

## Participation of Central P2X<sub>7</sub> Receptors in CFA-induced Inflammatory Pain in the Orofacial Area of Rats

Kui-Ye Yang<sup>1</sup>, Myung-Dong Kim<sup>1</sup>, Jin-Sook Ju, Min-Ji Kim, and Dong-Kuk Ahn\*

Department of Oral physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu (700-412), Korea.

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

(received February 28, 2014; revised March 10, 2014; accepted March 10, 2014)

We investigated the role of central P2X receptors in inflammatory pain transmission in the orofacial area in rats. Experiments were carried out using male Sprague-Dawley rats weighing 230-280g. Complete Freund's adjuvant (CFA, 40  $\mu$ L) was applied subcutaneously to the vibrissa pad to produce inflammatory pain. The intracisternal administration of *iso*-PPADS tetrasodium salt, a non-selective P2X receptor antagonist, A317491 sodium salt hydrate, a P2X<sub>2/3</sub> receptor antagonist, 5-BDBD, a P2X<sub>4</sub> receptor antagonist, or A438079 hydrochloride, a P2X<sub>7</sub> receptor antagonist, was performed 5 days after CFA injection. Subcutaneous injections of CFA produced increases in thermal hypersensitivity. Intracisternal injections of *iso*-PPADS (25  $\mu$ g) or A438079 (25 or 50  $\mu$ g) produced significant anti-hyperalgesic effects against thermal stimuli compared to the vehicle group. A317491 or 5-BDBD did not affect the head withdrawal latency times in rats showing an inflammatory response. Subcutaneous injections of CFA resulted in the up-regulation of OX-42, a microglia marker, and GFAP, an astrocyte marker, in the medullary dorsal horn. The intracisternal administration of A438079 reduced the numbers of activated microglia and astrocytes in

the medullary dorsal horn. These results suggest that a blockade of the central P2X<sub>7</sub> receptor produces anti-nociceptive effects, mediated by inhibition of glial cell function in the medullary dorsal horn. These data also indicate that central P2X<sub>7</sub> receptors are potential targets for future therapeutic approaches to inflammatory pain in the orofacial area.

**Key words:** P2X receptor, CFA, inflammation, thermal hyperalgesia, glia

### 서 론

Adenosine 5'-triphosphate (ATP)는 염증이나 감염 등의 다양한 원인으로 세포 손상이 발생할 때 세포밖으로 유리 되어 통증을 유발하는 흥분성 신경전달물질로 알려져 있다[1-3]. 일반적으로 ATP를 포함하는 퓨린(purine)계 물질 들과 반응하는 수용기를 퓨린성 수용체(purinergic receptor)라 하며, P2X (ligand-activated cationic channel)와 P2Y (G-protein-coupled receptor) 수용체가 있다[4,5]. 이 중 P2X 수용체는 비선택적으로 이온을 투과하는 특징을 가지고 있는데, ATP가 P2X 수용체에 결합하면 이온 채널이 열리게 되고, 이를 통해 이온이 세포막을 통과하여 전류를 형성하여 막전위를 변화시키게 된다[6-8]. P2X 수용체는 중추신경과 말초신경에 존재하면서 빠른 시냅스전달[9-10], 신경전달물질방출[11], 통증신호생성[12] 등과 같은 중요한 역할을 담당하고 있으며, 현재까지 모두 7개 이상의 아형(P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>)들이 존재하고 있다[5,13,14].

\*Correspondence to: Dong-Kuk, Ahn, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1 Sam Deok 2ga, Chung-gu, Daegu (700-412), Korea  
Tel: 82-53-660-6840, Fax: 82-53-421-4077  
Email: dkahn@knu.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.

말초신경 뿐 아니라 중추신경에서도 풍부하게 존재하는 P2X 수용체는 통증발생에도 매우 중요하게 작용 [1,8,15]한다고 알려져 있다. 이러한 증거로는 중추신경계에 P2X 수용체를 흥분시키는 효현제(agonist)를 투여하면 이질통을 유발하였으며[16], 뒷발에 열자극을 가하면 열 통각과민 현상이 발생하였다[17]. 또한 P2X 수용체 억제제(antagonist)를 중추로 주입하면 발바닥 피하로 formalin 혹은 capsaicin을 주입하여 발생하는 유해한 행위반응을 감소시켰다[18]. 이러한 사실은 중추신경계에 존재하고 있는 P2X 수용체가 염증에 의해 발생하는 통증 전도에 중요하게 관여하고 있다는 것을 말해준다. 이와같이 염증성 통증 전달에서 P2X 수용체에 대한 관심은 증가하고 있지만, 중추성 P2X 수용체가 안면부위에서 발생하는 염증성 통증 전도 및 조절에 어떻게 관여하는지에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

