

Participation of Peripheral P2X Receptors in Orofacial Inflammatory Nociception in Rats

Min-Kyoung Park, Hyun-Chul Song, Kui-Ye Yang, Jin-Sook Ju, and Dong-Kuk Ahn*

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

(received June 20, 2011 ; revised August 23, 2011 ; accepted September 2, 2011)

The present study investigated the role of peripheral P2X receptors in inflammatory pain transmission in the orofacial area in rats. Experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats weighing 220 to 280 g. Formalin (5%, 50 μ L) and complete Freund's adjuvant (CFA, 25 μ L) was applied subcutaneously to the vibrissa pad to produce inflammatory pain. TNP-ATP, a P2X_{2,2/3,4} receptor antagonist, or OX-ATP, a P2X₇ receptor antagonist, was then injected subcutaneously at 20 minutes prior to formalin injection. One of the antagonists was administered subcutaneously at three days after CFA injection. The subcutaneous injection of formalin produced a biphasic nociceptive behavioral response. Subcutaneous pretreatment with TNP-ATP (80, 160 or 240 μ g) significantly suppressed the number of scratches in the second phase produced by formalin injection. The subcutaneous injection of 50 μ g of OX-ATP also produced significant antinociceptive effects in the second phase. Subcutaneous injections of CFA produced increases in mechanical and thermal hypersensitivity. Both TNP-ATP (480 μ g) and OX-ATP (100 μ g) produced an attenuation of mechanical hypersensitivity. However, no change was observed in thermal hypersensitivity after the injection of either chemical. These results suggest that the blockade of peripheral P2X receptors is a potential therapeutic approach to the onset of inflammatory pain in the orofacial area.

Key words: P2X receptor, CFA, formalin, peripheral inflammation

*Corresponding author: 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

서 론

ATP (adenosine 5'-triphosphate)는 아데닌(adenine)에 3개의 인산(phosphate)이 달린 유기 화합물로 세포 내에 존재하며 신호 전달에서 중요한 기능을 한다. 또한 세포 외막에서는 적은 양으로 존재하며, 전령(messenger)물질로 작용하면서 생리적 기능에 관여한다(Burnstock *et al.*, 1970). ATP는 감각 신경(sensory nerves)에서 유리되어 신경전달을 조절하는 것으로 알려져 있으며 특히, 중추와 말초신경계에서 통증 전도에 관여한다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다(Collier *et al.*, 1966). 환취의 무릎관절에 ATP를 주입하거나 동맥으로 α , β -methylene ATP를 주입하였을 때 A δ 혹은 C 신경섬유로 전도되는 통각들신경(nociceptive afferent nerves)이 흥분되는 것을 전기 생리학적 기록을 통해 확인하였다(Dowd *et al.*, 1998). 퓨린 수용체(purinergic receptor)를 통하여 활성화된다고 알려져 있는 ATP는 주로 P2X 이온친화성 수용체(ionotropic receptor)를 통하여 통증을 조절한다고 알려져 있다. 현재까지 P2X 수용체의 아형은 7개 이상(P2X_{1,7})으로 알려져 있으며(Li *et al.*, 2008), 척수 뒷뿌의 중심종말(central terminals)(Burnstock G, 2007)과 척수 뒤뿌리(spinal dorsal root)(Burnstock G and Knight GE, 2004) 뿐만 아니라 삼차신경절 신경세포(trigeminal ganglion neurons)에서 주로 발현(Staikopoulos *et al.*, 2007)된다. 이러한 영역들은 통증 발생과 유지에 매우 중요하게 작용하는 곳이다.

