

## 흰쥐 삼차신경감각핵에서 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1의 공존에 관한 연구

문용석<sup>1</sup>, 류창현, 조이슬, 김홍태<sup>1</sup>, 박매자<sup>2</sup>,  
백상규, 문제일, 김윤숙\*, 배용철  
경북대학교 치과대학 구강해부학교실, <sup>1</sup>대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실  
<sup>2</sup>경북대학교 의과대학 해부학교실

### Coexpression of P2X<sub>3</sub> with TRPV1 in the Rat Trigeminal Sensory Nuclei

Yong Suk Moon<sup>1</sup>, Chang Hyun Ryoo, Yi Sul Cho, Hong Tae Kim<sup>1</sup>, Mae-Ja Park<sup>2</sup>,  
Sang Kyoo Paik, Cheil Moon, Yun Sook Kim\* and Yong Chul Bae

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea

<sup>1</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

<sup>2</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea

(Received June 15, 2008; Accepted September 18, 2008)

#### ABSTRACT

Trigeminal primary afferents expressing P2X<sub>3</sub> or transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) are involved in the transmission of nociceptive information. In order to characterize P2X<sub>3</sub>- and TRPV1-immunopositive neurons in the trigeminal ganglion (TG) and trigeminal caudal nucleus (Vc), we performed immunofluorescence experiments using anti-P2X<sub>3</sub> and anti-TRPV1 antisera and a morphometric analysis.

77.4% (1,401/1,801) of all the P2X<sub>3</sub>-positive neurons coexpressed TRPV1 and 51.9% (1,401/2,698) of all the TRPV1-immunopositive neurons also costained for P2X<sub>3</sub> in the TG. Immunoreactivity for both P2X<sub>3</sub> and TRPV1 were present in medium-sized neurons but not in small- and large-sized neurons. P2X<sub>3</sub>- and/or TRPV1-immunopositive fibers were observed in the primary afferents and their associated axons in the Vc. These fibers and terminals were distributed in the superficial lamina of Vc: P2X<sub>3</sub>-immunopositive fibers and terminals were distributed in the lamina I and II, especially in the inner part of lamina II (lamina Ili), whereas TRPV1-immunopositive ones were densely detected in the lamina I and outer part of lamina II (lamina Ilo). Immunopositive fibers and terminals for both P2X<sub>3</sub> and TRPV1 were observed on the border between lamina Ili and Ilo.

These results suggest that terminals coexpressing P2X<sub>3</sub> and TRPV1 are involved in specific roles in the transmission and processing of orofacial nociceptive information.

**Keywords** : P2X<sub>3</sub>, TRPV1, Trigeminal ganglion, Trigeminal caudalis, Immunofluorescence

This work supported by a grant from the Kyungpook National University Research Fund (YS KIM, 2007).

\* Correspondence should be addressed to Yun Sook Kim, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea. Ph.: (053) 660-6863. Fax: (053) 426-7731. E-mail: yunskim@knu.ac.kr

## 서 론

구강안면영역의 통각을 포함하는 감각정보는 일차들신경 섬유를 통하여 삼차신경감각핵군(trigeminal sensory nuclei: TSN)으로 투사하며, 이들 일차들신경섬유의 세포체는 삼차신경절에 위치한다. 삼차신경감각핵군은 기능적, 세포구조학적 특성에 의해 삼차신경주감각핵(principalis: Vp), 입쪽핵(orialis: Vo), 중간핵(interpolaris: Vi)과 꼬리핵(caudalis: Vc) 등 4개의 아핵으로 분류되는데(Olszewski, 1950) 그 중 삼차신경꼬리핵은 대부분의 구강안면영역에서 발생하는 통각 정보가 처리되는 핵으로 알려져 있다.

