

Effects of NaOCl on Neuronal Excitability and Intracellular Calcium Concentration 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, Korea

(received December 12, 2012 ; revised February 20, 2013 ; accepted February 28, 2013)

Recent studies indicate that reactive oxygen species (ROS) can act as modulators of neuronal activity, and are critically involved in persistent pain primarily through spinal mechanisms. In this study, we investigated the effects of NaOCl, a ROS donor, on neuronal excitability and the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in spinal substantia gelatinosa (SG) neurons. In current clamp conditions, the application of NaOCl caused a membrane depolarization, which was inhibited by pretreatment with phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN), a ROS scavenger. The NaOCl-induced depolarization was not blocked however by pretreatment with dithiothreitol, a sulfhydryl-reducing agent. Confocal scanning laser microscopy was used to confirm whether NaOCl increases the intracellular ROS level. ROS-induced fluorescence intensity was found to be increased during perfusion of NaOCl after the loading of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($H_2DCF\text{-}DA$). NaOCl-induced depolarization was not blocked by pretreatment with external Ca^{2+} free solution or by the addition of nifedipine. However, when slices were pretreated with the Ca^{2+} ATPase inhibitor thapsigargin, NaOCl failed to induce membrane depolarization. In a calcium imaging technique using the Ca^{2+} -sensitive fluorescence dye fura-2, the $[Ca^{2+}]_i$ was found

to be increased by NaOCl. These results indicate that NaOCl activates the excitability of SG neurons via the modulation of the intracellular calcium concentration, and suggest that ROS induces nociception through a central sensitization.

Key words: NaOCl, membrane excitability, confocal scanning, calcium imaging

서 론

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 과산화수소(H_2O_2), superoxide 음이온(O_2^-), 수산화기(hydroxyl radical; $\cdot OH$), 산화질소(NO), 과산화질산염(peroxynitrite; ONOO-)을 포함하는데 조직손상이나 증가된 유해반응과 관련되며[1-4], 최근에는 전사인자 활성화, 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 세포조절물질로서의 역할이 보고되고 있다[5-7]. NaOCl은 용액내에서 HOCl로 가수분해되며 HOCl은 myeloperoxidase (MPO)의 존재 하에 자연적으로 염소이온과 과산화수소로부터 합성되는데 반응성이 매우 높아서 thiol group, thioether, amino group, heme group 등을 쉽게 산화시키며 [8] 한편으로 높은 화학 반응성에도 불구하고 쉽게 세포막을 통과하여 세포내 효소를 불활성화 시키고 미토콘드리아에서의 세포호흡을 억제하며 세포내 glutathione을 산화시킨다[9-12].

최근의 연구에서 ROS가 통증발생에 관여되었다는 보고가 있다. H_2O_2 의 피하투여에 의해 통증을 유발하였고[13], 척수신경 결찰(spinal nerve ligation)에 의한 신경병증성

*Correspondence to: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinhyong-Dong, Iksan 570-749, Korea, Tel : +82-63-850-6932, E-mail : physiol@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.

통증에서 척수내의 ROS 생성 증가가 관찰되었으며[14], 항산화제의 투여로 수 시간동안 지속되는 진통효과가 나타나며 보고되었다[15]. 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[16].

전기생리학적 방법을 이용하여 세포에서 ROS의 작용을 규명하기 위한 연구의 결과는 다양하다. 예를 들면, 시상신경세포에서는 과산화수소가 흥분성 및 억제성 시냅스의 균형을 조절하여 과흥분을 유발하였고[17], 흰쥐 해마에서도 NMDA 수용체 활성화에 의해 과흥분성이 관찰되었다[18]. Bao 등[19]은 과산화수소가 transient receptor potential (TRP) 통로를 활성화하여 탈분극과 흥분성의 증가를 유발한다고 보고하였고, 후근신경절 세포에서는 HOCl이 TRPA1 수용체를 통해 내향성 전류를 발생시킨다고 하였다[20]. 척수의 아교질 세포에서는 과산화수소가 미세억제성 시냅스후 전류의 빈도를 증가시킨다고[21] 보고되었고, ROS의 일종인 tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) 투여에 의해 흥분성 시냅스후 전류의 빈도가 증가하고 탈분극이 유발됨이 보고되었다[22].

이 연구에서는 ROS의 일종인 HOCl이 통증전달에 1차적 중개역할을 하는 척수후각 세포에 작용하여 통증을 유발할 수 있는지 확인하고자 척수후각 세포의 흥분성에 대한 NaOCl의 효과를 알아보았고 또한 NaOCl에 의한 흥분성 증가는 어떤 기전에 의하여 일어나는지를 patch clamp 방법과 칼슘 형광영상법으로 조사하였다.

