

Blockade of Trigeminal Glutamate Recycling Produces Anti-allodynic Effects in Rats with Inflammatory and Neuropathic Pain

Kui-Ye Yang¹, Min-Kyung Lee², Min-Kyoung Park³, Jo-Young Son¹, Jin-Sook Ju¹ and Dong-Kuk Ahn^{1*}

¹Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Department of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Busan, Korea

³Department of Dental Hygiene, Kyung-Woon University, Gumi, Korea

(received August 30, 2017; revised September 07, 2017; accepted September 08, 2017)

The present study investigated the role of spinal glutamate recycling in the development of orofacial inflammatory pain or trigeminal neuropathic pain. Experiments were carried out on male Sprague–Dawley rats weighing between 230 and 280 g. Under anesthesia, a polyethylene tube was implanted in the atlanto-occipital membrane for intracisternal administration. IL-1 β -induced inflammation was employed as an orofacial acute inflammatory pain model. IL-1 β (10 ng) was injected subcutaneously into one vibrissal pad. We used the trigeminal neuropathic pain animal model produced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve. DL-threo- β -benzyloxyaspartate (TBOA) or methionine sulfoximine (MSO) was administered intracisternally to block the spinal glutamate transporter and the glutamine synthetase activity in astroglia. Intracisternal administration of TBOA produced mechanical allodynia in naïve rats, but it significantly attenuated mechanical allodynia in rats with interleukin (IL)-1 β -induced inflammatory pain or trigeminal neuropathic pain. In contrast, intracisternal injection of MSO produced anti-

allodynic effects in rats treated with IL-1 β or with infraorbital nerve injury. Intracisternal administration of MSO did not produce mechanical allodynia in naïve rats. These results suggest that blockade of glutamate recycling induced pro-nociception in naïve rats, but it paradoxically resulted in anti-nociception in rats experiencing inflammatory or neuropathic pain. Moreover, blockade of glutamate reuptake could represent a new therapeutic target for the treatment of chronic pain conditions.

Key words: glutamate recycling, transporter, MSO, TBOA, trigeminal pain

서론

흥분성 신경전달물질로 알려진 글루탐산염(glutamate)은 척수의 등뿔쪽(dorsal horn)에 존재하는 일차구심신경 말단에서 분비되어 통증을 전도하는 물질로 알려져 있다 [1, 2]. 분비된 글루탐산염은 수용기와 결합하여 작용을 나타내며 작용을 마친 다음에는 시냅스 틈새에서 제거된다. 이때 시냅스전신경이나 시냅스후신경 세포막에 존재하는 글루탐산 운반체(transporter)에 의해 신경세포 내로 유입되거나 별아교세포막에 존재하는 글루탐산 운반체에 의해 별아교세포 내로 유입되어 [3, 4] 제거된다. 시냅스로 분비된 글루탐산염이 이들 운반체에 의해 신속하게 제거되는 것은 신경흥분이 지속적으로 나타나는 것을 막기 위한 보호 작용으로 볼 수 있다 [5, 6]. 이와 같이 시냅스에서 글루탐산염을 낮은 농도로 일정하게 유지하여 주는 항상

*Correspondence to: Dong-Kuk, Ahn, DDS, PhD, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1 Sam Deok 2 ga, Chung-gu, Daegu (700-412), Korea
Tel: 82-53-660-6840, Fax: 82-53-421-4077
E-mail: dkahn@knu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-5570-2371

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.

성이 파괴되면 농도가 증가하게 되어 신경 흥분성이나 통증이 발생할 수 있기 때문에 글루탐산염의 분비나 제거가 균형을 이루면서 글루탐산염이 낮은 농도로 유지되는 것이 정상적인 신경활동에서 매우 중요하다.

정상적인 실험동물에서 글루탐산염의 운반체를 억제하면 등뿔신경 활동성이 증가하고, 자발성 통증 행위반응이 나타나며, 열 통증 자극이나 기계적 통증 자극에 대한 반응이 증가하는 등의 통증반응을 유발하였다[7, 8]. 이러한 통증 반응이 나타나는 이유는 정상 실험동물에서 글루탐산염의 운반체를 억제하면 시냅스 틈새에 존재하는 글루탐산염의 농도가 높아지기 때문이라고 판단된다[9, 10]. 하지만 이미 통증이 발생한 실험동물에서 글루탐산염의 운반체를 억제하면 정상 실험동물에서 나타나는 통증반응이 나타나지 않는다. 글루탐산염 운반을 억제하는 약물을 척수 내로 직접 투여하면 포르말린에 의해 나타나는 통증 반응은 오히려 억제되었으며[11, 12] Complete Freund's Adjuvant(CFA) 주입으로 발생하는 열통증 또한 유의하게 억제하였다[12]. 그러나 이와 같이 통증이 발생한 실험동물에서 글루탐산염 운반을 억제하면 정상 실험동물과는 반대로 나타나는 진통작용 기전에 대해서는 아직 확실하게 밝혀진 바가 없다.

