

## 흰쥐 삼차신경절 신경세포에서 P2X3와 vesicular glutamate transporters의 발현양식 및 말초 염증에 따른 변화

김윤숙<sup>1,†</sup>, 홍재현<sup>1,†</sup>, 조이슬<sup>1</sup>, 배용철<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 치과대학 구강해부학교실

## Expression Patterns of P2X3 and Vesicular Glutamate Transporters in Rat Trigeminal Ganglion Neurons and Their Changes during Peripheral Inflammation

Yun Sook Kim<sup>1,†</sup>, Jaehyun Hong<sup>1,†</sup>, Yi Sul Cho<sup>1</sup>, Yong Chul Bae<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University

**Abstract** : Activation of purinergic receptor P2X3 expressed on the primary sensory neurons, induces the release of glutamate from their central and peripheral afferents, which is involved in both acute and chronic pain. However, little is known about the type of vesicular glutamate transporter (VGLUT) that is involved in the glutamate release associated with P2X3 activation. To address this issue, we investigated the expression of P2X3, VGLUT1, and VGLUT2 in rat trigeminal ganglion neurons by immunofluorescence under the normal condition and following inflammation induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA)-injection into the rat vibrissa pad. In addition, we examined the ultrastructure of P2X3-immunopositive (+) central terminals by electron microscopy. P2X3+ neurons were mostly small to medium-sized and frequently coexpressed VGLUT2, but rarely VGLUT1. In the CFA group, which exhibited thermal hyperalgesia, there was a significant increase in the number of P2X3+, VGLUT2+, and VGLUT2+/P2X3+ neurons compared with controls (P2X3+ neurons: 39.0% vs. 28.4%, VGLUT2+ neurons: 44.6% vs. 34.9%, VGLUT2+/P2X3+ neurons: 33.8% vs. 22.5%,  $p < 0.05$ ). Conversely, the numbers of VGLUT1+ and VGLUT1+/P2X3+ neurons did not significantly differ between the CFA group and controls (VGLUT1+ neurons: 28.8% vs. 28.4%, VGLUT1+/P2X3+ neurons: 0.6% vs. 0.5%). Additionally, P2X3+ axon terminals in the trigeminal caudal nucleus frequently received an axoaxonic synapse from an axon terminal containing pleomorphic vesicles, suggesting presynaptic modulation of P2X3-mediated sensory signals before synaptic transmission. These results indicate that 1) VGLUT2, rather than VGLUT1, is involved in glutamate release associated with P2X3 activation under acute and inflammatory pain conditions, and 2) P2X3+ primary afferents in the trigeminal caudal nucleus are finely regulated by various presynaptic mechanisms.

**Keywords** : Inflammation, P2X3, Trigeminal ganglion neurons, VGLUT

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2021R1A2C1007061).

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

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

**Received:** August 22, 2024; **Revised:** September 19, 2024;

**Accepted:** September 23, 2024

**Correspondence to:** 배용철 (경북대학교 치과대학 구강해부학교실)

**E-mail:** ycbae@knu.ac.kr

## 서 론

Purinergic 수용기 P2X3는 ATP에 의해 활성화되는 7개의 P2X 수용기 subunits 중 하나인 양이온 채널이다[1-3]. P2X3는 삼차신경절과 뒤뿌리신경절의 작거나 중간크기의 신경세포에서 주로 발현되며, 대부분의 P2X3 면역양성(+) 신경세포는 substance P(SP)와 calcitonin gene-related peptide (CGRP)를 발현하지 않고, isolectin B4 (IB4)를 발현하는 비펩티드성이다[4,5]. 또한 P2X3+ 신경섬유는 척수 뒤뿌리와 삼차신경꼬리핵 표층부의 내측으로 투사하며, 이를 통한 통증 감각은 다양한 고위뇌영역으로 전달되어 처리된다[4,5].

지금까지의 많은 연구들은 P2X3가 급성, 염증성 및 신경병성 통증에 기여한다고 보고하였다[1-3]. 예를 들면, 흰쥐의 발바닥에 P2X3 작용제인  $\alpha, \beta$ -methylene ATP를 주입하면 통증 반응이 나타나며, 이는 P2X3 길항제 및 P2X3 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotides) 투여에 의해 통증 반응이 소실된다[6-8]. 또한 사람의 아래팔에 ATP를 피하주사하면 즉시 통증 감각이 유발된다[9]. P2X3는 조직 손상에 의한 급성 통증에 관여한다고 알려져 있으며[1], 염증성 통증[10,11]과 신경병성 통증을 보이는 동물모델[12,13]에서 ATP, P2X3 작용제, P2X3 길항제 및 P2X3 안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여에 따른 행동분석 연구들은 P2X3가 만성 통증에 기여한다고 보고되고 있다.

삼차신경절과 뒤뿌리신경절에 존재하는 일차감각신경세포는 말초 및 중추성 신경섬유를 내는데, 이는 기계적, 화학적, 온도 자극 및 전기 자극 등 다양한 자극에 의해 활성화될 때 말초 및 중추성 신경섬유에서 glutamate를 분비하여 감각 정보를 전달하고 처리한다[14,15]. 또한, 뒤뿌리신경절과 척수뒤뿌리를 함께 배양한 실험동물에서 ATP 및 P2X3 작용제인  $\alpha, \beta$ -methylene ATP를 처리하여 P2X3 수용기를 활성화하면 일차감각신경세포의 말초 및 중추성 신경섬유에서 glutamate가 분비되거나 이의 분비가 항진되며, 이는 P2X3 수용기에 의해 매개되는 급성 및 만성 통증에 중요한 역할을 한다[16,17]. 그러나 P2X3 활성화 시에 어떤 기전에 의해 일차감각신경세포에서 glutamate가 분비되어 급성 및 만성 통증에 기여하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

Vesicular glutamate transporter (VGLUT)는 glutamate를 연결소포에 탑재하여 이의 분비에 관여하는 단백질로서 말초 및 중추신경계에서 glutamate성 신경전달에 중요한 역할을 하며, glutamate성 신경세포의 표지자로 사용되고 있다[18]. VGLUT의 3가지 isoform 중 VGLUT1과 VGLUT2는 다수의 일차감각신경세포에서 발현되며, 뒤뿌리신경절과 삼

