

# Role of microglial activation on neuronal excitability in rat substantia gelatinosa

Areum Park<sup>1</sup> and Sang Woo Chun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Dental Hygiene, Gangdong University, Eumseong 27600, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang Dental Research Institute, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

Glial cells, including astrocytes and microglia, interact closely with neurons and modulate pain transmission, particularly under pathological conditions. In this study, we examined the excitability of substantia gelatinosa (SG) neurons of the spinal dorsal horn using a patch clamp recording to investigate the roles of microglial activation in the nociceptive processes of rats. We used xanthine/xanthine oxidase (X/XO), a generator of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), to induce a pathological pain condition. X/XO treatment induced an inward current and membrane depolarization. The inward current was significantly inhibited by minocycline, a microglial inhibitor, and fluorocitrate, an astrocyte inhibitor. To examine whether toll-like receptor 4 (TLR4) in microglia was involved in the inward current, we used lipopolysaccharide (LPS), a highly specific TLR4 agonist. The LPS induced inward current, which was decreased by pretreatment with Tak-242, a TLR4-specific inhibitor, and phenyl N-t-butyl nitron, a reactive oxygen species scavenger. The X/XO-induced inward current was also inhibited by pretreatment with Tak-242. These results indicate that the X/XO-induced inward current of SG neurons occurs through activation of TLR4 in microglial cells, suggesting that neuroglial cells modulate the nociceptive process through central sensitization.

**Keywords:** Substantia gelatinosa neuron, Toll-like receptor 4, Microglia, Patch clamp

## Introduction

척추후각의 아교질(substantia gelatinosa) 신경세포는 말초조직으로부터 감각신경섬유를 통해 정보를 전달받고 이를 통합한다. 조직손상과 관련된 통각정보는 A $\delta$  섬유와 C 섬유와 같은 일차 감각신경섬유를 통해 척수의 아교질로 전달되며 이곳을 경유하여 시상으로 통각정보를 전달한다[1].

Superoxide 음이온( $O_2^{\cdot-}$ ), 과산화수소( $H_2O_2$ ) 등으로 대표되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 조직손상이나 유해반응과 관련된다. ROS가 통증발생과 유지에 관여한다는 연구를 보면,  $H_2O_2$ 의 피하투여로 통증이 유발되고 항산화제 투여에 의해서는 통증이 감소하였으며[2], 피부 내 capsaicin 투여로 통증이 유발된 생쥐의 척수후

각 뉴런에서  $O_2^{\cdot-}$ 가 증가되었음을 관찰하였다[3]. 또한 본 실험실에서는 hydroxyl radical을 발생시키는 tert-butylhydroperoxide를 척수에 주입하여 행동학적으로 통각과민을 관찰하고, 아교질 세포의 흥분성의 증가를 확인하였으며[4], 최근의 연구에서는  $O_2^{\cdot-}$ 를 발생시키는 xanthine/xanthine oxidase (X/XO)의 투여에 의해 아교질세포의 시냅스 전에 작용하여 신경전달물질의 양을 증가시키거나 시냅스 후 뉴런의 이온통로에 직접 작용하여 탈분극시킬 수 있음을 확인하였다[5]. 그러나 Park과 Chun [5]의 연구에서 효소처리에 의해 단일세포로 분리된 아교질세포에서는 X/XO가 전혀 효과를 나타내지 않아, X/XO의 효과는 먼저 아교질세포 주위의 세포에 먼저 영향을 주고 이차적으로 아교질세포에 영향을 미쳤으리라 추측할 수 있다.

중추신경계의 신경교세포는 정상세포(astrocyte), 미세아교세포(mi-

Received December 7, 2020; Revised December 17, 2020; Accepted December 17, 2020

\*Correspondence to: Sang Woo Chun, E-mail: physio1@wonkwang.ac.kr <https://orcid.org/0000-0001-8083-0124>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

croglia), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 등으로 구성된다. 성상세포는 중추신경계에서 가장 많은 수를 차지하는데, 설치류에서 보고된 바에 의하면 하나의 성상세포는 4-6개의 신경세포체와 300-600개의 수상돌기와 14만여 개의 시냅스를 하고 있다[6]. 이러한 밀접한 접촉이 신경세포를 지지하는 역할을 함과 동시에 시냅스 신호전달 동안 신경세포 외부의 화학적 조성을 조절하는 역할을 한다[7]. 미세아교세포는 중추신경계에서 면역에 관계하는 세포로[8], 세포 주위 환경의 변화에 빠르고 역동적으로 반응한다[9].

