

Reactive Oxygen Species and Nitrogen Species Differentially Regulate Neuronal Excitability in Rat Spinal Substantia Gelatinosa Neurons

Hae In Lee, A-Reum Park, and Sang Woo Chun*

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

(received December 4, 2014; revised December 9, 2014; accepted December 10, 2014)

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) are implicated in cellular signaling processes and as a cause of oxidative stress. Recent studies indicate that ROS and RNS are important signaling molecules involved in nociceptive transmission. Xanthine oxidase (XO) system is a well-known system for superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$) generation, and sodium nitroprusside (SNP) is a representative nitric oxide (NO) donor. Patch clamp recording in spinal slices was used to investigate the role of $O_2^{\cdot -}$ and NO on substantia gelatinosa (SG) neuronal excitability. Application of xanthine and xanthine oxidase (X/XO) compound induced membrane depolarization. Low concentration SNP (10 μ M) induced depolarization of the membrane, whereas high concentration SNP (1 mM) evoked membrane hyperpolarization. These responses were significantly decreased by pretreatment with phenyl *N*-tert-butyl nitron (PBN; nonspecific ROS and RNS scavenger). Addition of thapsigargin to an external calcium free solution for blocking synaptic transmission, led to significantly decreased X/XO-induced responses. Additionally, X/XO and SNP-induced responses were unchanged in the presence of intracellular applied PBN, indicative of the involvement of presynaptic action. Inclusion

of GDP- β -S or suramin (G protein inhibitors) in the patch pipette decreased SNP-induced responses, whereas it failed to decrease X/XO-induced responses. Pretreatment with *n*-ethylmaleimide (NEM; thiol-alkylating agent) decreased the effects of SNP, suggesting that these responses were mediated by direct oxidation of channel protein, whereas X/XO-induced responses were unchanged. These data suggested that ROS and RNS play distinct roles in the regulation of the membrane excitability of SG neurons related to the pain transmission.

Key words: ROS, RNS, $O_2^{\cdot -}$, NO, membrane excitability

서론

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 \cdot)을 포함하는데 이중에서 NO, ONOO \cdot 는 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)으로 따로 분류하기도 한다. 이들은 조직손상이나 증가된 유해반응과 관련되는데[1-4], 최근에는 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 세포조절물질로서의 역할이 보고되고 있다[5-7]. 신경조직에서 ROS는 다양한 경로를 통해서 발생되는데 미토콘드리아의 전자전달계(electron transport complex) 과정 중 superoxide($O_2^{\cdot -}$)의 방출, 아라키돈산 산화과정에 의한 phospholipase A_2 의 활성화, xanthine dehydrogenase에서 xanthine oxidase(XO)로의 전환, NO synthase(NOS) 활성화에 의한 NO 생성, NO와 $O_2^{\cdot -}$ 의 결합에 의한 ONOO \cdot 의 생성 등으로부터 얻어진다[8,9].

*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. physiol1@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.

최근에 ROS가 통증발생에 관여된다는 연구가 보고되었는데 H_2O_2 의 피하투여에 의해 통증을 유발하였고[10], 항산화제의 투여로 수 시간동안 지속되는 진통효과가 나타남이 보고되었다[11]. 또한 척수신경을 절찰하여 신경병증성 통증을 유발시킨 흰쥐와[12] 피부 내 capsaicin 투여로 통증을 유발시킨 생쥐에서[13] 척수후각 뉴론의 미토콘드리아에서 O_2^- 가 증가됨이 관찰되었고, 척수에 전자전달계 억제제 투여에 의해 O_2^- 의 증가와 통증 행동반응의 증가를 나타냈는데[9], 이는 척수후각 뉴론에서 발생된 O_2^- 가 통증을 발생시키는 데 중요한 발생원이며 그것의 감소가 통증을 억제시키는 요인이라고 생각할 수 있다.

이에 반하여 RNS의 한 종류인 NO의 통증에 대한 역할은 확실치 않으며, 통증 유발효과와 진통효과가 같이 보고되어 있다. 예를 들면, 신경손상이나 조직염증에 의해 유발된 과민성은 NOS 억제제의 척수 내 투여나 nNOS 유전자를 제거한 생쥐에서 감소하였으며[14-16], 척수세포에서 발생된 NOS가 만성통증 발생에 중요하게 작용한다고[17] 보고되었다. 반면에 다른 연구에서는 L-arginine과 NO donor인 3-morpholinosydnomimine (SIN-1)을 같이 뇌실에 투여하거나[18], sodium nitroprusside (SNP)를 발바닥에 주입하여 진통효과를 유발함이 보고되었다[19].