본 연구에서는 안면영역에 만성적인 염증성 통증이 발생했을 때 P2X 수용체의 역할을 구명하여 어떤 수용체 종류가 관여하는지를 알아보고 또한 P2X 수용체의 통증조절작용에 신경아교세포의 역할을 알아보았다. 이러한 실험 목적을 위하여 실험동물 흰 쥐의 안면영역에 피하로 complete Freund's adjuvant(CFA)를 주입하여 만성 염증성 통증을 유발하였으며, 비선택적인 P2X 수용체 억제제인 iso-PPADS tetrasodium salt, P2X<sub>2/3</sub> 수용체 억제제인 A317491, P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제인 5-BDBD, 그리고 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제인 A438079를 소뇌연수조로 투여하여 온도 자극에 의해 나타나는 통증반응을 비교하여 중추에 존재하는 P2X 수용체가 염증성 통증에 미치는 영향을 관찰하였다. 염증성 통증이 유발된 실험동물에서 P2X<sub>7</sub> 수용체의 억제제를 소뇌연수조로 주입한 다음 삼차신경 척수감각핵 중 미세소핵에서 미세아교세포(microglia)의 표지자인 OX-42와 별아교세포(astrocyte)의 표지자인 GFAP의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(230-280 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 일정한 온도와 12시간 주/야 빛의 순환주기를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 치의학전문대학원 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 의식이 있는 동물의 실험에 관한 세계통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다.

### CFA에 의해 유도되는 염증성 통증

염증성 통증을 유발하기 위해 실험동물을 3% isoflurane으로 흡입마취한 뒤, CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)와 생리 식염수를 1:1의 비율로 혼합한 40  $\mu$ L emulsion 용액을 안면 영역 피하에 주사하였다. 선행연구에서 CFA를 안면 피하에 주입하면 1일째부터 열과민성 통증이 발생하여 주입 후 10일째까지 이어지고, 14일째가 되면 CFA를 주입하기 전과 같은 양상으로 회복된다는 것을 보고한 바 있다[19].

### 안면통증의 평가

통증행위 반응을 관찰하기 위해 실험동물이 목을 빼내어 자유롭게 움직일 수 있도록 설계된 투명한 플라스틱 관찰용 통에 한 마리씩 넣어 열자극을 받을 수 있도록 하였다. 동물 실험은 밝지 않으면서 조용한 곳에서 최소 30분 이상 안정화시킨 다음 실시하였다. 열자극은 레이저 자극기(Infrared Diode Laser, LVI-808-10, LVI tech, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 피부로부터 10 cm 떨어진 곳에서 90° 각도로 적용하였다[19,20]. 레이저 자극의 power와 current는 11 W와 18.1 A로 고정하였으며, 안면영역에 열자극을 적용한 다음 얼굴을 피하는 시간(head withdrawal latency)을 측정하여 평가하였다. 통증의 측정은 5분의 간격을 두고 2번의 자극을 가하여 측정된 평균값을 산출하였으며, cut-off time은 조직손상을 방지하기 위해 20초로 설정하였다.

### 중추로 주입한 P2X 수용체 억제제의 작용

P2X 수용체 억제제를 소뇌연수조로 투여하기 위해 수술을 시행하였다. 약물을 주입하기 3일 전 실험동물을 ketamine (40 mg/kg)과 xylazine (4 mg/kg) 혼합액으로 마취하여 뇌정위고정장치(model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 머리를 고정하였다. 두경부 피부의 일부를 절개하고, 후두골로부터 근육을 박리하여 고리뒤통수막의 일부를 노출시켰다. 주사기 바늘(27 gauge)을 사용하여 막에 작은 구멍을 만들고, 소뇌연수조로 약물을 주입하기 위한 폴리에틸렌 관(PE10, Clay Adams, Parsippany, NJ)을 삽입한 뒤[21-24] 접착제로 고정시켰다. 폴리에틸렌 관은 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진을 사용하여 머리에 고정하였다. 실험 동물을 72시간 동안 회복시킨 CFA를 주입한 5일째에 비선택적인 P2X 수용체 억제제인 iso-PPADS tetrasodium salt (1, 5 혹은 25  $\mu$ g/10  $\mu$ L), P2X<sub>2/3</sub> 수용체의 억제제인 A317491 sodium salt hydrate (1, 5 혹은 10  $\mu$ g/10  $\mu$ L), P2X<sub>4</sub> 수용체의 억제제인 5-BDBD (20 혹은 200  $\mu$ g/10  $\mu$ L), 혹은 P2X<sub>7</sub> 수용체의 억제제인 A438079 hydrochloride (25 혹은 50  $\mu$ g/10  $\mu$ L)를 소뇌연수조로 각각 주입한 후 열과민성 통증에 미치

는 영향을 평가하였다. 소뇌연수조로 투여한 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제가 CFA 주입으로 활성화된 신경아교세포를 억제하는지를 관찰하기 위하여 약물 투여 2시간째 실험동물의 미측소핵에서 OX-42와 GFAP의 발현 정도를 비교하였다. 실험에 사용한 약물 중 *iso*-PPADS tetrasodium salt (Tocris, Ellisville, MO)와 A317491 sodium salt hydrate (Sigma-Aldrich)는 생리식염수에 용해시켰고, A438079 hydrochloride (Tocris)와 5-BDBD (Tocris)는 각각 33% 혹은 80% DMSO에 용해시켰다.

