

흰쥐의 삼차신경절에서 Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)의 발현 특성에 관한 연구

백 상 규, 나 연 경¹, 김 윤 숙*

경북대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실, ¹경북대학교 간호대학

Characterization of Trigeminal Ganglion Neurons Expressing Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in the Rat

Sang Kyoo Paik, Yeon Kyung Na¹, Yun Sook Kim*

Department of Oral Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry,
Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea

¹College of Nursing, Kyungpook National University, Daegu 702-422, Korea

(Received March 16, 2012; Revised March 25, 2012; Accepted March 25, 2012)

ABSTRACT

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), responding to noxious cold ($\leq 17^{\circ}\text{C}$) and pungent compounds, is implicated in nociception, but little is known about the coexpression of TRPA1 and other channels or receptors involved in the nociception in craniofacial regions. To address this issue, we characterized the TRPA1-immunopositive (+) neurons in the rat trigeminal ganglion (TG) and investigated their colocalization with other proteins known to be expressed in nociceptive neurons, such as transient receptor potential vanilloid (TRPV1) and P2X₃ receptor, using light microscopic immunofluorescence labeling method with TRPA1 and TRPV1 or P2X₃ antisera.

The majority of TRPA1+ neurons contained for TRPV1 (TRPV1+/TRPA1+; 58.8%, 328/558) and 41.2% only expressed TRPA1 but not TRPV1. The TRPV1+/TRPA1+ neurons were small and medium sized. In addition, we investigated the colocalization of TRPA1 with P2X₃, a nonselective cation channel activated by ATP that may be released in the extracellular space as a result of tissue damage and inflammation. Among all TRPA1+ TG neurons, 26.1% (310/1186) contained for P2X₃, whereas 73.9% (876/1186) of TRPA1+ neurons did not coexpress P2X₃. P2X₃+TRPA1+ neurons were predominantly small and medium sized.

These results suggest that TRPA1+ neurons coexpressing TRPV1 or P2X₃ are involved in specific roles in the transmission and processing of orofacial nociceptive information by noxious cold, heat, and inflammation.

Keywords : Fluorescence immunohistochemistry, P2X₃, trigeminal ganglion, TRPA1, TRPV1

This research was supported by the Korea Research Foundation Grant (to Y. S. Kim, KRF-2008-E00006) founded by the Korean Government (MOEHRD) and Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (to S. K. Paik, No. 2010-0008469)

* Correspondence should be addressed to Yun Sook Kim, Department of Oral Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea. Ph.: (053) 660-6863, Fax: (053) 426-7731, E-mail: yunskim@knu.ac.kr

서 론

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)은 비선택적 양이온통로로서, 삼차신경절 및 뒤뿌리신경절에서 발현이 된다(Story et al., 2003; Nagata et al., 2005; Kim et al., 2010). TRPA1은 17°C보다 낮은 유해한 온도, 자극적인 화합물(isothiocyanate, cinnamaldehyde, allicin), 내인성인자들(bradykinin, 4-hydroxynonenal)과 환경유해물질인 acrolein 등에 의해 활성화되며(Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Andersson et al., 2008), 이는 염증 및 신경손상 시 야기되는 냉각과 민반응에 중요한 역할을 담당한다(Ji et al., 2008; del Camino et al., 2010). 최근 구강안면영역의 통각정보 전달에 관여하는 삼차신경절에서 TRPA1 mRNA의 발현이 확인 되었으며, 17°C보다 낮은 유해한 온도 자극시 세포내의 칼슘이 방출된다고 보고 되었다(Park et al., 2006; Kim et al., 2011). 이러한 결과는 TRPA1이 구강안면영역에서 유해한 냉각의 전달에 중요한 역할을 수행한다는 것을 의미한다. TRPA1이 삼차신경각각핵군의 등쪽얕은층(superficial lamina)의 축삭종말에서 강하게 발현이 되며(Kim et al., 2010), 뒤뿌리신경절에서 TRPA1은 substance P (SP)와 calcitonin gene related peptide (CGRP)와 공존한다는 다수의 보고에도 불구하고(Obata et al., 2005; Dai et al., 2007), 아직까지 삼차신경절에서 TRPA1을 발현하는 신경세포의 특성에 관해서는 잘 알려져 있지 않다.