차신경절에서 VGLUT1과 VGLUT2가 발현되는 1) 신경세포의 크기, 2) 이들의 SP, CGRP, IB4와 neurofilament 200 등과의 공존양식, 그리고 3) 척수뒤뿌리 및 삼차신경꼬리핵에서 VGLUT를 발현하는 일차구심성신경섬유의 투사양식 등이 각기 다르다고 보고되었다[18,19]. 이러한 연구 결과들은 VGLUT1과 VGLUT2가 각기 다른 유형의 일차구심성신경세포에서 발현될 것임을 시사한다. 또한, VGLUT2 발현량을 특이적으로 조절한 마우스 모델에서 VGLUT2가 급성 통증, 염증성 및 신경병성 통증에 관여한다는 다양한 행동분석 결과들이 보고되었다[20,21]. 그러나 VGLUT1 이형접합체 (+/-) 마우스는 염증성 및 신경병성 통증 동물모델에서 정상적인 통증 반응을 보인다고 보고되었으며[21], VGLUT1 결손마우스는 생후 초기에 사망하기 때문에[22], 감각운동계(sensorymotor system)에서 VGLUT1의 역할에 대해서는 명확하게 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 1) 흰쥐의 삼차신경절에서 P2X3+ 신경세포가 어떤 유형의 VGLUTs를 발현하는지 조사하였으며, 2) 흰쥐의 vibrissa pad에 Complete Freund's Adjuvant (CFA)를 주입하여 말초 염증성 통증을 유발한 후, 삼차신경절 신경세포에서 P2X3, VGLUT1 및 VGLUT2의 발현변화를 분석하였으며, 마지막으로 3) P2X3 수용기 매개 통증 정보가 뇌줄기(brain stem) 내 일차연접에서 어떤 양식으로 전달되는지 이해하기 위해서, 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 중추성 신경종말의 미세구조를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험에 사용된 실험동물의 보호 및 처치 과정은 경북대학교 동물실험윤리위원회(Intramural Animal Care and Use Committee, KNU2017-139)의 승인하에 진행되었으며, 미국 국립보건원(National Institutes of Health)의 지침에 따라 수행되었다. 본 실험에서는 Sprague-Dawley 계통의 수컷 흰쥐(250~300 g) 12마리를 사용하였으며, 이들은 정상군 6마리, 염증성 통증을 유발한 실험군과 대조군 각 3마리씩 구분하여 사용하였다.

### 2. 염증성 통증을 보이는 실험동물 모델

실험동물은 ketamine (40 mg/kg, 유한 케타민 50 주사, 유한양행, Seoul, Korea)과 rompun (10 mg/kg, 바이엘코리아, Seoul, Korea) 혼합액을 근육에 주사하여 마취하였다. 이후

만성 염증성 통증을 유발하기 위해 실험군에는 Complete Freund's Adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)와 생리식염수를 동일한 비율로 섞은 혼합용액(40  $\mu$ L)을, 그리고 대조군에는 생리식염수(40  $\mu$ L)를 왼쪽 안면부 수염이 위치한 피하부위에 주입하였다. 주입 후 1일, 3일과 4일째 레이저 자극기를 이용하여 용액을 주입한 위치에서 10 cm 떨어진 부위에 평행하게 열 자극을 가한 후, 얼굴 도피반응을 보이기까지의 시간(head withdrawal latency)을 측정하여 통증 반응을 평가하였다. 레이저 자극의 강도는 5 W, 12.2 A로 고정하였고, 각 동물당 5분 간격으로 3회 측정하여 평균값을 산출하였다. 또한, 피부손상을 방지하기 위해 14초의 cut-off time을 설정하였다.

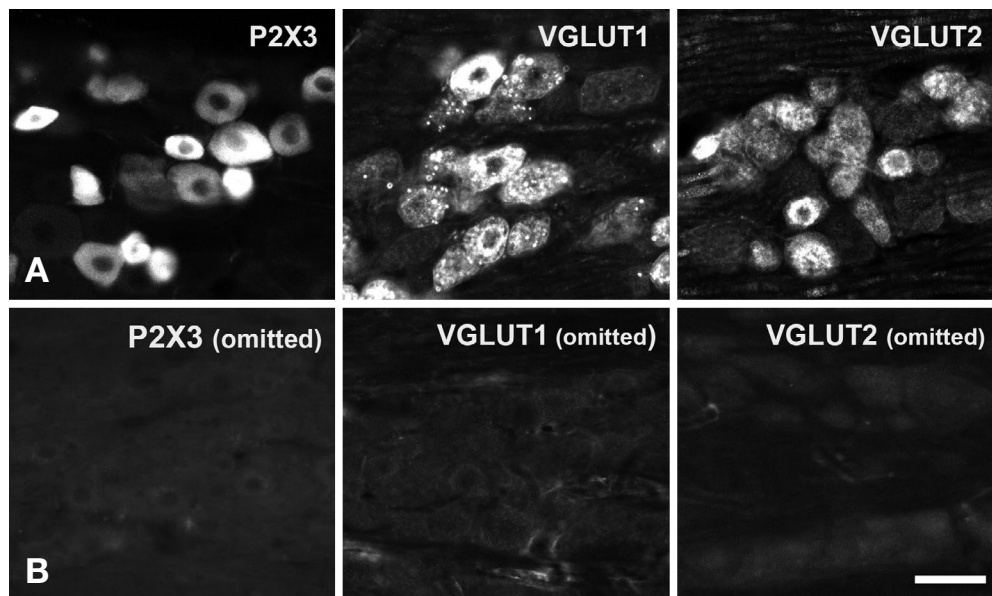
### 3. 광학 및 전자현미경 관찰을 위한 조직 샘플처리

Urethane (1.2 g/kg, i.p., Sigma-Aldrich)을 사용하여 실험 동물을 깊게 전신마취시킨 다음, 좌심실과 연결된 오름대동맥을 통하여 100 mL의 헤파린이 함유된 생리식염수를 주입하여 혈액을 제거한 후, 400 mL의 고정액을 사용하여 관류 고정을 시행하였다. 면역형광염색을 위해서 삼차신경절을 적출하였고, 전자현미경 분석을 위해서 뇌줄기를 적출하였다. 이후 관류고정에 사용한 것과 동일한 고정액(4°C)에서 약 2 시간 동안 후고정을 시행하였다. 면역형광염색을 위해 사용한 고정액은 4% paraformaldehyde (PFA, in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4))였고, 전자현미경 분석을 위해 사

용한 고정액은 1% PFA와 0.01% glutaraldehyde 혼합액(in PB, pH 7.4)을 사용하였다. 이후 조직을 PB (pH 7.4)로 세척한 다음 동결 시 발생할 수 있는 조직 손상을 최소화하기 위하여 30% sucrose 용액에 담구어 4°C에서 약 24시간 동안 침적시켰다. 이후 면역형광염색을 위해서는 동결절편기를 사용하여 30  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하였고, 전자현미경 분석을 위해서는 Vibratome (Vibratome 3000, The Vibratome Company, St. Louis, MO)을 사용하여 50  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하였다.

### 4. 광학현미경적 면역형광염색법

면역형광염색을 위한 모든 반응은 실온에서 진행하였다. 절편 내 항체의 침투를 용이하게 하기 위해 절편들을 50% 에탄올에서 30분 동안 침적시킨 후 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 5분간 3회의 세척 과정을 거쳤다. 항체의 비특이적 반응을 최소화하기 위해 10% normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)에서 30분간 반응하였다. 이후 실험목적에 맞게 일차항체를 준비하여 약 16시간 동안 반응시켰다. 이 실험에서 사용된 일차항체는 rabbit anti-P2X3 (1 : 1000; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), goat anti-VGLUT1 (1 : 300; Frontier Institute Co. Ltd., Hokkaido, Japan) 혹은 guinea pig anti-VGLUT2 (1 : 200; Frontier Institute Co. Ltd.)이다. 이후 0.01 M PBS로 10분씩 3회 세척 후 2% NDS에 30분간 반



**Fig. 1.** Immunofluorescent staining for P2X3, VGLUT1, and VGLUT2 in the trigeminal ganglion neurons (A). The P2X3, VGLUT1, and VGLUT2 immunostaining was abolished by the omission of each primary antibody (B). Scale bar = 50  $\mu$ m.