P2X 수용체는 중추신경계 뿐만 아니라 말초조직의 통증 전도에 관여한다는 것은 다양한 선행연구를 통하여 보고되었다. P2X 수용체는 말초신경의 신경종말에 분포하고(Nörendberg and Illes, 2000) 있으며, CFA (complete Freund's adjuvant)를 흰 쥐 뒷발에 주입 하여 염증상태를 유발한 뒤 P2X_{2/3,3} 수용체 억제제인 A-317491를 피하로 주입하였을 때 염증 상태에서 나타나는 기계적 통각과민과 열성 통각

과민이 유의하게 감소되었다(Jarvis *et al.*, 2002). 또한 P2X₇ 수용체가 결핍된 흰 쥐 뒷발에 CFA를 주입 하면 정상적으로 P2X₇ 수용체를 가진 흰쥐에 비해 기계적 통각과민과 열성 통각과민이 유의하게 감소하였다(Chessell *et al.*, 2005). 이러한 결과를 정리해보면, 말초신경에 존재하는 P2X 수용체가 통증 발생과 유지에 중요한 역할을 한다는 것을 말해준다.

P2X 수용체는 안면 영역에서 발생하는 통증의 전도와 조절에도 작용한다는 것은 선행연구에서 보고된 바 있다. P2X_{2,3} 수용체는 턱관절과 치수, 타액선을 포함하여 삼차신경절(trigeminal ganglion) 등 두개 안면 영역을 지배하는 신경에 존재한다(Alavi *et al.*, 2001; Ichikawa *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). 흰 쥐의 턱관절에 carrageenan을 주입하여 발생하는 염증성 통증에 P2X_{2,3}와 P2X₃ 수용체 억제제를 턱관절에 주입하면 통각과민을 유의하게 감소시켰다(Teixeira *et al.*, 2010; Shinoda *et al.*, 2005). 또한 턱관절로 ATP의 투여 후 삼차신경 뇌줄기 아핵 꼬리(trigeminal brainstem subnucleus caudalis)에서 WDR(wide dynamic range) 신경을 활성화시켰으며, 이러한 신경세포의 활성화는 P2X의 억제제인 PPADS의 투여에 의해 현저히 감소하였다(Tashiro *et al.*, 2007). 이러한 연구결과들은 안면부위에서 말초성 P2X수용체가 통증 전도와 조절에 중요하게 작용한다는 것은 일부 증명하고 있지만 현재까지 다양한 염증모델을 이용하여 P2X수용체가 염증성 통증 전도 및 조절작용에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

실험적으로 염증성 통증을 유발시키기 위하여 사용되는 대표적인 물질로는 포르말린, mustard oil, CFA 등이 있으며(Cairns *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999), 안면영역에서도 이들 물질을 이용하여 염증 반응을 유발시키고, 통증 반응을 평가하고 있다(Choi *et al.*, 2003a; Lee *et al.*, 2010). 본 연구에서는 포르말린과 CFA를 주입하여 염증성 통증을 유발시키고 P2X_{2,2,3,4} 수용체 억제제인 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphate tetra triethyl ammonium salt (TNP-ATP)와 P2X₇ 수용체 억제제인 adenosine 5-triphosphate periodate oxidized sodium salt (OX-ATP)를 말초조직으로 투여하여 P2X수용체가 염증성 통증에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(220-280 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 12시간 주야 순환 주기와 일정한 온도, 습도를 유지하면서 실험동물용 사료와 물을 자유로이 공급하여 사육하였다. 실험동물은 한 마리씩 투명한 플라스틱 상자에 분리하였고 실험동물은 안면 자극을 가할 수 있도록 상자 상단은

닫지 않은 상태로 두었다(Ahn *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006). 실험용 플라스틱 상자는 밝지 않으면서 조용한 공간에 두었고, 실험동물을 최소 30분 이상 안정화시켰다. 본 연구는 경북대학교 치의학전문대학원 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 의식이 있는 동물의 실험에 관한 통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다.

포르말린 유도 통증 행위반응

포르말린을 주입하여 나타나는 통증 행위반응은 선행연구에서 사용된 방법과 동일하게 평가하였다(Choi *et al.*, 2003 a,b,c; Lee *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). 50 μ L의 포르말린(5%)을 안면 피부에 주사한 다음 투명한 관찰 상자로 옮겨서 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반사를 기록하였다. 포르말린 용액을 주입한 다음 나타나는 안면부위를 긁는 행위를 측정하여 통증의 지표로 삼았다. 포르말린 주입 후 5분 간격으로 45분 동안 기록하였으며 초기에는 짧게 지속하는 일차반응(0-10분, first phase)과 이어서 나타나는 지속적인 이차반응(11-45분, second phase)을 평가하였다.