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)은 캡사이신(capsaicin), 유해한 온도(>43°C), 및 염증반응을 일으키는 매개물들에 의해 활성화되며 동통의 전달 과정에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다(Caterina & Julius, 2001). 이는 뒤뿌리신경절(Valtschanoff et al., 2001)과 삼차신경절(Bae et al., 2004)에서 작거나 중간크기의 신경세포에 발현될 뿐 아니라, TRPV1을 발현하는 일차들신경섬유는 삼차신경꼬리핵의 lamina I과 II 바깥부분에 투사됨으로써 통각의 전달에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되어지고 있다. 또한, TRPV1은 TG에서 SP나 CGRP와 공존한다고 보고되어 있는데(Bae et al., 2004), 이는 TRPV1을 발현하는 일차들신경섬유들이 SP나 CGRP와 같은 펩타이드를 분비함으로써 구강안면영역의 염증성동통의 전달에 중요한 역할을 담당할 것이라는 것을 의미한다.

Purinergic receptor인 P2X 수용체는 조직의 손상 및 염증시 분비되는 Adenosine-5'-triphosphate (ATP)와 결합하는 비선택적 이온채널이며, 7개의 subtype들이 존재한다(Burnstock, 2009). P2X₃ 수용기는 척수 뒤뿌리의 inner lamina II 부위에서 발현이 되며, glutamate의 분비를 촉진시켜 통각과민 반응을 조절한다고 알려져 있다(Gu & MacDermott, 1997). 또한 삼차신경꼬리핵에서도 inner lamina II 부위에서 발현이 되며,

삼차신경절에서는 작거나 중간크기의 신경세포에서 발현이 된다(Kim et al., 2008). 최근 보고에 의하면, P2X₃ 수용기가 급성 및 만성통증, 그리고 신경변성 통증에 연관이 있으며(Wirkner et al., 2007), P2X₃ 유전자가 결실된 실험동물에서는 포르말린(formalin)에 의한 염증성 통증반응이 유의하게 감소한다(Souslova et al., 2000).

현재까지 TRPA1이 삼차신경절에서 통각을 전도하는 신경세포에 대한 대표적인 표지자인 TRPV1과 P2X₃와의 공존에 관한 면역형광염색 연구결과는 없다. TRPA1이 이러한 통각수용기들과 동시에 발현하는 현상에 대해서 밝힌다면 구강안면영역의 통각전도 기전을 연구하는데 많은 도움이 되리라 판단된다. 본 연구에서는 흰쥐의 삼차신경절에서 TRPA1이 TRPV1 또는 P2X₃와 공존하는지, 만약 공존한다면 어떤 특성을 가지고 있는 세포에서 발현되는지 조사하여 TRPA1에 의한 동통의 전달기전에 대한 이해를 돕고자 한다.

재료 및 방법

실험동물의 보호 및 처치는 경북대학교 동물실험윤리위원회(Intramural Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 동물실험계획서에 따라서 진행하였다. 본 연구에서는 3마리의 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 300~320g)를 사용하여 결과를 도출하였다. 본 연구에 사용된 시약 중 제조회사가 언급되지 않은 것은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

실험동물을 sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal)로 깊게 마취하였으며, 500 unit의 heparin sodium이 포함된 생리식염수 100 mL를 좌심실과 연결된 대동맥을 통해 관류하여 혈관내 혈액을 제거한 다음, 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer; PB, pH 7.4) 500 mL로 관류하여 고정하였다. 그 후 삼차신경절을 적출하여 동일고정액에 4°C에서 약 2시간 동안 후고정 하였다. 그 후 조직을 PB (pH 7.4)로 세척한 다음 30% sucrose-용액 (in 0.1 M PB, pH 7.4)에서 24시간 보관하였다. 조직을 동결절편기를 이용하여 30 µm 두께로 절편을 제작 한 다음 형광면역조직화학법을 다음과 같이 시행하였다: 먼저 50% ethanol로 절편을 30분간 반응하여 항체의 침투를 용이하게 했다. 이 후 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 5분간 3회 세척한 다음, 비특이적 반응을 최소화하기 위하여 10% normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)으로 30분간 반응하였다. 그 후 일차항체 (in 0.01 M PBS, pH 7.4)로 16시간 동안 반응하였다. 본 실험에서는 일차항체로서 anti-TRPA1 antiserum (raised in rabbit; 1:500; kindly donated by professor Noguchi, Hyogo Univ. Japan), anti-TRPV1 antiserum (raised in goat; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