응한 다음, 이차항체에서 3시간 동안 반응하였다. 사용한 이차항체는 Cyanine 3 (Cy3)-conjugated donkey anti-rabbit 와 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-goat 혹은 FITC-conjugated donkey anti-guinea pig (1 : 200; Jackson ImmunoResearch)의 혼합액이다. 이후, 절편들을 세척하고 형광용 슬라이드 위에 도포한 후, 형광 보존액인 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하여 밀폐하였다. 절편의 관찰을 위해 광학현미경(Zeiss Axioplan 2, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)을 사용하였고, 분석을 위한 이미지는 광학현미경에 부착된 디지털카메라(Q-Imaging Inc., Surrey, CA)를 사용하였다.

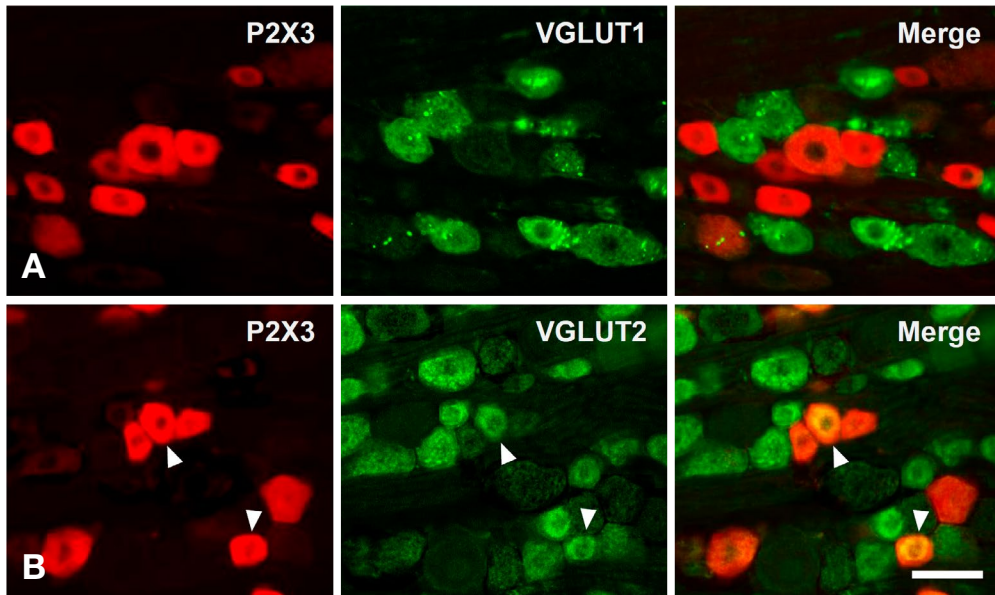
### 5. 면역형광염색에 사용된 항체의 특이성 검증

본 실험에서 사용된 항체의 특이성을 검증하기 위하여 앞서 언급한 면역형광염색을 수행하는 과정에서 일차항체 또는 이차항체를 제외하고 진행하거나, 일차항체를 제작하는 데 사용한 peptide와 일차항체를 실온에서 3시간 반응시킨 후, 원심분리하여 획득한 상층액을 일차항체로 대체하여 실험을 진행하였다. P2X3 항체에 대한 peptide (APR016AG0440, Alomone Labs, 4.8 µg/mL)와 VGLUT2 항체에 대한 peptide (G07B-VGLUT2-AG, Frontier Institute Co. Ltd, 10 µg/mL)로 흡착실험(preadsorption)한 결과, 각 항체에 의한 특이적 면역반응이 사라짐을 관찰하였다. 또한 일차 혹은 이차항체를 제외하고 면역조직화학법을 진행

한 경우 특이적 면역반응이 나타나지 않았음을 관찰하여, 사용한 항체의 특이성을 검증하였다(Fig. 1).

### 6. 정량분석

삼차신경절에서 P2X3+ 신경세포와, P2X3+ 신경세포 중 VGLUT1 또는 VGLUT2가 발현되는 신경세포의 수와 단면적을 측정하기 위하여 3마리의 삼차신경절 절편에서 200배의 배율(857.14×652.94 µm, 1360×1036 pixels)로 12장의 사진을 획득하였다. 세포핵이 가운데 위치하고 뚜렷하게 관찰되는 신경세포를 측정대상으로 사용하였으며, 면역양성 신경세포의 밝기는 최대 255 회색값에서 100~120 정도로 조정하여 ImageJ software (v1.38, NIH, Bethesda, MD)를 이용하여 분석하였다. 신경세포의 단면적이 500 µm<sup>2</sup> 이하를 작은 신경세포로, 500 µm<sup>2</sup> 이상 1000 µm<sup>2</sup> 이하를 중간크기 신경세포, 그리고 1000 µm<sup>2</sup> 이상을 큰 신경세포로 분류하였다. 실험군과 대조군의 흰쥐 삼차신경절에서 P2X3+ 신경세포와 P2X3+ 신경세포 중 VGLUT1 또는 VGLUT2가 발현된 신경세포의 수를 정량분석하기 위해, 각 군의 3마리 흰쥐 삼차신경절에서 위턱을 지배하는 신경세포가 위치하는 영역에서 200배의 배율(857.14×652.94 µm, 1360×1036 pixels)로 24장의 사진을 획득하고, 앞서 언급한 방법으로 분석하였다. 실험군과 대조군에서 분석한 전체 신경세포 중 P2X3+ 신경세포의 비율값(proportion)과 P2X3+ 신경세포 중 VGLUT1 또는 VGLUT2를 발현하는 신경세포의 비율값은