CFA 주입으로 유도되는 염증성 통증

실험동물을 ketamine(0.2 g/kg)과 xylazine(0.02 g/kg) 혼합액으로 가볍게 마취시킨 다음 실험군(n=7)은 안면피부에 25 μ L의 CFA를 대조군(n=7)은 생리식염수를 각각 주입한 다음 1, 3, 7, 10, 13, 17, 21일에 이질통과 열자극 통각과민을 평가하였다.

이질통 평가

CFA를 주입한 다음 von Frey filament를 이용하여 이질통을 평가하였다. CFA를 주입한 실험동물을 행위반응을 관찰하기 위하여 적응시키고 von Frey filament를 0.008 g부터 단계적으로 60 g까지 안면 부위에 수직으로 적용하였다(Lee *et al.*, 2010). 필라멘트는 10회 적용(2초 동안 지속 시간, 10초의 간격)시켜서 50%의 동물에서 filament의 탄력에 의해 회피하거나 긁는 행위 반응을 나타내는 자극을 회피 반응 역치로 결정하여 평가하였다.

열 자극에 대한 통각과민 평가

Laser (LVI 810-30, LVI Technology)를 이용하여 피부로부터 10 cm 떨어진 곳에서 90° 각도로 열 자극을 적용하였다. CFA를 주입한 동물에서 안면 피부에 열 자극을 적용한 다음 얼굴을 피하는 시간(Head withdrawal Time)을 측정하여 평가하였다.

말초로 주입한 P2X 수용체 억제제의 진통작용

말초성 ATP 수용체가 안면 영역에서 발생하는 통증에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수용체 억제제를 흰 쥐의 안면 피부에 투여한 다음 통증에 미치는 영향을 평가하였다. 주입한 ATP 수용체 억제제는 선행연구에서 이미 진통작용을 유발하는 것으로 알려진 P2X_{2,2,3,4} 수용체 억제제

인 TNP-ATP (Oliveira *et al.*, 2009)와 P2X₇ 수용체 억제제인 OX-ATP (Chen *et al.*, 2008)를 사용하였다. 포르말린 주입 20분 전 ATP 수용체 억제제를 피하조직으로 주입하여 포르말린에 의해 유도되는 통증 행위반응에 미치는 영향을 평가하였다. CFA 주입 후 통증이 나타나는 3일째 P2X 수용체 억제제를 안면 피부로 주입하여 약물 주입 전과 주입 후 30, 60, 120, 180, 360분 그리고 24시간 쯤 von Frey filament를 이용한 이질통과 Laser를 이용한 열성 통각과민에 미치는 영향을 평가하였다.

통계분석

행위반응의 통계 분석은 다중 그룹에서 반복측정자료의 분산분석법과 LSD post-hoc test를 이용하였다. 그룹간의 평균값을 비교하기 위하여 Student's T-test를 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준 값은 p < 0.05로 설정하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

실험결과

실험동물 흰 쥐의 안면 피부에 50 μL의 포르말린(5%)