신경세포뿐만 아니라 신경교세포에 존재하는 글루탐산 운반체도 글루탐산염의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다[13, 14]. 특히 별아교세포로 유입된 글루탐산염은 글루타민(glutamine)으로 바뀌어 신경세포로 다시 전달되어 재사용됨으로써 글루탐산염의 농도를 일정하게 유지하는 역할을 한다. 별아교세포에서 글루탐산염을 글루타민으로 변화시키는 효소를 차단하는 methionine sulfoximine(MSO)를 척수 내로 주입하면 삼차신경 손상[15]이나 만성 치수염[16]으로 인하여 연수의 통증 신경세포 활동이 증가되는 것을 유의하게 억제하였다. 이러한 실험결과는 별아교세포에 존재하는 글루탐산 운반체도 시냅스에서 글루탐산염의 항상성을 유지하는데 매우 중요하다는 것을 말해준다. 비록 이러한 실험결과들이 글루탐산 운반체가 통증유발에 중요하게 작용하다는 것을 보여주고 있으나 글루탐산 운반체 조절이 안면에서 발생하는 이질통증에 미치는 영향을 평가한 실험은 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 글루탐산 운반체의 기능을 차단하였을 때 안면에서 발생한 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다. 먼저 정상 실험동물의 소뇌연수조(intracisternal injection)로 신경세포에 존재하는 글루탐산 운반체를 차단하는 threo- β -Benzyloxyaspartic acid(TBOA)나 별아교세포에 존재하는 글루탐산 운반을 차단하는 MSO를 각각 투여한 다음 이질통증이 발생하는지를 관찰하였다. 염증성 이질통증을

야기하기 위하여 안면 조직의 피하로 interleukin-1 β (IL-1 β)를 주입한 실험동물과 신경병성 통증을 야기하기 위하여 안와하신경(infraorbital nerve)를 묶은 실험동물에서 소뇌연수조로 TBOA와 MSO를 각각 주입하여 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley계 흰 쥐 (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 실험동물위원회의 승인(2015-0053)을 얻었으며, 의식이 있는 동물 실험에 관한 세계통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다. 모든 행위반응에 관한 실험은 암맹검사로 진행하였다.

소뇌연수조로 약물주입(Intracisternal catheterization)

얼굴영역의 감각정보가 전달되는 삼차신경핵의 감각핵군으로 약물을 투여하기 위하여 실험동물의 소뇌연수조로 카테터(catheter)를 삽관하는 수술을 실시하였다[17-19]. 실험동물은 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(4 mg/kg) 혼합액을 근육으로 주사하여 마취시켰으며, 마취된 쥐는 stereotaxic frame(David Kopf instruments, Tujunga, CA, USA)으로 머리를 고정시켰다. 약물을 주입하기 위해 atlantooccipital membrane과 경막을 노출시킨 다음 폴리에틸렌관(PE10, Clay Adams, Parsippany, NJ)을 소뇌연수조 내로 삽관하였다. 폴리에틸렌관의 위치는 신경의 빗장(obex)부위에 두었으며 폴리에틸렌관을 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진(Dentsply Caulk, Milford, USA)을 사용하여 머리에 고정하였다. 선행실험과 같이 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다[20, 21].

실험동물 모델

IL-1 β -treated animals: 항상 일정한 위치에 약물을 투여하기 위해 마취된 쥐의 왼쪽 안면영역에서 3번째 줄의 5번째에 위치하고 있는 수염부분에 폴리에틸렌관을 삽관하였다. 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다. 안면부위에서 염증을 유발하기 위하여 선행 실험에서와 같이[22-24] IL-1 β (10 ng/20 μ L)를 피하조직으로 주입하였다. 선행실험에서 피하조직으로 주입한 IL-1 β 는 30분 후 유의한 이질통증을 유발하였으며 3시간 이상 지속하였다[24]. 따라서 TBOA와 MSO는 IL-1 β 를 주입하

고 2시간이 경과한 다음 이질통증이 유발한 것을 확인하고 소뇌연수조로 투여하였다.

