

Effects of Hydrogen Peroxide on Neuronal Excitability and Synaptic Transmission in Rat Substantia Gelatinosa Neurons

Yong Son¹ and Sang-Woo Chun^{2*}

¹Dept. of Anesthesiology, College of Medicine

²Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University

(Received December 20, 2007; Accepted December 28, 2007)

The superficial dorsal horn, particularly substantia gelatinosa (SG) in the spinal cord, receives inputs from small-diameter primary afferents that predominantly convey noxious sensation. 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 SG neurons in spinal cord slice of young rats to investigate the effects of hydrogen peroxide on neuronal excitability and excitatory synaptic transmission. In current clamp condition, tert-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), an ROS donor, depolarized membrane potential of SG neurons and increased the neuronal firing frequencies evoked by depolarizing current pulses. When slices were pretreated with phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN) or ascorbate, ROS scavengers, *t*-BuOOH did not induce hyperexcitability. In voltage clamp condition, *t*-BuOOH increased the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs), and monosynaptically evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) by electrical stimulation of the ipsilateral dorsal root. These data suggest that ROS generated by peripheral nerve injury can modulate the excitability of the SG neurons via pre- and postsynaptic actions.

Key word: hydrogen peroxide, substantia gelatinosa, excitability, synaptic transmission, pain

*Corresponding author: 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: physi01@wonkwang.ac.kr

서 론

척추후각 세포(dorsal horn neuron, DHN) 중 표층의 척수 아교질 신경세포(substantia gelatinosa, SG; lamina II)는 주로 말초로부터 일차 감각신경섬유를 통하여 직접 감각정보를 전달받고 이를 통합한다. 특히 신체에 유해한 통각정보는 얇은 수초를 가진 A δ -섬유와 무수 섬유인 C-섬유와 같은 일차 감각 신경섬유를 통해 척수 표층의 DHN으로 전달되며 이웃하는 lamina I과 IV등의 투사신 경세포(projection neuron)를 통하여 시상(thalamus) 등의 상위중추로 통각정보를 전달한다(Kumazawa와 Perl, 1978; Yoshimura와 Jessell, 1989). 만성통증은 이러한 정보전 달 체계 중에서 지속적 신경자극에 의해 시냅스 가소성의 변화가 유발되며, 이러한 변화에 의해 오랜 시간 지속되는 세포 반응성의 증가가 만성통증의 세포기전이라고 알려져 있다.

Hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radical, 산화질소를 포함하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 조직손상이나 증가된 유해반응과 관련 된다(Levy와 Zochodne, 1998; Khalil과 Khodr, 2001; Liu 등, 2004; Wang 등, 2004). 일반적으로 ROS의 생성과 생물학적 반응성은 superoxide dismutase나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화 활성에 의해 정밀하게 조절 된다(Djordjevic, 2004). 그러나 free radical의 생성이 증가하거나 항산화 방어가 감소하면 산화자극을 유발하게 되고(McGeer와 McGeer, 1999), 이는 세포내 단백질, DNA, 지질 등의 손상을 초래 한다(Wells 등, 1997; Parman 등, 1999).

최근의 연구에서는 ROS가 염증성 통증이나 신경병증성 통증과 같은 상태에서 통증발생에 관여되어 있다고 보고되고 있다. 척수신경 결찰 모델(spinal nerve ligation;

SNL)에 의한 신경병증성 통증에서 척수내의 ROS 생성 증가가 관찰되었으며 (Park 등, 2006), 대표적 항산화제인 phenyl N-tert-butyl nitron (PBN)과 5, 5-dimethyl-pyrroline-N-oxide (DMPO)의 투여로 과도한 ROS의 제거에 의해 수 시간동안 지속되는 진통효과가 나타남이 보고되었다 (Kim 등, 2004). 또한 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 하였다 (Kim 등, 2006).

전기생리학적 방법을 이용하여 세포에서 ROS의 작용을 규명하기 위한 연구의 결과는 아직 확실하지 않다. 예를 들면 흰쥐의 해마절편을 이용한 연구에서 저농도의 H₂O₂ 투여에 의해 장기강화현상 (long term potentiation)이 관찰되고 고농도를 적용시켰을 때는 약화현상 (depression)이 관찰되었다 (Kamsler와 Segal, 2004). Pellmar (1987)는 CA1 세포에서 H₂O₂가 시냅스 효율과 활동전압 발생을 감소시켰다고 하였으며, 반대로 Muller 등 (1993)은 CA3 세포에서 억제성 시냅스 후 전압을 감소시킴에 의해서 흥분성 효과를 나타낸다고 하였다. 척수의 아교질 세포에서도 H₂O₂가 미세억제성 시냅스 후 전류의 빈도를 증가시키고 (Takahashi 등, 2007) 또한 흥분성 시냅스 후 전류도 증가시킴이 (Tsuzuki 등, 2004) 보고되었다.