재료 및 방법

척수절편 제작

생후 13일-20일 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% O₂-5% CO₂를 공급하면서 두께 150-350 μm의 척수절편을 얻었는데, 절단 중 계속 온도 조절기(model 765, Campden, 영국)를 이용하여 용액의 온도를 1-2°C 정

도로 낮게 유지 시켰다. 척수절편은 32°C의 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 고정된 후 시행하였고, 실험기간 동안 계속해서 95% O₂-5% CO₂가 포함된 용액을 관류펌프(Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 관류시켰다(2-3 mL/min).

단일 세포의 분리

조직절편기를 이용하여 요수부위를 350 μm 두께의 횡단면으로 절개하여 절편을 만들었다. 척수절편은 인공 뇌척수액에 실온에서 1시간 이상 보관한 후 단백분해 효소인 pronase (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 절편은 효소가 없는 인공 뇌척수액에 보관하였다. 척수후각 부위는 끝을 부드럽게 한 21G 주사침으로 천공하여 얻었고 이를 지름 1 cm의 유리판 위에서 작은 피펫속으로 흡입, 분출하는 과정을 반복하여 단일세포를 분리하였다.

실험용액

척수절편 제작과 막전압을 기록하기 위한 세포외 용액의 조성(mM)은 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 Mg ATP, 0.3 Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 첨가하여 7.3으로 조정하였다. 실험에 사용한 NaOCl, phenyl-N- tert-butylnitron (PBN), dithiothreitol (DTT), thapsigargin, nifedipine 등은 Sigma사 (미국)에서 구입하였고, 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), fura-2 AM은 Molecular Probes사 (미국)에서 구입하여 사용하였다. Thapsigargin, nifedipine, H₂DCF-DA, fura-2 AM 등은 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma)에 먼저 녹인 후 최종농도로 실험직전에 인공뇌척수액에 희석하여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 증력을 이용한 관류장치(BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 기록용기 내 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

막전압 기록을 위하여 미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, 일본)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연질 유리미세관(TW 150-3, WPI, 미국)을 저항이 5-8 MΩ이 되도록 기록전극을 제작하였다. Gramicidin (Sigma, 미국)을 먼저 DMSO에 2.5-5 mg/ml의 농도로 녹인 후 세포내 용액에 2.5-5 μg/ml의 농

도가 되게 희석시켜 사용하였다. 기록전극을 gramicidin이 포함된 용액으로 채우기 전에 먼저 전극의 끝 쪽에 gramicidin이 포함되지 않은 용액으로 채워 세포와의 부착을 용이하게 하였다. 미세 전극조절기 (ROE -200, Sutter, 미국)를 이용하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. Gigaohm seal을 이룬 후 15-20분 경과하여 막전압이 -45 mV 이하로 안정되었을 때 기록을 시작하였다. 전압측정에는 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 전기 신호의 저장 및 분석에 이용하였다. 실험 시 sampling rate는 1 kHz로 기록하고, low pass 8-pole Bessel filter는 2 kHz로 여과 하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

세포내 활성산소 측정

세포내 활성산소 생성 정도는 H₂DCF-DA (Molecular Probes, 미국) assay로 측정하였다. 150 μ m의 척수절편은 32°C의 세포외 용액에서 DMSO로 먼저 녹인 H₂DCF-DA dye 10 μ M을 넣어 15분간 loading 하였다. 이후 척수절편은 공초점 레이저 형광현미경(LSM 510, Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 \times 400 배율로 관찰 하였으며, excitation 파장은 488 nm (argon laser), emission 파장은 505 nm이었다. Time series image를 이용하여 30초마다 연속이미지를 기록하였으며, 약물 투여 후 시간 경과에 따른 세포 내의 형광강도 변화를 관찰하였다.

세포내 칼슘양 측정

세포내 칼슘양의 변화를 측정하기 위한 표식자로 Fura-2/AM (Molecular Probes, 미국)을 사용하였다. 단일세포로 분리된 척수후각 세포를 인공 뇌척수액에 Fura-2/AM (5 μ M)을 첨가한 용액에서 실온에서 45분간 배양하였다. Fura가 loading된 세포는 현미경(BX50WI, Olympus, 일본) 위의 기록용기에 옮겨 기록하였는데 360과 380 nm에서 excitation시키고(F340, F380) 형광은 510 nm에서 측정하였다. 영상은 4초 마다 저장하였고 F340과 F380의 상대적인 비율로 세포내 칼슘양을 표시하였다.