CA), anti-P2X₃ antiserum (raised in guinea pig; 1:3,000; Chemicon, Temecula, CA)를 함께 사용하였다. 그 다음 PBS로 10분간 3회 세정한 다음, 2% NDS로 30분간 반응하였으며, 일차항체와 반응하는 2차항체 (fluorescein isothiocyanate-, Cy3-conjugated antibodies raised in donkey; 1:200; Jackson ImmunoResearch)로 3시간 반응하였다. PBS로 10분간 3회 세정하고, 증류수로 10분간 2회 세정한 다음 형광용 슬라이드 위에 조직을 올렸다. 관찰 및 분석을 위하여 형광현미경 (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 및 공초점 현미경 (LSM 510 META; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)을 사용하였다. 공초점 현미경으로 찍은 영상들은 TIFF형식으로 저장한 후, 밝기와 명암을 조정하였다. 삼차신경절의 세포 크기를 분석하기 위해서 형광현미경에 장착된 Exi-digital camera (Q-imaging Inc., Surrey, CA)로 촬영한 사진들을 TIFF 파일로 저장하였으며, 핵인이 선명하게 보이는 핵을 포함한 신경세포체의 단면적을 NIH image software (v 1.60, NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 측정하였다.

본 실험에서 사용한 일차항체의 특이성을 검증하기 위해서 대조실험을 다음과 같이 행하였다. 일차항체 혹은 이차항체를 제외하거나, blocking peptide로 preadsorption을 한 다음 앞에서 언급한 것과 동일한 면역조직화학기법을 시행한 결과 면역염색의 특이성이 보이지 않았다. TRPA1에 대한 항체는 펩타이드(RFKKERLEQMHSKWNF)에 대해 생성되었으며, blocking peptide 30 µg/mL로 preadsorption 한 경우 면역양성반응이 소실되는 것을 관찰함으로써 면역염색의 특이성을 확인하였다 (Dai et al., 2007; Kim et al., 2010). P2X₃에 대한 항체는 흰쥐 P2X₃의 carboxy 말단부의 아미노산 383~397의 펩타이드에 대해 생성되었다. Blocking peptide 농도 2 µg/mL (Neuromics P10108, lot P400124, Edina, MN)로 preadsorption한 경우 면역양성반응이 소실되는 것을 관찰함으로써 면역염색의 특이성을 확인하였다. TRPV1 항체는 흰쥐 TRPV1의 amino-terminus에 인접한 펩타이드에 대해 생성되었다. 면역염색의 특이성은 46 µg/mL blocking peptide (SC-12498P, P-19, lot L061, Santa Cruz Biotechnology)로 preadsorption한 경우 면역양성반응이 소실되는 것을 관찰함으로써 확인하였다.

결 과

3마리의 흰쥐에서 형성한 15장의 삼차신경절 절편에서 TRPA1에 대한 면역양성반응을 관찰하였다. TRPA1면역양성반응(TRPA1+)은 작거나 중간크기의 신경세포에서 관찰되었으며, 다수의 신경세포에서 TRPA1과 TRPV1의 공존을 관찰하였다 (Fig. 1A). TRPA1+ 신경세포에서 TRPV1의 공존율을 분석하였다. TRPA1과 TRPV1의 공존율은 3마리의