### 면역조직화학염색

실험동물(n=5 per group)은 P2X<sub>7</sub> 수용체의 억제제를 투여한 후 2시간째에 0.9% 생리식염수로 관류하고, 0.1 M phosphates buffer (PB, pH 7.4)에 용해시킨 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 숨뇌뒷뼈를 적출하여 동일한 고정액으로 4°C에서 24시간 동안 후고정한 뒤 후 고정한 조직을 다시 4°C에서 30% sucrose 용액에 두어 24시간 침투시켰다. 그 후 조직을 얼린 뒤, 박절기(model SM2000R, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 30 μm 두께로 잘랐다. 이어 비 특이성 항원에 대한 면역반응을 방지하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS)용액에 0.2% Triton X-100, 5% goat serum을 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 면역조직화학염색은 1차 항체로 미세아교세포의 표지자인 OX-42 (1:100, Millipore, Temecula, CA) 혹은 별아교세포의 표지자인 GFAP (1:3000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 4°C에서 24시간 반응시킨 다음, 2차 항체인 Alexa 488-conjugated mouse IgG (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 실온에서 1시간 반응시켰다. 발색된 절편은 형광현미경(BX 41 and U-RFL-T, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 이미지 분석은 software인 I-solution (Innerview Co, Seongnam, Republic of Korea)을 이용하여 분석하였다.

### 통계분석

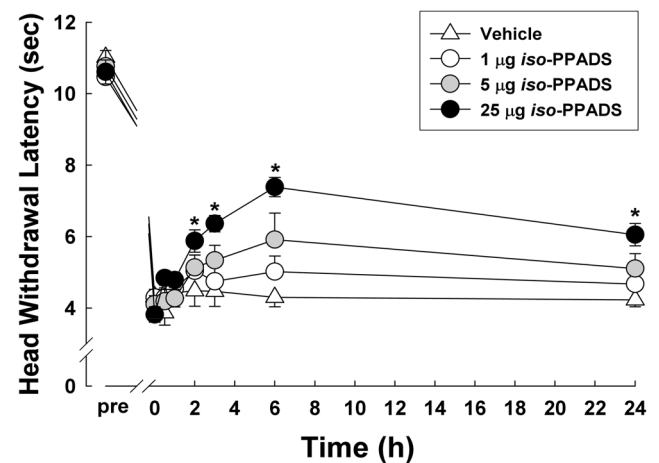
행위 반응 실험 결과의 통계분석은 반응의 유의성을 검증하기 위해 다중 그룹에서 LSD post-hoc test에 의한 반복측정자료의 분산분석법과 일원배치분산분석(ONE-WAY ANOVA)를 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은 P<0.05로 설정하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

## 실험 결과

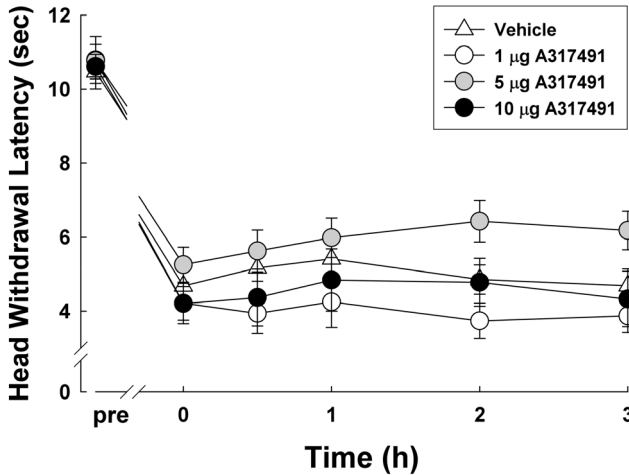
실험동물 흰 쥐의 안면영역 피하에 CFA를 주입하면 주입 1일 후부터 열성 통각과민 현상을 관찰할 수 있

며, 10일째까지 유의하게 유지되며 이후 시간이 지남에 따라 회복하여 14일째는 CFA를 주입하기 전과 같은 양상으로 회복된다[19]. CFA 주입 후 나타나는 통각과민현상이 가장 크면서도 일정하게 유지되는 주입 후 5일째에 P2X 수용체 약물을 소뇌연수조로 투여하여 통증에 미치는 영향을 평가하였다. 비특이적 P2X 수용체 억제제인 *iso*-PPADS가 CFA 주입으로 나타나는 통증 행위반응에 미치는 영향을 Fig 1에 나타내었다. 대조군으로 vehicle을 주입하거나 비선택적 P2X 수용체 억제제인 *iso*-PPADS 1 μg을 투여하면 head withdrawal latency에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 또한 *iso*-PPADS 5 μg은 CFA로 인해 유발되는 열성 통각과민을 억제하는 효과를 나타냈지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 25 μg의 용량으로 *iso*-PPADS를 투여하면 주입 후 30분째 부터 통각과민을 억제하기 시작하여 6시간째가 되면 진통작용이 가장 크게 나타났고, 24시간이 지난 이후에도 대조군과 비교했을 때 유의한 효과가 지속되었다(F<sub>(3,20)</sub> = 4.532; P<0.05).