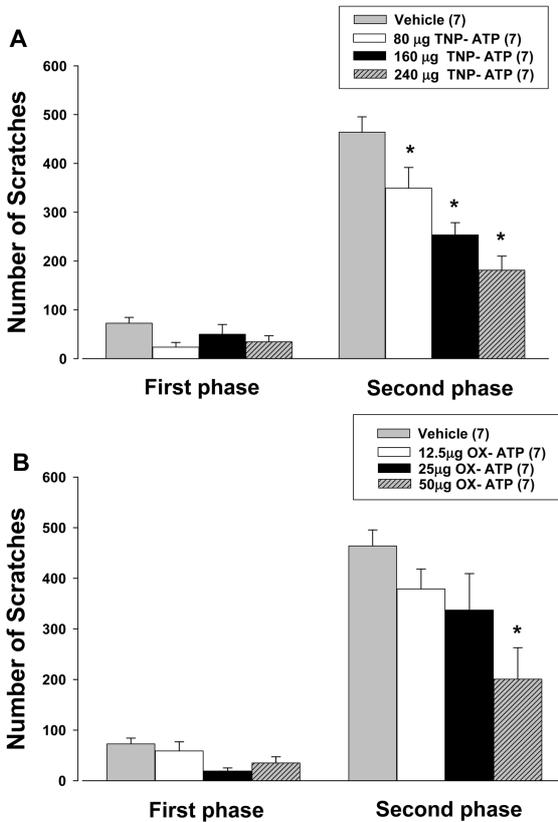


Fig. 1. Effects of the subcutaneous injection of TNP-ATP, (A) a P2X_{2,2/3,4} antagonist, and OX-ATP, (B) a P2X₇ antagonist, on the number of scratching responses produced by formalin injection in rats (n = 7 in each group). Asterisks denote significant inhibition compared to vehicle injection (*P < 0.05).

용액을 주입하면 통증 반응으로 주입된 피부를 긁는 행위반응이 나타났다. 이러한 행위반응은 초기에 짧게 나타나는 일차반응과 이어서 지속적으로 나타나는 이차반응으로 나타났다. 말초 ATP 수용체가 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 P2X_{2,2/3,4} 수용체 억제제인 TNP-ATP와 P2X₇ 수용체 억제제인 OX-ATP를 포르말린 주입 전 안면피부에 각각 투여하고 통증 행위반응에 미치는 영향을 평가 한 것을 Fig. 1에 나타내었다. TNP-ATP는 일차 반응에서 유의한 효과를 나타내지 않았으나 이차 반응에서 80, 160, 240 μg의 모든 농도에서 대조군에 비하여 포르말린에 의해 유도된 통증 반응을 유의하게 감소시켰다(P < 0.05, Fig. 1A). 또한 OX-ATP도 일차 반응에서는 진통작용을 나타내지 못하였으나 이차 반응에서 50 μg의 용량으로 주입하면 대조군에 비하여 유의하게 통증 반응이 감소되었다(P < 0.05, Fig. 1B).

흰 쥐의 안면 피부에 CFA를 주입하였을 때 나타나는 통

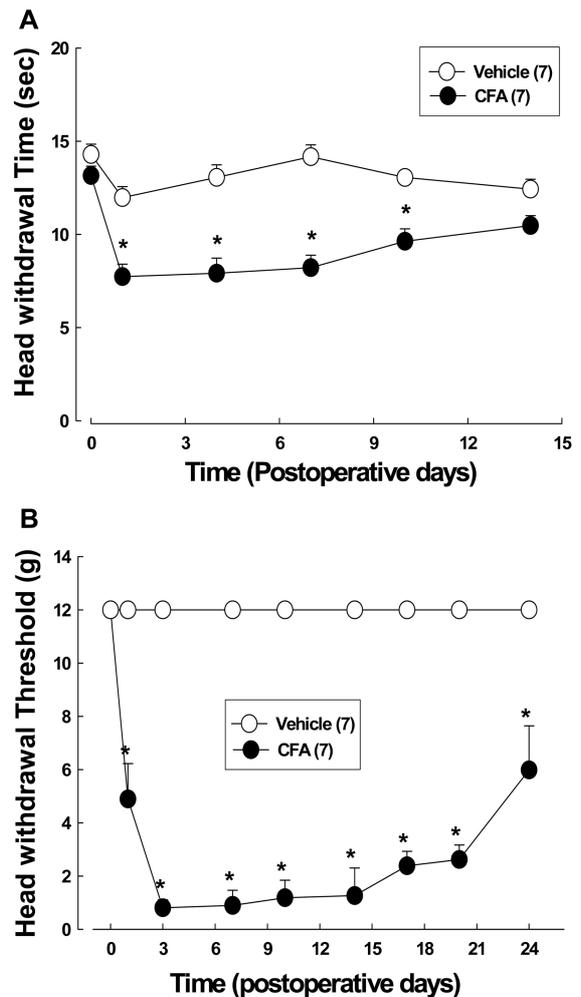


Fig. 2. Time course of changes in thermal hypersensitivity (A) and von Frey filament scores, (B) following subcutaneous injection of CFA. Asterisks denote significant inhibition compared to vehicle injection (*P < 0.05).