Purinergic receptor인 P2X 수용기는 세포의 adenosine-5'-triphosphate (ATP)에 의해 활성화되며 비선택적으로 이온을 투과시키는 수용기로서 현재까지 모두 7개의 아형들이 존재하는 것으로 알려져 있다(Collo et al., 1996; Le et al., 1998; Loesch & Burnstock, 1998; Kanjhan et al., 1999). 이 수용기들 중에서 P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> 및 P2X<sub>2/3</sub>의 활성을 촉진시키는 특이적인 작용제(agonist)인  $\alpha, \beta$ -meATP를 수막내투여(intrathecal application)할 경우 온도과민성 반응을 보이며, 반면 길항제(antagonist)인 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP)를 투여하게 되면 P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> 및 P2X<sub>2/3</sub>의 활성화에 의해 야기되는 기능이 억제된다(Driessen et al., 1994; Tsuda et al., 1999a, b). 특히 적색 조류에서 추출한 carrageenan을 처리하여 염증반응을 유도한 실험용 흰쥐에 작용제인  $\alpha, \beta$ -meATP를 처리하면 통증반응이 증가하며(Hamilton et al., 1999, 2000), P2X<sub>3</sub> 유전자가 인위적으로 결손된 흰쥐에서는 포르말린(formalin)에 의한 염증성 통증반응이 감소된다(Cockayne et al., 2000; Souslova et al., 2000). 또한 P2X<sub>3</sub> 수용기는 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion, DRG)의 신경세포체 중에서 작거나 중간 정도의 크기를 가진 세포에서 주로 발현되며(Vulchanova et al., 1997, 1998; Bradbury et al., 1998; Novakovic et al., 1999), 이러한 특징은 삼차신경절(trigeminal ganglion, TG)에서도 보고되고 있다(Eriksson et al., 1998; Xiang et al., 1998; Jiang & Gu, 2002; Ambalavanar et al., 2005; Kim et al., 2008). P2X<sub>3</sub> 수용기는 말이집이 두겹게 형성된 축삭에서 발현되며(Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998; Vulchanova et al., 1998; Xiang et al., 1998), 이들 P2X<sub>3</sub> 수용기를 발현하는 들신경섬유들이 삼차신경꼬리핵과 척수(spinal cord)의 제2층의 안쪽 영역으로 투사된다고 보고되고 있다(Vulchanova et al., 1997; Bradbury et al., 1998; Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998; Vulchanova et al., 1998). 이러한 연구 결과들을 종합해 보면 P2X<sub>3</sub> 수용기는 조직의 손상, 내부장기의 확장 그리고 염증 시 분비되는 ATP와 결합하며, 통증의 전도에 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 의미한다.

Vanilloid receptor (VR1)로 알려진 TRPV1은 capsaicin, 유해 열 자극(>43°C), 그리고 염증반응 매개물질에 의해서 활성화되며 통증을 유발하는 일련의 과정과 밀접한 연관이 있다(Tominaga et al., 1998; Szallasi & Blumberg, 1999; Caterina & Julius, 2001). P2X<sub>3</sub>가 발현되는 현상과 유사하게 TRPV1도 뒤뿌리신경절(Guo et al., 1999; Valtschanoff et al., 2001)과 삼차신경절(Ichikawa & Sugimoto, 2001)의 크기가 작거나 중간 정도의 세포체에서 주로 발현된다. 또한 TRPV1을 함유하는 뒤뿌리신경절의 신경세포체들은 대부분 민말이집 신경섬유(unmyelinated fiber)들이며, TRPV1을 발현하는 일차들신경섬유는 주로 척수후각 및 삼차신경 꼬리핵의 제1층 및 제2층 바깥쪽에 투사됨으로써 통각의 전도에 중요한 역할을 한다(Michael & Priestley, 1999; Valtschanoff et al., 2001; Hwang & Valtschanoff, 2003; Kim et al., 2008).

이러한 통각수용기들이 일차들신경섬유에서 동시에 발현하는 현상에 대해서 밝힌다면 구강안면영역의 통각전도 기전을 연구하는데 크게 기여할 것으로 판단되나 아직까지 이에 대해 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1이 구강안면영역을 지배하는 일차들신경섬유에서 동시에 발현하는지, 동시에 발현한다면 어떠한 특성을 가지는 세포에서 발현하는지, 그리고 이들은 삼차신경꼬리핵의 어느 부분으로 투사하는지에 대해 분석을 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에서는 모두 3마리의 흰쥐(Sprague-Dawley rats, 300~320 g)를 사용하여 결과를 도출하였다. 실험동물의 보호 및 처치는 경북대학교 동물실험윤리위원회에서 승인을 받아서 진행하였다.

실험동물을 sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal)로 깊게 마취하였으며, 500 unit의 heparin sodium을 포함한 생리식염수 100 mL를 좌심실과 연결된 대동맥을 통해 관류하여 혈관내 혈액을 제거한 다음, 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer; PB, pH 7.4) 500 mL을 약 30분 동안 관류하여 고정하였다. 그 후 삼차신경절 및 뇌줄기를 적출하여 동일고정액에 섭씨 4°C에서 약 2시간 동안 고정하였으며, PB (pH 7.4)에 세척 후 30% sucrose용액 (in 0.1 M PB, pH 7.4)으로 24시간 보관하여, 동결시 얼음결정이 조직 내에서 생성되는 것을 방지하였다.