Trigeminal neuropathic animal model: 실험동물을 마취한 뒤 선행연구에서 사용된 방법과 동일하게 수술을 하였다[25, 26]. 실험동물의 구강 내에서 제 1 대구치 영역의 치은과 협측(gingivo-buccal margin)선을 따라 절개하고 안와하신경을 노출시켰다. 노출된 신경을 느슨하게 두 번 묶은 (5-0 chromic gut) 다음 절개선을 봉합하였다. 대조군으로는 신경을 노출시켰으나 신경을 묶지 않았다. 안와하신경 손상은 유의한 이질통증을 유발하였으며 나타난 이질통증은 20일 이상 지속하였다. 신경손상 후 7일이 경과하여 이질통증이 최고로 나타났을 때 TBOA와 MSO를 소뇌연수조로 주입하고 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다.

이질통증의 평가

통증 행위반응을 관찰하기 위해 실험동물이 목을 빼내어 자유롭게 움직일 수 있도록 설계된 투명한 플라스틱 관찰용 통에 한 마리씩 넣어 실험을 수행하였다. 기계적 이질통증을 평가하기 위해 공기자극 테스트(air-puff test)를 이용하였는데[27-30], 삼차신경이 지배하는 안면영역에 가해지는 연속된 10번의 공기자극을 4초 동안 10초의 간격으로 주었을 때 머리를 회피하거나 깨무는 등의 공격적인 행동이 나타나는 것을 행위반응의 평가기준으로 삼았다. 공기자극은 금속관(26 gauge, 10 cm)을 통해 피부로부터 1 cm 떨어진 곳에서 90도 각도로 적용하였다. 공기자극 세기와 간격은 pneumatic pump module(BH2 system, Harvard Apparatus, USA)로 조절하였다. 자극의 역치는 총 시도에서 50% 이상의 반응을 보인 경우로 평가하였으며[30-32], 40 psi 이상의 자극에서도 반응이 나타나지 않으면 자극을 중지하였다. 정상적인 동물은 압력세기가 40 psi 이하인 경우 어떠한 통증 반응도 나타내지 않았다.

실험에 사용한 약물

신경세포막에 존재하는 glutamate/aspartate transporter (GLAST), glutamate transporter-1(GLT-1), excitatory amino acid carrier 1(EAAC1) 등을 억제하는 약물로 TBOA[33, 34]를 사용하였다. 별아교세포에서 글루탐산에서 글루타민으로 변화시켜주는 효소인 glutamine synthetase[16, 35, 36]를 억제하는 MSO를 사용하여 글루탐산염의 이동을 억제하였다. TBOA는 Tocris Bioscience(Langford, Bristol, UK)에서 구입하였으며 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액을 이용하여 용해하였다. MSO는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였으며 멸균된 생리식염수에 용해하였다.

통계분석

실험결과의 유의성을 검증하기 위해 다중 그룹에서 반복 측정자료의 분산분석법과 Holm-Sidak 사후 분석법을 이용하였다. 개별 시간에 따른 유의성을 확인하기 위해서 일원배치분산분석(ONE-WAY ANOVA)를 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은 $P < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

결과

정상상태의 실험동물에서 신경세포의 글루탐산운반체를 억제하는 TBOA와 별아교세포에서 글루탐산염 운반을 억제하는 MSO를 소뇌연수조로 주입한 다음 이질통증이 발생하는지를 평가하여 그림 1에 나타내었다. 소뇌연수조로 TBOA(1, 10 μ g)를 주입하면 주입 직후 공기자