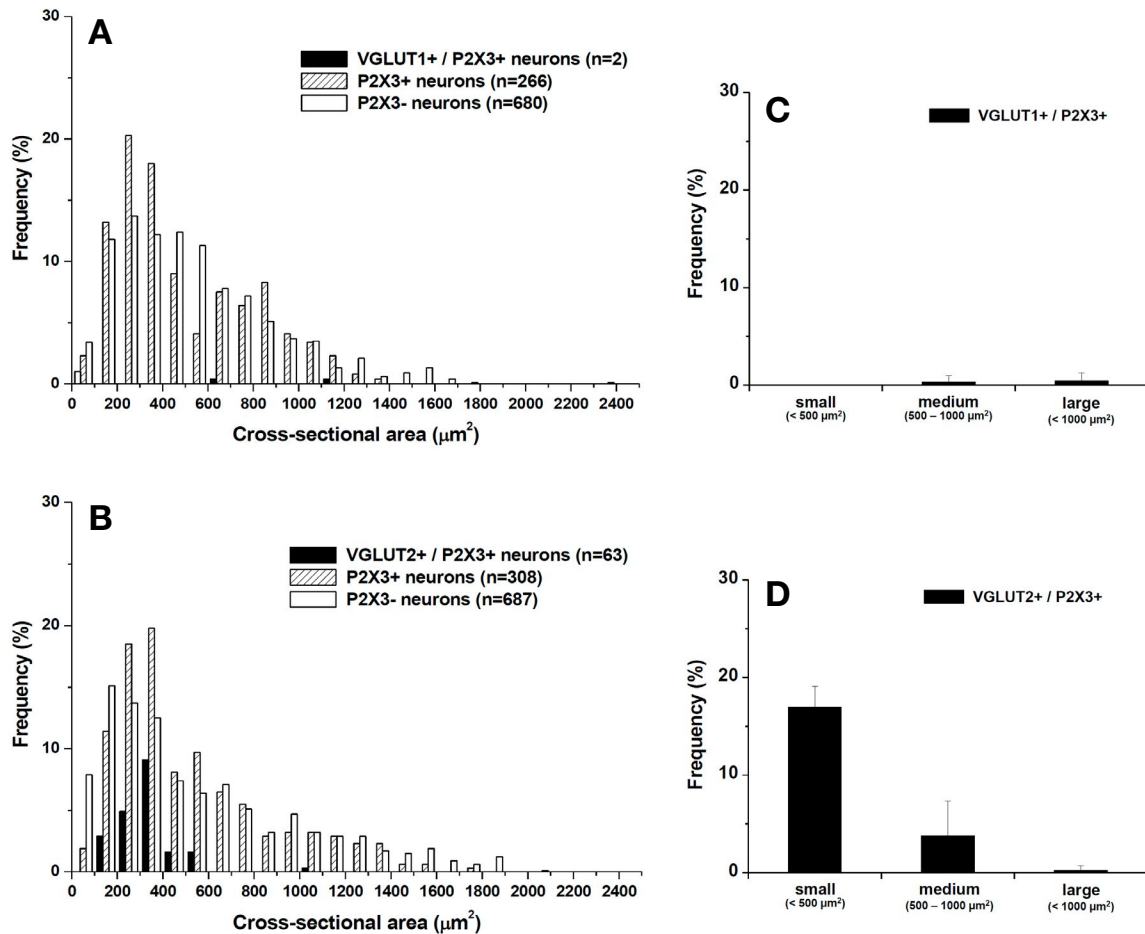
**Fig. 2.** Double immunofluorescent staining for P2X3 and VGLUT1 (A) or VGLUT2 (B) in the trigeminal ganglion. P2X3+ neurons rarely co-expressed VGLUT1 but frequently coexpressed VGLUT2. Arrowheads in B indicate P2X3+ neurons that coexpress VGLUT2. Scale bar = 50 µm.

mean ± SD 로 표시하였으며, Student's *t*-test를 통하여 통계적 유의성을 검증( $p < 0.05$ )하였다.

**7. 전자현미경적 면역조직화학법**

전자현미경적 면역조직화학법을 위한 모든 반응은 실온에서 진행하였다. 절편 내 항체의 침투를 용이하게 하기 위해 절편들을 드라이아이스 위에서 20분간 동결시킨 후 급속 해동하였다. 이후 0.01 M PBS로 세척 과정을 거친 다음, 1% NaBH<sub>4</sub>에 30분간, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분간 반응하였다. 항체의 비특이적 반응을 최소화하기 위해 10% NDS에 30분간 반응 후, 일차항체인 rabbit anti-P2X3 (1 : 1000; Alomone Labs)에서 약 16시간 동안 반응하였다. 이후, 0.01 M PBS로 세척하고, 2% NDS에서 반응 후 이차항체인 Biotin-conjugated donkey anti-rabbit (1 : 200; Jackson ImmunoResearch) 용액

에서 2시간 동안 반응하였다. 이후 ExtraAvidin peroxidase (1 : 5000; Sigma-Aldrich) 용액에서 1시간 반응 후 nikel-intensified 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride를 사용하여 발색반응을 진행하였다. 이후 1% osmium tetroxide (in 0.1 M PB, pH 7.4) 용액에서 1시간 동안 고정을 한 다음, 계열 에탄올로 탈수 과정을 거쳤으며, propylene oxide로 치환 과정을 거쳐 Durcupan ACM (Fluka, Buchs, Switzerland)으로 포매하여 59°C에서 48시간 동안 경화하였다. 경화된 절편에서 관찰부위를 절단한 다음 순간접착체를 이용하여 공 block 위에 부착한 후, 60 nm 두께의 연속초박절편을 형성하여 formvar film 지지막을 형성한 단공 grid 위에 올렸다. Uranyl acetate 포화용액과 0.3% lead citrate로 이중전자염색을 한 다음, 투과전자현미경(H-7500, Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 분석을 위한



**Fig. 3.** P2X3+ neurons that coexpress VGLUT1 or VGLUT2 in the trigeminal ganglion. A, B: Size distribution (cross-sectional area,  $\mu\text{m}^2$ ) of P2X3+ neurons that coexpressed VGLUT1 (A) or VGLUT2 (B) in the trigeminal ganglion. C, D: Frequency of small- ( $< 500 \mu\text{m}^2$  in cross-sectional area), medium- ( $500 \sim 1000 \mu\text{m}^2$ ), and large-sized ( $> 1000 \mu\text{m}^2$ ) P2X3+ neurons that coexpressed VGLUT1 (VGLUT1+/P2X3+, C) or VGLUT2 (VGLUT2+/P2X3+, D).

이미지는 투과전자현미경에 부착된 디지털 카메라(SC1000, GATAN, Pleasanton, CA)와 GATAN digital micrograph software를 통해 획득하였다.

## 결 과

### 1. 삼차신경절 신경세포에서 P2X3와 VGLUT 공존

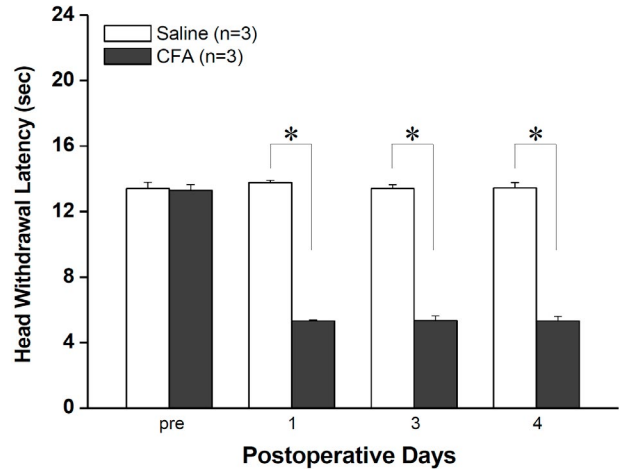
삼차신경절에서 P2X3, VGLUT1 및 VGLUT2 면역양성 반응은 신경세포의 세포질에서 국한되어 관찰되었고, 핵에서는 관찰되지 않았다. P2X3 면역양성 반응은 통각을 전달한다고 여겨지는, 작은크기(52.6%, <math>< 500 \mu\text{m}^2</math> in cross-sectional area)와 중간크기(34.0%, > 1000 \mu\text{m}^2</math>)에서도 간혹 관찰되었다(크기 분포:  $125.6 \sim 1891.4 \mu\text{m}^2</math> in cross-sectional area, Figs. 2, 3). 조직의 급성 손상 및 염증 시에 유리되는 ATP에 의해 P2X3가 활성화되었을 때 유발되는 glutamate 분비에 관여하는 VGLUT의 유형을 분석하기 위해, P2X3와 VGLUT1 또는 VGLUT2에 대한 이중면역형광법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 많은 수의 P2X3+ 신경세포가 VGLUT2 (20.5%)를 발현하였으며, VGLUT1을 발현하는 P2X3+ 신경세포는 거의 관찰되지 않았다(0.8%). VGLUT2는 작은크기(16.9%)와 중간크기(3.3%)의 P2X3+ 신경세포에서 주로 발현되었다(Figs. 2, 3).$