성상세포와 미세아교세포는 신경병증성 통증이나 염증성 통증의 발생과 유지에 중요한 역할을 하고 있다[10-12]. 피하염증, 말초신경손상, 척수손상 등 통각과민을 일으킬 수 있는 여러 상황에서 성상세포 표지자인 glial acidic fibrillary protein의 발현이 척수에서 증가하였으며[13], 또한 여러 자극에 의해 활성화된 미세아교세포는 신경세포 기능을 조절할 수 있는 다양한 신경전달물질과 사이토카인 같은 작은 분자들을 분비하는 것으로 보고되었다[14, 15]. 그러나 중추신경계에서 통증의 발생과 전달에 신경교세포가 중요하게 관여함이 보고되어 있음에도 불구하고, 신경교세포가 직접적으로 척수후각 뉴런의 흥분성에 미치는 효과를 확인한 연구는 많지 않은 상황이다.

이 연구에서는 X/XO 투여에 의해 발생한 ROS가 통증전달에 일차적 중계역할을 하는 척수 아교질세포의 흥분성을 조절하는 과정에서 미세아교세포의 관련성을 확인하고자 toll-like 4 수용체(TLR4)의 활성이 아교질세포의 신경활동성에 어떠한 영향을 미치는지 patch clamp 방법으로 조사하였다.

## Materials and Methods

### 1. 척수절편 제작

Patch clamp 실험은 생후 12-18일 된 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 동물실험에 관한 사항은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정을 준수하였다. 흰쥐에 25% urethane (4 mL/kg)을 복강 내 투여하여 마취하였다. 요추 부위를 척추제거술(laminectomy)로 척수를 노출하고 요천수 펌대부(L1-S3)에서 1 cm 정도 길이로 척수를 절단하였다. 미리 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>를 공급한 차가운 용액(1-2°C)에서 조직절편기(752M; Campden Instruments, Loughborough, UK)를 이용하여 두께 300 μm의 척수절편을 절단하였다. 척수절편은 32°C의 인공 뇌척수액에 1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에 실험을 진행하였다. 척수절편을 현미경(BX50WI; Olympus, Tokyo, Japan) 위의 기록용기에 위치시킨 후 지속적으로 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>를 공급한 용액을 관류펌프(Minipuls 3; Gilson, Villiers le Bel, France)를 이용하여 순환시키면서 막전압과 전류의 기록을 시행하였다.

### 2. 실험용액

기록을 위한 세포외 용액의 조성은 117 NaCl, 3.6 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose였고 95% O<sub>2</sub>-

5% CO<sub>2</sub>를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 기록전극 내 용액은 150 K-Glu, 10 HEPES, 5 KCl, 0.1 EGTA, 5 MgATP, 0.3 Na GTP를 사용하였고, pH는 KOH를 추가하여 7.3으로 만들었다.

실험에 사용된 X, XO, DL-fluorocitric acid barium salt (fluorocitrate), phenyl N-t-butylNitron (PBN), minocycline은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), lipopolysaccharide (LPS), Ethyl-(6R)-6-(N-(2-chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (Tak-242)는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. Tak-242는 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich)에 일차적으로 녹인 후 최종농도로 세포외 용액에 희석하여 사용하였고, 그 밖의 다른 약물은 실험 전에 세포외 용액에 녹여 사용하였다. 실험용액의 공급은 증류를 이용한 관류장치(BPS-4SG; ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA)를 이용하였다.

### 3. 전기생리학적 기록방법

막전압과 전류의 기록을 위하여 whole cell patch clamp의 전류고정법과 전압고정법을 각각 사용하였다. 미세유리전극 제조기(PP-830; Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 외경 1.5 mm의 가는 유리피펫(TW150-3; WPI, Sarasota, FL, USA)을 5-7 MΩ 정도의 저항을 갖도록 미세전극을 제작하였다. 기록용기에 척수절편을 위치시키고 밝은 띠를 나타내는 척수 아교질 부위를 확인한 후 양압을 가하면서 미세전극조절기(ROE-200; Sutter, Novato, CA, USA)를 이용하여 세포에 접근하였다. 세포에 접근하여 기록전극의 저항이 순간적으로 올라가는 것으로 세포에 근접하였음을 확인하였으며, 이후 천천히 음압을 가하여 세포와의 gigaohm seal을 이루었다. 다시 빠르고 짧은 음압을 가하여 whole cell을 만들었으며 막전압이 -45 mV 이하로 안정된 상태의 세포에서만 기록을 시작하였다. 전압과 전류측정은 Axopatch 200B 증폭기(Axon instruments, Union City, CA, USA)를 사용하였으며, 이 증폭기는 AD변환기(Digidata 1200B; Axon instruments)를 통해 컴퓨터와 연결하였다. pCLAMP software (version 10.0; Axon instruments)를 사용하여 데이터의 기록 및 분석을 시행하였으며 발생된 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실온(23 ± 1°C)에서 시행하였다.

