3.4±0.7 Hz, 13.8±0.7 pA)에 비해 각각 11.9±2.8, 20.9±2.1로 유의하게 증가하였다 (p<0.05). sEPSCs의 증가는 t-BuOOH 투여 후 5분 정도 후부터 관찰되었으며 30분-1시간 정도까지 유지된 후 서서히 약물처리 전 수준으로 감소하였다.

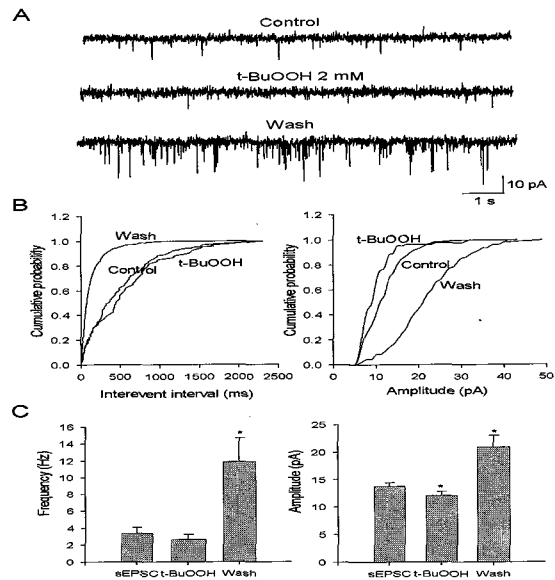


Fig. 3. Effects of t-BuOOH on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). A: Current traces of sEPSCs show the effects of t-BuOOH on the synaptic activity of a SG neuron. B: Cumulative fraction plot of sEPSCs interevent interval and amplitude. C: Bar graph showing the average sEPSCs frequency and amplitude. After wash-out of t-BuOOH, both the frequency and amplitude were significantly increased.

t-BuOOH의 흥분성 시냅스후 전류에 대한 조절작용이 시냅스 전 혹은 시냅스 후에 작용하는지를 알아보기 위해 미세 시냅스 후 전류 (mEPSCs)에 대하여 t-BuOOH를 투여하였다. TTX 0.5 μ M이 포함된 용액에서 기록한 mEPSCs에 t-BuOOH를 처리한 결과 정상용액으로 관류 후 빈도를 1.3 \pm 0.4 Hz에서 2.1 \pm 0.7 Hz로 유의하게 증가시켰으며 (n=12) (p<0.05), 크기도 11.9 \pm 2.0 pA에서 17.5 \pm 3.3 pA로 유의하게 증가시켰다 (p<0.05) (Fig. 4). 이러한 결과는 t-BuOOH가 척수후각 내에서 신경전달물질의 분비와 시냅스후 뉴런의 반응성에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

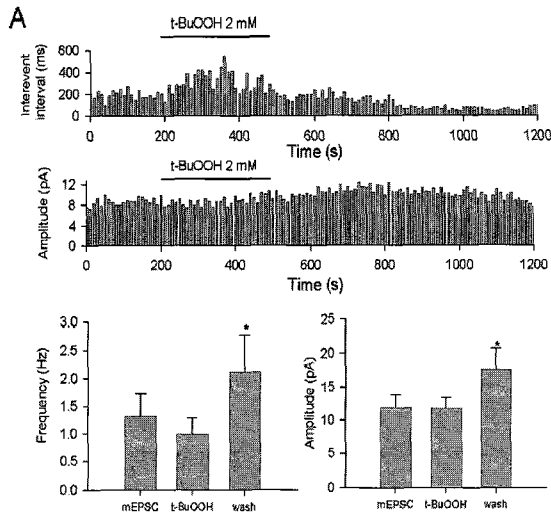


Fig. 4. Effects of t-BuOOH on miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) in the SG neurons. A: Time-course of changes in the frequency and the amplitude of mEPSCs showing the effects of t-BuOOH (2 mM). B: Bar graph showing the average mEPSCs frequency and amplitude.