따라서 이 연구에서는 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 과산화수소의 효과를 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

척수절편 제작

생후 13일-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 순간접착제를 이용하여 척수절편을 고정하였다. 95% O₂-5% CO₂를 공급하면서 두께 250 μm의 척수절편을 얻었는데, 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 회복 시켰고, 이후에 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 척수절편을 현미경 (BX50WI, Olympus, 일본) 위의 기록용기 (1 ml)에 옮긴 후 치실로 만든 그물로 움직이지 않도록 고정된 후 시행하였고, 실험기간 동안 계속해서 95% O₂-5% CO₂가 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 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄ 등으로 구성되었으며, 막전압 및 시냅스전류를 기록하기 위한 세포의 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. 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. 실험에 사용한 tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH), phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN), ascorbate 등은 Sigma사 (미국)에서 구입하였다. 세포에 대한 실험 용액의 적용은 중력을 이용한 관류장치 (BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

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 연결 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. 전압과 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 여과하였다.

척수후근을 자극하기 위하여 파스퇴르 피펫 유리 전극을 이용하여 bipolar 전극을 제작하였다. 이 전극을 현미경하에서 척수후근에 약간의 음압을 걸어 일정하게 유지 되도록 하였다. 전기자극기 (A360, WPI, 미국)를 통하여

자극전류를 가하였으며 이 전류에 의해 유발되는 아교질 뉴런의 흥분성 시냅스 후 전류를 기록 하였는데 발생된 전류의 양상을 분석하여 단일 시냅스를 가진 세포만을 선택하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

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 약물처리 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 paired t-test를 이용하였고, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균 값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시하였다.

실험결과

척수후각 아교질 세포의 전기 생리학적 특성

기록된 175개의 SG 세포 중 129개의 세포(74%)는 그림 1A에서 보여주는 신경세포의 특성을 가지고 있었다.

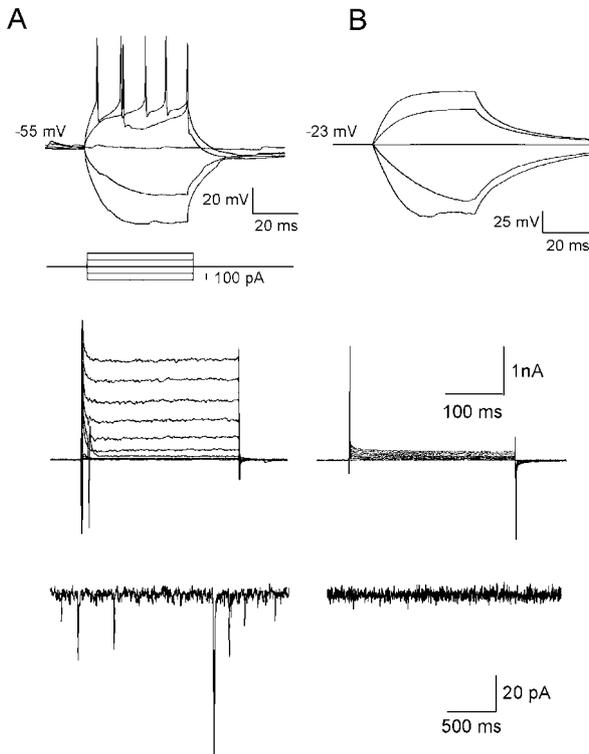


Fig. 1. Electrical activities of substantia gelatinosa (SG) neurons (A) and glial cells (B). Top, membrane potentials recorded in current clamp mode in response to injection of current step. middle, membrane currents recorded in voltage clamp mode in response to step depolarization incrementing by 10 mV from a holding potential of -70 mV. bottom, spontaneous excitatory postsynaptic currents recorded in voltage clamp mode from a holding potential of -70 mV.

전류고정법에서 기록용 전극을 이용하여 세포에 양전류를 단계적으로 가하였을 때 활동전압이 발생하였고 안정막 전압은 -45~-68 mV로 다양하였다. 전압고정법으로 막전압을 -70 mV로 고정된 후 10 mV씩 단계적으로 탈분극시켰을 때 초기의 빠른 내향성 전류와 이어지는 느리고 지속되는 외향성 전류를 기록하였다. 이온통로 차단제를 이용하여 확인하지는 않았으나 초기의 빠른 내향성 전류는 소듐 전류로, 느리고 지속되는 외향성 전류는 포타슘 전류로 생각이 되어진다.

유지전압 -70 mV에서 지속적으로 전류를 기록하였을 때 자발적인 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.

49개의 세포에서는 그림 1B에서 보여주는 신경교세포의 특성을 나타냈다. 양전류 자극 시 활동전압이 발생되지 않았고 막전압은 -20 mV 부근이었으며 전압고정법에서 전압의존성 이온전류나 시냅스 전류가 기록되지 않았다. 이 연구에서는 A와 같이 신경세포의 특성을 보이는 세포를 선택하여 실험을 실시하였다.