### 4. 실험자료의 분석

막전압과 전류의 분석은 Clampfit (version 10.0; Axon instruments)를 사용하였다. 약물처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는지의 여부는 independent t-test를 이용하였고 약물처리 전후 비교는 paired t-test를 이용하였다. 결과 값은 평균 ± 표준오차(mean ± standard error of the mean)로 표시하였으며,  $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다(SPSS ver. 12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

### 1. 척수아교질 뉴런의 흥분성에 대한 X/XO의 효과

Superoxide 음이온(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 발생시키는 것으로 알려진 X/XO의 병용 투여가 척수후각의 아교질 신경세포의 흥분성에 어떠한 효과를 나타내는지 확인하였다. X/XO가 막전압에 미치는 효과를 확인하기 위하여 안정막전압 상태에서 X/XO (300 μM/30 mU)를 투여하였는데, 세포는 약물투여 후 30초 이후부터 서서히 탈분극(9.5 ± 1.0 mV, n = 9)이 발생되었으며, 정상용액으로 관류 시 막전압은 서서히 원래 값으로 회복되었다(Fig. 1A). X/XO가 전류에 미치는 효과를 알아보기 위하여 유지전압을 -70 mV로 고정하고 지속적으로 전류를 기록하였다. X/XO 투여에 의해 발생한 전류는 하향성의 시냅스 전류를 포함하고 있었으며, 막전압에서의 변화와 유사한 양상으로 서서히 발생하는 내향성 전류(-9.3 ± 0.7 pA, n = 29)를 관찰하였다(Fig. 1B).

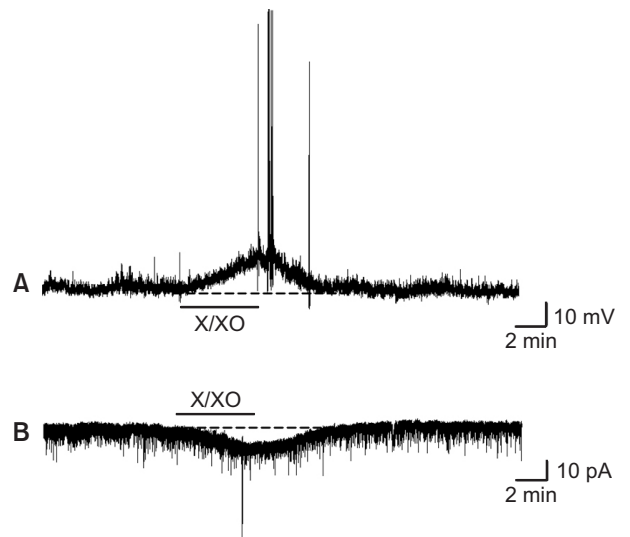
### 2. 척수아교질 세포에서 X/XO의 효과에 대한 신경교세포의 역할

이 연구에서는 먼저 X/XO 투여에 의한 내향성 전류의 발생에 신경교세포의 활성이 관여하는지를 알아보고자 미세아교세포의 억제제인 minocycline과 성상세포의 억제제인 fluorocitrate의 효과를 확인하였다. X/XO 투여에 의한 내향성 전류는 minocycline (100 μM) 전처리에 의해 유의하게 감소하였으며(-1.2 ± 2.4 pA, n = 4, p < 0.05) (Fig. 2A and 2C), fluorocitrate (100 μM)에 의해서도 유의하게 억제되었다(-2.6 ± 1.2 pA, n = 5, p < 0.05) (Fig. 2B and 2C). 이러한 결과는 아교질 세포의 흥분성에 대한 X/XO의 효과가 신경교세포와 관련된 신호전달 경로를 통하여 이루어짐을 추측할 수 있다.

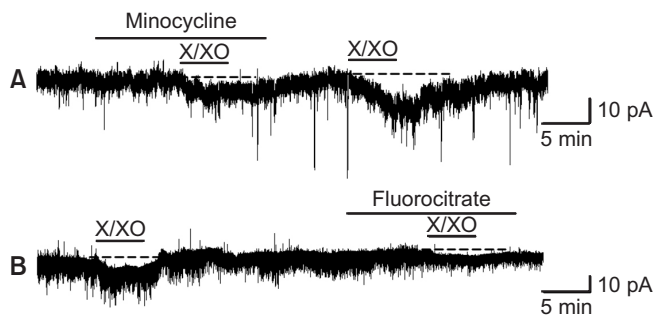
### 3. X/XO의 효과에 대한 TLR4의 역할

TLR4는 말초신경 손상 후 미세아교세포의 활성화에 의한 통증의 발생에 밀접히 관련되어 있다고 알려져 있다[16]. X/XO 투여에 의한 내향성 전류의 발생에 TLR4가 관여하는지를 알아보기 위하여 TLR4 억제제인 Tak-242의 효과를 확인하였다. X/XO 투여에 의해 발생한 내향성 전류는 Tak-242의 전처리 후 유의하게 감소하였다(-2.6 ± 0.9 pA, n = 7, p < 0.001) (Fig. 3A and 3B).