ROS의 일종인 H_2O_2 가 어떻게 세포에 작용하여 효과를 나타내는지에 대한 연구는 많이 보고되었다. Transient receptor potential (TRP) 통로를 활성화하여 탈분극을 유발하거나[20], ATP 민감성 K^+ (K_{ATP}) 통로의 열림을 자극하여 과분극을 유발하기도 한다[21]. 척수의 아교질 세포에서는 H_2O_2 가 미세액체성 시냅스후 전류의 빈도를 증가시킨다고 하였고[22], H_2O_2 와 유사한 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH)는 흥분성 시냅스후 전류를 증가시키고 탈분극을 유발하였다[23].

NO는 guanylyl cyclase를 활성화하여 세포내 cGMP를 증가시켜 반응을 나타내거나, S-nitration에 의해서 직접적으로 세포막 단백질에 작용하기도 한다[24]. O_2^- 가 세포에 어떤 기전으로 작용하는지는 아직 잘 알려져 있지 않았으나 PKA, PKC, extracellular signal-related kinase (ERK) 등의 단백질 인산화효소를 활성화하거나[25], Cl^- 통로를 통과하여 세포내부에서 이차적인 신호전달과정에 참여한다고 보고되었다[26].

따라서 이 연구에서는 ROS의 한 종류인 O_2^- 와 대표적 RNS인 NO가 통증전달에 1차적 중계역할을 하는 척수후각 세포에 어떻게 작용하여 통증을 조절할 수 있는지 확인하고자 척수후각 세포의 흥분성에 대한 X/XO와 SNP의 효과를 알아보았으며 시냅스 전, 혹은 후에 작용하는지, 세포내 G 단백질이 관여하는지, 세포막 단백질에 직접 작용하는지 등을 patch clamp 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

척수절편 제작

생후 13일-18일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였으며, 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인을 얻었다(WKU09-076). 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 절단하였다. 조직절편기(vibratome 752M, Campden, 영국)의 고정대에 agar block을 먼저 고정한 후 순간접착제를 이용하여 척수절편을 고정하였다. 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하면서 두께 150-350 μ m의 척수절편을 얻었는데, 절단 중 계속 온도 조절기(model 765, Campden, 영국)를 이용하여 용액의 온도를 1-2 $^{\circ}C$ 정도로 낮게 유지 시켰다. 척수절편은 32 $^{\circ}C$ 의 인공 뇌척수액 용액에 1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에 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% O_2 -5% CO_2 가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 관류시켰다(2-3 ml/min).

실험용액

척수절편 제작에 사용했던 절단용액의 조성(mM)은 252 Sucrose, 2.5 KCl, 0.1 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 glucose, 26 $NaHCO_3$, 1.25 NaH_2PO_4 등으로 구성되었으며, 막전압을 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 Glucose 이었고 95% O_2 -5% CO_2 를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 세포내 용액은 150 K-Glu, 10 HEPES, 5 KCl, 0.1 EGTA, 5 $MgATP$, 0.3 Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 첨가하여 7.3으로 조정하였다. 시냅스 전도를 차단하기 위하여 세포외 Ca^{2+} 를 제거한 후 Mg^{2+} 로 교체하였고, $CdCl_2$ 0.5 mM, thapsigargin 1 μ M을 추가하였다.

실험에 사용한 xanthine (X), XO, SNP, *N*-tert-butyl nitron (PBN), 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL), guanosine 5'-[β -thio]diphosphate trilithium salt (GDP- β -S), n-ethylmaleimide (NEM), suramin, thapsigargin 등은 Sigma사(미국)에서 구입하였고, S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)는 Tocris사(미국)에서 구입하여 사용하였다. Thapsigargin은 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma)에 먼저 녹인 후 최종농도로 세포외 용액에 희석하여 사용하였고, 그 외의 약물은

실험직전에 세포외 용액에 녹여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 증류를 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압의 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(TW150-3, WPI, 미국)을 저항이 5-8 MΩ이 되도록 기록전극을 제작하였다. 10배의 대물렌즈로 다른 부위에 비해 밝은 띠를 형성하고 있는 척수후각 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. Gigaohm seal을 이룬 후 10-20분 경과하여 막전압이 -45 mV 이하로 안정되었을 때 기록을 시작하였다. 전압 및 전류측정에는 Axopatch 200B 증폭기(Axon, 미국)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon, 미국) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (version 9.0, Axon, 미국)를 사용하여 실험수행의 명령과 얻어진 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 발생된 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

실험자료의 분석

막전압의 분석은 Clampfit (version 9.0, Axon, 미국)을 이용하였다. 약물처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 independent t-test를 이용하였고, 한 세포에서 약물 전후의 차이는 paired t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균값±표준오차(mean±SEM)로 표시하였다.