흰쥐 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았으므로 결과를 합쳤다. 558개의 TRPA1+ 신경세포중에서 328개의 신경세포에서 TRPV1을 동시에 발현하였으며 (58.8%, 328/558), 230개의 신경세포에서 TRPA1만 (41.2%, 230/558) 발현하였다 (Fig. 1B). TRPV1+ 신경세포에서 TRPA1의 발현정도를 분석해 본 결과, 668개의 TRPV1 면역양성 신경세포 중에서 328개의 신경세포에서 TRPA1을 동시에 발현하였으며 (49.1%, 328/668), 340개의 신경세포에서 TRPV1만 (50.9%, 340/668) 발현하였다 (Fig. 1C). TRPA1을 발현하는 신경세포 중 TRPV1을 동시에 발현하는 신경세포 (TRPV1+/TRPA1+)는 대부분 작거나 중간크기였으며 (Fig. 1D, 단면적평균값±표준편차: 460.2±166.7 µm²), 큰 세포에서는 공존이 관찰되지 않았다.

3마리의 흰쥐에서 형성한 19장의 삼차신경절 조직절편에서 TRPA1에 대한 면역양성반응을 보이는 신경세포에서 P2X₃ 발현하는 것을 관찰하였다 (Fig. 2). TRPA1+ 신경세포에서 P2X₃의 발현율은 3마리의 흰쥐 사이에서 유의한 차이를 보이지 않아서 합칠 수 있었는데, 1186개의 TRPA1 면역양성 신경세포 중에서 310개의 신경세포에서 P2X₃을 동시에 발현하였으며 (P2X₃+/TRPA1+, 26.1%, 310/1186), 876개의 신경세포에서 TRPA1만 (73.9%, 876/1186) 발현하였다 (Fig. 2B). P2X₃면역양성반응을 보이는 신경세포에서 TRPA1의 발현정도를 분석해 본 결과, 631개의 P2X₃면역양성 신경세포 중에서 310개의 신경세포에서 TRPA1을 동시에 발현하였으며 (49.1%, 310/631), 321개의 신경세포에서 P2X₃만 (50.9%, 321/631) 발현하였다 (Fig. 2C). TRPA1을 발현하는 신경세포 중 P2X₃을 동시에 발현하는 신경세포는 대부분 작거나 중간크기였다 (Fig. 2D, 단면적평균값±표준편차: 493.8±134.3 µm²).

고 찰

본 연구에서 관찰한 주요 결과는 다음과 같다. 1) 흰쥐의 삼차신경절에서 TRPA1+ 신경세포는 통각표지자인 TRPV1을 동시에 발현하였으며, 이들은 주로 작거나 중간크기의 신경세포에서 공존이 관찰되었다. 2) TRPA1+ 신경세포는, 또한, 작거나 중간크기의 신경세포에서 P2X₃와도 공존하였다. TRPV1은 삼차신경꼬리핵 및 척수 뒤뿔에서 lamina I 그리고 outer lamina II 부위에서 주로 발현이 되며 P2X₃는 inner lamina II 부위에서 주로 발현이 되는 특징을 가지고 있는 통각수용기들이다. 이러한 결과는 삼차신경절에서 TRPA1이 TRPV1 또는 P2X₃와 공존함으로써 구강안면영역에서 TRPA1에 의한 통증의 전달기전이 각기 독특한 방식으로 처리된다는 것을 시사한다.

본 연구에서 TRPA1+ 신경세포의 약 59%가 TRPV1과, 약 26%가 P2X₃와 각각 공존하였다. 이는 뒤뿔리신경절에서 대부분의 TRPA1+ 신경세포가 TRPV1 및 SP를 발현한다는