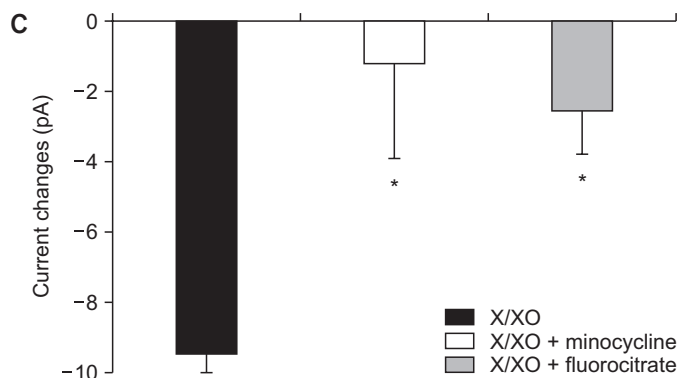
ROS가 신호전달에 영향을 미치는 대표적인 경로로 LPS에 의해 진행되는 경로를 들 수 있는데, LPS 유도 경로는 미세아교세포의 활성을 증가시키고 미세아교세포에서 세포외로 ROS를 방출하여 신경독성을 나

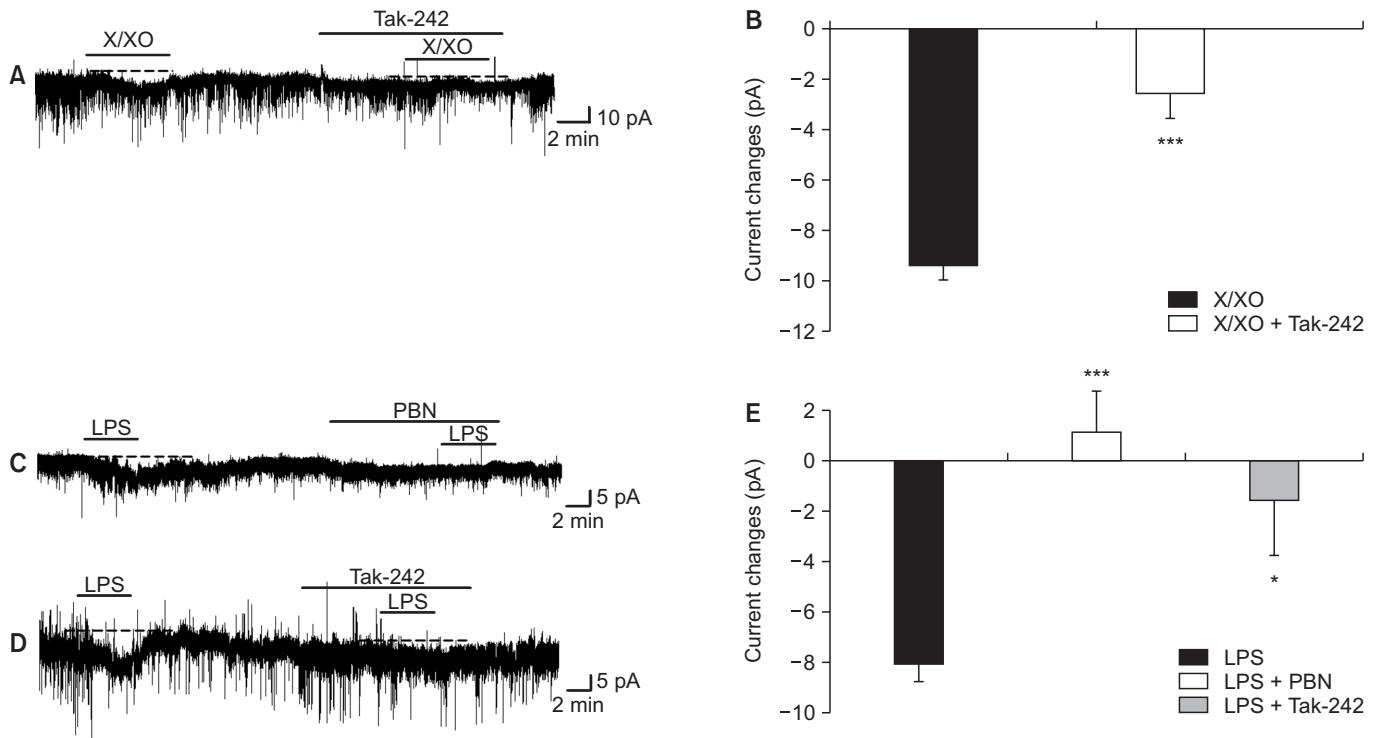


**Fig. 1.** Effect of xanthine/xanthine oxidase (X/XO) on neuronal excitation in substantia gelatinosa (SG) neurons of the spinal cord. (A) In a current clamp recording, X/XO (300 μM/30 mU) induced membrane depolarization. (B) In a voltage clamp recording, X/XO induced an inward current.