### 2. CFA 주입에 의한 염증성 통증을 나타내는 동물모델

실험동물의 왼쪽 vibrissa pad 부위의 피하조직에 CFA를 주입한 후, 레이저 조사에 의한 열 자극을 가하여 회피반응시간을 측정함으로써 염증성 통증이 유발되었는지 확인하였다. 생리식염수를 주입한 대조군에 비해 CFA 주입 후 1일부터 회피반응시간이 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), CFA 주입 후 4일까지 지속되었다(Fig. 4).

### 3. 염증성 통증 유발군의 삼차신경절 신경세포에서 P2X3와 VGLUT의 발현변화

본 연구에서는 CFA 및 생리식염수 주입 4일 후 실험동물을 희생하여 삼차신경절 신경세포에서 P2X3, VGLUT1 및 VGLUT2의 발현을 비교 분석하였다. 삼차신경절에서 위턱부위를 지배하는 영역에 존재하는 전체 신경세포 중 P2X3+, VGLUT2+, 그리고 VGLUT2+/P2X3+ 신경세포의 백분율은 CFA군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다(P2X3+ 신경세포:  $39.0 \pm 1.3\%$  vs.  $28.4 \pm$



**Fig. 4.** Behavioral assay showing the production of thermal hyperalgesia (decrease in the head withdrawal latency) following the injection of CFA into the rat vibrissa pad. Significant thermal hyperalgesia was evident from 1 day following CFA injection and persisted for 4 days. \* $p < 0.05$  compared with control rats (saline-injected rats).

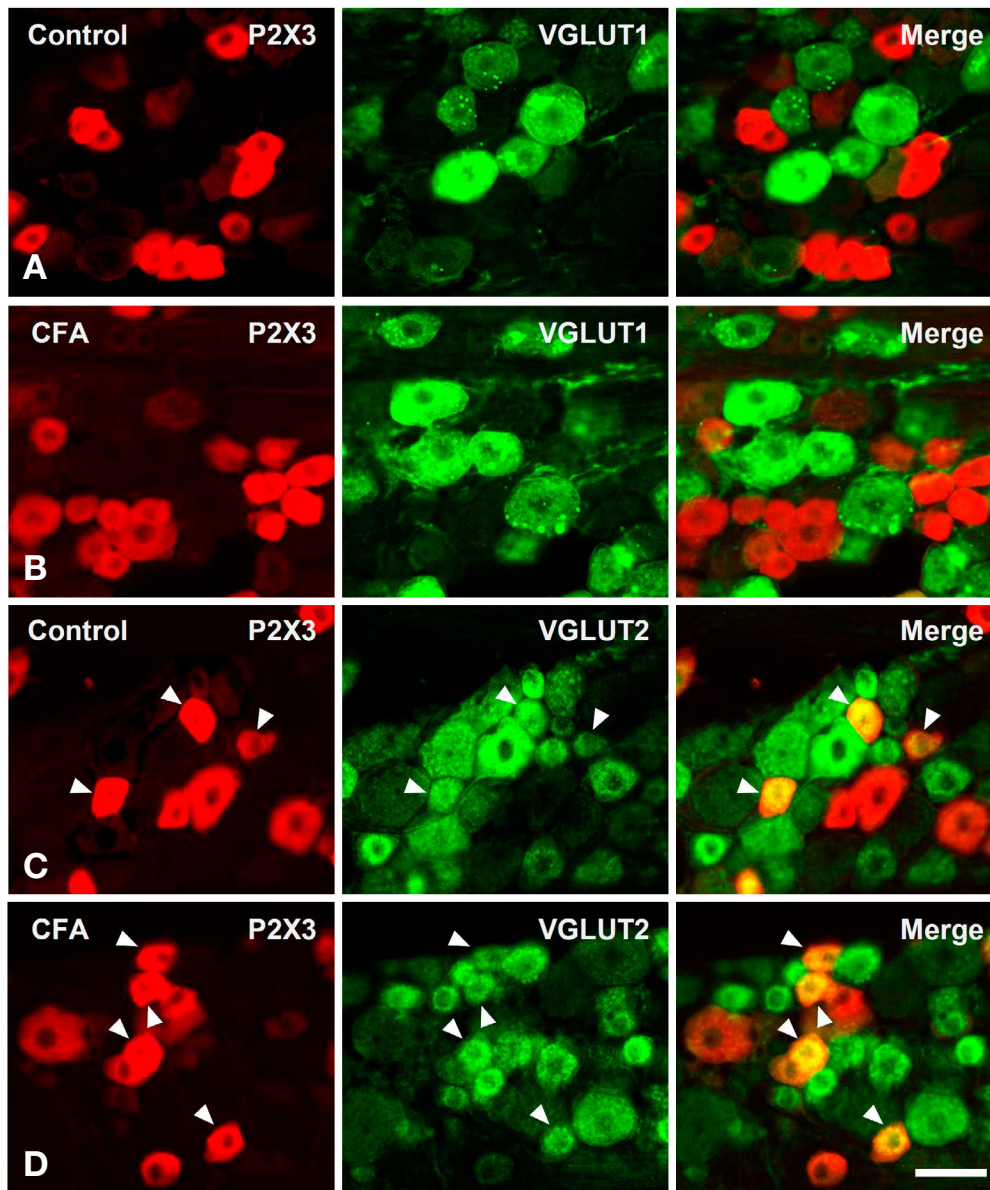
1.4%, VGLUT2+ 신경세포:  $44.6 \pm 1.0\%$  vs.  $34.9 \pm 0.1\%$ , VGLUT2+/P2X3+ 신경세포:  $33.8 \pm 3.0\%$  vs.  $22.5 \pm 2.0\%$ ,  $p < 0.05$ ). 그러나 전체 신경세포 중 VGLUT1+ 신경세포와 VGLUT1+/P2X3+ 신경세포의 백분율은 CFA군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다(VGLUT1+ 신경세포:  $28.8 \pm 0.0\%$  vs.  $28.4 \pm 0.7\%$ , VGLUT1+/P2X3+ 신경세포:  $0.6 \pm 0.7\%$  vs.  $0.5 \pm 0.5\%$ , Figs. 5, 6).