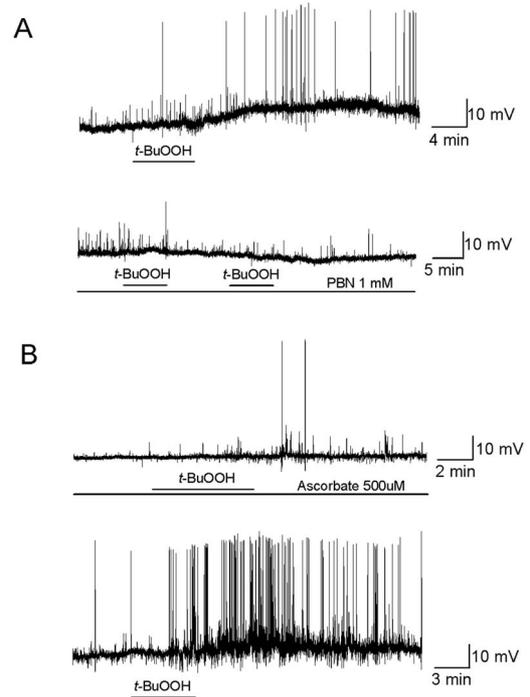


Fig. 2. Effects of *t*-BuOOH on membrane potential of SG neurons in current clamp mode. (A) Axogenous *t*-BuOOH (2 mM) applied for 7 min caused a reversible membrane depolarization and firing activity. *t*-BuOOH did not cause membrane depolarization in the continued presence of PBN (1 mM) in the same neuron. (B) Pretreatment of ascorbate (500 μM) attenuated *t*-BuOOH induced membrane depolarization and firing activity. After wash out of ascorbate for 30 min, *t*-BuOOH caused membrane depolarization in the same neuron.

야교질 세포의 흥분성에 대한 *t*-BuOOH의 효과

전류고정법으로 지속적으로 막전압을 기록하면서 *t*-BuOOH를 처리 하였을 때 약물 주입 후 1-5분 후부터 1-15 mV의 탈분극이 발생되었고(3.1±0.5 mV) 일부의 세포에서는 활동전압이 발생되었으며 이는 약물이 포함되지 않은 용액으로 관류시에도 5분-30분 동안 지속된 후 서서히 원상태로 회복되었다(n = 35)(Fig. 2A). 대표적인 항산화제인 PBN을 전 처리한 후 *t*-BuOOH를 투여 하

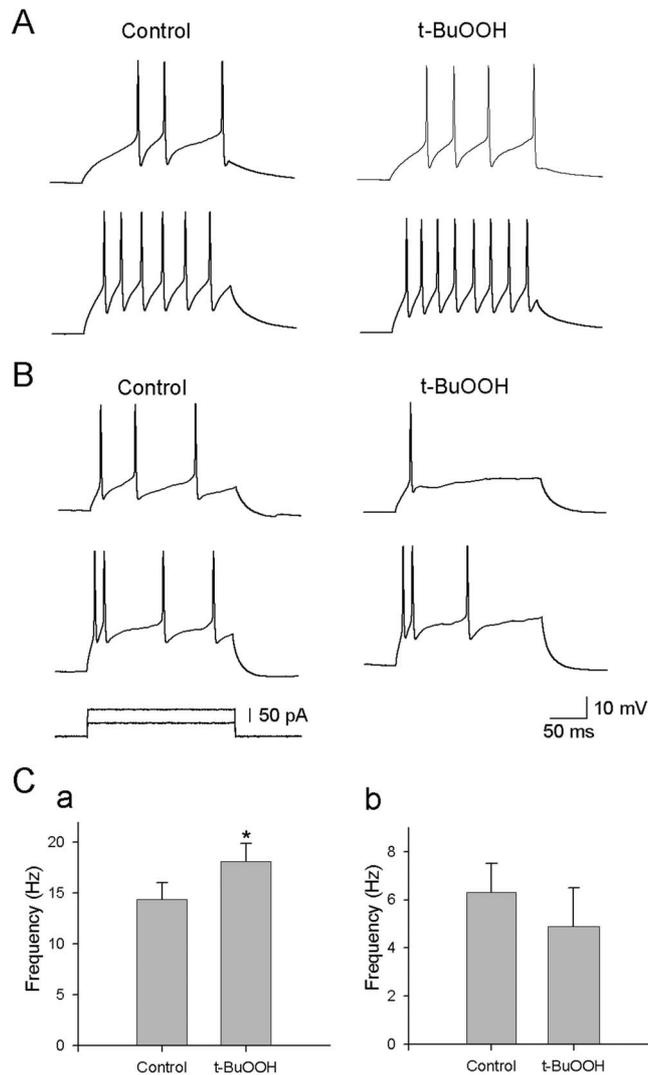


Fig. 3. Effects of *t*-BuOOH on neuronal excitability of the SG neurons. (A) Changes of discharge properties after *t*-BuOOH administration in a tonic firing neuron. Action potentials were evoked by direct intracellular injections of current pulses of increasing magnitude (50 pA steps). After *t*-BuOOH treatment, the frequency of action potentials was increased. (B) Changes of discharge properties after *t*-BuOOH administration in an adapting firing neuron. After *t*-BuOOH treatment, the neuron generated few action potentials and adapted. (C) Bar graph showing the average frequency of evoked action potentials in tonic firing neurons (a) and adapting firing neurons (b). *: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p < 0.05$). Means \pm SE.

였을 때는 탈분극 정도가 감소하였으며 8개의 세포 중 4개의 세포에서는 오히려 과분극이 관찰되었다(-1.0±1.0 mV, $p < 0.01$). 또한 vitamin C를 전 처리한 군(Fig. 2B)에서도 *t*-BuOOH에 의한 탈분극은 현저히 감소되었다(0.3±0.9 mV, $p < 0.05$)(n = 10).

