서 론

Voltage-gated sodium channel (Nav)은 흥분성 신경세포에서 나트륨을 세포막 안으로 유입시켜 활동전위(action potential)의 탈분극(depolarization) 상승기를 주도하는 막단백질(membrane protein)이다[1]. Nav은 기능과 발현 특성이 다른 9개의 아형이 있다[1-3]. 그중 Nav1.8은 tetrodotoxin에 대한 감수성이 낮아 tetrodotoxin-resistant (TTX-R) channel로 분류되며, 내향전류(inward current)에 의한 탈분극을 유지하는데 중요한 역할을 한다[4, 5]. Nav1.8은 위목신경절(superior cervical ganglion)이나 척수내 신경세포에서는 발현하지 않으며, 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion)과 같은 말초감각신경세포에서 주로 발현된다[1, 4, 5]. Nav1.8은 감각신경세포 중 작거나 중간 크기의 신경세포에서 발현되며[4, 6-9], 이들 신경세포는 대부분 통각에 관여하는 것으로 알려져 있다[4, 10, 11]. 흰쥐의 뒤뿌리신경절에서 유해자극에 대한 반응 유무에 따른 전기생리학적 특성과 Nav1.8 발현과의 상관관계를 조사한 결과, 대부분의 통각수용성신경세포(nociceptive neuron)에서 Nav1.8이 강하게 발현되는 것으로 보고되었으며[10], 신생(neonatal) 흰쥐에 capsaicin을 투여한 후 흰쥐의 뒤뿌리신경절에서 Nav1.8 mRNA가 감소한다는 보고도 있다[4]. 또한, Nav1.8 결손마우스(Nav1.8-null mice)를 이용한 연구에서 Nav1.8 결손시 유해 기계적 자극에 대한 통증 역치(threshold)가 증가하고[12, 13], 신경성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 complete Freund's adjuvant (CFA)에 의해 유도된 염증성 통증과민(pain hypersensitivity)이 감소하며[14, 15], 냉 통증(cold pain)도 감소한다는 보고가 있다[16]. 이러한 연구들은 Nav1.8이 급성 통증(acute pain) 및 염증성 통증과민에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 그러나 일부 연구에서 신경손상시 뒤뿌리신경절 신경세포에서 Nav1.8 mRNA의 발현이 감소하고[6, 17], Nav1.8 결손 동물모델에서 신경병성 통증(neuropathic pain)에 대한 영향이 없다고 보고되어[15], 신경병성 통증에서 Nav1.8의 역할은 명확하지 않다.

Glutamate는 신경계의 대표적인 흥분성 신경전달물질로서 통증 전달기전에 중요한 역할을 하며, 신경전달물질로 방출되기 전에 vesicular glutamate transporter (VGLUT)에 의해 시냅스 소포(synaptic vesicle) 내부로 유입된다[18]. VGLUT는 VGLUT1, VGLUT2, 그리고 VGLUT3의 세 가지 아형으로 나뉘며, 대부분의 glutamatergic 신경세포는 VGLUT1 또는 VGLUT2를 발현하며, 이들은 glutamatergic 신경세포의 간접적 표지자(marker)로 유용하게 사용된다[18]. 일차감각신경세포(primary sensory neuron)에서 VGLUT1은 주로 큰 크기의 기계수용성신경세포(mechanoreceptive neuron)에서 발현되며, VGLUT2는 대부분 작거나 중간 크기의 통각수용성신경세포에서 발현되어 서로 다른 발현 양상을 나타낸다[19-21]. VGLUT1+/-

www.kci.go.kr

마우스는 염증 및 신경손상시 통증 관련 행동반응이 정상 마우스와 차이가 없으나, VGLUT2+/- 마우스는 신경손상 동물모델에서 정상 마우스에 비해 냉 자극에 대한 반응이 감소한다[22]. 또한 뒤뿌리신경절 신경세포에서 VGLUT2를 제거한 마우스를 이용한 연구에서는 VGLUT2 소실시 기계적 및 냉 자극에 대한 급성 통각반응이 감소하였으며, 염증성 통증반응이 감소하고, 신경손상시 기계적 과민성이 감소하였으며, 냉 이질통(cold allodynia)과 열 통각과민(hyperalgesia)이 억제되었다[23]. 이러한 결과는 일차감각신경세포에서 VGLUT2에 의해 매개되는 glutamatergic 신경전달이 급성 통각뿐만 아니라 염증성 및 신경병성 통증에도 중요한 역할을 함을 시사한다.