실험자료의 분석

막전압의 분석은 Clampfit (version 9.0, Axon, 미국)을 이용하였고, 세포내 활성산소 생성 정도는 LSM 510 image analysis software (Carl Zeiss, 독일)를 이용하였으며, 세포내 칼슘양의 변화는 MetaFluor software (Molecular devices, 미국)를 이용하였다. 약물처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 independent t-test를 이용하였고, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하

였다. 통계자료의 값은 평균값 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 표시하였다.

결 과

척수후각 세포의 흥분성에 대한 NaOCl의 효과

척수후각 세포의 흥분성에 대한 NaOCl의 효과를 조사하기 위하여 patch clamp 방법을 이용하여 막전압을 기록하였다. Whole cell이 되었을 때 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 세포만을 결과분석에 이용하였다. 막전류 고정법으로 지속적으로 막전압을 기록하면서 NaOCl 1, 10, 50 μ M을 5분간 처리하였다. 1 μ M과 10 μ M을 투여하였을 때 각각 2.1 \pm 2.3 (n=7), 4.5 \pm 1.7 mV (n=18)의 탈분극이 관찰되었는데 탈분극은 약물 주입 후 30초-2분 후부터 1-10 mV의 크기로 발생되었다. 그 중 일부의 세포에서는 약물 투여 후 활동전압이 발생되었으며 이는 약물이 포함되지 않은 용액으로 처리하였을 때 탈분극이 5분-30분 동안 지속된 후 서서히 원상태로 회복되었다. 50 μ M (n=13)을 투여하였을 때는 약물투여 중에는 -6.1 \pm 1.6 mV의 과분극이 발생하였고 정상용액으로 재관류 시 4.7 \pm 1.5 mV의 지속적인 탈분극이 이어졌다(Fig. 1).

대표적인 광범위 항산화제인 PBN 2 mM을 세포외액에 전 처리한 후 NaOCl을 10 μ M 투여 하였을 때는 NaOCl에 의한 탈분극이 억제 되었다(-1.7 \pm 2.1, n=12)($p < 0.05$). 또한 세포막 단백질에 직접 작용하는 환원제인 DTT를 전처리한 후 NaOCl을 투여하였을 때 4.8 \pm 1.0 mV의 탈분극이 발생하여 NaOCl만 투여하였을 때와 유의한 변화를 보이지 않았다(n=5)(Fig. 2). 따라서 NaOCl에 의한 흥분성의 증가는 활성산소종이 세포내 신호전달 과정에 영향을 미쳐 발생하였을 것으로 추측할 수 있다.

세포내 활성산소의 확인

NaOCl 투여가 실제로 세포내 활성산소를 생성하는지를 확인하기 위하여 공초점 레이저 형광현미경으로 H₂DCF-DA의 형광강도를 측정하였다. H₂DCF-DA (10 μ M)로 loading된 척수절편에 5분간 NaOCl (10 μ M)을 관류하였을 때 27.2 \pm 3.7% (n=5)($p < 0.05$)로 형광강도가 유의적으로 증가하였고 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 원래 상태로 회복되었다(Fig. 3).

NaOCl에 의한 탈분극과 세포내 칼슘양의 변화

NaOCl에 의한 탈분극이 어떠한 기전에 의해서 발생하는지를 알아보고자 세포 내, 외의 칼슘과의 관련성을 확인하였다. 세포외 용액에서 칼슘을 제거하고 칼슘 chelator인 EGTA 1 mM을 첨가한 용액에서 막전압을 기록하면서