**Fig. 2.** Involvement of glial cells on membrane excitability of substantia gelatinosa (SG) neurons induced by xanthine/xanthine oxidase (X/XO). (A) Inward current induced by X/XO was decreased in the presence of minocycline. (B) Pretreatment with fluorocitrate significantly decreased the X/XO-induced inward current. (C) Summary bar graphs illustrating the effects of minocycline and fluorocitrate. Values are significantly different from the X/XO by independent t-test (\*p < 0.05). Values are presented as mean ± standard error of the mean.





**Fig. 3.** Involvement of microglial toll-like receptor 4 on membrane excitability of substantia gelatinosa (SG) neurons induced by xanthine/xanthine oxidase (X/XO). (A) Inward current induced by X/XO was inhibited by Tak-242 pretreatment. (B) Summary bar graphs illustrating the effect of Tak-242. (C) Lipopolysaccharide (LPS)-induced inward current was decreased after phenyl N-t-butyl nitron (PBN) pretreatment. (D) LPS-induced inward current was significantly inhibited by Tak-242. (E) Summary bar graphs illustrating the effects of PBN and Tak-242. Values are significantly different from the LPS or X/XO by independent t-test (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

타낸다[17]. X/XO 투여에 의한 ROS의 증가가 내향성 전류를 유발하는데 TLR4가 관여함을 확인하였으므로, 다음에는 LPS 처치에 의해서도 ROS가 발생되어 신경흥분성에 영향을 미치는지와 여기에 TLR4가 관여하는지를 확인하였다. LPS를 5분 동안 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여하였을 때 X/XO 투여와 유사한 내향성 전류가 발생하였으며( $-8.1 \pm 0.8 \text{ pA}$ ,  $n = 18$ ), 이는 비특이적 ROS scavenger인 PBN (1 mM)에 의해 유의하게 감소하였고( $0.8 \pm 1.2 \text{ pA}$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0.001$ ), Tak-242 (1  $\mu\text{M}$ ) 전처리에 의해서도 유의하게 감소하였다( $-1.6 \pm 2.1 \text{ pA}$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3C–3E). 이러한 결과는 미세아교세포 내의 ROS 증가가 TLR4의 활성을 통하여 이루어지며, 이어지는 경로를 통하여 인접한 아교질 세포의 흥분성을 변화시킬 수 있음을 의미한다.

## Discussion

ROS는 조직손상이나 유해반응에 의해 세포 내에서 증가하여 세포손상을 일으키는 물질로 작용하는 한편 유전자 발현, 세포 분화와 증식 등 여러 가지 세포기능을 조절하는 조절물질로서의 역할도 보고되어 있다 [3,18]. 최근에는 ROS가 통증발생과 유지에 중요하게 관여되어 있다고 보고되었는데, 예를 들면 척수의 ROS 양이 증가·감소함에 따라 비례적으로 통증행동 반응이 증가·감소되었고 [3,19,20], superoxide dismutase [20], tirilazad [21], PBN [4], vitamin E [22] 같은 다양

한 항산화제를 투여함으로써 진통효과가 나타나는 것이 보고되었다. 이러한 결과들은 척수에서 작용하는 ROS가 통증의 발생과 유지에 관여하고 있음을 나타낸다.

최근 ROS의 통증조절에 대한 역할을 규명하기 위하여 본 실험실에서는 여러 가지 ROS donor가 척수 아교질세포의 흥분성에 미치는 효과에 대한 연구를 진행하였다. NaOCl에 의해 아교질 세포의 막전압의 변화를 보고하였고 [23], NO donor인 sodium nitroprusside의 농도에 따른 막전압에 미치는 서로 다른 효과를 규명하였으며 [24],  $\cdot\text{OH}$ 를 발생시키는 tert-butylhydroperoxide가 척수 아교질세포의 흥분성 시냅스 후 전압을 증가시킴을 확인하였다 [22]. 최근에는 X/XO의 투여에 의해 발생한  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 가 시냅스 전과 후에 서로 다른 기전으로 작용하여 탈분극시킬 수 있음을 확인하였다 [5]. 그러나 Park과 Chun [5]의 연구에서는 아교질세포가 효소처리에 의해 단일세포로 분리된 상태에서는 X/XO에 의해 전혀 반응을 보이지 않아, X/XO는 먼저 척수 아교질세포의 주위 세포에 영향을 주고 이차적으로 척수 아교질세포에 영향을 미쳤으리라 추측할 수 있다.