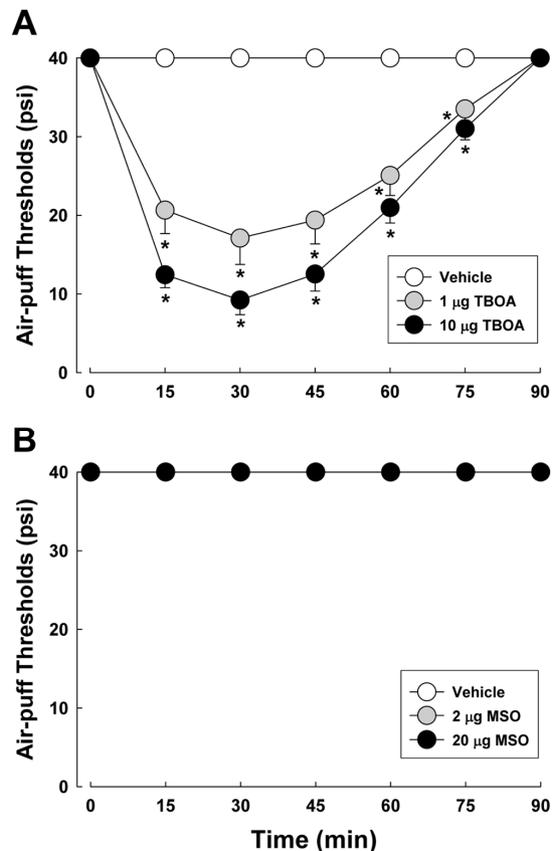


Figure 1. Effects of intracisternal administration of TBOA (1 or 10 μ g), a glutamate transporter inhibitor, or MSO (2 or 20 μ g), a glutamine synthetase inhibitor, on air-puff thresholds in naïve rats. (A) Intracisternal administration of TBOA decreased significantly air-puff thresholds. (B) Intracisternal administration of MSO did not alter air-puff thresholds. * $P < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group, $n=8$ animals per group.

극에 의한 억제값이 유의하게 낮게 나타났으며 이러한 억제작용은 주입 후 75분까지 지속하였다($P < 0.05$). 그러나 소뇌연수조로 MSO(2, 20 μg)을 투여하였을 때는 공기자극의 역치에 아무런 영향을 나타내지 못하였다.

그림 2는 안면 피하조직으로 IL-1 β 를 투여하여 염증을 유발한 실험동물에서 나타나는 이질통증에 TBOA나 MSO를 소뇌연수조로 주입하였을 때 미치는 영향을 평가하여 나타내었다. 안면 피하조직으로 10 ng의 IL-1 β 를 투여하면 공기자극의 역치를 유의하게 억제하여 이질통증을 유발시켰다. IL-1 β 를 투여한 2시간이 지난 다음 이질통증이 최고로 나타나는 시기에 소뇌연수조로 TBOA (1, 10 μg)를 투여하면 IL-1 β 로 유발되는 이질통증을 유의하게 억제하였다 ($P < 0.05$). 같은 방법으로 MSO를 투여한 다음 이질통증에 미치는 영향을 평가하면 낮은 농도의 MSO(2 μg)를 투여한 군에서는 공기자극 역치에 아무런 영향을 미치지 못하였지만 높은 농도의 MSO(20

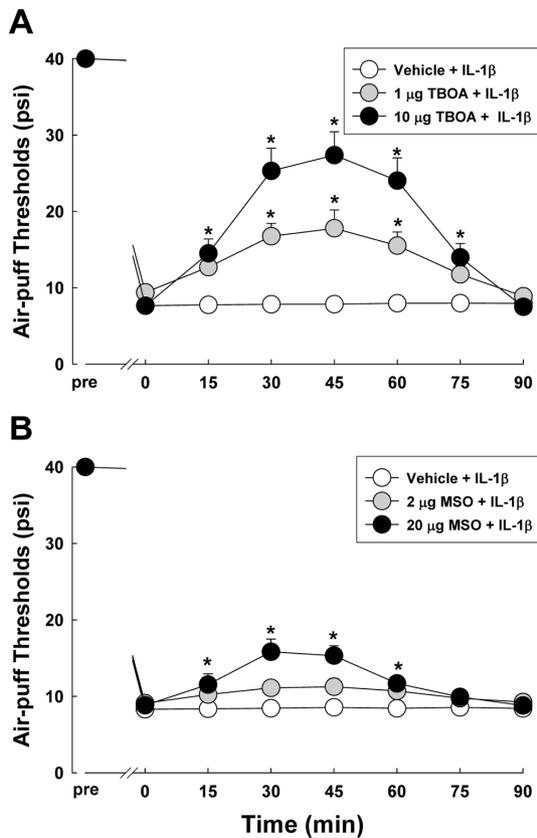


Figure 2. Effects of intracisternal administration of TBOA (1 or 10 μg) or MSO (2 or 20 μg) on IL-1 β -induced mechanical allodynia. Subcutaneous injection of IL-1 β decreased air-puff thresholds. (A) Intracisternal administration of TBOA (1, 10 μg) significantly attenuated IL-1 β -induced mechanical allodynia. (B) Intracisternal administration of high dose of MSO (20 μg) attenuated IL-1 β -induced mechanical allodynia. * $P < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group, $n=8$ animals per group.