### 4. 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 축삭종말의 미세구조

전자현미경으로 관찰한 결과, 전자밀도가 치밀한 P2X3 면역반응 산물은 주로 삼차신경꼬리핵 lamina II의 내측부에서 축삭종말의 세포질에서 관찰되었다. 이들 P2X3+ 축삭종말은 다양한 크기를 보였으며, 다수의 구형 소포를 함유하였다. P2X3+ 축삭종말은 주로 작거나 중간크기의 가지돌기와 비대칭 연결을 이루었으며, 세포체나 과립세포질그물을 포함하는 근위부 가지돌기와 연결은 드물었다. 또한, P2X3+ 축삭종말이 다수의 가지돌기와 연결하거나, 다양한 형태의 소포를 함유하는 축삭종말로부터 연결을 받는 경우가 자주 관찰되었다(Fig. 7).

## 고 찰

본 연구에서 밝혀진 주요 연구 결과는 다음과 같다. 1) 정상 삼차신경절에서 다수의 P2X3+ 신경세포가 VGLUT2를 발현하였으며, VGLUT1의 발현은 거의 없었다. 2) 말



**Fig. 5.** Double immunofluorescent staining for P2X3 and VGLUT1 (A, B) or VGLUT2 (C, D) in the trigeminal ganglion in control (A, C) and CFA-induced inflamed (B, D) rats exhibiting thermal hyperalgesia. P2X3+ neurons rarely coexpressed VGLUT1 but frequently VGLUT2. The number of VGLUT2+/P2X3+ neurons increased in CFA-induced rats compared with controls. Arrowheads in C, D indicate P2X3+ neurons that coexpress VGLUT2. Scale bar = 50  $\mu$ m.

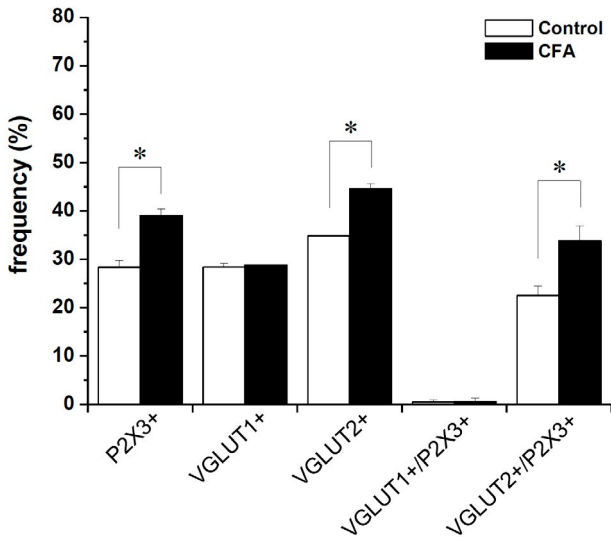
초 염증과 연관된 만성 통증을 보이는 CFA군에서는 대조군에 비해, P2X3+, VGLUT2+ 및 VGLUT2+/P2X3+ 신경세포의 수가 유의하게 증가하였다. 3) 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 축삭종말이 다수의 가지돌기와 연결하거나, 다양한 형태의 소포를 함유하는 축삭종말과 연결하는 미세구조가 관찰되었다. 이러한 결과는 1) 정상 및 염증 상태에서 P2X3의 활성화와 연관된 glutamate 분비에는 주로 VGLUT2에 의해 매개될 것이며, 2) 만성 통증 시 P2X3와 VGLUT2의

활성 증가가 중추 및 말초신경계에서 glutamate 신호전달을 증가시켜, P2X3에 의해 매개되는 통각 과민에 관여할 수 있으며, 마지막으로, 3) 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 일차구심성신경섬유가 다양한 연결이전 기전에 의해 정교하게 조절될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

#### 1. 정상 삼차신경절에서 P2X3+ 신경세포의 VGLUT 발현

P2X3를 발현하는 일차감각신경세포는 조직 손상과 연

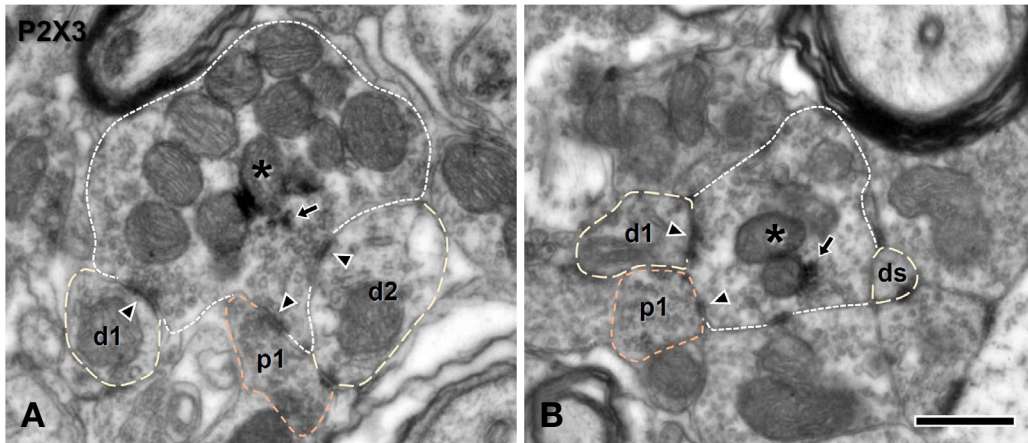
관된 급성 통증에 관여한다고 알려져 있다[1-3]. 예를 들면, P2X3 작용제를 흰쥐의 발바닥에 주입하면 즉시 통증 반응이 나타나며, 이는 P2X3 길항제 및 P2X3 안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여에 의해 소실된다[6-8]. 또한 사람의 피부에 ATP를 주사하면 즉시 통증 감각이 유발된다[9]. P2X3는 삼차신경절 감각신경세포의 세포체에서 합성되어 말초 및 중



**Fig. 6.** Histogram showing the fraction (%) of P2X3<sup>+</sup>, VGLUT1<sup>+</sup>, VGLUT2<sup>+</sup>, VGLUT1+/P2X3<sup>+</sup> and VGLUT2+/P2X3<sup>+</sup> neurons in the trigeminal ganglion in control and CFA induced inflamed rats. The fractions of P2X3<sup>+</sup>, VGLUT2<sup>+</sup> and VGLUT2+/P2X3<sup>+</sup> neurons, but not of VGLUT1<sup>+</sup> and VGLUT1+/P2X3<sup>+</sup> neurons, were significantly increased in the CFA-induced inflamed rats compared with controls (n = 3 rats per group). \*p < 0.05.

추성 신경섬유로 운송되며, 세포막에 매식되어 ATP에 의해 활성화된다. ATP는 조직의 손상, 염증 및 종양 시 말초 조직에서 분비되어, 말초 감각신경섬유에 발현되는 P2X3를 활성화하여 통증 신경섬유를 탈분극하거나 흥분시켜 말초 및 중추성 신경섬유에서 glutamate 분비를 유도하여 통증을 유발한다[1]. 또한, P2X3는 척수뒤뿌리와 삼차신경꼬리핵에서 일차감각신경세포의 중추성 신경섬유종말에서 발현되며, 말초에 유해자극이 가해지면, 중추성 신경섬유에서 ATP가 분비된다[23]. 이는 중추성 신경섬유종말에서 발현되는 연결이전 P2X3 수용기를 활성화함으로써, 이들 종말로부터의 glutamate 분비를 연결이전 기전에 의해 조절하는 것으로 알려져 있다[1].