연구성적

척수후각 세포의 흥분성에 대한 X/XO와 SNP의 효과

X/XO와 SNP 투여에 의해서 발생한 O_2^- 와 NO가 척수후각세포의 흥분성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 patch clamp 방법을 이용하여 막전압을 기록하였다. Whole cell이 되었을 때 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 세포만을 결과분석에 이용하였다. 전류기록법을 이용하여 지속

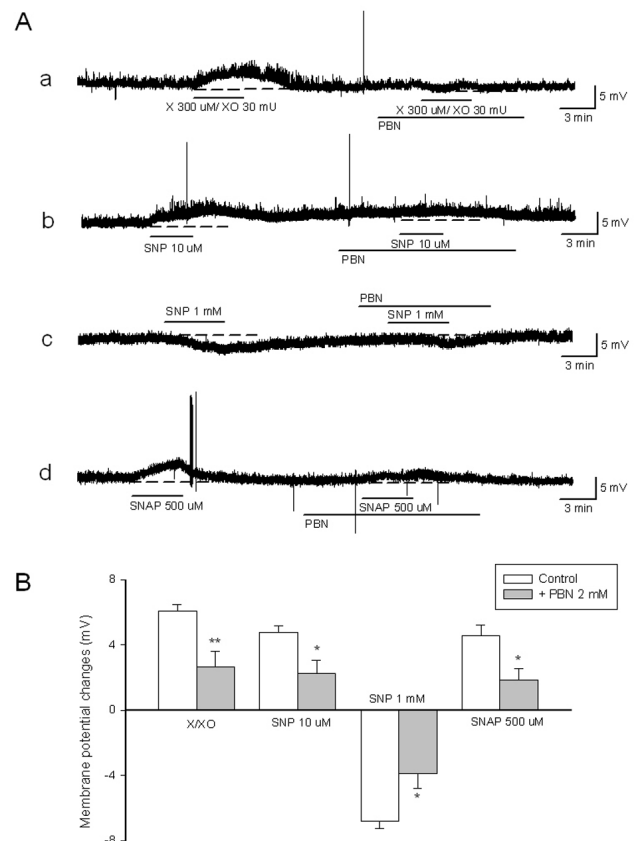


Fig. 1. Effects of X/XO and SNP on membrane potential of spinal substantia gelatinosa (SG) neurons.

(A) When cells were pretreated with 2 mM of PBN, X/XO (a), 10 μ M SNP (b), 1 mM SNP (c), and 500 μ M SNAP (d)-induced membrane potential changes were decreased, (B) X/XO and SNP-induced membrane potential changes under control condition and pretreatment with PBN. **: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p < 0.01$). * $p < 0.05$. Means \pm SEM.

적으로 막전압을 기록하면서 X 300 μ M과 XO 30 mU을 섞은 용액을 5분간 처리하였는데 약물 주입 후 1분 이내부터 3-15 mV의 크기의 탈분극이 관찰되었다(6.1 ± 0.4 mV, $n = 15$)(Fig. 1Aa).

SNP 처리에 의한 반응은 농도에 따라 상이하여 고농도와 저농도의 두 가지로 분리하여 관찰하였다. 저농도 용액(10 μ M)을 처리하였을 때는 탈분극이 관찰되는 반면에(4.8 \pm 0.4 mV, $n = 12$)(Fig. 1Ab), 고농도 용액(1 mM)을 처리하였을 때는 과분극이 관찰되었다(-6.8 \pm 0.5 mV, $n = 12$)(Fig. 1Ac). 다른 NO donor인 SNAP 처리에 의해서는 농도를 변화시켜도 탈분극만이 관찰되었는데 500 μ M 투여에 의해 4.6 \pm 0.6 mV의 탈분극이 유발되었다($n = 7$)(Fig. 1Ad). X/XO, SNP, SNAP에 의한 막전압의 변화는 비선택성 항산화제인 PBN이 포함된 용액으로 관류시 단독으로 투여하였을 때 보다 유의하게 감소하였다(Fig. 1A).