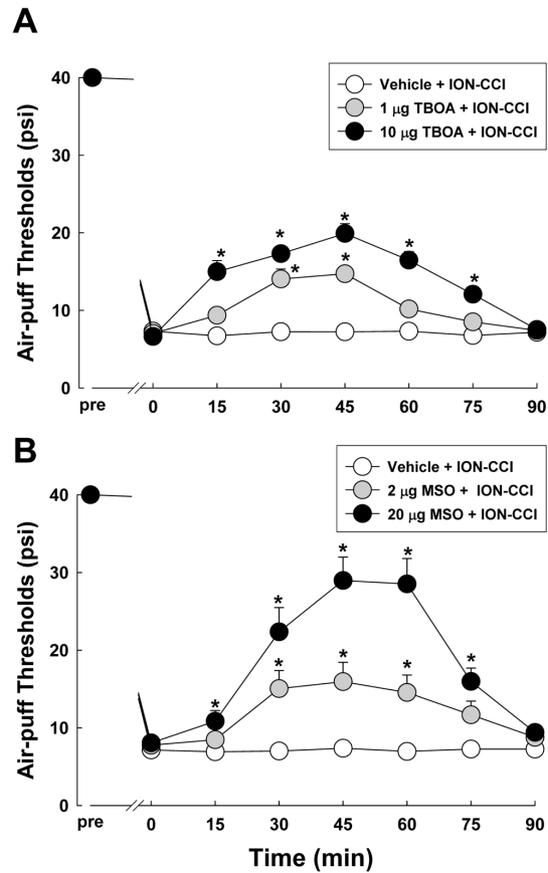


Figure 3. Effects of intracisternal administration of TBOA (1 or 10 μg) or MSO (2 or 20 μg) on trigeminal neuropathic mechanical allodynia. Chronic constriction injury of infraorbital nerve (CCI-ION) produced mechanical allodynia. Intracisternal administration of both TBOA (A) or MSO (B) attenuated trigeminal neuropathic mechanical allodynia. * $P < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group, $n=8$ animals per group.

μg)를 투여한 군에서는 이질통증을 유의하게 억제하였다($P < 0.05$). 그러나 TBOA가 이질통증을 억제하는 효과 보다는 낮게 나타났다.

그림 3은 안와하신경을 결찰하였을 때 나타나는 이질통증에 소뇌연수조로 TBOA나 MSO를 투여하였을 때 미치는 효과를 나타내었다. 안와하신경을 결찰하면 수술 후 2일이 지나 이질통증이 유발하였고 발생한 이질통증은 20일 이상 지속되었다. 신경손상 후 이질통증이 최고로 나타나는 7일째 소뇌연수조로 TBOA나 MSO를 투여하였다. 소뇌연수조로 TBOA(1, 10 μg)를 투여하면 신경손상으로 발생하는 이질통증이 유의하게 억제되었다($P < 0.05$). 또한 MSO(2, 20 μg)를 투여한 군에서도 이질통증을 유의하게 억제하였다 ($P < 0.05$). 고농도인 20 μg 의 MSO를 투여한 다음 나타나는 진통작용을 통증모델에 따라 비교하였을 때 IL-1 β 를 투여한 실험동물에서 나타나는 진통작용보다 신경손상을 가한 실험동물에서 나타나는 진통작용이 더 크게 나타났다.

고찰

본 연구에서는 소뇌연수조로 글루탐산 항상성을 조절하는 TBOA나 MSO를 각각 투여한 다음 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다. 정상 실험동물에서는 신경세포의 글루탐산운반체를 차단하는 TBOA는 이질통증을 유발시켰으나 별아교세포에서 글루탐산 운반을 차단하는 MSO는 이질통증을 발생시키지 못하였다. IL-1 β 를 주입하여 염증성 통증을 유발시킨 실험동물이나 안와화신경을 묶어 신경병성통증을 야기한 실험동물에서 TBOA는 정상동물에서와는 반대로 진통작용이 나타났다. 소뇌연수조로 투여한 MSO는 염증과 신경손상으로 야기되는 이질통증을 모두 감소시켰으나 신경손상으로 인한 이질통증의 억제효과가 더 크게 나타났다. 이러한 실험결과는 글루탐산염의 운반이 차단되면 안정상태 또는 통증이 발생한 상태에 따라 통증반응이 서로 다르게 나타난다는 것을 보여준다. 안정상태에서는 신경세포의 글루탐산염의 운반체가 주로 통증조절에 작용하며, 급성통증에서 만성통증으로 진행될수록 별아교세포의 글루탐산염 운반이 통증 조절에 더 중요하다는 것으로 보여준다.