동결절편기를 이용하여 30  $\mu$ m 두께로 절편을 제작한 후 형광면역조직화학법을 시행하였다. 모든 반응은 실온에서 그리고 교반기 위에서 시행하였다. 항체의 침투를 용이하게 하기 위하여 50% ethanol에서 30분간 절편을 침적하였으며, 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 5분간 3회 세척한 다음, 10% normal donkey serum (NDS, Jackson

Immunoresearch, West Grove, PA)로 30분간 반응하여 비특이적 반응을 최소화하도록 하였다. 그 후 일차항체 (0.01 M PBS, pH 7.4)에서 24시간 동안 반응하였다. 본 실험에서는 일차항체로서 anti-TRPV1 antiserum (raised in goat; 1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)과 anti-P2X<sub>3</sub> antiserum (raised in guinea pig; 1 : 3,000; Chemicon, Temecula, CA)를 함께 사용하였다. PBS로 10분간 3회 세정한 다음, 2% NDS로 30분간 반응하였으며, 2차항체 (fluorescein isothiocyanate-conjugated or Cy3-conjugated antibodies raised in donkey; 1 : 200; Jackson Immunoresearch)로 3시간 반응하였다. PBS로 10분간 3회 세정하고, 증류수로 10분간 2회 세정한 다음 형광용 슬라이드 위에 조직을 올린 후 형광 현미경 (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 및 공초점 현미경 (LSM 510 META; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 관찰 및 분석하였다. 공초점 현미경으로 찍은 영상들은 TIFF형식으로 저장한 후, 밝기와 명암을 조정하였다. 세포의 크기 분석을 위해서는 형광 현미경에 장착한 *Exi-digital camera* (Q-imaging Inc., Surrey, CA)로 얻은 사진들을 TIFF 파일로 저장하였으며, 핵인이 선명하게 보이는 핵을 포함한 신경세포체의 단면적을 NIH image software (v 1.60, NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 측정하였으며, KaleidaGraph software (v3.5, Synergy Software, Reading, PA)를 사용하여 그래프를 작성하였다.

본 실험에서 사용한 일차항체의 특이성을 검증하기 위해 대조실험을 하였다. 일차항체 혹은 이차항체를 제외하거나, 차단 펩타이드로 preadsorption을 한 다음 위에서 시행한 방법과 동일한 방법으로 면역조직화학기법을 시행한 결과 특이성을 보이는 면역염색이 되지 않았다. P2X<sub>3</sub>에 대한 항체는 흰쥐 P2X<sub>3</sub>의 아미노산 383~397의 펩타이드에 대해 생성하였다. 면역염색의 특이성은 농도 2 µg/mL의 차단 펩타이드 (Neuromics P10108, lot P400124, Edina, MN)로 preadsorption한 경우 소실되었다. TRPV1에 대한 항체는 흰쥐 TRPV1의 아미노산 말단에 인접한 펩타이드 순서에 대해 생성한 affinity purified polyclonal 항체이다. 면역염색의 특이성은 46 µg/mL 차단 펩타이드 (SC-12498P, P-19; lot L061, Santa Cruz Biotechnology)로 preadsorption한 경우 소실되었다.

## 결 과

삼차신경절에 존재하는 다수의 신경세포체에서 P2X<sub>3</sub> 혹은 TRPV1에 대한 면역양성반응을 관찰하였다. 3마리의 흰쥐에서 형성한 35장의 절편에서 P2X<sub>3</sub> 및 TRPV1의 면역양성 반응은 작거나 중간크기의 신경세포에서 주로 관찰되었으며 간혹 큰 신경세포에서도 P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경세포가