ROS는 정상 세포에서 미토콘드리아의 세포호흡 과정이나 세포질 혹은 세포막 효소활성에 의해 지속적으로 생성된다 [25]. 특히 미세아교세포에서 생성된 ROS는 신경세포에 직접적인 산화스트레스를 가하여 신경세포의 기능이상과 세포죽음의 주요한 요인으로 여겨진다 [26–28]. ROS가 미세아교세포를 통하여 신호전달에 영향을 미치는 대표적인 경

로 LPS에 의해 진행되는 경로를 들 수 있는데, 이 경로는 LPS가 미세아교세포의 활성을 증가시키고, 그로 인하여 미세아교세포에서 세포외로 ROS를 방출하여 신경독성을 나타낸다[17].

미세아교세포의 활성은 인접하고 있는 신경세포와 성상세포의 활성에 영향을 주는데, 빠르게 세포외 환경을 변화시키고, 시냅스 신호전달이나 신경세포의 기능을 조절하기 위하여 화학물질을 분비한다[29]. 그러나 중추에서의 신호전달에 신경교세포의 기능들이 보고되고 있음에도 불구하고 통증전달과 관련된 척수 아교질세포의 신경활동성에 대한 미세아교세포의 역할에 대한 연구는 잘 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 이 연구에서는 X/XO에 의한 척수 아교질세포의 흥분성의 증가에 대한 주변 미세아교세포의 영향을 확인하고자 TLR4의 역할을 조사하였다.

X와 XO를 혼합 투여하면 XO는 X를 산화시켜 uric acid로 만드는 과정에서  $O_2^-$ 를 발생시키고 이것은 세포내 superoxide dismutase (SOD)에 의해  $H_2O_2$ 로 변환된다. 이 연구결과에서 X/XO에 의한 ROS는 아교질세포에서 내향성 전류와 탈분극을 유발하였다. Sato 등[30]은 X/XO 투여에 의해 약물투여 직후부터  $O_2^-$ 가 발생되기 시작하여 5분 정도 경과하면 SOD에 의해  $H_2O_2$ 로 전환된다고 하였으며, Zhou 등[31]도 X/XO 투여는 즉각적인 변화를 보이지만  $H_2O_2$ 에 의해서는 느리고 지속적인 변화를 보인다고 하였다. 이 연구에서도 X/XO는 투여 후 1분 이내부터 즉각적인 내향성 전류와 탈분극을 나타냈는데(Fig. 1), 이것은 이전에 보고한  $H_2O_2$ 에 의한 작고 느린 반응과는 차이가 있었다[32].

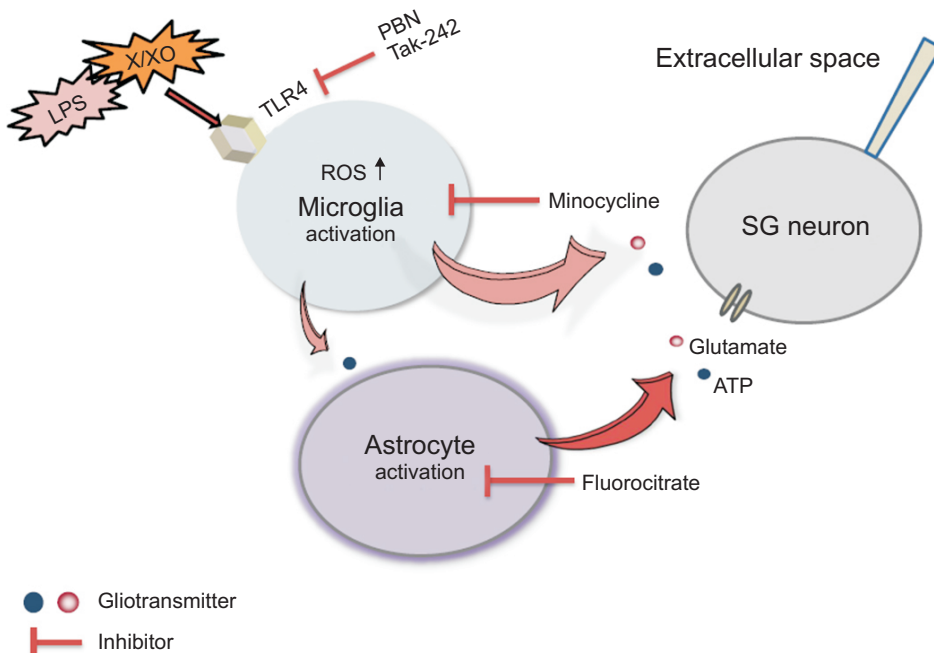
최근 연구에서 신경교세포의 억제제가 염증성 통증과 신경병증성 통증을 감소시키는 등[33], 신경세포에 이웃하고 있는 성상세포와 미세아교세포가 통증전달의 강력한 조절자로 작용함이 보고되고 있다[12]. 따라서 X/XO 투여에 의한 내향성 전류의 발생에 신경교세포의 활성이 관