흥분성 아미노산인 글루탐산염은 일차구심신경말단에서 분비되어 흥분신호를 조절하는데 이때 글루탐산염 운반체가 시냅스에서 글루탐산염의 농도를 조절한다[3]. 현재까지 포유류 신경세포에 존재하는 글루탐산염 운반체는 GLAST, GLT-1, EAAC1, excitatory amino-acid transporter 4(EAAT4), excitatory amino-acid transporter 5(EAAT5) 등 5개가 확인되었다[3, 38, 39]. 본 연구에서는 신경세포에 존재하는 GLAST, GLT-1, EAAC1을 억제하는 TBOA와 별아교세포에서 글루탐산에서 글루타민으로 변화시키는 glutamine synthetase[16, 35, 36]를 억제하여 글루탐산염 농도를 조절하는 MSO를 소뇌연수조로 주입하여 이질통증 발생에 미치는 영향을 평가하였다. 정상적인 환경에서는 굵은 신경섬유는 통증이나 이질통증을 유발하지 않는다. 그러나 염증상태와 신경손상과 같은 병적인 상태가 되면 굵은 신경섬유가 이질통증 발생에 관여한다고 알려져 있다[24].

정상상태의 실험동물에 소뇌연수조로 투여한 TBOA는 이질통증을 유발하였으나 MSO를 투여하면 이질통증이 발생하지 않았다. 이러한 실험결과는 정상상태에서 척수의 신경시냅스에서 글루탐산염의 농도가 일정하게 유지되는데 신경세포에 존재하는 글루탐산염 운반체가 주로 작용하며 별아교세포에서 글루탐산염을 농도를 조절하는 기능은 정상상태에서는 중요하게 작용하지 않는다는 것을 알 수 있다. 이와 같이 글루탐산염 운반체가 통증발생

에 중요하게 작용한다는 것은 선행연구들의 연구결과와 일치하고 있다. 글루탐산염 운반체 발현을 증가시키면 통증이 억제되었고[40] 운반체 발현을 억제시키면 통증이 유발되었다[41]. 이러한 실험 결과는 글루탐산염 운반체 작용이 증가하여 글루탐산염의 농도가 낮아지면 통증 전도를 억제할 수 있으며 글루탐산염 운반체 작용이 감소하여 글루탐산염의 농도가 증가하면 통증이 유발될 수 있다는 것을 설명하고 있다. 또한 선행연구에서 글루탐산염 운반을 차단하여 시냅스의 글루탐산염 농도를 증가시킬 경우 정상 실험동물에서 열통증을 유발시켰다[37]. 이러한 실험결과에서 글루탐산염 농도 조절이 이질통증 전도뿐만 아니라 열통증 발생에도 중요한 역할을 한다는 사실을 알 수 있으며 글루탐산의 농도조절이 새로운 통증조절 방안이 될 수 있다는 것을 보여주고 있다.

본 연구에서 글루탐산염 운반체의 억제는 정상 실험동물에서 이질통증을 유발하였기 때문에 통증이 유발된 실험동물에서는 더욱 통증을 증가시킬 것으로 예상된다. 그러나 소뇌연수조로 주입한 TBOA나 MSO는 염증이나 신경손상으로 유발된 이질통증을 오히려 억제하였다(paradoxical antinociception). 이와 같은 역설적 진통작용(paradoxical anti-nociception)은 선행연구에서도 관찰할 수 있었다. 선행연구에서 글루탐산염 운반을 차단하여 시냅스의 글루탐산염 농도를 증가시킬 경우 정상 실험동물에서는 열통증을 유발시켰지만 염증에 의해 발생하는 열통증은 오히려 억제하였다[37]. 또한 GLAST를 유전자 조작으로 제거한 실험동물의 뇌척수액에서 글루탐산염의 농도가 증가한 것을 직접 관찰하였으며, 포르말린 주입으로 유발되는 통증 행위반응이 억제하였다[42]. 그러나 글루탐산염 운반체 조절로 나타나는 진통작용은 단순히 글루탐산염의 농도조절 뿐만 아니라 다른 작용기전이 관여할 가능성도 있어 기전을 정확하게 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요해 보인다.

별아교세포는 글루탐산염을 glutamine synthetase을 이용하여 글루타민으로 변화시켜 세포 밖으로 배출시켜 시냅스에서 글루탐산염의 농도를 조절하는 것으로 알려져 있다[14, 43, 44]. 본 연구에서 glutamine synthetase를 억제하는 MSO를 소뇌연수조로 투여하여 이질통증 발생에 미치는 영향을 평가하였다. 소뇌연수조로 투여한 MSO는 정상상태의 실험동물에서는 이질통증을 발생시키지 못하였으나 IL-1 β 에 의해 야기되는 염증과 신경손상으로 발생하는 이질통증을 유의하게 억제하였다. 그러나 상대적으로 염증에 의한 이질통증의 억제효과보다 신경병성 이질통증이 더 크게 억제되었다. 이러한 실험결과는 별아교세포에서 조절하는 글루탐산염의 농도는 정상상태보다 통증이 발생한 상태에서 더욱 중요하게 작용하며, 급성통