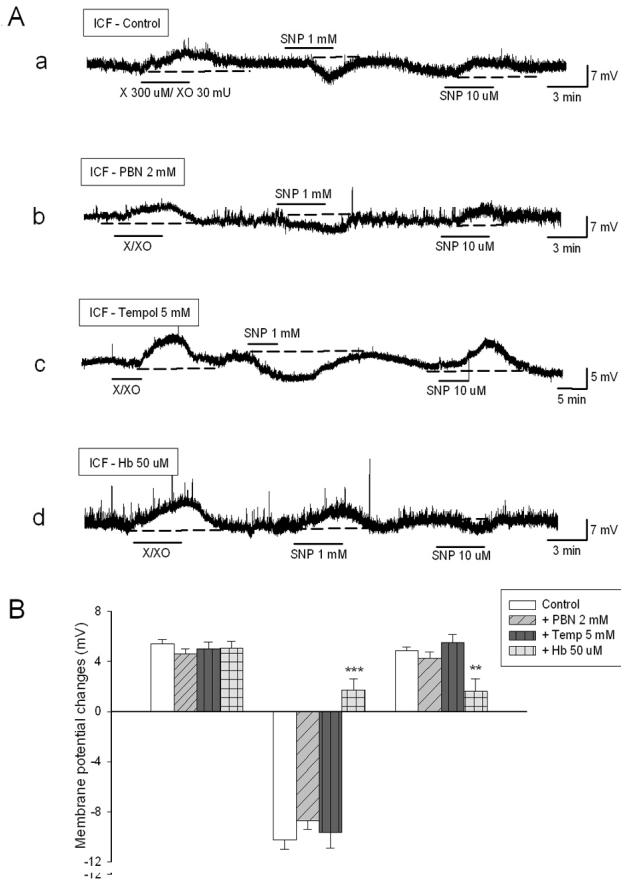


Fig. 2. Effects of intracellular applied ROS scavengers on X/XO and SNP-induced responses. (Aa) X/XO and SNP-induced responses using control pipette solution. (Ab, c) *N*-tert-butylnitron (PBN) or 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) within pipette solution did not decrease X/XO and SNP-induced response. (Ad) Hemoglobin (Hb) within pipette solution did not decrease a X/XO-induced response, but SNP-induced responses were significantly blocked. (B) Mean X/XO and SNP-induced responses in control and drugs within pipette solution. ***: Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.001$). ** $p < 0.01$. Means \pm SEM.

비선택성 항산화제인 PBN, $O_2^{\cdot -}$ 에 작용하여 H_2O_2 로 전환시키는 SOD 유사물질 TEMPOL, NO에 선택적으로 작용하여 항산화 작용을 하는 hemoglobin (Hb) 등을 각각 세포내액에 포함시킨 후 X/XO와 SNP를 투여하였다. X/XO 투여에 의한 탈분극은 세 가지 항산화제 모두에서 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2A). SNP를 투여하였을 때는 고농도와 저농도 모두에서 PBN과 TEMPOL에 의해서 대조군과 차이가 없었고(Fig. 2Ab, Ac), Hb 세포내액을 사용한 경우만 고농도와 저농도에서 각각 유의한 억제 관찰하였다 (-10.2 \pm 0.8 mV vs. 1.7 \pm 0.9 mV, $P < 0.001$; 4.9 \pm 0.3 mV vs. 1.6 \pm 1.2 mV, $P < 0.01$)(Fig. 2Ad, B).

X/XO와 SNP에 의한 반응 기전

X/XO와 SNP의 반응이 시냅스 전 혹은 시냅스 후 뉴론에 작용하는지를 알아보았다. 시냅스 전달을 차단하기 위하여 세포외 용액에서 Ca^{2+} 를 제거하고 Mg^{2+} 를 증가시켰으며 $CdCl_2$ 0.5 mM, thapsigargin 10 μ M을 추가하였다. X/XO 투여에 의한 반응은 정상용액에 비해 유의하게 감소하였고(7.7 \pm 1.5 mV vs. 3.1 \pm 1.3 mV, $n=9$, $P < 0.05$)(Fig. 3Aa), SNP 투여에 의해서는 감소하는 경향이었으나 유의하지 않았다(5.4 \pm 0.6 mV vs. 3.9 \pm 0.9 mV, $n=8$)(Fig. 3Ab).

X/XO와 SNP에 의한 반응이 G 단백질과 연결된 신호전달 과정을 통해서 발생하는지를 확인하고자 G 단백질 억제제인 GDP- β -S와 suramin을 세포외 용액에 첨가한 후 기록하였다. X/XO 투여에 의한 탈분극은 두 가지 억제제 모두에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 그러나 고농도의 SNP에 의한 과분극은 GDP- β -S (-4.8 \pm 1.5 mV, $n=9$)와 suramin (-4.6 \pm 1.6 mV, $n=8$) 세포내액에 의해 유의하게 억제되었으며, 저농도의 SNP에 의한 탈분극도 GDP- β -S (2.2 \pm 1.0 mV, $n=9$)와 suramin (-2.0 \pm 0.8 mV, $n=8$) 세포내액에 의해 유의하게 억제되었다(Fig. 4).