여하는지를 알아보려고 minocycline과 fluorocitrate의 효과를 확인하였다. X/XO 투여에 의한 내향성 전류는 미세아교세포의 억제제인 minocycline과 성상세포의 억제제인 fluorocitrate의 전처리에 의해 억제되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 아교질 세포의 흥분성에 대한 X/XO의 효과가 신경교세포와 관련된 경로를 통하여 이루어짐을 추측할 수 있다.

신경교세포가 통증조절과 관련된다라는 연구는 많이 시행되고 있다. 신경교세포의 억제제가 염증성 통증과 신경병증성 통증을 감소시키고[33], minocycline의 전신투여로 포르말린에 의해 유발되는 염증성 통증이 억제된다고 하였으며[34], 말초신경 손상에 의한 신경병증성 통증의 발생에 미세아교세포의 활성이 증가함이 보고되었다[35]. 또한 Tanga 등[16]은 말초신경 손상 후 미세아교세포의 활성에 의한 통증의 발생에 TLR4가 밀접히 관련되어 있다고 하였다.

신경교세포가 ROS에 의해 영향을 받는 기전은 다양하게 보고되어 있는데, Little 등[36]은 신경교세포에 존재하는 glutamate transporter (GLT1)가 ROS에 의해 억제되며, 이것은 시냅스 공간에서 glutamate 농도를 증가시켜 흥분성 전달을 강화할 수 있다고 하였으며, Ficker 등[37]은 ROS가 신경교세포의 P2X 수용체를 활성화하여 통증전달에 영향을 미친다고 하였다. Kim 등[38]은 다양한 외부자극에 의해서 발생한 ROS가 TLR의 기능과 발현을 조절한다고 하였다. 특히 미세아교세포에서 LPS에 의해 매개된 TLR4의 활성은 신경염증 연구의 모델로 사용되고 있는데, 생쥐의 뇌에 LPS를 주입하여 광범위한 미세아교세포의 활성을 일으키고 ROS 발생을 증가시켰다[39].

이 연구에서는 X/XO 투여에 의해 발생한 ROS의 작용에 TLR4가 관여하는지를 알아보기 위하여 TLR4 억제제인 Tak-242의 효과를 확인하였는데, Tak-242의 전처리 후 X/XO에 의해 발생된 내향성 전류를 유의하게 감소시켰다(Fig. 3A and 3B). 또한 LPS 처치에 의해서도 ROS가 발생되어 신경흥분성에 영향을 미치는지와 여기에 TLR4가 관



**Fig. 4.** Schematic representation depicting possible mechanisms of xanthine/xanthine oxidase (X/XO)-generated reactive oxygen species (ROS) in substantia gelatinosa (SG) of the dorsal horn. LPS, lipopolysaccharide; TLR4, toll-like receptor 4; PBN, phenyl N-t-butyl nitron; ATP, adenosine triphosphate.

여하는지를 확인한 결과 LPS는 X/XO와 유사하게 내향성 전류를 발생시켰으며 이는 ROS scavenger인 PBN과 TLR4 억제제인 Tak-242 전처리에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 3C-3E). 이러한 결과는 미세아교세포 내의 ROS 증가가 TLR4의 활성을 통하여 이루어지며, 이어지는 경로를 통하여 인접한 아교질세포의 흥분성을 변화시킬 수 있음을 의미한다. 이러한 일련의 과정을 종합하여 Fig. 4에 나타내었다.

이상의 연구결과를 종합하면 X와 XO의 병용투여는 직접적으로 척수 아교질세포에 ROS를 증가시키기보다는 인접한 미세아교세포의 TLR4에 작용하여 세포내 ROS를 증가시키며, 이어지는 작용을 통하여 아교질세포에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 차후의 연구에서는 척수 아교질세포 주위의 신경교세포에서 어떠한 조절물질이 분비되어 작용을

나타내는지 확인하고자 한다.