증 보다 만성통증 발생에서 보다 중요하게 작용한다는 것으로 알 수 있다. 또한 별아교세포에서 글루탐산염 조절 방법이 신경손상으로 나타나는 신경병성 통증 치료에 새로운 치료방법으로 개발될 수 있다는 것을 보여 준다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 IL-1 β 를 주입하여 염증을 유발시킨 실험동물이나 안와하신경을 묶어 신경손상을 야기한 실험동물에서 글루탐산염의 운반을 차단하면 진통작용이 나타났다. 따라서 향후 글루탐산염의 운반을 조절하는 것이 진통제 개발에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) and funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2012M3A9B6055414).

References

- Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2011;130:283-309. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.005.
- Yoshimura M, Jessell T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord. *J Physiol.* 1990;430:315-335.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65:1-105.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 1996;16:675-686.
- Lievens JC, Bernal F, Forni C, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L. Characterization of striatal lesions produced by glutamate uptake alteration: cell death, reactive gliosis, and changes in GLT and GADD45 mRNA expression. *Glia.* 2000;29:222-232.
- Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem.* 1996;271:5976-5979.
- Liaw WJ, Stephens RL Jr, Binns BC, Chu Y, Sepkuty JP, Johns RA, Rothstein JD, Tao YX. Spinal glutamate uptake is critical for maintaining normal sensory transmission in rat spinal cord. *Pain.* 2005;115:60-70.
- Weng HR, Chen JH, Cata JP. Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. *Neuroscience.* 2006;138:1351-1360.
- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:8733-8738.
- Jabaudon D, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5610-5615.
- Niederberger E, Schmidtko A, Rothstein JD, Geisslinger G, Tegeder I. Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1. *Neuroscience.* 2003;116:81-87.
- Yaster M, Guan X, Petralia RS, Rothstein JD, Lu W, Tao YX. Effect of inhibition of spinal cord glutamate transporters on inflammatory pain induced by formalin and complete Freund's adjuvant. *Anesthesiology.* 2011;114:412-423. doi: 10.1097/ALN.0b013e318205df50.
- Fonseca LL, Monteiro MA, Alves PM, Carrondo MJ, Santos H. Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia.* 2005;51:286-296.
- Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 2004;27:735-743.
- Chiang CY, Wang J, Xie YF, Zhang S, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Astroglial glutamate-glutamine shuttle is involved in central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn. *J Neurosci.* 2007;27:9068-9076.
- Tsuboi Y, Iwata K, Dostrovsky JO, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. *Eur J Neurosci.* 2011;34:292-302. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07747
- Kim HJ, Lee GW, Kim MJ, Yang KY, Kim ST, Bae YC, Ahn DK. Antinociceptive Effects of Transcytosed Botulinum Neurotoxin Type A on Trigeminal Nociception in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015;19:349-355. doi: 10.4196/kjpp.2015.19.4.349
- Yang GY, Lee MK, Bae YC, Ahn DK. Intracisternal administration of COX inhibitors attenuates mechanical allodynia following compression of the trigeminal ganglion in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:589-595. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.02.010
- Yang KY, Kim MJ, Ju JS, Park SK, Lee CG, Kim ST, Bae YC, Ahn DK. Antinociceptive Effects of Botulinum Toxin Type A on Trigeminal Neuropathic Pain. *J Dent Res.* 2016;95:1183-1190. doi: 10.1177/0022034516659278.
- Jeon HJ, Han SR, Lim KH, Won KA, Bae YC, Ahn DK. Intracisternal administration of NR2 subunit antagonists