X/XO와 SNP에 의한 반응이 세포막 단백질을 직접 산화시킴에 의해 반응이 일어나는지를 확인하고자 alkylating

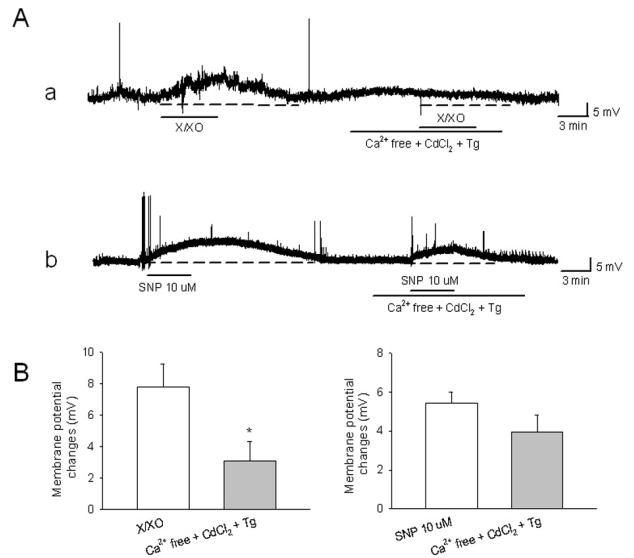


Fig. 3. Effects of a removal of extracellular Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} store depletion on X/XO and SNP-induced responses. (A) In a pretreatment with Ca^{2+} free solution plus thapsigargin (Tg), (a) X/XO-induced depolarization was significantly blocked and (b) 10 μ M SNP-induced depolarization was decreased. (B) Mean X/XO and SNP-induced membrane depolarization in control and pretreatment with drugs. *: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

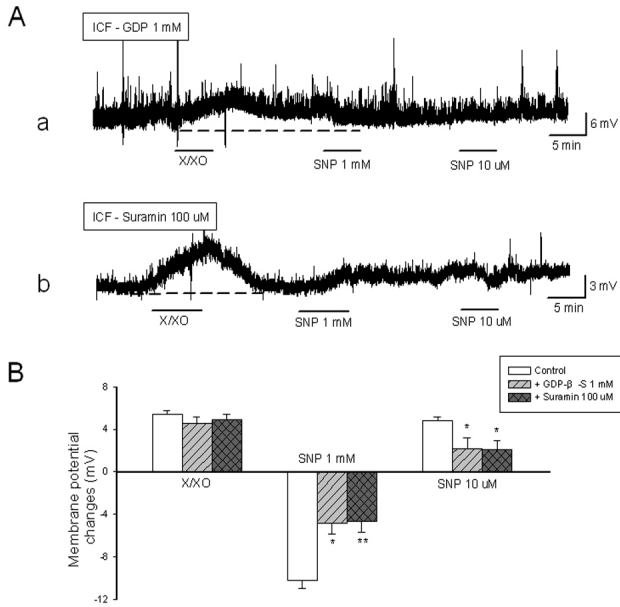


Fig. 4. Involvement of G-protein on X/XO and SNP-induced membrane potential changes. (A) Inclusion of GDP-β-S (a) and suramin (b) within pipette solution did not block a X/XO-induced depolarization, but significantly blocked SNP-induced responses. (B) Mean X/XO and SNP-induced responses in control and drugs within pipette solution. *: Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

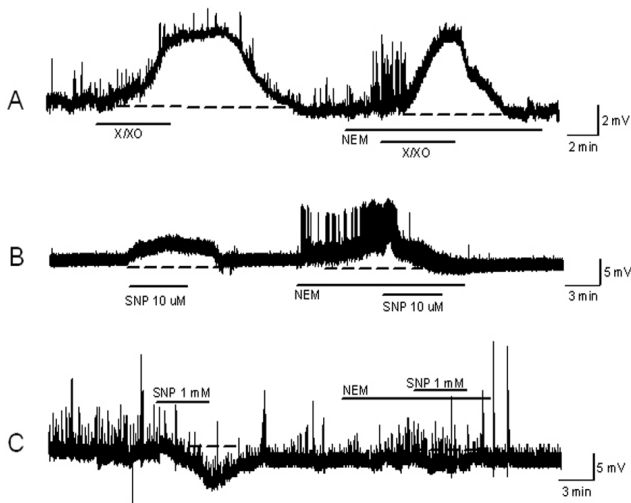


Fig. 5. Effects of NEM, a thiol-modifying agent, on X/XO and SNP-induced membrane potential changes. (A) When cells were pretreated with 1 mM of NEM, X/XO-induced depolarization was not blocked. (B, C) SNP-induced responses were significantly decreased by pretreatment with MEM.

agent인 NEM을 전처리한 후 결과를 비교하였다. X/XO 투여에 의한 탈분극은 전처리에 의해서 변화를 보이지 않았

고(5.4 ± 0.7 mV vs. 4.9 ± 0.6 mV, $n=5$)(Fig. 5a), 저농도와 고농도의 SNP 투여에 의한 반응은 각각 유의하게 감소하였다(-4.2 ± 0.8 mV vs. 1.0 ± 1.2 mV, $n=7$, $P < 0.05$; -6.3 ± 0.9 mV vs. -3.4 ± 1.1 mV, $n=5$, $P < 0.05$)(Fig. 5b, c).