## Acknowledgements

이 논문은 2019년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

1. Yoshimura M, Jessell TM. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1989;62:109-18. doi: 10.1152/jn.1989.62.1.109.
2. Kallenborn-Gerhardt W, Schröder K, Geisslinger G, Schmidtko A. NOXious signaling in pain processing. *Pharmacol Ther* 2013;137:309-17. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.001.
3. 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;138:514-24. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.029.
4. Kim HY, Lee I, Chun SW, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015;2015:293423. doi: 10.1155/2015/293423.
5. Park A, Chun SW. Pre- and postsynaptic actions of reactive oxygen species and nitrogen species in spinal substantia gelatinosa neurons. *Int J Oral Biol* 2018;43:209-16. doi: 10.11620/IJOB.2018.43.4.209.
6. Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 2010;7:482-93. doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.016.
7. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 2013;154 Suppl 1:S10-28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022.
8. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 2004;1:14. doi: 10.1186/1742-2094-1-14.
9. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:752-8. doi: 10.1038/nn1472.
10. Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* 2009;57:1469-79. doi: 10.1002/glia.20871.
11. McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron* 2009;64:46-54. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.033.
12. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:23-36. doi: 10.1038/nrn2533.
13. Gwak YS, Hulsebosch CE. Remote astrocytic and microglial activation modulates neuronal hyperexcitability and below-level neuropathic pain after spinal injury in rat. *Neuroscience* 2009;161:895-903. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.055.
14. Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 2007;55:233-8. doi: 10.1002/glia.20459.
15. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007;10:1387-94. doi: 10.1038/nn1997.
16. Tanga FY, Nutille-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5856-61. doi: 10.1073/pnas.0501634102.
17. Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem* 2004;279:1415-21. doi: 10.1074/jbc.M307657200.
18. 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. doi: 10.14670/HH-21.69.
19. 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. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.041.
20. 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;29:159–68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3792-08.2009.
  21. 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;79:31–7. doi: 10.1016/s0304-3959(98)00143-2.
  22. 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. doi: 10.1016/j.pain.2006.01.013.
  23. Lee HI, Park AR, Chun SW. Effects of NaOCl on neuronal excitability and intracellular calcium concentration in rat spinal substantia gelatinosa neurons. *Int J Oral Biol* 2013;38:5–12. doi: 10.11620/IJOB.2013.38.1.005.
  24. Park AR, Lee HI, Semjid D, Kim DK, Chun SW. Dual effect of exogenous nitric oxide on neuronal excitability in rat substantia gelatinosa neurons. *Neural Plast* 2014;2014:628531. doi: 10.1155/2014/628531.
  25. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1140–9. doi: 10.1089/ars.2005.7.1140.
  26. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:57–69. doi: 10.1038/nrn2038.
  27. Gao HM, Zhou H, Hong JS. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:295–303. doi: 10.1016/j.tips.2012.03.008.
  28. Rojo AI, McBean G, Cindric M, Egea J, López MG, Rada P, Zarkovic N, Cuadrado A. Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:1766–801. doi: 10.1089/ars.2013.5745.
  29. Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:E197–205. doi: 10.1073/pnas.1111098109.
  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;150:173–81. doi: 10.1093/jb/mvr051.
  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:H1096–107. doi: 10.1152/ajpheart.01037.2008.
  32. Son Y, Chun SW. Effects of hydrogen peroxide on neuronal excitability and synaptic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Int J Oral Biol* 2007;32:153–60.
  33. Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* 2007;11:223–30. doi: 10.1016/j.ejpain.2006.02.003.
  34. Cho IH, Chung YM, Park CK, Park SH, Lee H, Kim D, Piao ZG, Choi SY, Lee SJ, Park K, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. Systemic administration of minocycline inhibits formalin-induced inflammatory pain in rat. *Brain Res* 2006;1072:208–14. doi: 10.1016/j.brainres.2005.12.039.
  35. Moss A, Beggs S, Vega-Avelaira D, Costigan M, Hathway GJ, Salter MW, Fitzgerald M. Spinal microglia and neuropathic pain in young rats. *Pain* 2007;128:215–24. doi: 10.1016/j.pain.2006.09.018.
  36. Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids* 2012;42:75–94. doi: 10.1007/s00726-010-0633-0.
  37. Ficker C, Rozmer K, Kató E, Andó RD, Schumann L, Krügel U, Franke H, Sperlág B, Riedel T, Illes P. Astrocyte-neuron interaction in the substantia gelatinosa of the spinal cord dorsal horn via P2X7 receptor-mediated release of glutamate and reactive oxygen species. *Glia* 2014;62:1671–86. doi: 10.1002/glia.22707.
  38. Kim D, Kim YJ, Koh HS, Jang TY, Park HE, Kim JY. Reactive oxygen species enhance TLR10 expression in the human monocytic cell line THP-1. *Int J Mol Sci* 2010;11:3769–82. doi: 10.3390/ijms11103769.
  39. Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;81:1285–97. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00928.x.