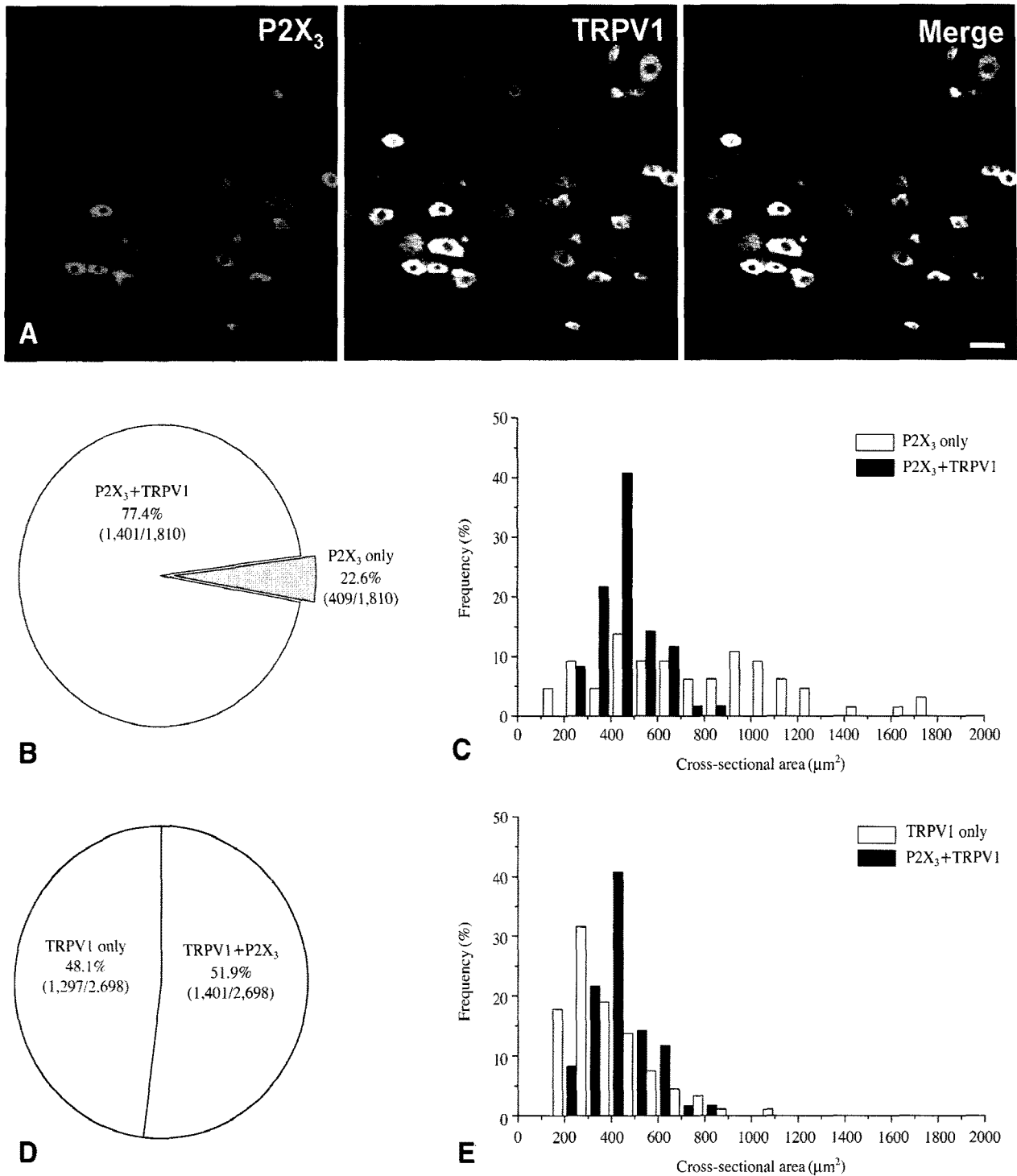
관찰되었다 (Fig. 1A). P2X<sub>3</sub> 면역양성반응을 보이는 신경세포에서 TRPV1의 발현정도를 분석한 결과 전체 1,810개의 P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경세포중에서 77.4% 신경세포에서 (1,401/1,810) TRPV1이 동시에 발현하였으며, 나머지 22.6% 신경세포 (409/1,810)에서는 P2X<sub>3</sub>만 면역양성반응을 보였다. 또한 TRPV1 면역양성 신경세포에서 P2X<sub>3</sub>의 공존을 분석한 결과, 전체 2,698개의 TRPV1 면역양성 신경세포중에서 51.9% 신경세포에서 (1,401/2,698) P2X<sub>3</sub>와 공존을 보였으며, 나머지 48.1% (1,297/2,698)의 신경세포에서는 TRPV1에만 면역양성반응을 보였다 (Fig. 1B, C).

P2X<sub>3</sub> 그리고 TRPV1 면역양성반응을 보이는 신경세포체에서 면역양성 신경섬유가 나와서 중추방향 및 말초방향으로 향하는 모습이 관찰되었다. P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경세포체에서 단면적 분포는 132.9~1758.8 µm<sup>2</sup>이며 TRPV1 면역양성 신경세포체의 단면적의 분포는 112.6~1,095.9 µm<sup>2</sup>이다. TRPV1 면역양성반응을 보이는 신경세포는 작거나 중간크기의 신경세포에서 주로 관찰되었으며 큰 신경세포에서는 거의 관찰되지 않았다. P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경세포에 비해 좁은 단면적 분포를 보였다. 또한 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1의 면역양성반응을 동시에 보이는 신경세포는 중간크기의 신경세포에서 주로 관찰되었으며, 아주 작거나 큰 신경세포에서는 공존이 관찰되지 않았다 (Fig. 1C, D).

삼차신경교리핵에서 P2X<sub>3</sub> 또는 TRPV1 면역양성반응은 신경섬유 및 신경종말들에서 선 혹은 puncta형태로 관찰되었다. P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경섬유 및 신경종말들은 제1층과 제2층에 분포되었으며, 특히 제2층의 안쪽에서 대부분 발현되었다. TRPV1 면역양성 신경섬유 및 신경종말들은 제1층과 제2층의 바깥쪽에서 주로 관찰되었으며 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1을 동시에 발현하는 신경섬유 및 신경종말들은 제2층의 안쪽과 바깥쪽의 경계부분에 존재하였다 (Fig. 2).