각과민 반응을 Fig. 2에 나타내었다. CFA 주입 1일 후부터 열성 통각과민 현상을 관찰할 수 있었으며, 10일째 까지 유의하게 유지되었고 이 후 시간이 지남에 따라 회복되어 15일째는 대조군과 비슷한 수준으로 회복 되었다($P < 0.05$, Fig. 2A). CFA 주입 후 안면 피부에서 나타나는 이질통의 평가는 von Frey filament 테스트를 수행하여 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 2B). 생리 식염수를 주입한 대조군에서는 유의한 반응이 나타나지 않았지만, CFA를 주입한 실험군에서는 역치 값이 유의하게 감소되었다. 이러한 이질통은 CFA를 주입 후 3일째부터 유의하게 나타났으며, 21일째까지 지속되었고 이 후 회복되었다.

CFA 주입 후 나타나는 이질통이 가장 크게 나타나는 3일째 말초 P2X 수용체 억제제 투여하여 통증에 미치는 영향을 평가하여 Fig. 3에 나타내었다. 낮은 농도의 TNP-ATP (240, 160 μg)는 유의한 진통작용을 나타내지 못하였지만 높은 농도인 480 μg 을 투여하면 유의한 진통작용을 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 3A). OX-ATP도 낮은 농도인 50

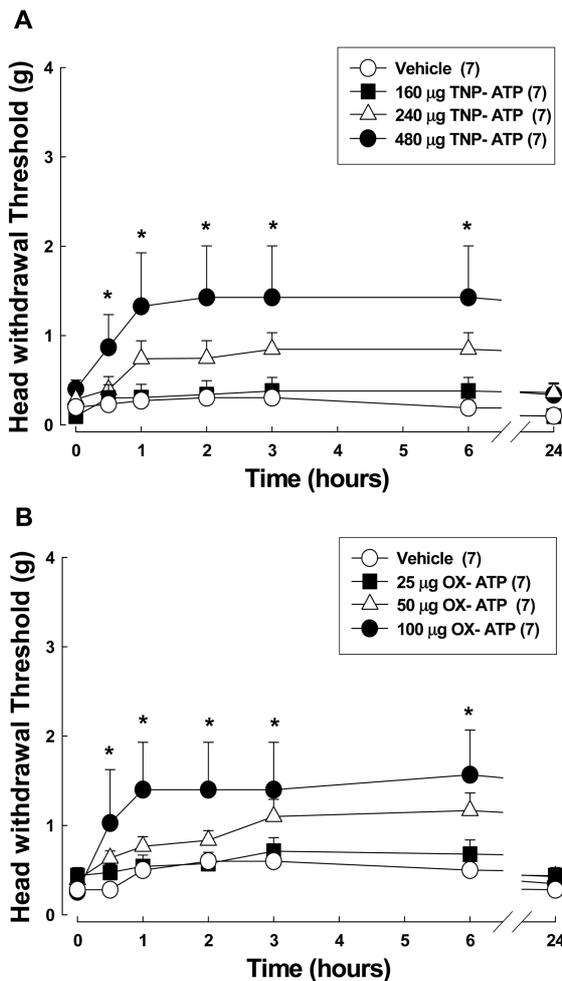


Fig. 3. Effects of subcutaneous injection of TNP-ATP, (A) a P2X_{2,2/3,4} antagonist and OX-ATP, (B) a P2X₇ antagonist, on mechanical allodynia. Asterisks denote significant inhibition compared to vehicle injection (* $P < 0.05$).