세포에 50-100 pA의 양전류를 단계적으로 자극하였을 때 활동전압이 기록되었는데(n = 31), 이 중 12개의 세포(39%)에서는 300 ms-1초의 자극기간 동안 활동전압이 지속적으로 기록되는 tonic firing 뉴런이었으며 나머지(61%)는 자극기간 동안 활동전압의 빈도가 감소하는 adapting 뉴런이었다(Fig. 3). Tonic firing 뉴런에서는 100 pA로 자극하였을 때 활동전압이 14.4±16회의 빈도로 발생하였는데 *t*-BuOOH 처리에 의해 18.1±1.8회로 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 3A). Adapting 뉴런에서는 대조군에서 6.3±1.2회의 빈도를 보였고 *t*-BuOOH 처리에 의해서는 4.9±1.6회로 감소하였으며 adaptation 현상이 더욱 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3B).

흥분성 시냅스후 전류에 대한 *t*-BuOOH의 효과

자발적 흥분성 시냅스후 전류(sEPSCs)에 대한 *t*-BuOOH

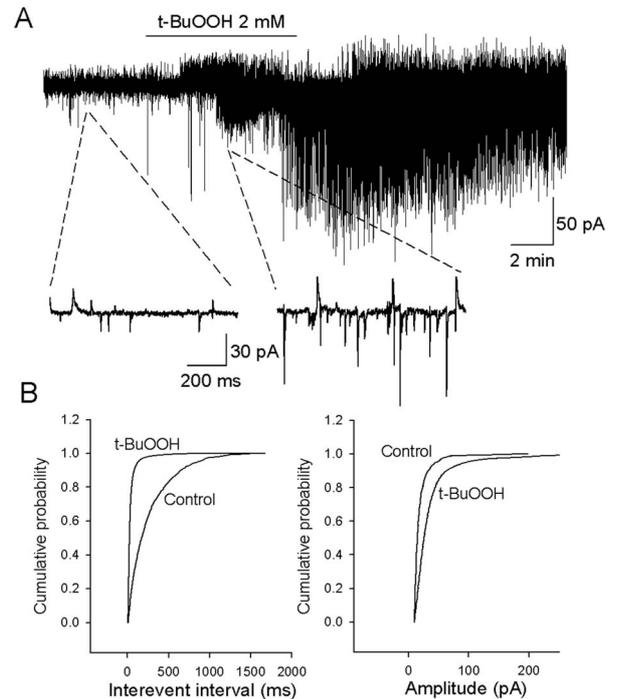


Fig. 4. Effects of *t*-BuOOH on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). (A) Continuous recording of spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) at a holding potential of -50 mV. lower records: Traces of sPSCs in the control (left) and under the action of *t*-BuOOH (right) are shown in an expanded scale in time. Note that spontaneous inhibitory synaptic currents (upward) as well as excitatory postsynaptic currents (downward) are recorded. (B) Cumulative fraction plot of sEPSCs interevent interval and amplitude. After application of *t*-BuOOH, both the frequency and amplitude were increased.

의 효과를 관찰하기 위하여 유지전압을 -70 또는 -50 mV로 고정하고 지속적으로 시냅스 전류를 기록하였다. -50 mV로 유지하고 기록하였을 때 상향 및 하향의 두 가지 전류가 기록되었는데 이 연구에서 사용한 실험용액의 조성을 고려하면(Moore 등, 2002) 상향파형은 억제성 시냅스후 전류(sIPSCs)이고 하향파형은 sEPSCs이다. *t*-BuOOH를 투여하였을 때 약물투여 전에 비하여 sIPSCs와 sEPSCs 모두에서 빈도와 크기의 증가가 관찰되었다(Fig. 4). 유지전압 -70 mV에서 기록된 sEPSCs에 *t*-BuOOH를 투여하였을 때는 빈도와 크기가 대조군(3.4 ± 0.7 Hz, 15.9 ± 1.1 pA)에 비해 각각 11.9 ± 2.8 , 20.9 ± 2.1 로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)($n = 12$).

구심신경 자극에 의하여 유발되는 흥분성 시냅스후 전류에 대한 효과(eEPSCs)를 기록하기 위하여 유지전압을 -70 mV로 고정하고 척수 후근을 흡입전극을 이용하여 0.5 - 1.5 V의 자극을 가하였다. 아교질 뉴런 중 일차 구심신경으로부터 직접 정보를 받는 세포만을 선택하여 기록하였으며($n = 14$) 이는 조사된 세포 중 약 35%를 차지하고 있었다. 이들은 단일 시냅스를 형성하고 있는데 자극에 대해 역치전류를 가지고 있거나 고빈도의 자극에 대해서도 일정하게 반응하는 전기 생리학적 특징을 가지

고 있었으며, A섬유 자극에 의한 파형만 보이거나(Fig. 5A) A섬유와 C섬유에 의한 파형이 같이 기록되기도 하였다(Fig. 5B). eEPSCs를 기록하면서 *t*-BuOOH를 투여하였을 때 대조군(187.5 ± 20.5 pA)보다 유의하게 증가하였고 (224 ± 23.8 pA, $p < 0.05$)(Fig. 5A), PBN으로 전처리한 군(194.5 ± 34.0 pA)에서는 *t*-BuOOH를 처리하였을 때 eEPSCs의 증가가 관찰되지 않았다(190.5 ± 39.1 pA)(Fig. 5B).