고찰

ROS는 조직손상이나 증가된 유해반응에 의하여 세포내에서 증가하여 세포독성을 일으키고 세포죽음과 관련되며, 전사인자 활성화, 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 여러 가지 생리적 기능을 조절하는 세포조절물질로서의 역할도 보고되고 있다[6,27]. 또한 최근에는 ROS가 통증발생에 관여되어 있다고 보고되고 있는데, 척수의 ROS 양이 감소함에 따라 통증행동 반응이 저하되었고[11,28], ROS 양이 많아짐에 따라 반응이 증가되었다[9,13]. 또한 superoxide dismutase[4], PBN[11], vitamin E[29]와 같은 다양한 항산화제를 전신투여 혹은 척수 내로 투여함에 의해 진통효과를 가짐이 보고되었으며 이러한 결과는 척수의 활성산소가 통증의 발생과 전달에 중요하게 관여하고 있음을 의미한다.

신경조직에서 ROS는 다양한 경로를 통해서 얻어지는데 미토콘드리아 세포호흡의 부산물로 형성되거나 nicotine adenine diphosphate, xanthine oxidase (XO), 아라키돈산 산화효소, NO synthase 활성화 등으로부터 만들어 진다[8]. 이 연구에서는 ROS를 발생시키기 위해 X와 XO를 혼합하여 투여하였는데 척수후각 뉴론에서 탈분극을 발생시켰다 (Fig. 1). XO는 X를 산화시켜 uric acid로 만드는 과정에서 superoxide 음이온(O_2^-)을 발생시키며 이것은 superoxide dismutase (SOD)에 의해 H_2O_2 로 변환된다. Sato 등[30]과 Hawkins 등[26]은 X/XO 투여에 의해 약물투여 직후부터 O_2^- 가 발생되기 시작하여 3분에서 최고치를, 5분정도 경과하면 SOD에 의해 H_2O_2 로 변환된다고 하였으며, Zhou 등[31]도 X/XO 투여는 즉각적이고 일시적인 변화를 H_2O_2 투여는 느리고 지속적인 변화를 보인다고 하였다. 이 연구에서도 X/XO의 투여는 약물 주입 후 1분 이내부터 즉각적인 탈분극을 유발하였으며 이는 이전에 보고한 H_2O_2 투여에 의해 발생하는 작고 느린 탈분극과는 차이를 보였다[23]. 이 연구에서는 약물적용 시간을 5분으로 하였는데 이는 O_2^- 가 SOD에 의해 H_2O_2 로 전환되기 충분한 시간으로 X/XO의 투여효과는 O_2^- 외에 H_2O_2 도 발생시켜 세포에 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

NO는 통증전달과정에서 농도 의존적으로 통증유발효과와 진통효과를 가진다. 즉, Li와 Qi는 낮은 농도의 L-arginine을 척수 내 투여하여 포르말린으로 유발된 통증

반응을 억제하였고, 높은 농도에 의해서는 증가시켰다고 하였다[32]. 반면에, Kawabata는 낮은 농도의 L-arginine은 통증반응을 증가시키고 높은 농도에서는 억제시켰다고 상반된 결과를 보고하였다[33]. 세포외 기록법을 이용한 전기생리학적 연구에서도 Pehl과 Schmid는 NO가 서로 다른 농도에서 척수신경을 흥분 혹은 억제시킨다고 보고하였다[34]. 이 연구에서도 높은 농도(1 mM)의 SNP는 막전압을 과분극 시켰으며 낮은 농도(10 μ M)는 탈분극을 발생시켰다(Fig. 1). SNP의 농도에 따른 서로 다른 반응이 유발됨에 따라 다른 종류의 NO donor인 SNAP의 처리로 NO의 작용을 확인한 결과 SNAP는 농도에 관계없이 탈분극만을 발생시켰다. 그러나 이 연구에서는 SNP의 농도에 따른 반응의 차이만 관찰하였으므로 차후에 추가적으로 왜 농도에 따른 차이가 발생하는지, 또는 탈분극과 과분극에 어떤 이온통로가 관여하는지를 밝히는 연구가 필요하다고 생각된다.