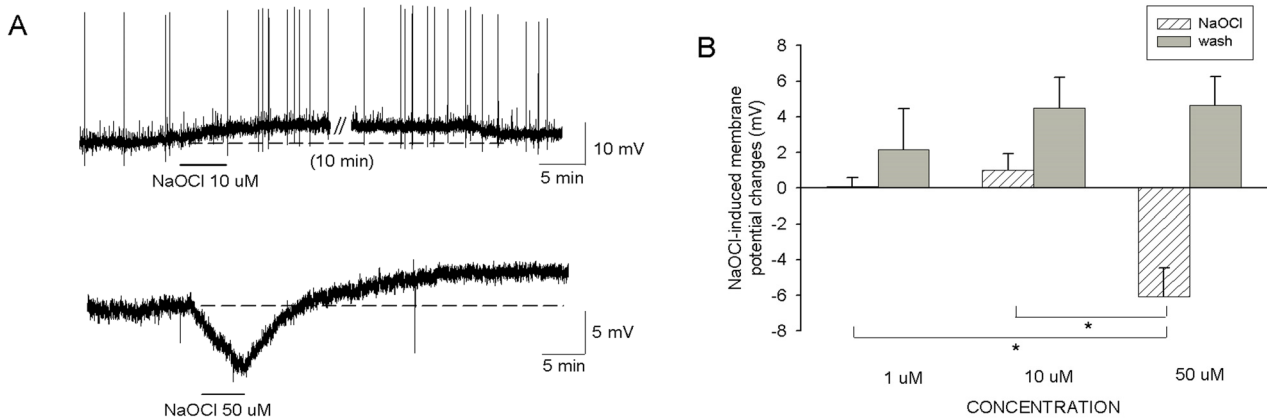


Fig. 1. Effects of NaOCl on membrane potential of spinal substantia gelatinosa (SG) neurons in patch clamp recording. (A) NaOCl (10 μ M) applied for 5 min caused a reversible membrane depolarization and firing activity (upper). A high concentration of NaOCl (50 μ M) induced a transient hyperpolarization followed by a long-lasting depolarization (lower). (B) Graph shows the NaOCl-induced membrane potential changes. *: Values are statistical significance by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

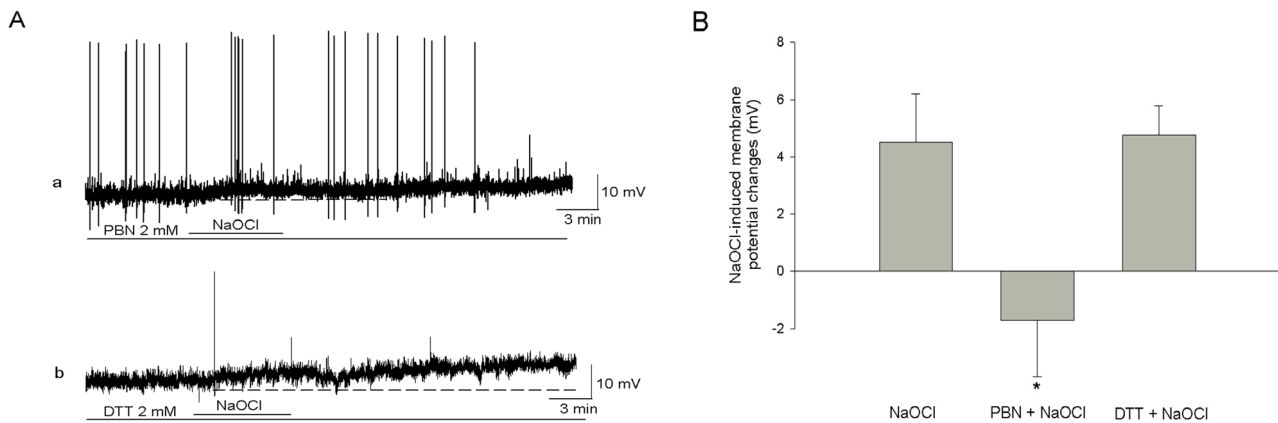


Fig. 2. Effects of PBN and dithiothreitol on NaOCl-induced membrane potential changes in SG neurons. (Aa) When cells were pretreated with 2 mM of extracellular PBN, a ROS scavenger, NaOCl failed to induce membrane depolarization. The NaOCl-induced depolarization was not blocked by pretreatment with dithiothreitol (DTT; 2 mM), a sulfhydryl-reducing agent (b). (B) NaOCl-induced membrane potential changes under control condition and pretreatment of drugs. *: Values are significantly different from the control by independent t-test ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