고찰

척수 아교질 뉴런은 주로 통각정보를 전달하는 일차 감각신경의 시냅스 흥분을 받아 통각정보를 통합한다. 이 세포의 흥분성은 통증의 역치를 결정하는 척수 내의 첫 관문으로 많은 종류의 신경전달물질이 이 신경세포의 시냅스 전달을 매개하거나 혹은 시냅스 통합에 기여하고 있다. 만성통증은 이러한 정보전달 체계 중에서 지속적인 신경자극에 의해 시냅스 가소성의 변화가 유발되며, 이러한 변화에 의해 오랜 시간 지속되는 세포 반응성의 증가가 만성통증의 세포기전이라고 알려져 있다. 중추에서는 척수후각 뉴런이 감각되어지고 말초 자극에 의하여 더 민감하게 반응하며 더 넓은 수용야로부터의 입력 신호를 받는다(Cook 등, 1987; Woolf와 Thomson, 1991). NMDA 수용체는 중추감각을 매개하고 많은 이차 전달자들이 일련의 변화에 관여되어 있다(Woolf와 Thomson, 1991; Willis, 1994; Woolf와 Costigan, 1999; Woolf와 Salter, 2000). 말초에서는 손상 받은 구심신경으로부터의 변위활성(ectopic discharge)과 같은 비정상적인 활성이 발생되고 그것이 척수에 영향을 미쳐 중추감각을 개시하고 유지시킨다(Sheen과 Chung, 1993; Yoon 등, 1996; Devor와 Seltzer, 1999; Chung과 Chung, 2002; Sukhotinsky 등, 2004).

ROS의 한 종류인 *t*-BuOOH는 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 유기 과산화수소(hydrogen peroxide)로 뇌와 척수에 많이 분포되어 있다(Sohn 등, 2005). 이것은 *t*-BuOO· 혹은 *t*-BuO·로 대사되어 지질 과산화반응(lipid peroxidation)을 유발하여 세포에 손상을 준다(Abe와 Saito, 1998). 특히 신경세포는 내재성 항산화물질인 glutathione의 농도가 낮고 산소 이용도가 높아서 이러한 산화자극에 더 민감하다(Calabrese 등, 2005). 그러나 ROS는 세포독성과 관련된 역할 이외에 여러 가지 생리적 기능을 조절하는 세포내 신호전달물질로도 작용하고 있다(Droge, 2002). 예를 들면, TGF- β 1(transforming growth factor)이나 EGF(epidermal growth factor)와 같은 성장인자에 의한 수용체 자극은 일시적으로 과산화수소 생성을 유발하여 세포 증식, 혈관확장과 같은 정상적인 세포의 기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다(Sobey 등, 1997; Varela 등, 2004).

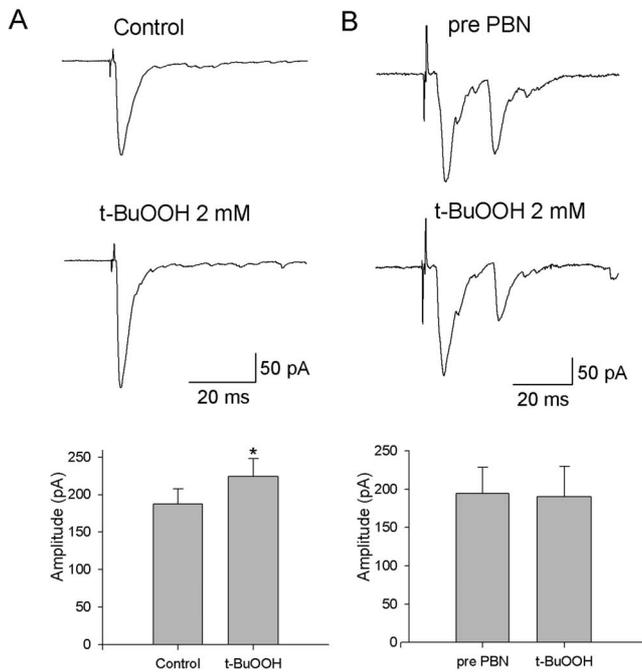


Fig. 5. Modulation by *t*-BuOOH on monosynaptic evoked postsynaptic currents (eEPSCs) of the SG neurons. eEPSCs were increased after application of *t*-BuOOH (A), and when slices were pretreated with PBN, these excitatory effects were blocked (B). eEPSCs were elicited by electrical stimulation of the dorsal root and recorded at a holding potential of -70 mV. SG neurons exhibit monosynaptic A fiber-mediated EPSC (A) or monosynaptic A and C fiber-mediated EPSC (B). *: Values are significantly different from the control by paired *t*-test ($p < 0.05$). Means \pm SE.