고찰

취척수 SG 뉴런은 주로 통각정보를 전달하는 일차 감각신경의 시냅스 흥분을 받아 통각정보를 통합한다. 이 세포의 흥분성은 통증의 역치를 결정하는 척수 내의 첫 관문으로 많은 종류의 신경전달물질이 신경세포의 시냅스 전달을 매개하거나 혹은 시냅스 통합에 기여하고 있다. 만성통증은 이러한 정보전달 체계 중에서 지속적 신경자극에 의해 시냅스 가소성의 변화가 유발되며, 이러한 변화에 의해 오랜 시간 지속되는 세포 반응성의 증가가 만성통증의 세포기전이라고 알려져 있다.

Willis²¹⁾는 이러한 관점에서 만성통증의 기전이라고 알려진 중추성 감각 (central sensitization)이 척수에서 관찰되는 장기강화 (long term potentiation; LTP)의 하나의 형태라고 제시하였으며, LTP와 중추성 감각 사이에는 매우 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 즉 LTP는 glutamate에 의한 시냅스후 세포에 존재하는 NMDA, non-NMDA 그리고 metabotropic glutamate 수용체의 활성화, 전압 의존성 Ca²⁺ 이온통로를 통한 Ca²⁺의 유입, 다양한 세포내 신호전달기전 (PKC, CaMKII, PKA, PKG, NO), 그리고 GABA 수용체의 억제 등을 통해서 이루어지며 이러한 기전은 중추성 감각과 유사한 기전이라고 하였다.

산화자극은 다양한 퇴행성 신경질환을 유발하는 중요한 인자이며^{8,22,23)}, ROS는 비가역적인 세포 죽음을 일으키는 심한 산화상태를 유발하는 주요 물질로 작용한다고 알려져 있으나 이 연구에서는 t-BuOOH에 의한 뉴런 활동성의 증가나 흥분성 시냅스 전류의 증가 등의 반응이 항산화제인 PBN에 의해 가역적으로 회복되는 것으로 보아 (Fig. 1, 2) 통증에 관여하는 ROS의 작용은 영구적인 세포 죽음을 일으키는 것이 아닌 경미한 산화자극에 의한 일시적인 기능 변화를 일으키는 상태라 할 수 있다. 또한 PBN 투여에 의해 오히려 정상 상태 이하로 막전압이 과분극되거나 양전류에 의해 유발되는 활동전압의 빈도가 감소됨은 (Fig. 1, 2) 평상시 세포내에 존재하는 ROS가 정상적으로 세포내 조절분자로 작용하며 catalase, glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화 활성에 의해 정밀하게 조절되고 있는바와 같이¹⁹⁾ 과도한 항산화 활성의 증가로 세포의 활성을 억제한 결과에 기인하였다고 추측할 수 있다.

ROS에 의해 유발되는 뉴런의 안정막 전압에 관한 초기의 변화는 과분극이 발생됨이 보고 되고 있다. 해마의 CA1 뉴런이나 중뇌의 도파민 분비 뉴런에서 H₂O₂ 투여에 의해 과분극을 유발하였는데 이는 칼슘 의존성 K⁺ 통로의 활성화나 ATP 민감성 K⁺ 통로의 활성화에 의해 발생하여 산화자극에 대하여 세포를 보호하는 역할을 할 것이라 보고하였다^{24,25)}. 그러나 H₂O₂ 투여 후 정상용액으로 재관류 하는 과정에서 과흥분된 전기활성이 발생함이 최근 보고 되었는데, H₂O₂에 의한 과흥분성은 H₂O₂에 의한 시냅스 공간에서의 glutamate의 증가, NMDA 수용체 활성의 증가에 따른 이차적인 NMDA 수용체에 의해 매개되는 ROS 생성의 결과라 추측하였으며²⁶⁾ 이 연구에서도 대부분의 세포에서 H₂O₂ 투여에 의해 초기 1-5분 사이에서는 과분극이 관찰 되었고 그 이후 점진적인 탈분극이 발생되어 10분-1시간 동안 지속된 후 서서히 원상태로 회복됨이 확인되었다 (Fig. 2).