치수(tooth pulp)에 분포하는 신경섬유의 대부분은 C와 Aδ 통각수용성신경섬유(nociceptive nerve fibers)로, 외부의 유해 자극에 민감하게 반응하므로 말초신경계의 통증 기전을 연구하는데 유용한 조직 모델이다[24, 25]. 최근 연구에 따르면, 사람의 염증성 치수에서 Nav1.8의 발현이 증가하여 Nav1.8이 치수 내 염증성 통증 기전에 중요한 역할을 할 가능성이 있음이 보고되었다[26-28]. 또한 흰쥐와 사람 치수에서 VGLUT1과 VGLUT2 모두 발현되며[29-31], CFA를 치수에 주입하여 염증을 유도하면 VGLUT2 면역양성 신경섬유가 증가하고 VGLUT2 단백질의 발현량이 증가한다[29, 31]. VGLUT의 발현량은 glutamate의 방출량과 연관이 있으므로[32], 치수 염증시 VGLUT2의 발현 증가에 따라 glutamate의 방출이 증가하며, 이로 인해 VGLUT2 매개 염증성 통증과민이 일어날 수 있을 것으로 생각된다. 최근 연구에 따르면, 삼차신경절 신경세포에서 26℃ 이하의 유해 및 무해한 냉 자극에 의해 활성화되는 transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)은 VGLUT2와 공발현하지만 VGLUT1과는 공발현하지 않는 것으로 밝혀졌다[29]. 이는 TRPM8 매개 냉 통각에 VGLUT2 의존적 glutamatergic 신경전달이 관여할 수 있음을 시사한다. 그러나 Nav1.8을 발현하는 신경세포의 glutamatergic 신경전달에 어떤 아형의 VGLUT가 관여하는지는 명확하지 않다. 이에 본 연구에서는 이중형광면역기법을 이용하여 흰쥐 삼차신경절의 Nav1.8+ 신경세포와 치수의 Nav1.8+ 신경섬유에서 VGLUT1 및 VGLUT2와의 발현 양상을 분석하였다. 이는 두개안면영역에서 Nav1.8 매개 통각 정보전달 기전을 밝히는데 중요한 단서를 제공할 것이다.

www.kci.go.kr

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물의 보호 및 처치는 경북대학교 동물실험윤리위원회(Intramural Animal Care and Committee)의 승인을 받아 진행하였다. 본 연구에서는 광학현미경 분석을 위해 체중이 340–370 g인 수컷 흰쥐(Sprague–Dawley rat, 10–11 주령) 3마리를 사용하였다.