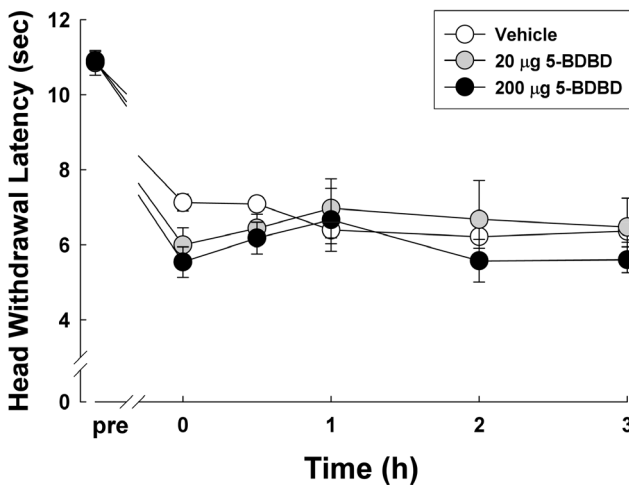
P2X<sub>2/3</sub> 수용체 억제제인 A317491을 소뇌연수조로 투여한 다음 CFA를 주입한 동물에서 발생한 열성통증에 미치는 영향을 Fig 2에 나타내었다. A317491을 1, 5 혹은 10 μg의 농도로 투여하여 대조군과 비교해보았을 때 통계적으로 유의한 진통작용을 발생시키지는 못하였다(F<sub>(3,20)</sub> = 2.329; P=0.105). P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제인 5-BDBD를 소뇌연수조로 투여한 다음 CFA의 주입으로 유발한 열성통증에 미치는 결과를 알아본 실험에서도 대조군과 비교해보았을 때 통계적으로 유의한 진통작용을 발생시키지 못



**Fig. 1.** Effects of intracisternal administration of *iso*-PPADS (1, 5, 25 μg/10 μL), a P2X receptor antagonist, on CFA-induced thermal hypersensitivity in the orofacial area. The intracisternal administration of *iso*-PPADS (25 μg) attenuated thermal nociception in the ipsilateral side. There were 6 animals in each group. \* P<0.05, vehicle- vs. *iso*-PPADS-treated group. pre: before CFA injection



**Fig. 2.** Effects of intracisternal administration of A317491 (1, 5, 10  $\mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ ), a  $\text{P2X}_{2/3}$  receptor antagonist, on CFA-induced thermal hypersensitivity in the orofacial area. The intracisternal administration of A317491 did not produce anti-nociceptive behavior. There were 6 animals in each group.

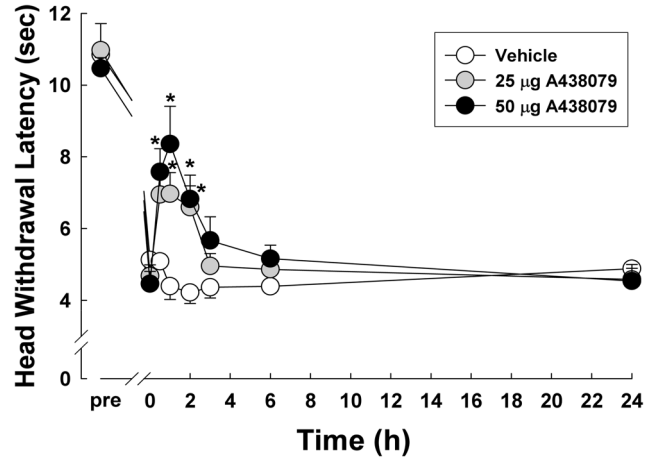


**Fig. 3.** Effects of intracisternal administration of 5-BDBD (20, 200  $\mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ ), a  $\text{P2X}_4$  receptor antagonist, on CFA-induced thermal hypersensitivity in the orofacial area. The intracisternal administration of 5-BDBD did not produce anti-nociceptive behavior. There were 6 animals in each group.

였다(Fig. 3.  $F_{(2,15)} = 0.680$ ;  $P=0.521$ ).