Kamslar와 Segal(2003)은 과산화수소가 해마세포에서 농도에 따라 LTP와 LTD를 유발하였다고 하였으며 Klann(1998)은 superoxide가 해마 세포에서 LTP를 유발하는 등 시냅스활성의 조절에도 관여하고 있다. 또한 최근에는 ROS가 통증발생에 관여되어 있다고 보고되고 있는데, tirilazad(Khalil 등, 1999), superoxide dismutase(Wang 등, 2004), PBN(Kim 등, 2004), vitamin E(Kim 등, 2006)과 같은 다양한 항산화제를 전신투여 혹은 척수내로 투여함에 의해 진통효과를 가짐이 보고되었다. 이러한 결과는 척수의 활성산소가 통증의 발생과 전달에 관여하고 있음을 의미하는 것으로 이 연구에서는 실제로 척수절편에서 외부에서 투여한 *t*-BuOOH가 아교질 세포의 막전압을 탈분극시키고 흥분성 시냅스 전도를 증가시킴을 확인하였다.

이 연구에서 *t*-BuOOH의 투여에 의해 2-3분 후부터 서서히 발생하고 약물제거 후에도 5-30분 동안 유지되는 막전압의 탈분극과 활동전압의 발생이 관찰되었다(Fig. 2A). 발생시간으로 보아 이러한 반응에는 세포내의 2차 전달기전이 관여하고 있으리라 추측할 수 있다. H_2O_2 는 다양한 세포에서 세포내 칼슘농도의 증가를 일으키는데, 이는 L형의 칼슘통로를 활성화 시키거나(Akaiishi 등, 2004), TRPM2(Wehage 등, 2002), ryanodine 수용체(Favero 등, 1995), IP_3 의존성 통로(Hu 등, 2000)와 같은 칼슘방출통로를 조절하거나, SERCA와 같은 칼슘펌프의 조절(Redondo 등, 2004)에 의한다. 세포내의 증가된 칼슘은 이차전달물질로 작용할 수 있고 Na^+Ca^{2+} 교환기전의 활성화(Hirono 등, 1998), 비특이성 양이온 전도도의 증가(Chuang 등, 2000)를 유발하여 막전압의 탈분극을 일으킬 수 있어 이러한 과정에 의해 느리고 지속적인 반응이 유발될 수 있다.

t-BuOOH의 투여에 의한 반응은 약물제거 후 원상태로 회복되는 가역적인 반응을 보였는데(Fig. 2A, 4A), 이는 통증에 관여하는 ROS의 작용은 영구적인 세포 죽음을 일으키는 것이 아닌 정상적인 신호조절물질로써의 작용 혹은 경미한 산화 자극에 의한 일시적인 기능 변화를 일으키는 상태라 할 수 있다. ROS에 의해 유발되는 안정막 전압의 변화에 관한 일부 연구에서는 약물투여 초기에 과분극이 발생됨이 보고되고 있다. 해마의 CA1 뉴런이나 중뇌의 도파민 분비 뉴런에서 H_2O_2 투여에 의해 과분극을 유발하였는데 이는 칼슘 의존성 K^+ 통로의 활성화나 ATP 민감성 K^+ 통로의 활성화에 의해 발생하여 산화 자극에 대하여 세포를 보호하는 역할을 한다고 하였다(Park 등, 2003; Avshalumov 등, 2005). 그러나 이 연구에서는 세포내 용액의 ATP 농도를 5 mM로 사용하여 기록한 세포 중 5% 이하의 세포에서만 *t*-BuOOH의 투여에 의해 과분극이 유발됨을 관찰하였다.

척수 아교질 세포는 탈분극 자극에 의해 발생하는 활동전압의 양상에 따라 자극기간 동안 지속적인 활동전압

을 보이는 tonic firing 뉴런과 자극기간 동안 활동전압의 빈도가 점차 감소하는 adapting 뉴런으로 구분할 수 있는데(Fig. 3) 이 실험에서는 adapting 뉴런이 60% 정도 분포를 보여 Schoffnegger 등(2006)의 보고와 유사하였다. Tonic firing 뉴런은 전압의존성 소듐 전류(I_{Na})와 delayed rectifier 포타슘전류(K_{DR}), 칼슘활성화 포타슘전류(K_{Ca}) 등에 의해 흥분발사(firing)의 빈도가 조절되고 있고 adapting 뉴런은 I_{Na} 와 K_{DR} 이 존재하나 전류의 크기가 tonic 뉴런에 비해 더 작은 것으로 알려졌다(Melnick 등, 2004a; Melnick 등, 2004b). H_2O_2 는 여러 종류의 포타슘전류, 즉 K_{DR} , 일과성 외향성 포타슘전류(K_A), 전도도가 작은 칼슘활성화 포타슘전류, 지연성 포타슘전류(K_D), 내향성 포타슘전류와 소듐전류(I_{Na}) 등 다양한 전압의존성 이온통로의 활성을 조절하여 막전압과 흥분성을 조절한다(Muller와 Bittner, 2001; Chang 등, 2003). Gruss 등(2006)은 흰쥐 후근신경절 세포에서 dendrotoxin에 민감한 포타슘전류(K_D)를 차단하여 adaptation이 빨라지고 소듐 전류를 불활성화 시킴에 의해 빈도가 감소하는 현상을 관찰하였다. 따라서 이 연구에서 활동전압의 빈도가 변화하는 결과는(Fig. 3) *t*-BuOOH가 전압의존성 통로의 활성화를 조절하여 발생하였을 것으로 생각되며 두 가지의 firing을 보이는 뉴런에서 반응이 다르게 나타나는 것은 차후의 연구에서 각각 어느 전류에 영향을 주었는지 확인해 보고자 한다.