본 연구에서 P2X3는 주로 작거나 중간크기의 삼차신경절 신경세포에서 강하게 발현되었으며, 큰 신경세포에서도 간혹 발현되었다. 이는 이전에 발표된 연구 결과들과 유사하였다[4,5]. 정상 삼차신경절에서 P2X3를 발현하는 신경세포의 다수는 VGLUT2 (20.5%)를 발현하였다. 이는 일차감각신경세포에서 발현되는 P2X3가 ATP 등과 같은 자극에 의해 활성화되면, P2X3<sup>+</sup> 말초 및 중추성 신경섬유에서 VGLUT2에 의해 매개되는 glutamate 분비가 야기되며, 이를 통한 연결전달 혹은 신호전달이 급성 통증에 관여할 것임을 시사한다. VGLUT1을 발현하는 P2X3<sup>+</sup> 신경세포는 거의 관찰되지 않았는데(0.1%), 이는 VGLUT1이 P2X3 활성화와 연관된 glutamate 분비에 거의 관여하지 않을 것임을 시사한다. 본 연구에서 다수의 P2X3<sup>+</sup> 신경세포는 VGLUT1 또는 VGLUT2를 발현하지 않았다. 대부분의 삼차신경절과 뒤뿌리신경절의 신경세포가 활성화되면 신경전달물질로서



**Fig. 7.** Electron micrographs showing P2X3<sup>+</sup> axon terminals in the trigeminal caudal nucleus. A, B: P2X3<sup>+</sup> axon terminal (asterisk) contained clear round vesicles and was presynaptic to small-sized dendrites (d1, d2) in an asymmetric fashion. It was also occasionally presynaptic to dendritic spine (ds in B). The P2X3<sup>+</sup> axon terminal frequently received an axoaxonic synapse from a presynaptic ending containing pleomorphic vesicles (p1 in A, B) in a symmetric fashion. The arrow indicates the immunoreactive product for P2X3. Arrowheads indicate the site of synapse. Scale bar = 500 nm

glutamate를 분비한다는 점을 고려할 때[24], P2X3 활성화와 연관된 glutamate 분비에는 VGLUT3가 관여하거나, VGLUT 이외의 기전과 연관된 glutamate 분비가 야기될 가능성을 시사한다[25]. 또한, 본 실험에서 사용된 VGLUT1과 VGLUT2 항체에 의해 탐지되지 않는 소량의 VGLUT1 및 VGLUT2가 존재할 가능성도 배제할 수 없으며, 특정 유형의 VGLUT이 존재할 가능성도 있다.

## 2. 삼차신경절 신경세포에서 염증성 통증과 연관된 P2X3와 VGLUT2의 발현증가

다수의 연구들은 P2X3가 염증과 신경 손상 시 야기되는 만성 통증에 관여한다고 보고하였다[1,2]. 예를 들어, 염증 상태에서 ATP 또는  $\alpha, \beta$ -methylene ATP를 가하면 P2X 수용기 매개 통증 반응이 증폭되며, 이는 P2X3 수용기 길항제 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 투여에 의해 감소된다[8,26,27]. 또한, 염증성 통증 동물모델의 뒤뿌리신경절에서 P2X3의 발현이 증가되며, ATP를 가해 야기되는 내향전류(inward current)는 대조군에 비해 2~3배 증가된다[28]. 본 연구에서 vibrissa pad에 CFA를 주입하고 4일 경과한 군에서 열 자극에 의한 통각 과민반응이 관찰되었으며, 이와 함께 삼차신경절 신경세포에서 P2X3와 VGLUT2의 발현이 증가하였다. 이는 뒤뿌리신경절 및 삼차신경절에서의 연구 결과와 일치하였다[20,28,29]. 이러한 연구 결과는 염증성 통증에는 염증 시 분비되는 다양한 염증 매개물질에 의한 P2X3 수용기의 과민화와 VGLUT2 매개 glutamate 분비 증가가 관련될 것이라는 것을 의미하며, P2X3 수용기와 VGLUT2 길항제의 투여가 염증성 통증의 중요한 치료 전략이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 염증성 통증과 관련하여 특히 VGLUT2+/P2X3+ 신경세포의 수가 증가하였는데, 이는 염증 시 삼차신경절 신경세포에서 VGLUT2에 의해 매개되는 glutamate 신호전달의 증가는 P2X3 발현 증가와 직접적으로 연관될 수 있다는 것을 시사한다. 말초 염증에 대한 삼차신경절 신경세포의 반응, 통증 민감도 및 유해 구심성 신경섬유 활성화 등에서 성별 차이를 보인다는 보고를 고려하면[30], 본 연구의 수컷 흰쥐 삼차신경절 신경세포에서의 염증에 의한 반응은 암컷과 다를 수 있으며, 염증성 통증의 치료 전략도 성별에 따라 다를 가능성을 배제할 수 없다.

## 3. 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 신경종말의 미세구조

삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 신경종말은 직경 약 45 nm의 구형의 소포들을 함유하고 있었고, 연접이후 가지돌기에는 넓은 연접이후 치밀질이 발달되어 있었다. 또한, 연접틈새가 큰 비대칭 연접구조의 특징을 보여 주로 glutamate를 신

경전달물질로 사용하는 전형적인 흥분성 연접구조를 보였다. 이들 신경종말에는 큰 치밀소포가 거의 관찰되지 않아 SP 및 CGRP와 같은 펩티드를 함유하지 않는 비펩티드성 신경섬유 종말의 특징을 보였다[31]. P2X3+ 신경종말은 다수의 작은 가지돌기와 연접을 이루었는데, 이는 P2X3 활성화와 VGLUT2 매개 glutamate 분비에 의한 P2X3+ 신경세포의 흥분이 삼차신경꼬리핵에서 다수의 2차 신경세포의 원위부 가지돌기로 전달되어 확산됨을 시사한다. 이는 통증을 전달하는 transient receptor potential ankyrin 1+와 transient receptor potential vanilloid 1+ 신경종말[32,33] 및 저역치 기계자극을 전달하는 A $\beta$  신경섬유종말[34,35]의 연접양상과 유사하다. 다수의 P2X3+ 신경종말은 다양한 모양의 연접소포를 함유하는 축삭종말과 대칭연접을 이루었다. 다양한 모양의 연접소포를 함유하며 대칭연접을 이루는 축삭종말은 억제성 신경전달물질인 GABA와 glycine을 함유한다는 많은 보고들[34,36,37]을 감안하면, 다수의 P2X3+ 중추성 신경종말에서의 VGLUT2 매개 glutamate 분비는 연접이전 기전에 의해 조절됨을 시사한다. 또한 중추성 신경섬유종말에서 발현되는 P2X3는 연접이전 기전에 의해 glutamate성 연접전달을 촉진한다는 보고[1,38]를 함께 고려하면, P2X3 활성화에 의한 중추성 신경섬유에서의 glutamate 분비와 통증 정보전달은 뇌졸중 내 일차연접핵에서 다양한 연접이전 기전에 의해 정교하게 조절됨을 시사한다.