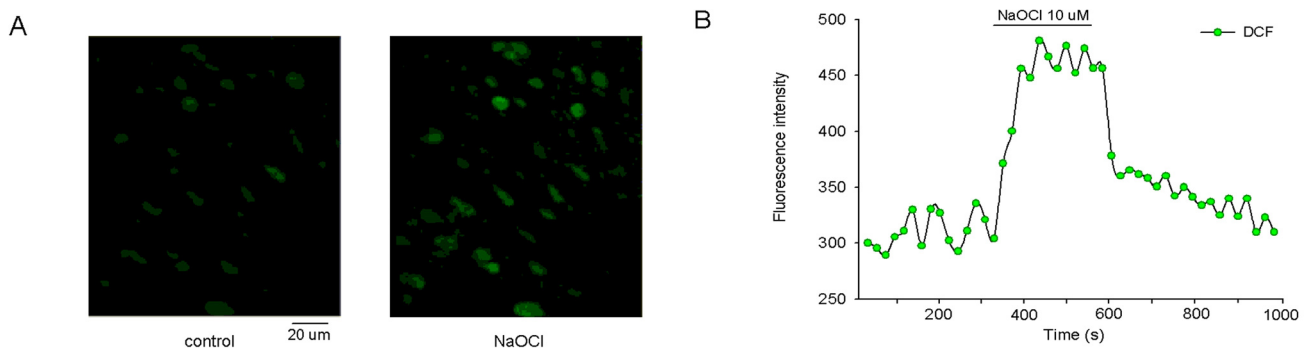


Fig. 3. Measurement of ROS using confocal microscopy in SG neurons. (A) Spinal cord slices were stained with H₂DCF-DA (10 μ M) for 15 min, and fluorescence images of the slices were obtained by laser confocal microscopy. Addition of NaOCl (10 μ M) increased fluorescence intensity. (B) NaOCl-induced fluorescence intensity were monitored by time-series analysis.

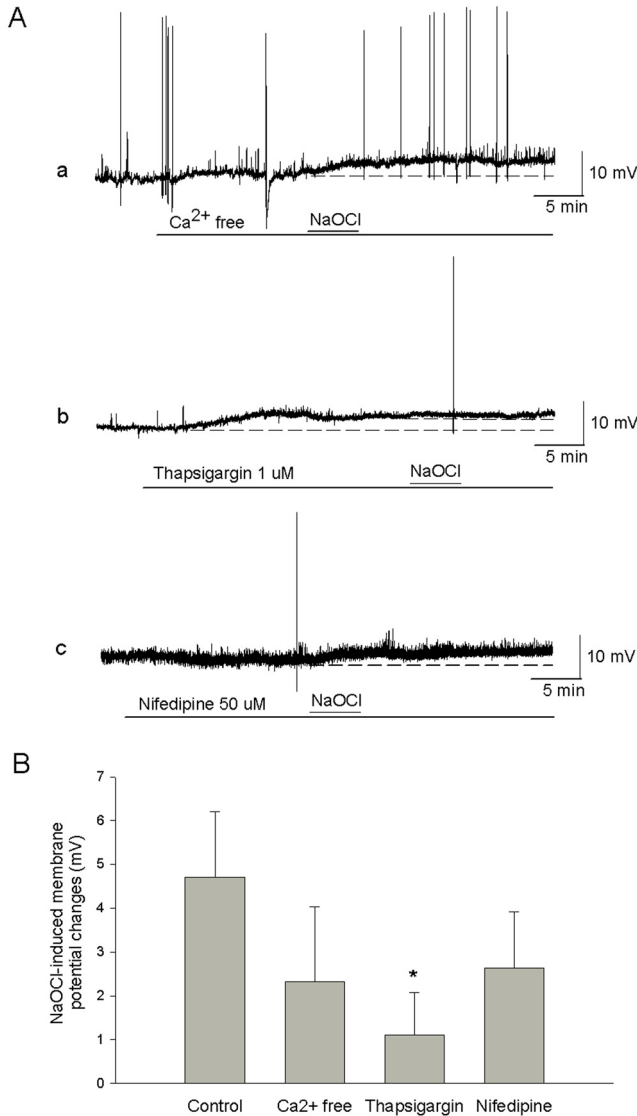


Fig. 4. Effects of Ca^{2+} store depletion and a removal of extracellular Ca^{2+} on NaOCl-induced membrane potential changes. (Aa) NaOCl-induced depolarization was not blocked by pretreatment with Ca^{2+} free solution. When slices were pretreated with Ca^{2+} ATPase inhibitor thapsigargin, NaOCl failed to induce membrane depolarization (b). Nifedipine, voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker, did not block NaOCl-induced membrane depolarization (c). (B) Mean NaOCl-induced membrane depolarization in control and in neurons pretreated with Ca^{2+} free solution, thapsigargin and nifedipine. *: Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.05$). Means \pm SEM.