PBN은 “spin-trapping” 작용이 있는 질소화합물로 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH , NO, ONOO $^{\cdot-}$ 등의 다양한 ROS 형성을 억제한다[35]. 이 연구에서도 PBN을 세포외 용액에 사용하였을 때 $O_2^{\cdot-}$ 와 NO의 작용을 비선택적으로 모두 억제시켰다(Fig. 1). 그러나 PBN을 세포내 용액에 사용하였을 때는 억제효과가 나타나지 않아 $O_2^{\cdot-}$ 와 NO의 작용은 주로 시냅스전 세포에 작용하였으리라 추측된다(Fig. 2).

TEMPOL은 SOD 유사물질로 $O_2^{\cdot-}$ 를 H_2O_2 로 전환시킨다[36]. TEMPOL을 세포내 용액에 포함시켜 막전압을 기록하였을 때는 SNP에 의한 반응에는 영향을 주지 않았다. 그러나 $O_2^{\cdot-}$ 에 의한 탈분극은 초기에 억제되었으며 반응이 지연되어 나타났다. 즉, $O_2^{\cdot-}$ 에 의해 초반의 과분극과 이어지는 후반의 느린 탈분극이 발생하여 이전의 H_2O_2 를 투여하였을 때의 반응과 유사하였으며[23], 이는 $O_2^{\cdot-}$ 의 효과라기보다는 $O_2^{\cdot-}$ 에서 전환된 H_2O_2 의 효과일 가능성을 배제할 수 없다. $O_2^{\cdot-}$ 는 인지질 이중층을 통과하는데 낮은 투과력을 가지고 있고[37], 전하를 가지지 않는 안정상태인 H_2O_2 로 빠른 dismutation을 보이기 때문에[38] 세포내 신호전달 물질로 작용하는 것은 어렵다고 여겨 왔다. 그러나 최근 $O_2^{\cdot-}$ 가 Cl^- 통로를 통과하여 세포내부로 빠르게 이동하여 이차적인 신호전달과정에 참여함이 보고되어[26,39], $O_2^{\cdot-}$ 의 효과는 직접 세포에 작용하거나 혹은 H_2O_2 로 전환되어 작용하는 두 가지 가능성을 모두 고려해야 한다.

PBN을 포함시킨 세포내 용액을 사용하여 X/XO와 SNP에 의한 반응을 억제하지 못한 결과나(Fig. 2) 칼슘을 제거하고 thapsigargin을 첨가한 세포외 용액에서 X/XO와 SNP에 의한 반응이 억제된 결과는(Fig. 3) $O_2^{\cdot-}$ 와 NO의 작용이 주로 시냅스전에 작용함을 의미한다. 척수 아교질 세포에서 신경전달물질의 분비는 시냅스전 축색말단의 칼슘농도

증가가 필요한데 이는 세포 밖으로부터 유입되거나 세포내 칼슘저장소인 ER로부터의 방출에 의해 이루어진다[22]. 그러나 세포내 칼슘저장소의 칼슘을 고갈시키는 작용이 있는 thapsigargin의 사용은 시냅스 전 뿐만 아니라 시냅스 후에도 작용하여 X/XO와 SNP에 의한 반응을 억제하였을 가능성이 있다. Hawkins 등[26]은 $O_2^{\cdot-}$ 가 장시간 세포 신호전달 과정에 사용되기 위해서는 먼저 세포내 칼슘의 이동을 유도하고 미토콘드리아에서 칼슘을 매개로 $O_2^{\cdot-}$ 를 지속적으로 방출해야 한다고 하였는데 이 연구와 같이 thapsigargin의 사용은 세포내 칼슘 공급원을 고갈시켜 세포내 칼슘농도의 증가를 억제시켜 반응의 감소를 유발할 수 있다.