## 고 찰

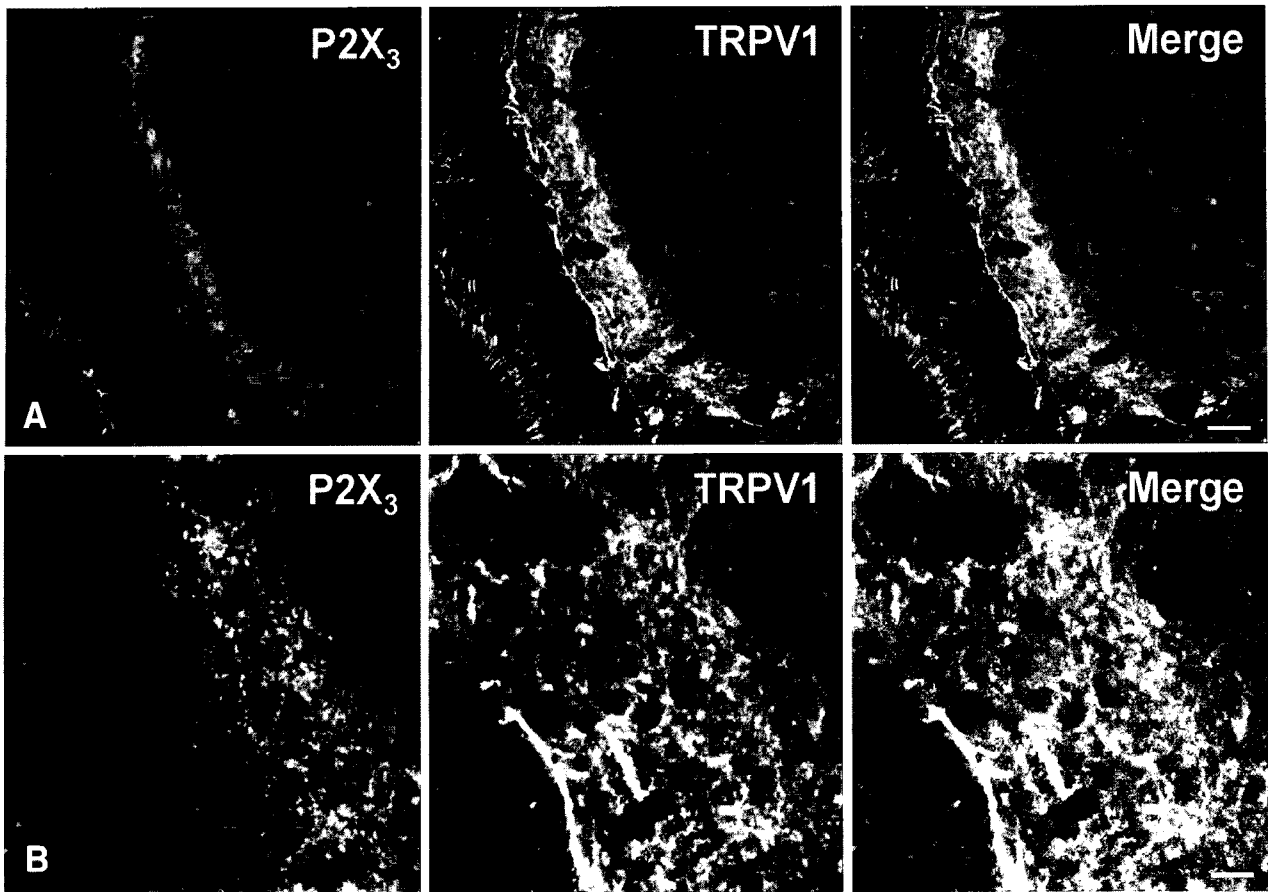
Adenosine-5'-triphosphate (ATP)는 조직손상 혹은 염증시, 그리고 내장장기의 확장시 분비되며 P2X<sub>3</sub> 수용기와 결합함으로써 동통을 야기한다. 또한, ATP는 병적인 상태에서 교감신경말단에서 분비되거나 (Burnstock, 2000), 혈관내피세포에서 분비되어 확산에 의해 혈관 바깥막에 도달하며 (Burnstock, 1990, 1996), 중양세포에서 직접적으로 분비되어 (Machara et al., 1987; Siems et al., 1993) P2X<sub>3</sub>를 포함한 유해수용기와 결합하여 동통을 야기한다. P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2/3</sub> 수용기의 작용제 (agonist)인 αβ-meATP를 투여시 농도 의존적으로 열 자극에 의한 통각과민을 야기하며, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2/3</sub> 수용기의 길항제 (agonist)인 TNP-ATP, 혹은 광범위한 P2X 수용기 길항제 (nonselective P2X receptor antago-