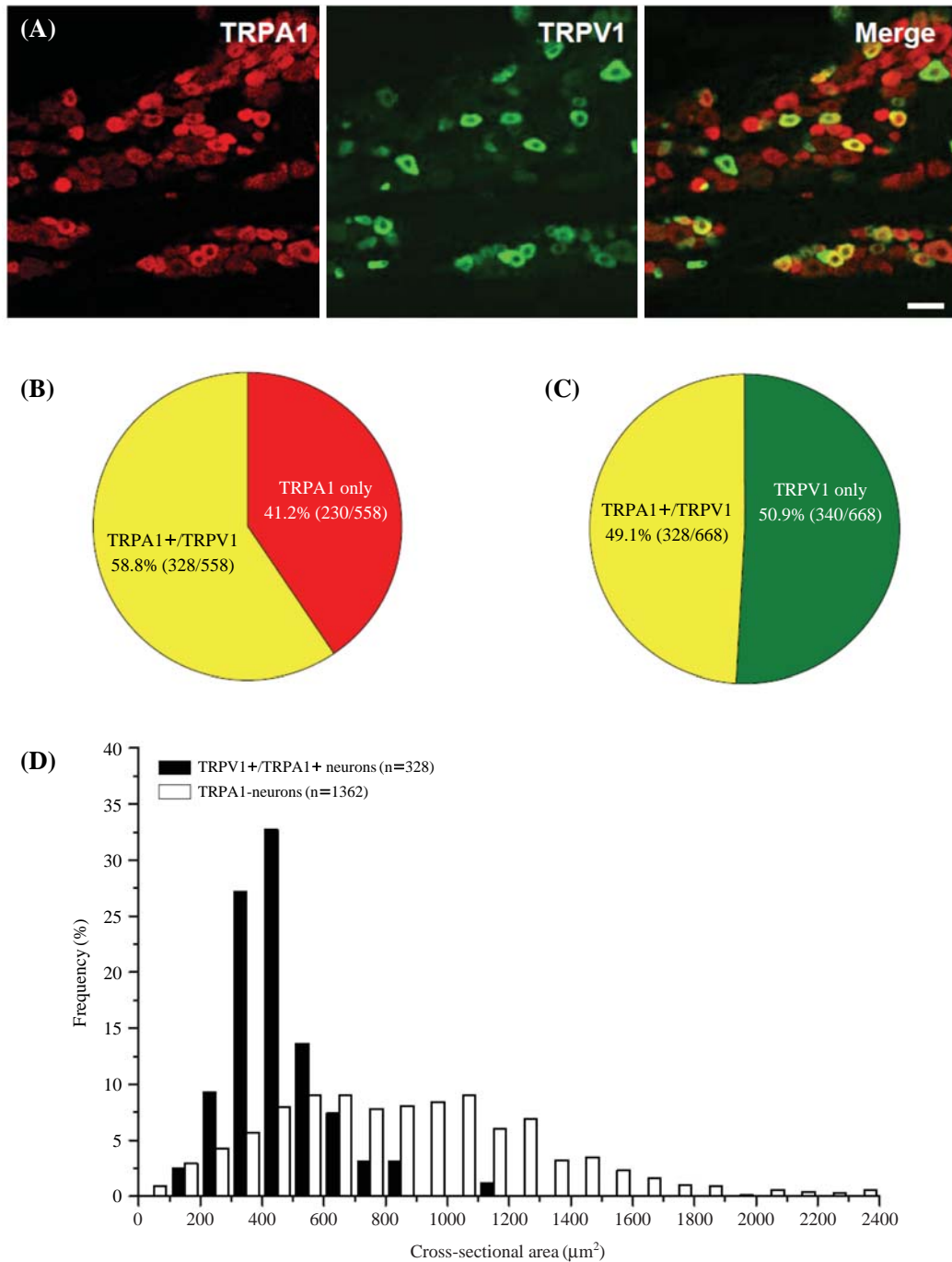


Fig. 1. Double immunofluorescence staining for TRPA1 (red) and TRPV1 (green) in the trigeminal ganglion (TG). A: The majority of TRPA1-immunopositive (TRPA1+) neurons costained for TRPV1. Colocalization is represented in yellow in the merged image. Scale bar=50 μm . B: Quantitative analysis of colocalization of TRPA1 with TRPV1. Among all TRPA1+ TG neurons, 58.8% (328/558 in 15 sections) costained for TRPV1, and among all TRPV1+ TG neurons, 49.1% (328/668 in 15 sections) costained for TRPA1. C: TRPV1+/TRPA1+ neurons were predominantly small- and medium-sized.