2. 면역형광염색

실험동물은 sodium pentobarbital (80 mg/kg)을 복강 내 주사하여 깊게 마취시킨 후, 100 mL의 헤파린이 포함된 생리식염수(0.85% NaCl 용액)와 500 mL의 4% paraformaldehyde 용액(PFA; in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 관류고정을 실시하였다. 삼차신경절과 상악 대구치 치수를 적출한 후, 동일 고정액에 4ºC에서 2시간 동안 후고정하였다. 고정된 조직은 0.1 M phosphate buffer (PB)로 세척한 후 30% sucrose (in 0.1 M PB, pH 7.4)에 넣어 4ºC에서 하루 동안 침적시켰다. 다음날 동결절편기를 이용하여 30 m 두께로 절편을 제작한 후, 0.1 M PB로 세척하고 조직 내 항체의 침투력을 높이기 위해 절편을 50% 에탄올에 30분 동안 반응시켰다. 절편을 0.01 M phosphate–buffered saline (PBS; pH 7.4)으로 여러 차례 수세한 후, 비특이적 반응을 최소화하기 위해 10% normal donkey serum (NDS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)에 30분간 반응시켰다. 이후 일차항체 용액(in PBS, pH 7.4)에서 16시간 동안 반응시켰다. 본 실험에서 사용된 일차 항체 및 표지자는 rabbit anti-Nav1.8 (1:1500, Chemicon International, Billerica, MA, USA) 항혈청과 guinea pig anti-substance P (SP; 1:1000, Chemicon International), mouse anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP; 1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), biotinylated-isolectin B4 (B-IB4; 3.5 g/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mouse anti-parvalbumin (PV; 1:1000, Sigma-Aldrich), mouse anti-neurofilament 200 (NF200; 1:100,000, Sigma-Aldrich), guinea pig anti-VGLUT1 (1:1000, Synaptic Systems, Göttingen, Germany), 또는 guinea pig anti-VGLUT2 (1:500, Frontier Institute Co., Ltd., Hokkaido, Japan)를 실험 목적에 따라 조합하여 사용하였다. 다음날 절편을 0.01 M PBS로 3차례 수세한 다음 2% NDS에 30분간 반응시키고, donkey Cy3-conjugated 또는 FITC-conjugated secondary antibodies (1:200, Jackson ImmunoResearch)를 포함한 용액에서 3시간 동안 반응시켰다. B-IB4의 형광염색을 위해서는 streptavidin-Alexa Fluor 488 (1:800, Molecular Probes, Grand Island, NY, USA)에 3시간 동안 반응하였다. 그 후 조직을 슬라이드 위에 도포한 뒤 형광현미경으로 관찰하였다.

www.kci.go.kr

3. 분석

Nav1.8을 발현하는 신경세포의 특성을 규명하기 위해, 핵이 선명하게 보이며 세포질에서 형광면역반응이 균일하게 관찰되는 신경세포를 면역양성 신경세포로 결정하여 분석에 사용하였다. 3마리의 흰쥐에서 얻은 양측 6개의 삼차신경절에서 각 신경절당 6개의 비연속 절편을 선택하여 총 36장의 사진을 촬영하였다. 사진은 Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany)에 부착된 EXi digital camera (Q-Imaging Inc., Surrey, CA, USA)를 사용하여 200배 배율(1360 × 1036 pixels)로 촬영하여 TIFF 파일로 저장하였다. 이중형광면역염색시, 각 채널에 대한 면역양성 신경세포를 분석하고 이들의 공발현 여부를 결정하기 위해 ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하였다. 원본 이미지를 grayscale 이미지로 변환한 후, 분석을 위해 밝기와 대비를 일관된 기준으로 조정하였다. 면역양성 신경세포를 판별하기 위한 역치는 0–255의 grayscale 범위에서 100–120으로 설정하였다. 또한, 각 실험동물에서 공발현율을 산출한 후, 3마리에서 얻은 측정값을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하였다.