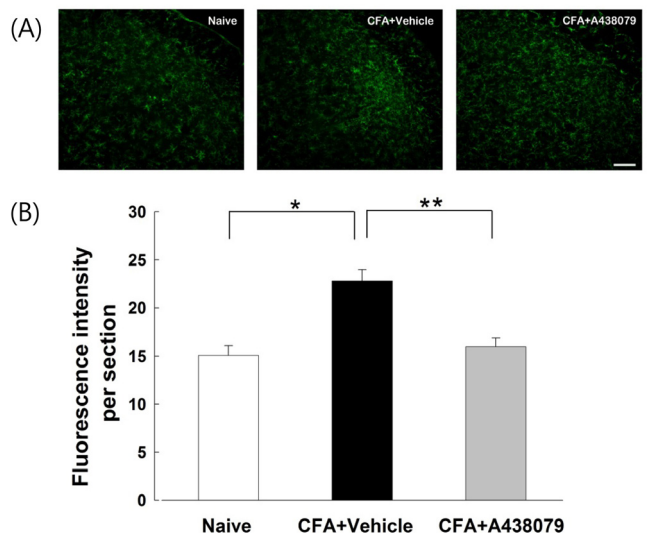
소뇌연수조로 주입한  $\text{P2X}_7$  수용체 억제제인 A438079가 CFA를 주입하여 나타나는 열통증 과민현상을 억제할 수 있는지 관찰한 결과를 Fig 4에 나타내었다. A438079를 25 혹은 50  $\mu\text{g}$ 의 농도로 투여하면 대조군과 비교해 보았을 때 투여 후 30분째부터 통각과민 현상을 억제하기 시작하여 2시간째까지 통계적으로 유의한 진통작용을 관찰하였다( $F_{(2,15)} = 4.327$ ,  $P<0.05$ ).

$\text{P2X}_7$  수용체 억제제인 A438079가 CFA를 투여하면 발현이 증가된 미세아교세포와 별아교세포에 미치는 영향

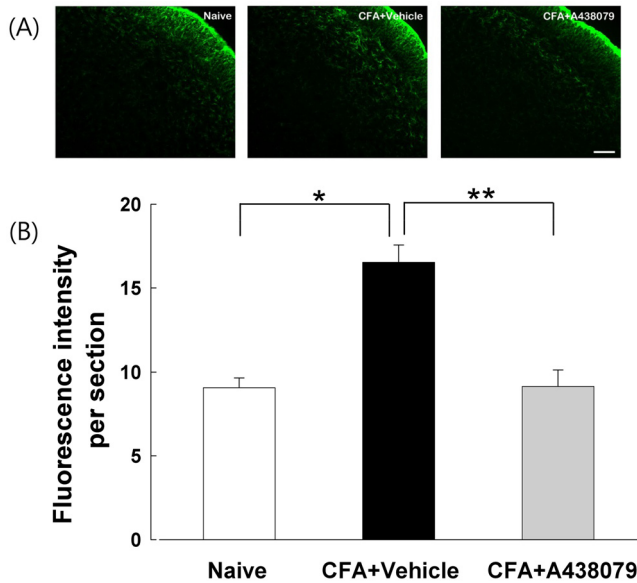


**Fig. 4.** Effects of intracisternal administration A438079 (25, 50  $\mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ ), a  $\text{P2X}_7$  receptor antagonist, on CFA-induced thermal hypersensitivity in the orofacial area. The intracisternal administration of A438079 (25 or 50  $\mu\text{g}$ ) attenuated thermal nociception in the ipsilateral side. There were 6 animals in each group. \*  $P<0.05$ , vehicle- vs. A438079-treated group.

을 관찰하여 Fig 5와 6에 나타내었다. CFA 투여 후 5일째 미측소핵에서 정상적인 실험군과 비교했을 때 미세아교세포의 표지자인 OX-42 (Fig 5)와 별아교세포의 표지자인 GFAP (Fig 6)가 유의하게 증가된 것을 관찰하였다. CFA의 주입 후 5일째에 만성적인 염증이 발생한 실험동물



**Fig. 5.** Expression of OX-42 immunoreactivity in the ipsilateral medullary dorsal horn. (A) Subcutaneous injection of rats with CFA increased the expression of OX-42 compared to the naive rats. Intracisternal injection of A438079 (50  $\mu\text{g}$ , on 5 days after CFA injection) decreased up-regulated microglial expression, as compare to the CFA-injected animals. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (B) Fluorescence intensity of OX-42 in the medullary dorsal horn. \*  $P<0.05$ , naive group vs. CFA+vehicle-treated group. \*\*  $P<0.05$ , CFA+vehicle- vs. CFA+A438079-treated group.



**Fig. 6.** Expression of GFAP immunoreactivity in the ipsilateral medullary dorsal horn. (A) Subcutaneous injection of rats with CFA increased the expression of GFAP compared to the naive rats. Intracisternal injection of A438079 (50  $\mu$ g on 5 days after CFA injection) decreased up-regulated astrocyte expression, as compared to the CFA-injected animals. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Fluorescence intensity of GFAP in the medullary dorsal horn. \*  $P < 0.05$ , naive group vs. CFA+vehicle-treated group. \*\*  $P < 0.05$ , CFA+vehicle- vs. CFA+A438079-treated group.

에서 소뇌연수조로 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제인 A438079(50  $\mu$ g)를 투여한 다음 2시간이 지난 뒤 미세아교세포와 별아교세포의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제인 A438079의 투여는 CFA로 인해 증가된 미세아교세포와 별아교세포의 발현을 유의하게 감소시켰다.