척수후각 뉴런에서 ROS의 발생은 미토콘드리아에서 유래되는 superoxide와 산화질소 합성효소에 의해 유래되는 산화질소 등이 대표적이다²⁷⁾. 어느 형태가 신경병증성 통증과 이 연구에서의 흥분성의 증가에 더욱 중요하게 관여 되는지는 알 수 없으나 PBN이 peroxy radical, peroxy nitrite, nitrogen dioxide, superoxide 등에 모두 작용 할 수 있다고 알려져 있으므로²⁸⁾ 두 가지 형태 모두 관여될 수 있으며, 특히, Kamsler와 Segal²⁹⁾은 hydrogen peroxide가 해마세포에서 농도에 따라 LTP와 장기 약화 (long term depression; LTD)를 유발하였다고 하였으며 Klann³⁰⁾은 superoxide가 해마 세포에서 LTP를 유발한다고 보고하였다.

척수후각 뉴런 내 ROS가 증가되는 기전으로는 먼저 일차 구심신경의 활성 증가에 의한 glutamate의 증가 혹은 시냅스전 뉴런의 축삭말단에 존재하는 glutamate transporter가 ROS에 의해 억제됨으로써 시냅스 공간에 glutamate가 증가됨에 의해 시냅스후 뉴런의 세포막에 존재하는 NMDA 수용체가 활성화되며³¹⁾, 이어서 활성화 된 NMDA 수용체는 세포내 Ca²⁺ 증가를 일으키고 이는 세포내 ROS 합성 증가를 일으키거나 PKC를 활성화시킨다. PKC는 세포에 내재되어 있는 AMPA 수용체를 세포막에 부착시켜 (trafficking) 흥분성 시냅스후 전압을 증가시키고 뉴

론의 흥분성을 증가시키는데, 이 연구에서 EPSCs의 크기 증가와 이에 따른 흥분성의 증가는 (Fig. 3, 4) 이 과정에 의해 유발 되었을 것으로 추측 할 수 있다. 또한 미세 시냅스후 전위의 크기가 증가되는 이유로는 1) 하나의 quantum 분비에 의해 glutamate 수용체가 포화되지 않았을 경우, glutamate에 대한 수용체의 친화도 증가로 분비되는 glutamate에 결합되는 수용체 수가 증가 하였거나, 2) 시냅스후 수용체의 전도도가 증가하여 많은 이온을 이동시켜 전류의 크기가 증가하였거나, 3) 축삭이 분지될 때 일부에서만 신경전달 물질이 분비되다가 분비하는 축삭말단의 수가 증가하여 시냅스후 수용체의 open probability가 증가되었을 경우를 들 수 있다³²⁾.

이전의 연구에서 항산화제인 PBN의 복강 내 투여에 의해 통증행동을 감소시키고 그것의 척수 내 투여에 의해서도 유사한 진통작용을 나타내 ROS가 중추감작에 관여할 것으로 추측하였으나¹⁹⁾ ROS 생성의 증가는 손상된 신경 부위와 손상된 신경의 후근 신경절에서도 관찰되며³³⁻³⁵⁾ 이러한 말초의 ROS도 통증 발생에 관여 하므로 차후에 ROS의 중추감작에 대한 효과 이외에 말초감작에 대한 효과도 확인해야 할 것으로 사료된다.

결 론

활성산소종이 통증에 미치는 영향을 규명하기 위하여 통각을 전달하는데 일차적 중계역할을 하는 척수후각의 아교질 신경 세포에서 막전압과 시냅스 전류를 기록하고 이에 대한 t-BuOOH의 효과를 조사하였다. 흰쥐의 요추 부위를 250 μ m 두께로 척수절편을 만들고 whole cell patch clamp 방법을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

t-BuOOH (2 mM) 처리에 의하여 양전류 자극으로 발생된 활동전압의 빈도가 감소되었고 약물이 포함되지 않은 용액으로 관류 시 t-BuOOH 처리 전 보다 빈도가 더 증가되었으며 이러한 효과는 PBN에 의하여 억제되었다. TTX가 포함된 용액에서 t-BuOOH 처리에 의해 막전압이 3-5분 감소된 후 지속적으로 증가되었으며 이는 PBN에 의하여 억제되었다. t-BuOOH에 의해 자발적 흥분성 시냅스후 전류와 미세 시냅스후 전류의 빈도와 크기가 초기 감소 후 지속적으로 증가되었다.