척수후각 뉴런과 연결되는 일차 구심신경의 활성 증가에 의해 glutamate가 증가되거나 혹은 시냅스전 뉴런의 축삭말단에 존재하는 glutamate transporter가 ROS에 의해 억제됨으로써 시냅스 공간에 glutamate가 증가되면 시냅스후 뉴런의 세포막에 존재하는 NMDA 수용체가 활성화되며(Smythies, 1999), 이어서 활성화된 NMDA 수용체는 세포내 Ca^{2+} 증가를 일으키고 이는 세포내 ROS 합성 증가를 일으키거나 PKC를 활성화 시킨다. PKC는 세포에 내재되어 있는 AMPA 수용체를 세포막에 부착시켜(trafficking) 흥분성 시냅스후 전압을 증가시키는데, 이 연구에서 EPSCs의 크기, 빈도의 증가와 이에 따른 흥분성의 증가는 이 과정에 의해 유발 되었을 것으로 추측할 수 있다. 또한 시냅스후 전위의 크기가 증가되는 다른 이유로는 glutamate에 대한 수용체의 친화도 증가로 분비되는 glutamate에 결합되는 수용체 수가 증가하거나, 시냅스후 수용체의 전도도가 증가하여 많은 이온을 이동시켜 전류의 크기가 증가하였기 때문이다(Perrais와 Ropert, 1999). 이 연구에서는 *t*-BuOOH의 투여에 의해 sEPSCs의 증가와 함께 정도는 크지 않으나 sIPSCs의 증가도 관찰되어(Fig. 4A) 척수에서의 통각전달에 대한 과산화수소의 효과는 시냅스전에 작용하여 신경전달물질의 분비를 조절하는 역할보다는 다른 요소가 더 중요하게 작용할 수 있을 것이라 추측할 수 있으며, 이 결과는 아교질 뉴런에서 H_2O_2 에 의해 EPSCs의 증가(Tsuzuki 등, 2004)

와 함께 IPSCs의 증가도 관찰된 이전의 연구(Takahashi 등, 2007)와 일치하며, 이들은 신경전달물질의 분비증가가 주로 IP₃ 수용체를 통한 세포내 칼슘증가에 의해 조절된다고 하였다.

이전의 연구에서 항산화제인 PBN의 척수내 투여에 의해 통증행동을 감소시켜 ROS가 중추감작에 의해 진통작용을 일으켰을 것이라 추측하였으나(Kim 등, 2004), ROS 생성의 증가는 손상된 신경 부위와 손상된 신경의 후근 신경절에서도 관찰되며(Haley 등, 1992; Levy 등, 1999; Khalil과 Khodr, 2001) 이러한 말초의 ROS도 통증발생에 관여하므로 차후에 ROS의 중추감작에 대한 효과 이외에 말초감작에 대한 효과도 확인해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음