www.kci.go.kr

결과

흰쥐의 삼차신경절에서 Nav1.8 면역양성반응(Nav1.8+)은 신경세포의 핵을 제외한 세포질에서 관찰되었다. Nav1.8+ 신경세포는 대부분 작거나 중간 크기였으며, 큰 신경세포에서는 드물게 관찰되었다. 대부분의 Nav1.8+ 신경세포(77.9 ± 1.2%)는 VGLUT2와 공발현하였으며, VGLUT1과 공발현하는 Nav1.8+ 신경세포는 드물게 관찰되었다(2.3 ± 1.2%, Table 1, Fig. 1). Nav1.8+ 신경세포는 통각수용성신경세포의 표지자인 SP, CGRP 또는 IB4와 공발현하였으나, 비교적 큰 직경의 감각신경세포에서 발현되는 PV 또는 NF200과는 드물게 공발현하였다(Table 1, Fig. 2). 또한 흰쥐의 상악 대구치에서 Nav1.8+ 신경섬유는 치근부 치수(radicular pulp)에서 다발을 이루어 주행하였고 분지를 거의 형성하지 않았으나, 치관부 치수(coronal pulp)의 중심부에서는 빈번하게 분지하였으며, 치관부 치수의 주변부(peripheral region of the coronal pulp)에서는 광범위하게 분지하였다. 일부 Nav1.8+ 신경섬유는 상아질모세포 사이를 지나 상아질세관 내로 주행하였다(Fig. 3). 치관부 치수에서 관찰된 대부분의 Nav1.8+ 신경섬유는 VGLUT2와 공발현하였으며, VGLUT1과는 드물게 공발현하였다(Fig. 4).

www.kci.go.kr

고찰

본 연구의 주요 결과는 다음과 같다. 1) 흰쥐의 삼차신경절에서 Nav1.8+ 신경세포의 다수가 VGLUT2(약 77.9%)를 발현하였으며, VGLUT1과 공발현하는 세포는 매우 드물었다(약 2.3%). 2) 흰쥐의 치수에서 Nav1.8+ 신경섬유는 치수의 주변부에서 광범위하게 분포하였으며, 대부분 VGLUT2와 공발현하였다. 이러한 결과는 두개안면부위에서 Nav1.8+ 통각수용성신경세포가 VGLUT2 의존적 glutamatergic 신경전달을 통해 통각 전달에 관여할 수 있음을 시사하는 조직학적 증거를 제시한다.

Nav1.8은 작거나 중간 크기의 말초감각신경세포에서 발현되며, 특히 통각수용성신경세포에서 높은 수준으로 발현되는 voltage-gated sodium channel로 알려져 있다[4-6, 10]. Nav1.8 결손마우스를 이용한 연구에 따르면, Nav1.8은 급성 통증(acute pain), 급성 냉 통증(acute cold pain) 및 염증성 통증(inflammatory pain)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, Nav1.8 결손마우스에서는 유해 기계적 자극에 대한 통증 역치가 증가하고[12], 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)에 의해 유도된 열 통각과민(hyperalgesia)이 감소하였다[15]. 또한 유해 냉 자극 및 저온 상태에서의 기계적 자극에 대한 반응도 감소하여, Nav1.8이 기계적, 열 및 냉 통각에 관여하는 것으로 보고되었다[16]. Diphtheria toxin A (DTA)를 이용하여 Nav1.8 발현 감각신경세포를 선택적으로 제거한 변이마우스(Nav1.8-DTA mice)를 대상으로 한 연구에서도[14], Nav1.8-DTA 마우스는 정상적인 운동 기능을 유지하고 저역치 기계적 자극과 유해 열 자극에는 정상적으로 반응하였으나, 유해 기계적 압력과 냉 자극에 대한 반응이 현저히 감소하였으며, 염증성 자극에 의해 유도되는 통증 관련 행동도 감소하였다. 이러한 결과는 Nav1.8이 급성 통증, 냉 유발 통증 및 염증성 통증에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

VGLUT는 glutamate를 시냅스 소포(synaptic vesicle) 내로 수송(transport)하는 단백질로서, glutamatergic 신경전달에 중요한 역할을 한다[18]. VGLUT1과 VGLUT2는 중추신경계에서 상호보완적 분포를 보이며, 서로 다른 기능적 특징과 연관되어 있다. VGLUT1은 뒤뿌리신경절과 삼차신경절에서 대부분 중간 및 큰 신경세포에서 발현되며, VGLUT2는 작거나 중간 크기의 신경세포에서 발현된다[20, 33, 34]. 척수뒤뿔에서 VGLUT1은 Aβ 저역치기계적수용기(low threshold mechanoreceptor) 또는 고유감각신경세포(proprioceptive neuron)가 투사되는 영역에서 발현되며, VGLUT2는 Aδ와 C 통각수용성신경세포가 투사되는 영역에서 발현된다[19, 21, 35]. VGLUT1