이상의 연구결과는 활성산소종이 척수후각의 아교질 세포에서 시냅스전과 시냅스후 작용기전에 의하여 흥분성 시냅스후 전류를 증가시키고 막전압을 탈분극시킴으로써 중추감작을 유발하여 통증을 조절할 수 있음을 나타낸다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 뇌질환 한방연구센터 (03-PJ9-PG6-SO02-0001)에 의해서 수행되었음

참고문헌

1. Hunt, S.P., Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain

control. *Nat Rev Neurosci* 2: 83-91, 2001.

2. Woolf, C.J., Costigan, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 7723-7730, 1999.

3. Woolf, C.J., Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1768, 2000.

4. Willis, W.D., Coggeshall, R.E. Sensory mechanisms of the spinal cord. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004.

5. Cook, A.J., Woolf, C.J., Wall, P.D., McMahon, S.B. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature* 325: 151-153, 1987.

6. Woolf, C.J., Thompson, S.W.N. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implication for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-299, 1991.

7. Coyle, J.T. Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695, 1993.

8. Balazs, L., Leon, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* 19: 1131-1137, 1994.

9. Götz, M.E., Küning, G., Riederer, P., Youdim, M.B. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration. *Pharmac. Ther* 63: 37-122, 1994.

10. Jenner, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344: 796-798, 1994.

11. Hensley, K., Pye, Q.N., Tabatabaie, T., Stewart, C.A., Floyd, R.A. Reactive oxygen involvement in neurodegenerative pathways. *Neuroinflammation: Mechanism and management*, Humana Press: Totowa NJ, pp 365-281, 1997.

12. Lewen, A., Matz, P., Chan, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J neurotrauma* 17: 871-890, 2000.

13. Djordjevic, V.B. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol* 237: 57-89, 2004.

14. McGeer, E.G., McGeer, P.L. Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharm Res* 5: 821-836, 1999.

15. Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., Nicol, C.J., Parman, T., Winn, L.M. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res* 396: 65-78, 1997.

16. Parman, T., Wiley, M.J., Wells, P.G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5: 582-585, 1999.

17. Salvemini, D., Wang, Z.Q., Zweier, J.L., Samouilov, A., Macarthur, H., Misko, T.P. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286: 304-306, 1999.

18. Wang, Z.Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot,

- R., Masini, E. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 869-878, 2004.
19. Kim, H.K., Park, S.K., Zhou, J.L., Tagliabue, G., Chung, K., Coggeshall, R.E., Chung, J.M. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111: 116-124, 2004.
 20. Kim, H.K., Kim, J.H., Gao, X., Zhou, J.L., Lee, I., Chung, K., Chung, J.M. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 122: 53-62, 2006.
 21. Willis, W.D. Is central sensitization of nociceptive transmission in the spinal cord a variety of long-term potentiation? *Neuroreport* 8(16):3427-3430, 1997.
 22. Olanow, C.W. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32: 695-698, 1998.
 23. Gerlach, M., Ben Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63: 793-807, 1994.
 24. Park, Y.K., Jung, S.J., Yoo, J.E., Lim, W., Kim, J. Effect of acute hypoxia on ATP-sensitive potassium currents in substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Eur J physiol* 446: 600-606, 2003.
 25. Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Koos, T., Tepper, J.M., Rice, M.E. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 25: 4222-4231, 2005.
 26. Avshalumov, M.V., Rice, M.E. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87: 2896-2903, 2002.
 27. Wu, J., Fang, L., Lin, Q., Willis, W.D. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain* 94: 47-58, 2001.
 28. Van Haaften R.I., Haenen, G.R., Evelo, C.T., Bast, A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev* 35: 215-253, 2003.
 29. Kamsler, A., Segal, M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J Neuroscience* 23(1):269-276, 2003.
 30. Klann, E. Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 80: 452-457, 1998.
 31. Smythies, J. Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review. *Eur J Pharmacology* 370: 1-7, 1999.
 32. Perrais, D., Ropert, N. Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABAA receptors in central synapses. *J Neurosci* 19: 578-588, 1999.
 33. Haley, J.E., Dickenson, A.H., Schachter, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacol* 31: 251-258, 1992.
 34. Levy, D., Hoke, A., Zochodne, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 260: 207-209, 1999.
 35. 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* 31: 430-439, 2001.