## 고찰

본 연구는 CFA를 안면영역의 피하로 투여하여 발생하는 염증성 통증 실험모델을 이용하여 중추성 P2X 수용체의 역할을 연구하였다. 비선택적인 P2X 수용체 억제제인 *iso*-PPADS는 CFA의 주입으로 인해 유발되는 열성 통각과민을 억제하였지만, P2X<sub>2/3</sub> 수용체 억제제인 A317491 혹은 P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제인 5-BDBD의 투여는 유의한 진통작용이 나타나지 않았다. 그러나 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제인 A438079는 유의한 진통작용을 보여주었을 뿐 아니라, CFA로 인해 미세아교세포에서 증가된 신경아교세포의 활성을 억제시켰다. 이러한 실험 결과는 만성 염증성 통증에서 중추성 P2X<sub>7</sub>이 통증 발생에 중요하다는 것을 보여주고 있으며, 신경아교세포의 활성화도 관련이 있음을 보여준다.

## 중추신경계에 존재하는 P2X 수용체 역할

본 연구에서는 P2X<sub>2/3</sub> 혹은 P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제를 중추로 투여했을 때 CFA로 인해 발생한 열자극에 대한 민감성의 증가를 변화시키지 못하였지만, P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제의 투여는 진통작용이 발생하였다. 이러한 실험 결과는 중추신경계에 존재하는 P2X 수용체의 아형 중 P2X<sub>7</sub> 수용체가 안면영역에서 발생하는 열 통증 전도에 중요하다는 것을 말해 준다. 일반적으로 P2X<sub>7</sub> 수용체는 면역관련세포에서 발현된다고 알려져 있으며[14,25], 중추신경계에서 수용체는 미세아교세포[26,27]와 별아교세포[28]에서 발현된다. 선행실험에서 P2X<sub>7</sub> 수용체가 통증 발생에 미치는 영향을 연구한 결과를 살펴보면 P2X<sub>7</sub> 수용체가 결핍된 마우스에서 CFA를 발바닥으로 투여하면 기계적 자극과 열자극에 대한 통증과민 행위반응이 발생하지 않았다[29]. 또한 중추로 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제를 투여하면 발바닥 피하로 주입한 bee venom에 의해 발생하는 자발적인 유해한 행위반응과 기계적 이질통이 감소하였다[30]. 이와 같은 실험 결과들은 중추에 존재하는 P2X<sub>7</sub> 수용체가 염증성 통증 발생과 유지에 중요하게 관여하고 있다는 것을 보여준다.

최근연구에서 악안면 영역에서 발생하는 통증에서도 중추성 P2X<sub>7</sub> 수용체가 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 흰 쥐의 눈확아래신경을 결찰하여 발생한 신경병성 통증 모델에서 삼차신경 척수감각핵 중 미세소핵의 미세아교세포에서 P2X<sub>7</sub> 수용체의 발현이 증가했으며[31], 소뇌연수조로 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제를 투여하면 눈확아래신경 결찰로 유발된 기계적 이질통과 통각과민 현상을 감소시켰다[31]. 또한 치수에 mustard oil을 적용하여 발생하는 급성 치수염 모델에서 중추로 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제를 주입하면 mustard oil로 인해 유도된 중추성 감각(central sensitization)을 감소시킬 수 있었다[32]. 이러한 결과는 안면영역에서 발생하는 통증에서도 중추성 P2X<sub>7</sub> 수용체가 중요하게 작용하고 있다는 것을 말해준다.

본 연구에서는 중추성 P2X<sub>2/3</sub> 혹은 P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제의 투여가 CFA로 유발된 만성 염증성 통증을 감소시키지 못하는 결과를 보여주었다. 그러나 선행 실험에서는 carrageenan을 발바닥 피하에 주입하여 발생한 염증성 통증에서 P2X<sub>2/3</sub> 수용체 억제제를 중추로 투여하면 열자극에 대한 민감도가 감소하였으며[33], formalin 투여로 인해 발생하는 유해한 행위반응을 감소시켰다[18,33]. 또한 발바닥 피하에 주입한 formalin은 척수뒤뿌에서 P2X<sub>4</sub> 수용체 발현을 증가시켰으며[34], P2X<sub>4</sub> 수용체가 결핍된 마우스에서 CFA를 주입하거나 신경손상을 가하여 발생하는 염증성 통증 혹은 신경병성 통증이 감소하였다[35,36]. 악안면 영역에서 발생한 통증 연구에서

도 중추로 P2X<sub>2/3</sub> 수용체 억제제는 치수에 mustard oil을 적용하여 발생한 중추성 감각을 억제하였다[37]. 그러나 본 연구에서는 중추성 P2X<sub>2/3</sub> 혹은 P2X<sub>4</sub> 수용체 억제제가 CFA주입 후 나타나는 열통증 과민현상을 억제하지 못하였다. 이러한 실험 결과의 차이는 통증 실험 모델, 통증 평가방법, 통증의 형태와 같은 실험 조건의 차이에 따라 다르게 나타나는 것으로 보여진다.