www.kci.go.kr

이형접합체(heterozygote) 마우스는 통증 관련 행동의 변화가 없으나[22], 마우스의 뒤뿌리신경절 신경세포에서 VGLUT2를 선택적으로 결손시킨 마우스에서는 급성 통증 및 염증성 통증과민이 감소하는 것으로 보고되었다[23]. 또한 Nav1.8을 발현하는 신경세포에서 VGLUT2를 선택적으로 제거한 *Vglut2$^{f/f}$;Nav1.8*-Cre 마우스는 급성 통증 및 염증성 통증이 감소하였다[36]. 이러한 연구 결과는 Nav1.8을 발현하는 신경세포가 활성화될 때 VGLUT2 의존적 glutamatergic 신경전달이 Nav1.8 매개 급성 통증 및 염증성 통증과민에 관여할 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 Nav1.8+ 신경세포의 약 77.9%는 VGLUT2와 공발현하였으며, 이는 TRPM8+ 삼차신경세포에서 보고된 VGLUT2 공발현율(약 18%)보다 높았다[29]. 또한 Nav1.8+ 신경세포는 통각수용성신경세포의 표지자인 SP (19.5%), CGRP (28.4%), 또는 IB4 (66.7%)와 공발현하여, 뒤뿌리신경절에서의 이전 연구결과와 일치하였다[14, 37-39]. 삼차신경절에서 SP+ 신경세포의 93%는 CGRP를 공발현한다는 보고[40]를 고려하면, 본 연구에서 관찰된 SP+/Nav1.8+ 및 CGRP+/Nav1.8+ 신경세포들은 중복될 가능성이 있다. 또한, VGLUT2+ 신경세포 역시 뒤뿌리신경절에서 CGRP 또는 IB4를 공발현하는 것으로 알려져 있어[20], Nav1.8과 유사한 발현 특성을 보인다. 이러한 결과는 C 통각수용성신경세포에서 Nav1.8과 VGLUT2가 함께 발현되며, VGLUT2 의존적 glutamate 방출이 Nav1.8 매개 통증 신호전달에 관여할 수 있음을 뒷받침하는 조직학적 증거를 제시한다.

치수에 분포하는 신경섬유의 대부분은 외부의 유해 자극에 반응하는 C 및 Aδ 통각수용성신경섬유이며, 삼차신경절에서 유래한 신경섬유는 치근부 치수에서 다발로 주행하다가 치수 주변부로 갈수록 가늘어지고 많은 곁가지를 형성한다[41, 42]. 본 연구에서 Nav1.8+ 신경섬유는 치수의 치근부에서 치관부까지 주행하였으며, 치근부보다 치관부에서 더 높은 밀도로 분포하였다. 특히 치관부 치수의 주변부에서는 일부 신경섬유가 상아질모세포층을 지나 상아질세관 내로 주행하였다. 이는 치수 주변부가 유해 자극의 감지와 통증 전달에 중요한 역할을 할 것이라는 형태학적 근거를 제시한 것이다. 또한 치수 주변부의 Nav1.8+ 신경섬유는 대부분 VGLUT2와 공발현하는 반면, VGLUT1과의 공발현은 거의 관찰되지 않았다. 특히 Nav1.8과 VGLUT2는 신경섬유의 구슬모양(varicosity) 부위에서 강하게 공발현하였으며, 이는 치수의 급성 및 염증성 통증 신호전달에서 Nav1.8+ 신경섬유로부터 VGLUT2 의존적 glutamate가 방출될 가능성을 시사한다. 즉, 유해 자극에 의해 Nav1.8+ 신경섬유가 활성화되면 축삭반사(axon reflex)를

www.kci.go.kr

통해 말초신경에서 VGLUT2 의존적 glutamate가 방출되어 통증 신호의 증폭이나 말초감작(peripheral sensitization)에 기여할 가능성이 있다.