**Fig. 1.** Double immunofluorescence staining for P2X<sub>3</sub> (red) and TRPV1 (green) in the trigeminal ganglion (TG). A: The majority of P2X<sub>3</sub>-immunopositive (P2X<sub>3</sub>+ ) neurons costained for TRPV1. Scale bar=50 μm. B, D: Quantitative analysis on colocalization of P2X<sub>3</sub> with TRPV1. Among a total of 1,810 P2X<sub>3</sub>+ TG neurons tallied in 35 sections, 22.6% (409/1,810) stained for P2X<sub>3</sub> alone and 77.4% (1,401/1,810) costained for TRPV1. Among 2,698 TRPV1-immunopositive (TRPV1+) TG neurons, 48.1% (1,297/2,698) stained for TRPV1 only and 51.9% (1,401/2,698) costained for P2X<sub>3</sub>. C, D: Size frequency distribution on cross-sectional area (μm<sup>2</sup>) of TG neurons for P2X<sub>3</sub>+ only (n=409), TRPV1+ only (n=1297), and TRPV1+/P2X<sub>3</sub>+ (n=1401).

nist)인 pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonate (PPADS)를 투여하면 이러한 효과가 저해된다고 보고되고 있다(Hamilton et al., 1999, 2000). 또한 P2X<sub>3</sub> 유전자가 결손

된 동물에서는 포르말린에 대한 유해반응이 감소된다 (Cockayne et al., 2000; Souslova et al., 2000). 이러한 연구 결과들은 P2X<sub>3</sub> 수용기가 열에 의한 통각과민 혹은 염증성



**Fig. 2.** Confocal microscopy of double immunofluorescence staining for P2X<sub>3</sub> (red) and TRPV1 (green) in the superficial lamina of Vc reveals numerous P2X<sub>3</sub>+TRPV1+ fibers and puncta (yellow). Scale bars=40 μm in A and 10 μm in B.

통각과민에 관여하는 것으로 생각되어지고 있다. 그러나, P2X<sub>3</sub> 수용기는 정상적인 상태에서 급성동통의 전달에는 관여하지 않는다. 예를 들면, P2X<sub>3</sub>가 정상적으로 발현되는 동물과 P2X<sub>3</sub> 유전자가 결손된 동물에서 온도자극에 대한 행위반응은 관찰되지 않았으며 (Cockayne et al., 2000; Souslova et al., 2000), PPADS 투여 후 유해 통증에 의한 행위 변화가 없다 (Driessen et al., 1994; Li et al., 1998).

TRPV1 수용기는 고추에서 매운맛을 내는 주성분인 capsaicin, 43°C 이상의 유해열자극, 그리고 염증시 분비되는 여러 염증매개체와 결합함으로써 동통을 유발한다 (Tominaga et al., 1998; Caterina & Julius, 2001).

본 연구에서는 다수의 P2X<sub>3</sub> 발현 신경세포에서 TRPV1 면역양성을 보였으며, 또한 TRPV1 발현 신경세포에서 P2X<sub>3</sub> 면역양성을 관찰하였다. 이는 P2X<sub>3</sub> 수용기가 전달하는 유해자극과 TRPV1 수용기가 전달하는 유해자극이 동일한 신경섬유를 통해 전달될 것이라는 것을 의미하며 P2X<sub>3</sub>를 발현하는 신경섬유는 유해열 자극에 의한 동통의 전달에도 관여할 것이라는 것을 시사한다. 염증성 동통은 타는 듯한 작열통을 수반한다는 사실이 이러한 추측을 뒷받침하며, 또한 ATP를 피하주사하면 작열통을 동반한 지속성 동통을

야기한다는 연구결과는 이러한 추측을 뒷받침 한다 (Coutts et al., 1981). P2X<sub>3</sub> 수용기 및 TRPV1 수용기를 자극하면 신경말단에서 glutamate가 방출되는데 (Gu & MacDermott, 1997; Khakh & henderson, 1998; Sikand & Premkumar, 2007), 이러한 수용기들이 공존하는 신경말단이 활성화되면 glutamate의 방출량이 증가되며 이는 동통을 더욱 증폭하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 P2X<sub>3</sub> 면역양성반응을 보이는 신경세포체는 다수가 작거나 중간크기였으며, 간혹 큰 신경세포체에서도 면역양성을 보였는데, 이는 이전의 삼차신경절 (Eriksson et al., 1998; Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998; Xiang et al., 1998; Jiang & Gu, 2002; Hwang et al., 2004; Ambalavanar et al., 2005) 및 뒤뿌리신경절 (Vulchanova et al., 1997; Bradbury et al., 1998; Vulchanova et al., 1998; Novakovic et al., 1999; Aoki et al., 2003)에서의 연구 결과와 일치하였다. 그러나 TRPV1 면역양성 신경세포는 대다수가 작거나 중간크기의 신경세포에서 관찰되었으며, 큰 신경세포에서는 TRPV1이 거의 발현되지 않았는데, 이 또한 이전의 삼차신경절 (Helliwell et al., 1998; Ichikawa & Sugimoto, 2001) 및 뒤뿌리신경절 (Helliwell et al., 1998; Guo et al., 1999; Michael &