- attenuates the nociceptive behavior and p-p38 MAPK expression produced by compression of the trigeminal nerve root. *Mol Pain*. 2011;7:46. doi: 10.1186/1744-8069-7-46.
21. Won KA, Kim MJ, Yang KY, Park JS, Lee MK, Park MK, Bae YC, Ahn DK. The glial-neuronal GRK2 pathway participates in the development of trigeminal neuropathic pain in rats. *J Pain*. 2014;15:250-261. doi: 10.1016/j.jpain.2013.10.013.
 22. Ahn DK, Jung CY, Lee HJ, Choi HS, Ju JS, Bae YC. Peripheral glutamate receptors participate in interleukin-1beta-induced mechanical allodynia in the orofacial area of rats. *Neurosci Lett*. 2004;357:203-206.
 23. Ahn DK, Kim KH, Jung CY, Choi HS, Lim EJ, Youn DH, Bae YC. Role of peripheral group I and II metabotropic glutamate receptors in IL-1beta-induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *Pain*. 2005;118:53-60.
 24. Kim MJ, Lee SY, Yang KY, Nam SH, Kim HJ, Kim YJ, Bae YC, Ahn DK. Differential regulation of peripheral IL-1 β -induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats. *Pain*. 2014;155:723-732. doi: 10.1016/j.pain.2013.12.030
 25. Imamura Y, Kawamoto H, Nakanishi O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*. 1997;116:97-103.
 26. Lim EJ, Jeon HJ, Yang GY, Lee MK, Ju JS, Han SR, Ahn DK. Intracisternal administration of mitogen-activated protein kinase inhibitors reduced mechanical allodynia following chronic constriction injury of infraorbital nerve in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31:1322-1329.
 27. Ahn DK, Lee SY, Han SR, Ju JS, Yang GY, Lee MK, Youn DH, Bae YC. Intratrigeminal ganglionic injection of LPA causes neuropathic pain-like behavior and demyelination in rats. *Pain*. 2009a;146:114-120. doi: 10.1016/j.pain.2009.07.012.
 28. Ahn DK, Lim EJ, Kim BC, Yang GY, Lee MK, Ju JS, Han SR, Bae YC. Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats. *Eur J Pain*. 2009b;13:568-575. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.07.008.
 29. Lee MK, Shin HJ, Yang GY, Yoon YW, Han SK, Bae YC, Ahn DK. Intracisternal and intraperitoneal administration of morphine attenuates mechanical allodynia following compression of the trigeminal ganglion in rats. *J Orofac Pain*. 2010;24:113-121.
 30. Kim MJ, Shin HJ, Won KA, Yang KY, Ju JS, Park YY, Park JS, Bae YC, Ahn DK. Progesterone produces antinociceptive and neuroprotective effects in rats with microinjected lysophosphatidic acid in the trigeminal nerve root. *Mol Pain*. 2012;8:16. doi: 10.1186/1744-8069-8-16.
 31. Han SR, Yang GY, Ahn MH, Kim MJ, Ju JS, Bae YC, Ahn DK. Blockade of microglial activation reduces mechanical allodynia in rats with compression of the trigeminal ganglion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;36:52-59. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.10.007.
 32. Jeon HJ, Han SR, Park MK, Yang KY, Bae YC, Ahn DK. A novel trigeminal neuropathic pain model: compression of the trigeminal nerve root produces prolonged nociception in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38:149-158. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.03.002
 33. Shigeri Y, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Seal RP, Yumoto N, Nakajima T, Amara SG. Effects of threo-beta-hydroxyaspartate derivatives on excitatory amino acid transporters (EAAT4 and EAAT5). *J Neurochem*. 2001;79:297-302.
 34. Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, Nakajima T. DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol*. 1998;53:195-201.
 35. Liang SL, Carlson GC, Coulter DA. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci*. 2006;26:8537-8548.
 36. Sugimoto H, Koehler RC, Wilson DA, Brusilow SW, Traystman RJ. Methionine sulfoximine, a glutamine synthetase inhibitor, attenuates increased extracellular potassium activity during acute hyperammonemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:44-49.
 37. Yang KY, Mun JH, Park KD, Kim MJ, Ju JS, Kim ST, Bae YC, Ahn DK. Blockade of spinal glutamate recycling produces paradoxical antinociception in rats with orofacial inflammatory pain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;57:100-109. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.10.011.
 38. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992;360:467-471.
 39. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10955-10959.
 40. Yang M, Roman K, Chen DF, Wang ZG, Lin Y, Stephens RL Jr. GLT-1 overexpression attenuates bladder nociception and local/cross-organ sensitization of bladder nociception. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300:F1353-1359. doi: 10.1152/ajprenal.00009.2011.
 41. Weng HR, Aravindan N, Cata JP, Chen JH, Shaw AD, Dougherty PM. Spinal glial glutamate transporters downregulate in rats with taxol-induced hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2005;386:18-22.
 42. Niederberger E, Schmidtko A, Coste O, Marian C, Ehnert C, Geisslinger G. The glutamate transporter GLAST is involved in spinal nociceptive processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346:393-399.
 43. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*. 1997;21:56-63.
 44. Bacci A, Sancini G, Verderio C, Armano S, Pravettoni E, Fesce R, Franceschetti S, Matteoli M. Block of glutamate-glutamine cycle between astrocytes and neurons inhibits epileptiform activity in hippocampus. *J Neurophysiol*. 2002;88:2302-2310.