## REFERENCES

1. Chizh BA, Illes P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53:553-68.
2. Inoue K, Tsuda M. Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochem Pharmacol.* 2021;187:114309.
3. Burnstock G. Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv Pharmacol.* 2016;75:91-137.
4. Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M, et al. Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 2008;506:627-39.
5. Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, et al. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci.* 1998;10:3470-8.
6. Tsuda M, Koizumi S, Kita A, Shigemoto Y, Ueno S, Inoue K. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *J Neurosci.* 2000;20:RC90.
7. Bland-Ward PA, Humphrey PP. Acute nociception mediated

- by hindpaw P2X receptor activation in the rat. *Br J Pharmacol.* 1997;122:365-71.
8. Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, et al. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature.* 2000;407:1011-5.
  9. Hamilton SG, McMahon SB. ATP as a peripheral mediator of pain. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81:187-94.
  10. 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.* 1999;126:326-32.
  11. 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;123:1238-46.
  12. Chen Y, Shu Y, Zhao Z. Ectopic purinergic sensitivity develops at sites of chronic nerve constriction injury in rat. *Neuroreport.* 1999;10:2779-82.
  13. Wang WS, Tu WZ, Cheng RD, He R, Ruan LH, Zhang L, et al. Electroacupuncture and A-317491 depress the transmission of pain on primary afferent mediated by the P2X3 receptor in rats with chronic neuropathic pain states. *J Neurosci Res.* 2014;92:1703-13.
  14. deGroot J, Zhou S, Carlton SM. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. *Neuroreport.* 2000;11:497-502.
  15. 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.
  16. Gu JG, Heft MW. P2X receptor-mediated purinergic sensory pathways to the spinal cord dorsal horn. *Purinergic Signal.* 2004;1:11-6.
  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;127:449-56.
  18. Fremeau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 2004;27:98-103.
  19. Brumovsky P, Watanabe M, Hokfelt T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience.* 2007;147:469-90.
  20. Lagerstrom MC, Rogoz K, Abrahamsen B, Lind AL, Olund C, Smith C, et al. A sensory subpopulation depends on vesicular glutamate transporter 2 for mechanical pain, and together with substance P, inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:5789-94.
  21. Leo S, Moechars D, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Meert T. Impairment of VGLUT2 but not VGLUT1 signaling reduces neuropathy-induced hypersensitivity. *Eur J Pain.* 2009;13:1008-17.
  22. Johnson J, Sherry DM, Liu X, Fremeau RT, Jr., Seal RP, Edwards RH, et al. Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol.* 2004;477:386-98.
  23. Sweeney MI, White TD, Sawynok J. Morphine, capsaicin and K<sup>+</sup> release purines from capsaicin-sensitive primary afferent nerve terminals in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248:447-54.
  24. Bae YC, Ihn HJ, Park MJ, Ottersen OP, Moritani M, Yoshida A, et al. Identification of signal substances in synapses made between primary afferents and their associated axon terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol.* 2000;418:299-309.
  25. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:462-8.
  26. Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt AT, Johnston JF, Wyatt JR, et al. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain.* 2002;99:11-9.
  27. McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, et al. 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;140:1381-8.
  28. Xu GY, Huang LY. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 2002;22:93-102.
  29. Rogoz K, Lagerstrom MC, Dufour S, Kullander K. VGLUT2-dependent glutamatergic transmission in primary afferents is required for intact nociception in both acute and persistent pain modalities. *Pain.* 2012;153:1525-36.
  30. Kuzawinska O, Lis K, Cudna A, Balkowiec-Iskra E. Gender differences in the neurochemical response of trigeminal ganglion neurons to peripheral inflammation in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2014;74:227-32.
  31. Gerke MB, Plenderleith MB. Ultrastructural analysis of the central terminals of primary sensory neurones labelled by transganglionic transport of bandersea simplicifolia I-isolectin B4. *Neuroscience.* 2004;127:165-75.
  32. Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 2010;518:687-98.
  33. Yeo EJ, Cho YS, Paik SK, Yoshida A, Park MJ, Ahn DK, et al. Ultrastructural analysis of the synaptic connectivity of TRPV1-expressing primary afferent terminals in the rat tri-

- geminal caudal nucleus. *J Comp Neurol.* 2010;518:4134-46.
34. Bae YC, Ahn HJ, Park KP, Kim HN, Paik SK, Bae JY, et al. The synaptic microcircuitry associated with primary afferent terminals in the interpolaris and caudalis of trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Res.* 2005;1060:118-25.
35. Bae YC, Nakagawa S, Yoshida A, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga Y. Morphology and synaptic connections of slowly adapting periodontal afferent terminals in the trigeminal sub-nuclei principalis and oralis of the cat. *J Comp Neurol.* 1994; 348:121-32.
36. Moon YS, Paik SK, Seo JH, Yi HW, Cho YS, Moritani M, et al. GABA- and glycine-like immunoreactivity in axonal endings presynaptic to the vibrissa afferents in the cat trigeminal interpolar nucleus. *Neuroscience.* 2008;152:138-45.
37. Paik SK, Oh SJ, Son YJ, Ma SK, Ahn CH, Kim SK, et al. Neural mechanisms controlling jaw-jerk reflex in the cat. *Neuroreport.* 2005;16:1565-8.
38. Li J, Perl ER. ATP modulation of synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa. *J Neurosci.* 1995;15:3357-65.

**간추림** : 일차감각신경세포에서 발현되는 P2X3의 활성화는 중추 및 말초 구심성신경섬유에서 glutamate 분비를 유도하며, 이는 급성 및 만성 통증에 관여한다. 그러나 P2X3 활성화와 관련된 glutamate 분비에 관여하는 vesicular glutamate transporters (VGLUTs)의 유형에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 정상 조건과 흰쥐의 vibrissa pad에 CFA를 주입하여 말초 염증 통증을 유발한 후, 삼차신경절 신경세포에서 P2X3, VGLUT1 및 VGLUT2의 발현을 면역형광염색법으로 조사하였다. 또한, 전자현미경을 사용하여 P2X3 면역양성(+) 중추 신경종말의 초미세구조를 관찰하였다. P2X3+ 신경세포는 주로 작거나 중간크기이며, VGLUT1보다 VGLUT2를 함께 발현하였다. CFA 처리군에서는 대조군에 비해 P2X3+, VGLUT2+ 및 VGLUT2+/P2X3+ 신경세포의 수가 유의하게 증가하였다. 반대로, VGLUT1+ 및 VGLUT1+/P2X3+ 신경세포의 수는 CFA군과 대조군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 축삭종말은 다양한 형태의 소포를 포함하는 축삭종말로부터 축삭 간 시냅스를 형성하였다. 이 결과는 1) 급성 및 염증성 통증 상태에서 P2X3 활성화와 관련된 glutamate 분비에는 VGLUT2가 관여하며, 2) 삼차신경꼬리핵에서 P2X3+ 일차구심성신경섬유는 다양한 연접이전 기전에 의해 정교하게 조절될 가능성이 있다는 것을 시사한다.

**찾아보기 낱말** : 글루탐산 수송체, 삼차신경절 신경세포, 염증, 퓨린 수용기