NO는 직접적으로 통로단백질을 S-nitrosilation 시킴에 의해 세포반응을 유도하거나 간접적으로 guanylate cyclase (GC)를 활성화하여 세포내 cGMP를 증가시켜 작용을 나타낸다. 즉, Kawano 등[40]은 NO가 S-nitrosilation에 의해 K_{ATP} 통로를 활성화 한다고 하였고, Sausa와 Prado [41]는 NO donor의 척수 내 투여 효과가 sGC 억제제인 ODQ에 의해 억제됨을 보고하였다. 이 연구에서는 X/XO와 SNP에 의한 반응의 G 단백질 관련성을 세포내 용액에 G 단백질 억제제인 GDP- β -S와 suramin을 첨가하여 확인하였는데, SNP의 효과는 억제되었으나 X/XO의 효과는 억제되지 않았다(Fig. 4). 이는 H_2O_2 와 같은 ROS도 G 단백질의 α 소단위에 작용하여 세포의 기능을 조절한다[42]는 보고와 다른 결과로 이 연구에 사용한 $O_2^{\cdot-}$ 는 H_2O_2 에 비해 세포막 투과성이 현저히 낮아 세포내 G 단백질에 대한 영향이 낮았을 것으로 생각된다. 한편, suramin은 G 단백질을 억제하는 효과 외에 주로 P2 수용체의 억제제로 이용되고 있으며 ROS는 다양한 경로를 통하여 P2 수용체에 영향을 줄 수 있다고 보고되어 있어[43-45] suramin의 SNP 반응 억제는 P2 수용체도 관여되었을 가능성을 배제할 수 없다. 또한 이 연구에서 세포막 단백질을 직접 산화시킴에 의해 반응이 일어나는지를 확인하고자 alkylating agent인 NEM을 전처리하였을 때도 SNP의 효과는 억제되었으나 X/XO의 효과는 억제되지 않았다(Fig. 5). 이는 X/XO에 의한 반응은 주로 시냅스 전 세포에 작용하여 G 단백질을 이용하지 않는 세포내 기전에 의해 발생하였으리라 생각된다.

요약하면 이 연구에서는 NO는 시냅스 전과 후 모두에서 G 단백질을 이용하거나 세포막 단백질을 직접 산화시켜 작용을 나타내고 $O_2^{\cdot-}$ 는 주로 시냅스전에 작용하여 G 단백질을 이용하지 않는 세포내 기전에 의해 작용을 나타냄을 확인하였다. 이는 ROS와 RNS가 서로 다른 기전에 의해 척수후각 아교질 세포의 흥분성을 조절함을 나타내며 차후 활성산소와 관련된 통증조절물질의 개발에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

References

1. Levy D, Zochodne DW. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci.* 1998; 10:1846-1855.
2. 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 Me.* 2001;31:430-439.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:509-517.
9. 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.
10. Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol. Rev.* 2004;23:51-57.
11. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabue 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.
12. 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.
13. 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;29: 159-168.
14. 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.
15. 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. *Neuropharmacology.* 2009;56:702-708.
16. 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;119:113-213
17. Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience.* 1994;60:367-374.
18. 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.
19. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide - cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1990;186:289-293.
20. Bao L, Avshalumov M, 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.
21. 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.
22. 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.
23. Son Y, Chun SW. Effects of hydrogen peroxide on neuronal excitability and synaptic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Int J Oral Biol.* 2007;32:153-160.
24. Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation : two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 2002;25:510-517.
25. Li Z, Ji G, Neugebauer V. Mitochondrial reactive oxygen species are activated by mGluR5 through IP₃ and activate ERK and PKA to increase excitability of amygdala neurons and pain behavior. *J Neurosci.* 2011;31:1114-1127.
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;18:2002-2012.
27. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.
28. 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;138:514-524.

29. 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.
30. 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;150:173-181.
31. 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:H1096-1107.
32. Li K, Qi WX. Effects of multiple intrathecal administration of L-arginine with different doses on formalin-induced nociceptive behavioral responses in rats. *Neurosci Bull*. 2010;26:211-218.
33. Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br J Pharmacol*. 1994;112:547-550.
34. Pehl U, Schmid HA. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. *Neuroscience*. 1997;77:563-573.
35. Kotake Y. Pharmacologic properties of phenyl N-tert-butyl nitron. *Antioxid Redox Signal*. 1999;1:481-499.
36. Tal M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport*. 1996;7:1382-1384.
37. Tanabe S, Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y. HCO₃⁻-independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2005;579:517-522.
38. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:247-254.
39. Brzezinska AK, Lohr N, Chilian WM. Electrophysiological effects of O₂⁻ on the plasma membrane in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2379-2386.
40. Kawano T, Zoga V, Kimura M, Liang MY, Wu HE, Gemes G, McCallum JB, Kwok WM, Hogan QH, Sarantopoulos CD. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain*. 2009;14:5-112.
41. Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*. 2001;897:9-19.
42. Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H. Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species. *Nature*. 2000;408:492-495.
43. Giniatullin AR, Grishin SN, Sharifullina ER, Petrov AM, Zefirov AL, Giniatullin RA. Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 2005;565:229-242.
44. Mason HS, Bourke S, Kemp PJ. Selective modulation of ligand-gated P2X purinoceptor channels by acute hypoxia is mediated by reactive oxygen species. *Mol Pharmacol*. 2004;66:1525-1535.
45. Andrea P, Romanello M, Massimiliano B, Steinberg TH, Tell G. H₂O₂ modulates purinergic-dependent calcium signalling in osteoblast-like cells. *Cell Calcium*. 2008;43:457-468.