참고 문헌

- Abe, K. and Saito, H.: Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **83**:40-46, 1998.
- Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y. and Ito, Y.: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci. Lett.* **356**:25-28, 2004.
- Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Koos, T. and Rice, M.E.: Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J. Neurosci.* **25**:4222-4231, 2005.
- Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Stella, A.M. and Butterfield, D.A.: Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* **233**:145-162, 2005.
- Cook, A.J., Woolf, C.J., Wall, P.D. and McMahon, S.B.: Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature* **325**:151-153, 1987.
- Chang, D.J., Lim, C.S., Lee, S.H. and Kaang, B.K.: Hydrogen peroxide modulates K⁺ ion currents in cultured *Aplysia* sensory neurons. *Brain Res.* **970**:159-168, 2003.
- Chuang, S.C., Bianchi, R. and Wong, R.K.: Group I mGluR activation turns on a voltage-gated inward current in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **83**:2844-2853, 2000.
- Chung, J.M. and Chung, K.: Importance of hyperexcitability of DRG neurons in neuropathic pain. *Pain Practice* **2**:87-97, 2002.
- Djordjevic, V.B.: Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* **237**:57-89, 2004.
- Devor, M. and Seltzer, Z.: Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone 12-164, 1999.
- Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**:47-95, 2002.
- Favero, T.G., Zable, A.C. and Abramson, J.J.: Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**:25557-25563, 1995.
- Gruss, M., Ettore, G., Stehr, A.J., Henrich, M., Hempelmann, G. and Scholz, A.: Moderate hypoxia influences excitability and blocks dendrotoxin sensitive K⁺ currents in rat primary sensory neurons. *Molecular Pain* **2**:12-25, 2006.
- Haley, J.E., Dickenson, A.H. and Schachter, M.: Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacol.* **31**:251-258, 1992.
- Hirono, M., Konishi, S. and Yoshioka, T.: Phospholipase C-independent group I metabotropic glutamate receptor-mediated inward current in mouse Purkinje cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**:753-758, 1998.
- Hu, Q., Zheng, G., Zweier, J.L., Deshpande, S., Irani, K. and Ziegelstein, R.C.: NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**:15749-15757, 2000.
- Kamsler, A. and Segal, M.: Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **23**:269-276, 2003.
- Khalil, Z., Liu, T. and Helme, R.D.: Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain* **79**:31-37, 1999.
- Khalil, Z. and 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.
- Kim, H.K., Park, S.K., Zhou, J.L., Tagliatalata, G., Chung, K., Coggeshall, R.E. and Chung, J.M.: Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **111**:116-124, 2004.
- Kim, H.K., Kim, J.H., Gao, X., Zhou, J.L., Lee, I., Chung, K. and Chung, J.M.: Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* **122**:53-62, 2006.
- Klann, E.: Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J. Neurophysiol.* **80**:452-457, 1998.
- Kumazawa, T. and Perl, E.R.: Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indication of their place in dorsal horn functional organization. *J. Comp. Neurol.* **177**:417-434, 1978.
- Levy, D. and Zochodne, D.W.: Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.* **10**:1846-1855, 1998.
- Levy, D., Hoke, A. and Zochodne, D.W.: Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **260**:207-209, 1999.
- 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* **21**:805-816, 2004.
- McGeer, E.G. and McGeer, P.L.: Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr. Pharm. Res.* **5**:821-836, 1999.
- Melnick, I.V., Santos, S.F., Szokol, K., Szucs, P. and Safronov, B.V.: Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J. Neurophysiol.* **91**:646-655, 2004a.
- Melnick, I.V., Santos, F.A. and Safronov, B.V.: Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurons of rat. *J. Physiol.* **559**:383-395, 2004b.
- Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H. and Woolf, C.J.: Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci.* **22**:6724-6731, 2002.
- Muller, M., Fontana, A., Zbinden, G. and Gähwiler, B.H.: Effects of interferons and hydrogen peroxide on CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res.* **619**:157-162, 1993.
- Muller, W. and Bittner, K.: Differential oxidative modulation of voltage-dependent K⁺ currents in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **87**:2990-2995, 2001.
- Parman, T., Wiley, M.J. and Wells, P.G.: Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med.* **5**:582-585, 1999.
- Park, Y.K., Jung, S.J., Yoo, J.E., Lim, W. and 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.
- Park, E.S., Gao, X., Chung, J.M. and Chung, K.: Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* **391**:108-111, 2006.
- Pellmar, T.C.: Peroxide alters neuronal excitability in the CA1 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *Neurosci.* **23**:447-456, 1987.
- Perrais, D. and Ropert, N.: Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABA_A receptors in central synapses. *J. Neurosci.* **19**:578-588, 1999.
- Redondo, P.C., Salido, G.M., Rosado, J.A. and Pariente, J.A.: Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **67**:491-502, 2004.
- Sheen, K. and Chung, J.M.: Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model. *Brain Res.* **610**:62-68, 1993.
- Smythies, J.: Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **370**:1-7, 1999.
- Sohn, J.H., Han, K.L., Lee, S.H. and Hwang, J.K.: Protective effects of panduratin A against oxidative damage of tert-butylhydroperoxide in human HepG2 cells. *Biol. Pharm.* **28**:1083-1086, 2005.
- Sobey, C.G., Heistad, D.D. and Faraci, F.M.: Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* **28**:2290-2294, 1997.
- Sukhotinsky, I., Ben-Dor, E., Raber, P. and Devor, M.: Key role of the dorsal root ganglion in neuropathic tactile hypersensitivity. *Eur. J. Pain* **8**:135-143, 2004.
- Takahashi, A., Mikami, M. and Yang, J.: Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP₃ receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *European J. Neurosci.* **25**:705-716, 2007.
- Tsuzuki, K., Xing, H., Ling, J. and Gu, J.G.: Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca⁺⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission. *J. Neurosci.* **24**:762-771, 2004.
- Varela, D., Simon, F., Riveros, A., Jorgensen, F. and Stutzin, A.: NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **279**:13301-13304, 2004.
- Wang, Z.Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R. and Masini, E.: A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**:869-878, 2004.
- Wheage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jungling, E., Zitt, C. and Luckhoff, A.: Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **277**:23150-23156, 2002.
- Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., Nicol, C.J., Parman, T. and Winn, L.M.: Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res.* **396**:65-78, 1997.
- Willis, W.D.: Central plastic responses to pain. In Gebhart GF, Hammond DL, Jensen TS. *Proceedings of the 7th world congress on pain, Progress in pain research and management*, IASP Press, Seattle, 301-321, 1994.
- Woolf, C.J. and Salter, M.W.: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**:1765-1768, 2000.
- Woolf, C.J. and 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.
- Woolf, C.J. and Costigan, M.: Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:7723-7730, 1999.
- Yoshimura, M. and Jessel, T.M.: Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **62**:109-118, 1989.
- Yoon, Y.W., Na, H.S. and Chung, J.M.: Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. *Pain* **64**:27-36, 1996.