### 염증성 통증발생에서 신경아교세포의 역할

염증성통증은 말초조직의 손상이나 염증에 의해 발생하는데, 본 연구에서는 실험동물의 안면영역 피하에 CFA를 주입하여 오래 지속되는 만성 염증성 통증을 발생시킨 실험모델[38,39]을 이용하였다. 이러한 실험 모델은 선행연구에서 보고한 흰 쥐의 발바닥 피하로 CFA를 주입하면 열자극에 대한 민감성 증가와 기계적 자극에 대한 통각과민 현상이 주입 후 4시간째부터 발생하여 주입 후 14일째까지도 유의하게 이어진다는 결과[39]와 일치하고 있으며, 본 연구실의 선행 연구에서도 CFA를 안면영역의 피하로 주입하면 1일째부터 열과민성 통증이 발생하여 10일 이상 이어진다는 것을 관찰하였다 [19]. 이때 만성통증 발생에 중추신경계에 존재하는 신경아교세포가 중요한 역할을 한다는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 말초로 CFA를 주입하면 척수뒤뿌에서는 신경아교세포의 활성이 증가하고 미세아교세포는 주입 후 4시간째부터 활성화되어 14일 이상 지속되었으며, 별아교세포는 주입 후 4일째부터 활성화되어 14일 이상 지속되었다[39]. 이와 같은 현상은 말초조직의 손상으로 인해 중추신경계에서 변화하는 신경아교세포가 만성통증 발생에 중요하다는 것을 말해준다. 본 연구에서도 약 안면 피하에 CFA를 주입하여 신경아교세포의 변화를 관찰하였다. 안면 영역의 피하로 CFA를 주입하면 삼차 신경 감각핵 중 미측소핵에서 별아교세포와 미세아교세포의 활성이 증가하였다. P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제를 투여하면 진통작용이 발생할 뿐만 아니라 CFA의 주입으로 인해 증가된 신경아교세포의 활성도 감소시켰다. 이와 같은 결과는 안면부위에 CFA주입으로 발생하는 만성 염증성 통증에 신경아교세포가 중요하게 작용한다는 것으로 보이며, 특히 P2X<sub>7</sub> 수용체를 통하여 신경아교세포를 조절하면 만성통증을 조절할 수 있다는 것을 보여준다.

### 신경아교세포의 역할과 작용기전

신경아교세포는 중추신경계에서 혈관과 신경세포 사이에 위치하며 신경세포를 지지하고 영양을 공급하거나 식작용 등을 담당하는데, 중추신경계에서 통증에 관여한다고 알려진 신경아교세포는 미세아교세포와 별아교세포가

있다. 미세아교세포는 조직이나 신경의 손상, 바이러스 혹은 박테리아의 감염 등에 의해서 활성화 될 수 있다 [40,41]. 활성화된 미세아교세포는 아메바 모양의 형태와 분화가 증가되어 있는 모습이 나타나며, complement 3 수용체와 같은 세포 표면의 표지자나 수용체를 발현한다. 조직의 손상이 발생하면 미세아교세포가 활성화되어, interleukin-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine과 ATP가 다량으로 생산되며, 별아교세포를 자극시키기도 한다[42]. 별아교세포는 중추신경계에 널리 존재하며, 활성화되면 세포체나 돌기가 비대(hypertrophy)해지는 양상의 출현, 세포내 신호전달 물질인 S100의 증가와 같은 현상이 발생한다[43,44]. 미세아교세포에 의해 자극된 별아교세포에서는 chemokine, cytokine, glutamate가 방출되어 지속적인 병적 상태로의 변화와 세포사멸, 그리고 gliosis를 유발하게 된다[43,45-47]. 이렇듯 염증이거나 말초 손상에 따른 통각과민이 발생하는 기전에 중추에 존재하는 신경아교세포 활성화는 필수적이며, 미세아교세포는 말초의 염증으로 유도된 통증을 발생시키는데 중요한 역할을 담당하는 반면, 별아교세포는 발생한 통증을 지속적으로 유지하는데 중요한 역할을 한다[40]. 따라서 신경아교세포의 활성을 조절할 수 있는 기전을 찾는 연구가 더 진행된다면 만성염증성 통증을 다루는데 보다 효과적으로 적용할 수 있을 것이라 생각된다.

## 요 약

이상의 실험결과들을 요약하면, CFA를 안면영역 피하로 주입하여 발생한 염증성 통증 행위반응은 P2X 수용체의 억제제의 투여로 감소할 수 있었다. 특히 P2X<sub>7</sub> 수용체 억제제를 투여하면 진통작용 뿐 아니라 활성화된 신경아교세포 발현을 억제하였다. 이러한 실험 결과는 P2X<sub>7</sub> 수용체가 신경아교세포에 영향을 미쳐 안면에서 발생하는 만성 염증성 통증의 발생과 유지에 관여하고 있다는 것을 보여준다. 따라서 중추신경계의 신경아교세포를 조절할 수 있는 중추성 P2X<sub>7</sub> 수용체 작용기전은 임상에서 만성 염증성 통증을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 방법을 제시해 줄 수 있다고 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교과부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012M3A9B6055414).