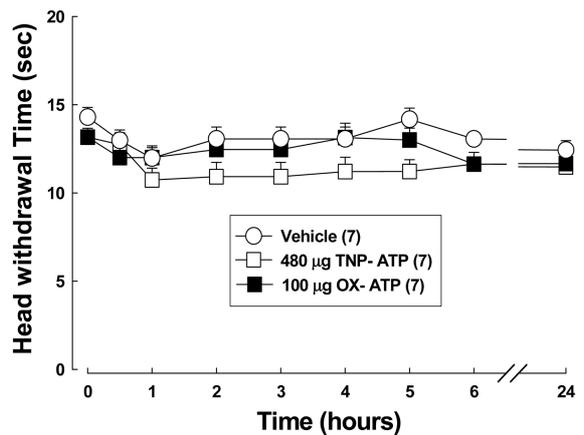


Fig. 4. Effects of subcutaneous injection of TNP-ATP, a P2X_{2,2/3,4} antagonist and OX-ATP, a P2X₇ antagonist, on thermal hypersensitivity produced by CFA injection. Both drugs did not affect CFA-induced thermal hypersensitivity.

과 25 μg 에서는 통증 억제 효과를 관찰할 수 없었지만 높은 농도인 100 μg 에서는 유의한 진통작용을 나타내었다($P < 0.05$, Fig. 3B).

CFA 주입 후 3일째 TNP-ATP와 OX-ATP를 주입한 다음 통증에 미치는 영향을 평가하여 Fig. 4에 나타내었다. TNP-ATP와 OX-ATP를 투여한 실험군에서 생리 식염수를 주입한 대조군과 비교하였을 때 유의한 변화를 관찰할 수 없었다($P > 0.05$).

고찰

본 연구는 말초 ATP 수용체가 악안면 영역에서 포르말린과 CFA를 주입하여 나타나는 염증성 통증에 미치는 영향을 평가하였다. P2X_{2,2/3,4} 수용체 억제제인 TNP-ATP와 P2X₇ 수용체 억제제인 OX-ATP는 포르말린에 의해 유도된 통증 행위반응을 유의하게 감소시켰다. CFA로 유도된 이질통은 TNP-ATP와 OX-ATP에 의해 억제되었으나 열성 통각과민현상에는 영향을 주지 못하였다. 이러한 실험결과는 말초 ATP 수용체가 악안면 영역에서 발생하는 염증성 통증을 조절하는 것으로 생각되지만 통증의 형태에 따라 작용 기전에 차이가 있는 것으로 보인다.

ATP는 Drury와 Szent-Gyorgyi의 연구에서 세포 밖에서 강하게 활성화되는 아데닌 화합물(adenine compounds)을 발견함으로써 처음 보고하였고(Drury and Szent-Györgyi, 1929), 그 이후 Holton에 의해 처음으로 신경 말단에서 ATP가 유리되는 것을 확인함(Holton, 1959)으로서 신경전달물질의 기능을 하는 것으로 판단된다. ATP는 퓨린 수용체는 크게 P2Y 대사성 수용체(metabotropic receptor)와 P2X 이온 친화성 수용체(ionotropic receptor)로 나뉘어진다. P2Y 수용체는 G-단백수용체(G-protein coupled receptor)와 결합 후 활성화되고, P2X 수용체는 이온 채널을 조절하여 작용

을 나타낸다(Shaver, 2001; Ziganshin *et al.*, 2002; Volonté *et al.*, 2003). P2X 수용체는 7개의 아형을 가지고 있으며 통증 진도에 관여할 뿐만 아니라 세포의 증식과 분화, 세포 사멸 등을 유도하거나 촉진하는 작용을 한다(Abbraccio and Burnstock, 1998).

P2X_{2,2,3,4}와 P2X₇ 수용체는 중추신경계 뿐만 아니라 말초 조직에서도 염증성 또는 신경병증성 통증 조절에 관여하고 알려져 있다. CFA를 흰 쥐의 뒷발에 주입 하여 염증성 통증을 유발시킨 후 P2X_{2,2,3,4} 억제제인 A-317491를 발바닥에 처치하였을 때 이질통과 통각과민 현상이 감소하였다(McGarraughty *et al.*, 2003). 말초로 투여한 P2X₇ 억제제도 CFA로 야기한 열성 통각과민 현상을 유의하게 감소시켰다(Honore *et al.*, 2009). 이러한 실험 결과는 P2X_{2,2,3,4}와 P2X₇ 수용체가 말초조직에서 통증 발생과 유지에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있지만 안면영역에서의 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