본 연구에서 Nav1.8+ 신경세포의 약 80%는 VGLUT1 (2.3%) 또는 VGLUT2 (77.9%)를 공발현하였으나, 약 20%에서는 VGLUT1과 VGLUT2의 발현이 관찰되지 않았다. 따라서 이들 신경세포에서 glutamate를 방출하는지, 방출한다면 어떠한 기전이 관여하는지는 명확하지 않다. 일부 Nav1.8+ 신경세포에서는 VGLUT3가 glutamate의 소포성 방출에 관여할 가능성이 있으며[43], 또는 Ca^{2+} 의존적 소포 방출과는 다른 기전을 통해 glutamate가 방출될 가능성도 있다[44]. 한편, 이들 신경세포에서는 glutamate 이외에도 aspartate나 nitric oxide와 같은 다른 신경전달물질 또는 신경조절물질이 Nav1.8 매개 통각 신호전달에 관여할 가능성도 있다[45, 46].

www.kci.go.kr

References

1. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC *et al*. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. Neuron. 2000;28:365–8.
2. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron. 2000;26:13–25.
3. Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. Pain. 2007;131:243–57.
4. Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. Nature. 1996;379:257–62.
5. Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR *et al*. Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. J Biol Chem. 1996;271:5953–6.
6. Bongenhielm U, Nosrat CA, Nosrat I, Eriksson J, Fjell J, Fried K. Expression of sodium channel SNS/PN3 and ankyrin(G) mRNAs in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury in the rat. Exp Neurol. 2000;164:384–95.
7. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. J Neurophysiol. 2001;86:629–40.
8. Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannion RJ *et al*. Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. Nat Neurosci. 1998;1:653–5.
9. Thun J, Persson AK, Fried K. Differential expression of neuronal voltage-gated sodium channel mRNAs during the development of the rat trigeminal ganglion. Brain Res. 2009;1269:11–22.
10. Djouhri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM, Lawson SN. The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. J Physiol. 2003;550:739–52.
11. Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na+ current in nociceptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:1108–12.
12. Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J *et al*. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. Nat Neurosci. 1999;2:541–8.
13. Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN. Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. Mol Pain. 2005;1:24.
14. Abrahamsen B, Zhao J, Asante CO, Cendan CM, Marsh S, Martinez-Barbera JP *et al*. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. Science. 2008;321:702–5.
15. Kerr BJ, Souslova V, McMahon SB, Wood JN. A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. Neuroreport. 2001;12:3077–80.
16. Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J *et al*. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. Nature. 2007;447:855–8.
17. Zhang XF, Zhu CZ, Thimmapaya R, Choi WS, Honore P, Scott VE *et al*. Differential action potentials and firing patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. Brain Res. 2004;1009:147–58.

www.kci.go.kr

18. Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ *et al*. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. Neuron. 2001;31:247–60.
19. Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, Schneider SP. Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. J Comp Neurol. 2004;472:257–80.
20. 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.
21. Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F. Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. J Comp Neurol. 2004;468:380–94.
22. 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.
23. 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.
24. Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. Prog Neurobiol. 1995;45:165–222.
25. Paik SK, Park KP, Lee SK, Ma SK, Cho YS, Kim YK *et al*. Light and electron microscopic analysis of the somata and parent axons innervating the rat upper molar and lower incisor pulp. Neuroscience. 2009;162:1279–86.
26. Renton T, Yiangou Y, Plumpton C, Tate S, Bountra C, Anand P. Sodium channel Nav1.8 immunoreactivity in painful human dental pulp. BMC Oral Health. 2005;5:5.
27. Suwanchai A, Theerapiboon U, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. NaV 1.8, but not NaV 1.9, is upregulated in the inflamed dental pulp tissue of human primary teeth. Int Endod J. 2012;45:372–8.
28. Warren CA, Mok L, Gordon S, Fouad AF, Gold MS. Quantification of neural protein in extirpated tooth pulp. J Endod. 2008;34:7–10.
29. Kim YS, Kim TH, McKemy DD, Bae YC. Expression of vesicular glutamate transporters in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-positive dental afferents in the mouse. Neuroscience. 2015;303:378–88.
30. Paik SK, Kim SK, Choi SJ, Yang ES, Ahn SH, Bae YC. Vesicular glutamate transporters in axons that innervate the human dental pulp. J Endod. 2012;38:470–4.
31. Yang ES, Jin MU, Hong JH, Kim YS, Choi SY, Kim TH *et al*. Expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the rat dental pulp and trigeminal ganglion following inflammation. PLoS One. 2014;9:e109723.
32. Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, Dant J, Brooks ES, Krantz DE *et al*. Increased expression of the Drosophila vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. J Neurosci. 2004;24:10466–74.
33. Morris JL, Konig P, Shimizu T, Jobling P, Gibbins IL. Most peptide-containing sensory neurons lack proteins for exocytotic release and vesicular transport of glutamate. J Comp Neurol. 2005;483:1–16.