NaOCl을 10 μM 투여하였을 때 2.4 ± 1.7 mV ($n=9$)의 탈분극이 발생하여 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Thapsigargin은 세포내 칼슘저장소로 Ca^{2+} 을 reuptake 하는 과정을 차단함으로써 칼슘저장소내의 칼슘을 고갈시킨다. Thapsigargin 1 μM 을 15분 이상 전처리하는 동안에 $4.6 \pm$

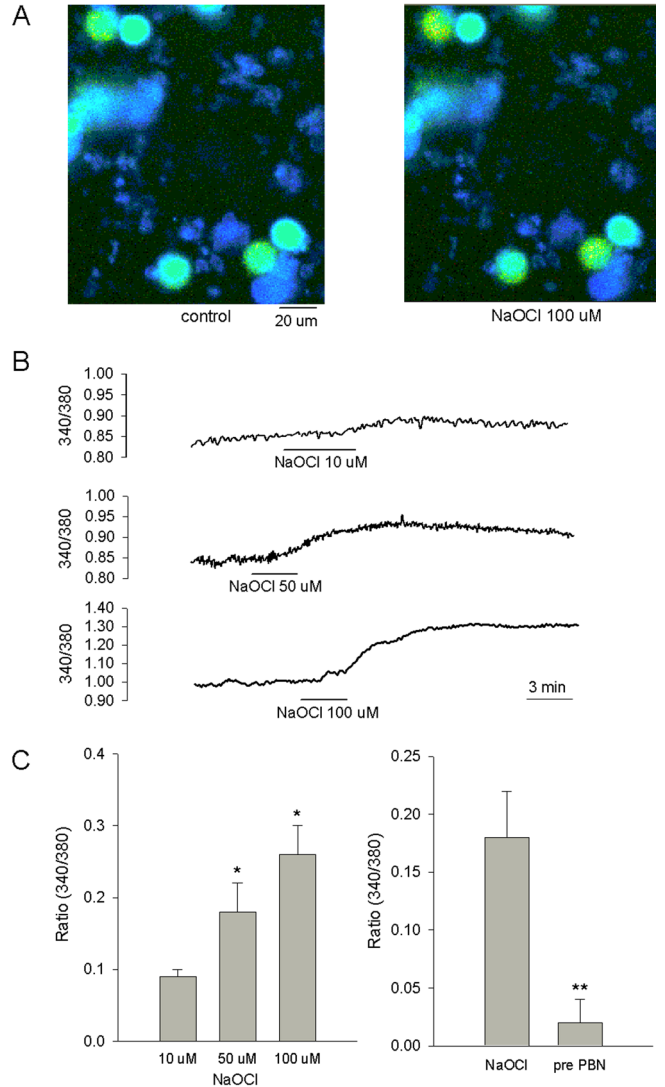


Fig. 5. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses by NaOCl in acutely dissociated SG neurons. (A) Increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by NaOCl 100 μM , as measured by fluorescent Fura-2 imaging, magnification, X400. (B) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses by NaOCl 10, 50, 100 μM . Changes in intracellular Ca^{2+} concentration were monitored by ratio metric fluorescence imaging. (C) Mean NaOCl-induced peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in control and in neurons pretreated with PBN. *: Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.05$). **: $p < 0.01$. Means \pm SEM.

2.7 mV의 탈분극이 발생되었으며 NaOCl을 추가적으로 투여 하였을 때 1.1 ± 1.0 mV ($n=6$)의 전압변화가 발생하여 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 또한 전압의존성 칼슘통로 차단제인 nifedipine 50 μM 을 전처리하고 NaOCl을 처리하였을 때는 2.6 ± 1.3 mV ($n=4$)의 탈분극이 발생하여 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

실제로 NaOCl 투여가 세포내 칼슘양을 증가시키는지 를 확인하기 위하여 단백질해 효소처리에 의해 단일세포

로 분리된 척수후각 신경세포에서 Fura-2를 이용한 세포내 칼슘양의 변화를 측정하였다. NaOCl 10, 50, 100 μM 을 3분간 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포내 칼슘양의 증가가 관찰되었다(0.09 ± 0.01 , 0.18 ± 0.03 , 0.26 ± 0.04). 세포내 칼슘양의 증가는 약물처리 30초-2분 후부터 나타났는데 약물농도가 높으면 반응속도가 빠른 경향을 보였으며 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 5-20분 유지되다가 원래 상태로 회복되었다(Fig. 5B). 항산화제인 PBN을 전처리한 후 NaOCl 50 μM 을 투여하였을 때는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(0.02 ± 0.02 , $p < 0.05$, $n=8$) (Fig. 5C).

고 찰

척수 아교질 세포는 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 매개하고 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. 중추에서는 척수후각 뉴런이 감각되어지고 말초자극에 의하여 더 민감하게 반응하며 더 넓은 수용야로부터의 입력신호를 받는다[23,24].