이전의 보고와 (Story et al., 2003; Bautista et al., 2005; Kobayashi et al., 2005) 다른 양상을 보였다. 또한 TRPV1을 함께 발현하는 TRPA1+ 신경세포의 비율은 뒤뿌리신경절(약 100%)에 비해 삼차신경절(59%)에서 훨씬 낮게 나타났다.

이는 삼차신경절 및 뒤뿌리신경절에서의 TRPA1의 발현을 차이로 인한 것으로 생각된다. 또 다른 가능성은 in situ hybridization 기법, 면역조직화학기법 등과 같은 TRPA1을 감지하는 방법의 차이에 의한 것일 수 있다. TRPA1이 비펩티

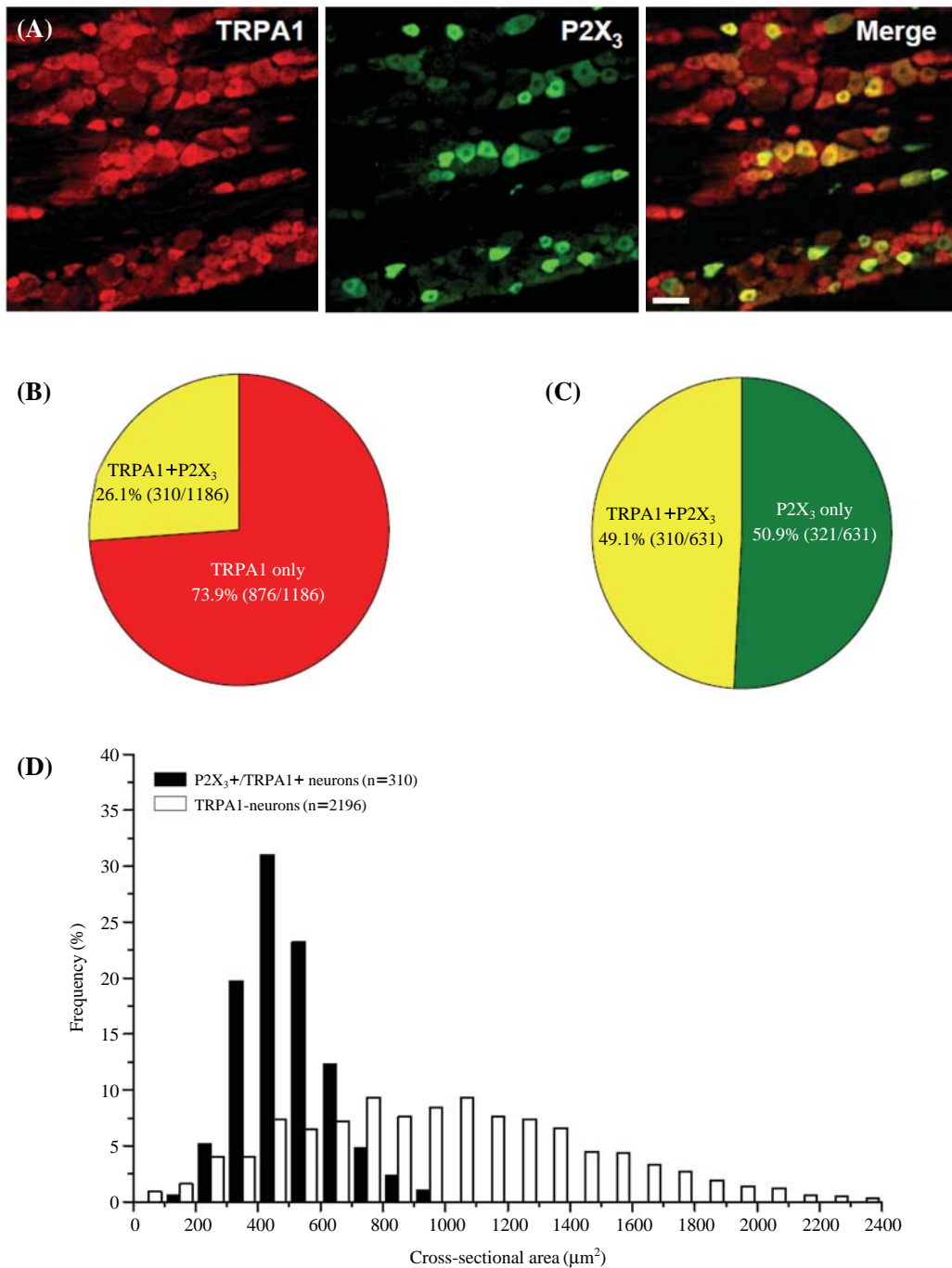


Fig. 2. Double immunofluorescence staining for TRPA1 (red) and P2X₃ (green) in the trigeminal ganglion (TG). A: TRPA1+ neurons costained for P2X₃. Colocalization is represented in yellow in the merged image. Scale bar=50 µm. B: Quantitative analysis of colocalization of TRPA1 with P2X₃. Among all TRPA1+ TG neurons, 26.1% (310/1186 in 19 sections) costained for P2X₃, and among all P2X₃+ TG neurons, 49.1% (310/631 in 19 sections) costained for TRPA1. C: P2X₃+TRPA1+ neurons were predominantly small- and medium-sized.

드성 (non-peptidergic) 일차돌신경세포의 표지자인 IB4면역 양성 신경세포에서도 발현한다는 기존 연구결과(Kim et al., 2010)와 동일하게, 본 연구에서는 TRPA1이 비펩티드성 일차돌신경세포에서 주로 발현되는 P2X₃와 공존한다는 사실을 알았다. 이는 TRPA1이 펩티드성 및 비펩티드성 신경세

포 모두에서 발현된다는 것을 의미한다.