## References

1. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007;87:659-797.
2. Collier HO, James, GW, Schneider C. Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate. *Nature* 1966;212:411-412.
3. 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* 2000;123:1238-1246.
4. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994;64:445-475.
5. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50:413-492.
6. Chizh BA, Illes P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53:553-568.
7. Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol.* 2001;65:107-134.
8. Inoue K. P2 receptors and chronic pain. *Purinergic Signal* 2007;3:135-144.
9. Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott A. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci.* 1997;17:5297-5304.
10. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol.* 1993;265:C577-606.
11. Khakh BS, Henderson G. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol.* 1998;54:372-378.
12. Chen M, Gu JG. A P2X receptor-mediated nociceptive afferent pathway to lamina I of the spinal cord. *Mol Pain* 2005;1:4.
13. 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* 1998;83:177-190.
14. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002;82:1013-1067.
15. Burnstock G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des.* 2009;1717-1735.
16. Fukuhara N, Imai Y, Sakakibara A, Morita K, Kitayama S, Tanne K, Dohi T. Regulation of development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice. *Neurosci Lett.* 2000;292:25-28.
17. 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.* 1999;127:449-456.
18. 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.* 1999;128:1497-1504.
19. Park MK, Song HC, Yang KY, Ju JS, Ahn DK. Participation of peripheral P2X receptors in orofacial inflammatory nociception in rats. *Int J Oral Biol.* 2011;36:143-148.
20. Han SR, Yeo SP, Lee MK, Bae YC, Ahn DK. Early dexamethasone relieves trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res.* 2010;89:915-920.
21. Ahn DK, Choi HS, Yeo SP, Woo YW, Lee MK, Yang GY, Jeon HJ, Park JS, Mokha SS. Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects of inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. *Pain* 2007;132:23-32.
22. Won KA, Park SH, Kim BK, Baek KS, Yoon DH, Ahn DK. Intracisternal administration of voltage dependent calcium channel blockers attenuates orofacial inflammatory nociceptive behavior in rats. *Int J Oral Biol.* 2011;36:43-50.
23. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 1976;17:1031-1036.
24. Yang KY, Kim HK, Jin MY, Ju JS, Ahn DK. Glia dose not participate in antinociceptive effects of gabapentin in rats with trigeminal neuropathic pain. *Int J Oral Biol.* 2012;37:121-129.
25. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X<sub>7</sub>). *Science* 1996; 272:735-738.
26. Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. Tissue distribution of the P2X receptor. *Neuropharmacology* 1997;36:1277-1283.
27. Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S. Cellular localization of P2X<sub>7</sub> receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* 2008;1194:45-55.
28. Franke H, Grosche J, Schadlich H, Krugel U, Allgaier C, Illes P. P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 2001;108:421-429.
29. Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. Disruption of the P2X<sub>7</sub> purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 2005;114:386-396.
30. Zhou ZH, Wang JX, Liu BJ, Li M, Lu Y, Chen HS. Contribution of the spinal P2X<sub>7</sub> receptors to bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats. *Neurosci Lett.* 2012;531:145-148.
31. Murasaki K, Watanabe M, Takahashi K, Ito G, Suekawa Y, Inubushi T, Hirose N, Uchida T, Tanne K. P2X<sub>7</sub> receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain. *J Dent Res.* 2013;92:260-265.
32. Itoh K, Chiang CY, Li Z, Lee JC, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn involves purinergic P2X<sub>7</sub> receptors. *Neuroscience* 2011;192:721-731.
33. McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P,

- Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF. Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol.* 2003;140:1381-1388.
34. Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ. Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol.* 2005;163:120-127.
35. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptor induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003;424:778-783.
36. Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain* 2009;5:28.
37. Hu B, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis. *J Neurophysiol.* 2002;88:1614-1624.
38. Hui J, Zhang ZJ, Zhang X, Shen Y, Gao YJ. Repetitive hyperbaric oxygen treatment attenuates complete Freund's adjuvant-induced pain and reduces glia-mediated neuroinflammation in the spinal cord. *J Pain* 2013;14:747-758.
39. Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci.* 2004;20:467-473.
40. Cao H, Zhang YQ. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:972-983.
41. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19:312-318.
42. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36:180-190.
43. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:23-36.
44. Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:973-985.
45. Miller RJ, Jung H, Bhangoo SK, White FA. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;194:417-449.
46. Saab CY, Waxman SG, Hains BC. Alarm curse? The pain of neuroinflammation. *Brain Res Rev.* 2008;58:226-235.
47. Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:333-359.