ROS의 한 종류인 HOCl은 반응성이 매우 높아서 thiol group, thioether, amino group, heme group 등을 산화시키며[8] 쉽게 세포막을 통과하여 세포내 효소를 불활성화시키고 미토콘드리아에서의 세포호흡을 억제한다[9-12]. 특히 신경세포는 내재성 항산화물질인 glutathione의 농도가 낮고 산소이용도가 높아서 이러한 산화자극에 더 민감하다[25]. 최근에는 ROS가 통증발생에 관여되어 있다고 보고되고 있는데, tirilazad [26], superoxide dismutase [4], PBN [15], vitamin E [16] 와 같은 다양한 항산화제를 전신투여 혹은 척수내로 투여함에 의해 진통효과를 가짐이 보고되었다. 이러한 결과는 척수의 활성산소가 통증의 발생과 전달에 관여하고 있음을 의미하는 것으로 이 연구에서는 외부에서 투여한 NaOCl이 아교질 세포의 세포내 ROS의 양과 칼슘양을 증가시키고 막전압을 탈분극시켜 흥분성을 증가시킴을 확인하였다(Fig. 1, 3, 5).

이 연구에서 막전압을 기록하면서 NaOCl을 투여하였을 때 서서히 탈분극을 유발하고 약물제거 후 원상태로 회복되는 가역적인 반응을 보였다(Fig. 1). 또한 NaOCl에 의한 세포내 ROS양의 증가도 약물 제거 후 빠르게 원상태

로 회복되는 경향을 보였는데(Fig. 3) 이는 통증에 관여하는 ROS의 작용은 영구적인 세포죽음을 일으키는 것이 아닌 정상적인 세포내 신호조절물질로써의 작용 혹은 경미한 산화자극에 의한 일시적인 기능변화를 일으킨 상태라 할 수 있다.

ROS에 의해 유발되는 안정막 전압의 변화에 관한 일부 연구에서는 약물투여 초기에 과분극이 발생됨이 보고되고 있다. 해마의 CA1 뉴론이나 중뇌의 도파민 분비 뉴론에서 H_2O_2 투여에 의해 과분극을 유발하였는데 이는 칼슘 의존성 K^+ 통로의 활성화나 ATP 민감성 K^+ 통로의 활성화에 의해 발생하여 산화자극에 대하여 세포를 보호하는 역할을 한다고 하였다[27,28]. 이 연구에서는 저농도 (1, 10 μM)의 NaOCl에 의해서는 탈분극만이 발생하였으나 고농도로 (50 μM) 투여 시 약물처리 기간 중 과분극을 유발하여 차후의 연구에서 과분극을 일으키는 기전에 관하여 조사하고자 한다.

ROS는 세포막의 단백질에 직접 작용하여 산화작용을 일으켜 효과를 나타낼 수 있다[29,30]. 척수 아교질 세포에서 NaOCl에 의한 흥분성의 증가가 직접적인 산화작용에 의한 것인지를 알아보기 위하여 세포막 단백질에 작용하는 환원제인 DTT를 전처리 한 후 NaOCl을 투여하였을 때 4.8 ± 1.0 mV의 탈분극이 발생하여 NaOCl만 투여하였을 때와 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 이는 NaOCl에 의한 흥분성의 증가는 세포내 신호전달 과정에 의해 발생하였을 것으로 추측할 수 있으며 이전에 보고된 활성산소종의 다른 종류인 t-BuOOH의 척수 후각세포에서의 작용과 유사하다[31].

2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$)는 세포내 ROS 생성을 측정하는데 일반적으로 사용된다[32]. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 는 세포막을 지나 세포내로 이동한 후 내재성 esterase에 의해 불투과성의 2',7'-dichlorofluorescein (H_2DCF)로 가수분해되어 저장되며 이것은 H_2O_2 와 반응하여 산화되면서 dichlorofluorescein (DCF)을 형성한다[33]. Yeo 등 [34]은 척수손상 모델에서 과산화수소가 농도 의존적으로 DCF 산화를 증가시켰고 상승된 DCF 형광 강도는 항산화제인 sodium selenite에 의해 억제되었다고 보고하였는데 이 연구에서도 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 에 의해 NaOCl이 ROS양을 증가시키는 것이 확인되었으나 그 지속시간은 약물제거 후 빠르게 감소하여 막전압의 탈분극이 NaOCl 제거 후 5-30분 동안 유지되는 것과는 차이가 있었다. 이는 NaOCl 투여가 세포내의 빠른 ROS 증가를 유발하지만 막전압의 변화는 이어지는 세포내 신호전달기전의 작동에 의하여 발생되었으리라 추측할 수 있다. Hempel 등 [35]은 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 가 과산화수소 뿐 만 아니라 수산화(OH), 산화질소(NO), 과산화질산염(ONOO^-) 등 다양한 ROS에 비선택적으로 반