www.kci.go.kr

34. Oliveira AL, Hydling F, Olsson E, Shi T, Edwards RH, Fujiyama F *et al*. Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. Synapse. 2003;50:117–29.
35. Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP *et al*. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. Eur J Neurosci. 2003;17:13–27.
36. Liu Y, Abdel Samad O, Zhang L, Duan B, Tong Q, Lopes C *et al*. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch. Neuron. 2010;68:543–56.
37. Amaya F, Decosterd I, Samad TA, Plumpton C, Tate S, Mannion RJ *et al*. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. Mol Cell Neurosci. 2000;15:331–42.
38. Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. Neuron. 2005;47:787–93.
39. 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.
40. Ma QP, Hill R, Sirinathsinghji D. Colocalization of CGRP with 5-HT1B/1D receptors and substance P in trigeminal ganglion neurons in rats. Eur J Neurosci. 2001;13:2099–104.
41. Beasley WL, Holland GR. A quantitative analysis of the innervation of the pulp of the cat's canine tooth. J Comp Neurol. 1978;178:487–94.
42. Holland GR, Robinson PP. The number and size of axons at the apex of the cat's canine tooth. Anat Rec. 1983;205:215–22.
43. Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI *et al*. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. Nature. 2009;462:651–5.
44. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. Trends Pharmacol Sci. 1990;11:462–8.
45. Stoyanova, II, Lazarov NE. Localization of nitric oxide synthase in rat trigeminal primary afferent neurons using NADPH-diaphorase histochemistry. J Mol Histol. 2005;36:187–93.
46. Tracey DJ, De Biasi S, Phend K, Rustioni A. Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. Neuroscience. 1991;40:673–86.

www.kci.go.kr

간추림

Voltage-gated sodium channel 1.8 (Nav1.8)은 일차통각수용기(primary nociceptors)에서 활동전위(action potential)의 생성과 전도에 중요한 역할을 한다. 또한 Nav1.8은 급성통증(acute pain)과 염증에 의해 유도되는 통증과민(pain hypersensitivity)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Nav1.8에 의해 매개되는 통각입력(Nav1.8-mediated nociceptive input)이 어떤 유형의 vesicular glutamate transporters (VGLUTs)와 연관되는지는 아직 명확하지 않다. 이를 규명하기 위하여 본 연구에서는 흰쥐 삼차신경절(trigeminal ganglion, TG)과 치수에서 Nav1.8과 VGLUT1 또는 VGLUT2의 공발현(coexpression)을 형광면역조직화학법(fluorescence immunohistochemistry)으로 조사하였다.

삼차신경절의 Nav1.8+ 신경세포와 치수의 Nav1.8+ 신경섬유는 대부분 VGLUT2와 공발현하였으며, VGLUT1과의 공발현은 매우 드물었다. 또한 삼차신경절에서 Nav1.8+ 신경세포는 통각수용성신경세포의 표지자인 substance P, calcitonin gene-related peptide 또는 isolectin B4와 공발현하였으나, 비교적 큰 직경의 감각신경세포에서 발현되는 parvalbumin 또는 NF200과는 거의 공발현하지 않았다.