Priestley, 1999)에서의 연구 결과와 일치하였다. P2X<sub>3</sub> 면역 양성 신경세포 중에서 작거나 중간크기의 신경세포에서 TRPV1이 공존하는 것을 관찰하였으며 큰 신경세포에서는 TRPV1이 발현되지 않았다. 이러한 결과는 P2X<sub>3</sub> 면역 양성 신경세포는 크기에 따라 서로 다른 기능적 특성을 보인다고 추측한다.

삼차신경꼬리핵에서 P2X<sub>3</sub> 수용기 및 TRPV1 수용기의 면역 양성 신경섬유와 종말들은 모두 제1층과 제2층, 즉 얇은 층(superficial lamina)에서 많이 발현되었으며 이들의 신경섬유 및 신경종말들의 밀도는 부위별로 차이가 있었다. 즉, P2X<sub>3</sub> 면역 양성 신경섬유 및 종말들은 제2층의 안쪽부위에서 그리고 TRPV1 면역 양성 신경섬유 및 종말들은 제1층 및 제2층의 바깥부위에서 많이 관찰되었다. P2X<sub>3</sub>와 TRPV1 면역 반응이 공존하는 신경섬유 및 종말들은 제2층의 안쪽과 바깥쪽의 경계부에서 관찰되었다. 삼차신경꼬리핵의 얇은 층은 P2X<sub>3</sub>에만 면역 양성인 종말들, TRPV1에만 면역 양성인 종말들 그리고 P2X<sub>3</sub>/TRPV1 수용기가 공존하는 신경종말들이 투사되는 부위가 서로 다른 특성을 보이며, 이는 얇은 층에서 통각정보의 특성에 따라 처리되어지는 부위가 서로 다르다는 것을 의미한다.

## 참 고 문 헌

- Ambalavanar R, Moritani M, Dessem D: Trigeminal P2X<sub>3</sub> receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation. *Pain* 117 : 280-291, 2005.
- Aoki Y, Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Ozawa T, Douya H, Chiba T, Moriya H: P2X<sub>3</sub>-immunoreactive primary sensory neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats. *Brain Res* 989 : 214-220, 2003.
- Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB: The expression of P2X<sub>3</sub> purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 12 : 256-268, 1998.
- Burnstock G: Local mechanisms of blood flow control by peripheral nerves and endothelium. *J Hypertens Suppl* 8 : S95-106, 1990.
- Burnstock G: A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* 347 : 1604-1605, 1996.
- Burnstock G: P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth* 84 : 476-488, 2000.
- Caterina MJ, Julius D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24 : 487-517, 2001.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP: Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X<sub>3</sub>-deficient mice. *Nature* 407 : 1011-1015, 2000.
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G: Cloning OF P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16 : 2495-2507, 1996.
- Coutts AA, Jorizzo JL, Eady RA, Greaves MW, Burnstock G: Adenosine triphosphate-evoked vascular changes in human skin: mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 76 : 391-401, 1981.
- Diressen B, Reimann W, Selve N, Friderichs E, Bültmann R: Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoreceptor antagonists in rats. *Brain Res* 666 : 182-188, 1994.
- Eriksson J, Bongenhielm U, Kidd E, Matthews B, Fried K: Distribution of P2X<sub>3</sub> receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. *Neurosci Lett* 254 : 37-40, 1998.
- Gu JG, MacDermott AB: Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389 : 749-753, 1997.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R: Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X<sub>3</sub> purinoreceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11 : 946-958, 1999.
- Hamilton SG, Wade A, McMahon SB: The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol* 126 : 326-332, 1999.
- Hamilton SG, Warburton J, Bhattacharjee A, Ward J, McMahon SB: ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia. *Brain* 123(Pt 6) : 1238-1246, 2000.
- Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, McIntyre P: Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* 250 : 177-180, 1998.
- Hwang IK, Lee HY, Yoo KY, Seong NS, Chung HG, Kim JH, Lee HJ, Lee WH, Kang TC, Won MH: Chronological alterations of P2X<sub>3</sub> receptor expression in the trigeminal ganglion after ischemic insult in the Mongolian gerbil. *Anat Histol Embryol* 33 : 220-224, 2004.
- Hwang SJ, Valtchanoff JG: Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett* 349 : 41-44, 2003.
- Ichikawa H, Sugimoto T: VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res* 890 : 184-188, 2001.
- Jiang J, Gu J: Expression of adenosine triphosphate P2X<sub>3</sub> receptors in rat molar pulp and trigeminal ganglia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94 : 622-626, 2002.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF: Distribution of the P2X<sub>2</sub> receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407 : 11-32, 1999.
- Khakh BS, Henderson G: ATP receptor-mediated enhancement of

- fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol* 54 : 372-378, 1998.
- Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M, Yoshida A, Ahn DK, Valtschanoff J, Hwang SJ, Moon C, Bae YC: Expression of P2X<sub>3</sub> receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 506 : 627-39, 2008
- Le KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P: Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83 : 177-190, 1998.
- Li P, Calejesan AA, Zhuo M: ATP P2X receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats. *J Neurophysiol* 80 : 3356-3360, 1998.
- Llewellyn-Smith IJ, Burnstock G: Ultrastructural localization of P2X<sub>3</sub> receptors in rat sensory neurons. *Neuroreport* 9 : 2545-2550, 1998.
- Loesch A, Burnstock G: Electron-immunocytochemical localization of P2X<sub>1</sub> receptors in the rat cerebellum. *Cell Tissue Res* 294 : 253-260, 1998.
- Maehara Y, Kusumoto H, Anai H, Kusumoto T, Sugimachi K: Human tumor tissues have higher ATP contents than normal tissues. *Clin Chim Acta* 169 : 341-343, 1987.
- Michael GJ, Priestley JV: Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 19 : 1844-1854, 1999.
- Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JA, Eglen RM, Ford AP, Hunter JC: Immunocytochemical localization of P2X<sub>3</sub> purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain* 80 : 273-282, 1999.
- Olszewski J: On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 92 : 401-413, 1950.
- Siems WG, Grune T, Schmidt H, Tikhonov YV, Pimenov AM: Purine nucleotide levels in host tissues of Ehrlich ascites tumor-bearing mice in different growth phases of the tumor. *Cancer Res* 53 : 5143-5147, 1993.
- Sikand P, Premkumar LS: Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* 581(Pt 2) : 631-647, 2007.
- Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN: Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X<sub>3</sub> receptors. *Nature* 407 : 1015-1017, 2000.
- Szallasi A, Blumberg PM: Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51 : 159-212, 1999.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21 : 531-543, 1998.
- Tsuda M, Ueno S, Inoue K: In vivo pathway of thermal hyperalgesia by intrathecal administration of alpha,beta-methylene ATP in mouse spinal cord: involvement of the glutamate-NMDA receptor system. *Br J Pharmacol* 127 : 449-456, 1999a.
- Tsuda M, Ueno S, Inoue K: Evidence for the involvement of spinal endogenous ATP and P2X receptors in nociceptive responses caused by formalin and capsaicin in mice. *Br J Pharmacol* 128 : 1497-1504, 1999b.
- Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ: Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 436 : 225-235, 2001.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R: Immunohistochemical study of the P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 36 : 1229-1242, 1997.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R: P2X<sub>3</sub> is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci* 10 : 3470-3478, 1998.
- Xiang Z, Bo X, Burnstock G: Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* 256 : 105-108, 1998.

#### < 국문초록 >

삼차신경계에서 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1 면역양성 일차신경섬유는 통각정보의 전달에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 삼차신경절 및 삼차신경꼬리핵에서 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1 면역양성 신경세포의 형태학적 특성 및 투사양식을 이해하기 위하여, 흰쥐 삼차신경절 및 삼차신경꼬리핵에서 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1에 대한 항체를 사용하여 형광면역염색법 및 형태계측학적인 기법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경세포중 77.4%의 신경세포에서 (1,401/1,810) TRPV1이 동시에 발현되었으며, TRPV1 면역양성 신경세포중 51.9% (1,401/2,698)의 신경세포에서 P2X<sub>3</sub>와 공존을 보였다. P2X<sub>3</sub>와 TRPV1에 동시에 면역양성반응을 보이는 신경세포는 중간크기의 신경세포에서 주로 관찰되었으며, P2X<sub>3</sub> 혹은 TRPV1 면역양성 신경세포중 아주 작거나 큰 신경세포에서는 공존하지 않았다. 삼차신경꼬리핵에서 P2X<sub>3</sub> 면역양성 신경섬유 및 신경종말들은 제1층과 제2층에 분포하는데 주로 제2층의 안쪽부위에서 밀도가 높게 관찰되었으며, TRPV1 면역양성 신경섬유 및 신경종말들은 제1층과 제2층의 바깥쪽에서 밀도가 높게 관찰되었다. P2X<sub>3</sub>와 TRPV1이 공존하는 신경섬유 및 신경종말들은 제2층의 안쪽과 바깥쪽의 경계부위에서 관찰되었다.

이러한 연구결과는 P2X<sub>3</sub>와 TRPV1을 동시에 발현하는 신경세포는 구강안면영역에서 통각정보의 처리에 독특한 역할을 수행할 것이라는 것을 시사한다.