본 연구에서 P2X_{2,2,3,4} 수용체 억제제인 TNP-ATP와 P2X₇ 수용체 억제제인 OX-ATP는 포르말린에 의해 유도되는 통증 반응과 CFA를 주입하여 나타나는 이질통을 유의하게 감소시켰다. 그러나 CFA를 주입하여 나타나는 열성 통각과민 반응에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 반응의 차이는 선행연구에서 ATP로 유도된 기계적 이질통과 열자극 통각과민은 조직의 pH의 영향을 받는다(Seo *et al.*, 2011)는 보고를 고려해 볼 때 말초에 있는 ATP 수용체의 종류나 통증의 형태, 그리고 실험 조건에 따라 다르게 나타나는 것으로 보여 진다. 그러나 CFA를 주입 후 나타나는 열성 통각과민과 이질통에서 ATP 수용체 차단효과가 다르게 나타나는 기전은 향후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다. 또한 말초에 ATP 수용체 억제제를 투여하였을 때 의해 나타나는 진통작용이 중추신경계를 통하여 나타나는 것인지 확인하기 위하여 ATP 수용체 억제제를 반대편의 뒷다리에 투여한 다음 통증 반응에 어떠한 영향을 관찰한 결과 통증 행위반응에 어떠한 영향도 미치지 못하였다. 이러한 실험 결과는 ATP 수용체 억제제 투여는 말초 수용체를 차단하여 진통작용을 나타낸다는 것을 말해준다.

본 연구에서 염증성 통증을 유발하기 위하여 사용한 포르말린이나 CFA는 염증성 통증을 유발하는 물질로 알려져 있다. CFA는 턱관절(Ren and Dubner, 1996)과 아랫입술(Lee *et al.*, 2010) 등에 주입하여 염증을 유발하였으며, 포르말린 주입은 이상(biphasic) 통증 행동반응을 유발한다(Tjolsen *et al.*, 1992). 특히 포르말린을 주입하여 나타나는 이차 반응은 중추 감각과 통증을 매개하는 물질의 방출에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 포르말린에 의해 유도되는 일차 및 이차 반응은 안면 통증 연구에서 보여준 다른 연구 결과와도 일치한다(Clavelou *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 2003 a,b,c).

이상의 연구결과를 요약하면, 말초조직으로 투여된 P2X_{2,2,3,4} 수용체 억제제인 TNP-ATP와 P2X₇ 수용체 억제제인 OX-

ATP는 포르말린과 CFA를 주입 후 나타나는 염증성 통증 반응을 억제하였다. 이러한 연구결과는 향후 말초에 존재하는 ATP 수용체 약물이 향후 안면영역에서 발생하는 염증성 치료제의 후보물질로 사용될 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0012329).

참고 문헌

- Abbraccio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 1998;78:113-45.
- Ahn DK, Chae JM, Choi HS, Kyung HM, Kwon OW, Park HS, Youn DH, Bae YC. Central cyclooxygenase inhibitors reduced IL-1beta-induced hyperalgesia in temporomandibular joint of freely moving rats. *Pain.* 2005;117:204-13.
- Alavi AM, DUBYAK GR, Burnstock G. Immunohistochemical evidence for ATP receptors in human dental pulp. *J Dent Res.* 2001;80:476-83.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 1970;40:668-88.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor different systems. *Int Rev Cytol.* 2004;240:31-304.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007;87:659-797.
- Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. *J Neurosci.* 1998;18:8056-64.
- Chen Y, Zhang X, Wang C, Li G, Gu Y, Huang LY. Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16773-8.
- 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 P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2005;114:386-96.
- Choi HS, Lee HJ, Jung CY, Ju JS, Park JS, Ahn DK. Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1 beta-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci Lett.* 2003a;352:187-90.
- Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of intracisternal injection of interleukin-6 on nociceptive jaw opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Brain Res Bull.* 2003b;59:365-70.