본 연구 결과는 Nav1.8이 주로 삼차신경절의 통각수용성신경세포와 치수 신경섬유에서 발현되며, VGLUT1보다 VGLUT2와 선택적으로 연관되어 있음을 시사한다. 또한 Nav1.8과 VGLUT2의 선택적인 공발현은 Nav1.8+ 통각수용기가 VGLUT2 의존적 glutamatergic 신경전달을 통해 통각 전달에 기여할 수 있음을 시사한다.

찾아보기 낱말: Nav1.8, VGLUT1, VGLUT2, 치수

www.kci.go.kr

Table 1. Frequency (mean ± standard deviation, %) of Nav1.8-immunopositive (+) neurons coexpressing VGLUT1, VGLUT2, or neuronal markers (peptidergic nociceptive neurons: SP and CGRP; non-peptidergic nociceptive neuron: IB4; relatively large-diameter sensory neurons: parvalbumin (PV) and NF200) in the rat trigeminal ganglion (n = 3).

VGLUT1+/ Nav1.8+	VGLUT2+/ Nav1.8+	SP+/ Nav1.8+	CGRP+/ Nav1.8+	IB4+/ Nav1.8+	PV+/ Nav1.8+	NF200+/ Nav1.8+
2.3 ± 1.2 (31/1402)	77.9 ± 1.2 (1314/1688)	19.5 ± 7.7 (381/1875)	28.4 ± 5.4 (495/1729)	66.7 ± 2.1 (1108/1672)	0.3 ± 0.2 (3/1200)	4.9 ± 1.5 (66/1412)

www.kci.go.kr

Figure Legends

Fig. 1. Double immunofluorescent staining for Nav1.8 (A and B, red) and VGLUT1 (A, green) or VGLUT2 (B, green) in the trigeminal ganglion. Nav1.8-immunopositive (+) neurons mostly coexpressed VGLUT2 but rarely VGLUT1. Arrowheads indicate Nav1.8+ neurons that express VGLUT1 (A) or VGLUT2 (B). Scale bar = 100 μm.

Fig. 2. Histochemical characterization of Nav1.8-immunopositive (+) neurons in the trigeminal ganglion. Double immunofluorescent staining for Nav1.8 (A–E, red) and markers (A–E, green) of peptidergic nociceptive neurons, SP (A) and CGRP (B); non-peptidergic nociceptive neurons, IB4 (C); and relatively large-diameter sensory neurons, PV (D) and NF200 (E). Nav1.8+ neurons coexpressed SP, CGRP, or IB4, but rarely PV or NF200. Arrowheads indicate Nav1.8+ neurons coexpressing SP (A), CGRP (B), IB4 (C), or NF200 (E). Scale bar = 100 μm.

Fig. 3. Fluorescent micrographs showing the distribution of Nav1.8-immunopositive (+) axons in the rat molar pulp. Most Nav1.8+ axons in the radicular (A) and central coronal (B) regions of the molar pulp were observed in bundles and traveled toward the peripheral regions of the cervical and coronal pulp. Nav1.8+ axons were often observed in the peripheral regions of the cervical (C) and coronal pulp (D, E), where they formed a subodontoblastic plexus and extended into the odontoblast layers. Panel E is an example of beaded Nav1.8+ axons in the coronal pulp. Scale bars = 50 μm.

Fig. 4. Double immunofluorescent staining for Nav1.8 (A and B, red) and VGLUT1 (A, green) or VGLUT2 (B, green) in the peripheral region of the rat dental pulp. The majority of Nav1.8+ fibers coexpressed VGLUT2 but rarely VGLUT1. Arrowheads indicate Nav1.8+ nerve fibers coexpressing VGLUT2. Scale bars = 20 μm.

www.kci.go.kr