응한다고 보고하였는데 이 연구에서 NaOCl에 의해 증가된 ROS가 구체적으로 어떤 종류인지는 각각의 ROS에 특이성을 가진 다른 표지자를 이용한 연구가 필요하다고 생각된다.

이 연구에서 thapsigargin 전처리에 의해 탈분극이 발생하고 NaOCl에 의한 탈분극을 감소시킨 것(Fig. 4 Ab)은 thapsigargin이 세포내 칼슘저장고를 고갈시키는 신호가 NaOCl에 의한 탈분극에 중요하게 작용하고 있음을 의미한다. 세포내 칼슘의 고갈은 이후 밖으로부터 칼슘 유입을 일으키는데 이러한 이온통로를 이전부터 저장고 의존성 통로(store operated channel; SOC)로 명명하였고 최근 많이 연구되어지고 있다. 이 SOC를 통해 들어온 칼슘은 여러 효현제(agonist)들에 의한 반응을 조절할 뿐만 아니라 세포내 저장고에 칼슘을 공급하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[36].

결론적으로 이 연구에서 NaOCl의 투여로 발생된 ROS는 척수후각 뉴론에서 막전압을 탈분극 시키고 세포내 칼슘양을 증가시켰는데 이러한 결과는 주로 세포내 Ca^{2+} 저장고를 통하여 유발되었다고 할 수 있다. 또한 이러한 점은 ROS가 이전의 역치하 입력신호에 대하여 더 쉽게 시냅스후 뉴론의 활동전압을 발생시킬 수 있어 통증의 정보전달과정에 중요하게 관여할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

참고문헌

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 Med*. 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(1):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. 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.
8. Winterbourn CC. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim Biophys Acta*. 1985;840(2):204-210.
9. Schraufstätter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest*. 1990;85(2):554-562.
10. Eley DW, Eley JM, Korecky B, Fliss H. Impairment of cardiac contractility and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase activity by hypochlorous acid: reversal by dithiothreitol. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69:1677-1685.
11. Vissers MC, Winterbourn CC. Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem J*. 1995;307(Pt1):57-62.
12. Pullar JM, Winterbourn CC, Vissers MC. Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cell exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *Am J Physiol*. 1999;277:H1505-1512.
13. Watt, B.E, Proudfoot, A.T, Vale and J.A. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol. Rev*. 2004;23:51-57.
14. 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.
15. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliatalata 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.
16. 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.
17. Frantseva MV, Velazquez JLP, Carlen PL. Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *J Neurophysiol*. 1998;80:1317-1326.
18. Avshalumov MV, Rice ME. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 2002;87:2896-2903.
19. Bao L, Avshalumov MV and Rice ME. Partial mitochondria inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H_2O_2 elevation, not ATP depletion. *J Neurosci*. 2005;26:10029-10040.
20. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1899-1910.
21. 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.
22. 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.
 23. Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature.* 1987;325: 151-153.
 24. Woolf CJ, Thompson SWN. 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.* 1991;44:293-299.
 25. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci.* 2005;233:145-162.
 26. 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.
 27. Park YK, Jung SJ, Yoo JE, Lim W, Kim J. Effect of acute hypoxia on ATP-sensitive potassium currents in substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Eur J Physiol.* 2003; 446:600-606.
 28. 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.
 29. Hong JH, Moon SJ, Byun HM, Kim MS, Jo H, Bae YS, Lee SI, Bootman MD, Roderick HL, Shin DM, Seo JT. Clinical role of phospholipase C1 in the generation of H₂O₂-evoked [Ca²⁺]_i oscillations in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem.* 2006;281:13057-13067.
 30. 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.
 31. Lim SJ, Chun SW. Mechanisms of tert-butyl hydroperoxide-induced membrane depolarization in rat spinal substantia gelatinosa neurons. *Int J Oral Biol.* 2008;33: 117-123.
 32. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(2):227-231.
 33. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):146-159.
 34. Yeo JE, Kim JH, Kang SK. Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):225-238.
 35. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):146-159.
 36. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 1997;77(4):901-930.