- Choi HS, Lee HJ, Jung CY, Ju JS, Park JS, Ahn DK. Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1 beta-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci Lett*. 2003c;352:187-90.
- Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett*. 1989;103:349-53.
- Collier HO, James GW, Schneider C. Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate. *Nature*. 1966;212:411-2.
- Dowd E, McQueen DS, Chessell IP, Humphrey PP. P2X receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic rat knee joint. *Br J Pharmacol*. 1998;125:341-6.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*. 1929;68:213-37.
- Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol*. 1959;145:494-504.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic M, Zhong C, Wade C, Chandran P, Zhu C, Carroll W, Perez-Medrano A, Iwakura Y, Jarvis MF. The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1alpha knock-out mice. *Behav Brain Res*. 2009;204:77-81.
- Ichikawa H, Fukunaga T, Jin HW, Fujita M, Takano-Yamamoto T, Sugimoto T. VR1-, VRL-1- and P2X3 receptor-immunoreactive innervation of the rat temporomandibular joint. *Brain Res*. 2004;1008:131-6.
- Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol*. 1999;82:1244-53.
- Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:17179-84.
- Jung CY, Lee SY, Choi HS, Lim EJ, Lee MK, Yang GY, Han SR, Youn DH, Ahn DK. Participation of peripheral group I and II metabotropic glutamate receptors in the development or maintenance of IL-1beta-induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *Neurosci Lett*. 2006;409:173-8.
- Kim SH, Cho YK, Chung KM, Kim, KN. Purinergic Receptors Play Roles in Secretion of Rat von Ebner Salivary Gland. *IJOB*. 2006;31:141-148.
- Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M, Yoshida A, Ahn DK, Valtschanoff J, Hwang SJ, Moon C, Bae YC. Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol*. 2008;506:627-39.
- Lee HJ, Choi HS, Jung CY, Ju JS, Kim SK, Bae YC, Ahn DK. Intracisternal NMDA produces analgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28:497-503.
- Lee S, Zhao YQ, Ribeiro-da-Silva A, Zhang J. Distinctive response of CNS glial cells in oro-facial pain associated with injury, infection and inflammation. *Mol Pain*. 2010;6:79.
- Li HY, Oh SB, Kim JS. Pharmacological and electrophysiological characterization of rat P2X currents. *IJOB*. 2008;33:1-5.
- 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;140:1381-8.
- Nörenberg W, Illes P. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362:324-39.
- Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X3,2/3 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*. 2009;141:127-34.
- Ren K, Dubner R. An inflammation/hyperalgesia model for the study of orofacial pain. *J Dent Res*. 1996;75:217.
- Seo HS, Roh DH, Kwon SG, Yoon SY, Kang SY, Moon JY, Choi SR, Beitz AJ, Lee JH. Acidic pH facilitates peripheral $\alpha\beta$ meATP-mediated nociception in rats: differential roles of P2X, P2Y, ASIC and TRPV1 receptors in ATP-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2011;60:580-6.
- Shaver SR. P2Y receptors: biological advances and therapeutic opportunities. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2001;4:665-70.
- Shinoda M, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. Changes in P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats. *Pain*. 2005;116:42-51.
- Staikopoulos V, Sessle BJ, Furness JB, Jennings EA. Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*. 2007;144:208-16.
- Tashiro A, Okamoto K, Milam SB, Bereiter DA. Differential effects of estradiol on encoding properties of TMJ units in laminae I and V at the spinomedullary junction in female rats. *J Neurophysiol*. 2007;98:3242-53.
- Teixeira JM, Oliveira MC, Nociti FH Jr, Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, Tambeli CH. Involvement of temporomandibular joint P2X3 and P2X2/3 receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2010;645:79-85.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.
- Volonté C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003;2:403-12.
- Yang GY, Lee JH, Ahn DK. Participation of NMDA and non NMDA glutamate receptors in the formalin-induced inflammatory temporomandibular joint nociception. *International Journal of Oral Biology*. 2007;32:59-65.
- Zhou Q, Imbe H, Dubner R, Ren K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *J Comp Neurol*. 1999;412:276-91.
- Ziganshin AU, Ziganshina LE, Burnstock G. P2 receptors: theoretical background for the use in clinical practice. *Bull Exp Biol Med*. 2002;134:313-7.