최근 많은 연구들에 의해 TRPA1이 17°C보다 낮은 유해한 온도에 의해 활성화 될 뿐만 아니라, 다양한 자극들, 예를 들면 allyl isothiocyanate, cinnamaldehyde, allicin과 같은 겨자, 계피 그리고 마늘의 얼얼한 성분, 그리고 acrolein과 같은

환경유해물질들에 의해 활성화 된다는 것이 알려져 있다 (Story et al., 2003; Bautista et al., 2005; Andersson et al., 2008). 또한 TRPA1은 고역치 기계자극에 의한 통증의 전도에 기여 하며 (Kwan et al., 2006), 염증 및 신경손상시 야기되는 통각 과민화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Ji et al., 2007; Petrus et al., 2007; Eid et al., 2008). 이러한 TRPA1의 역할에 대한 많은 연구에도 불구하고 TRPA1을 발현하는 신경세포의 특성이 잘 알려져 있지 않는데, 본 연구에서는 TRPA1이 TRPV1 및 P2X₃와 공존한다는 사실을 밝혔다. TRPV1은 염증 및 신경손상시 발현양이 증가하며, 이는 다양한 유해자극에 의한 통각과민화를 조절한다는 것으로 알려져 있다 (Caterina & Julius, 2001). 또한, TRPV1은 43°C보다 높은 유해한 열자극에 의해 활성화되는 수용기이므로 (Caterina & Julius, 2001), TRPA1과 TRPV1을 발현하는 신경세포는 냉통각 및 열통각을 동시에 전달할 수 있다는 것을 시사한다. 그리고 TRPV1+/TRPA1+ 신경세포는 유해한 냉자극에 의한 작열감을 일으킬 수 있다는 것을 의미하며, 이는 TRPA1만을 발현하는 냉자극 수용기와 다른 독특한 기능을 수행할 것이라고 판단된다. 종합하면, TRPA1과 TRPV1을 동시에 발현하는 신경세포는 이들의 고유한 기능들을 서로 조절함으로써 유해한 자극이 TRPV1+/TRPA1+ 신경세포에 전달이 될 경우 과민화반응이 더 빨리 그리고 더 오랫동안 지속될 수 있을 것이라는 것을 시사한다.

P2X₃ 수용기는 조직의 손상 및 염증 시 분비되는 ATP와 결합하여 통증의 전도에 중요한 역할을 담당한다 (Burnstock, 2009). P2X₃ 수용기가 발현되지 않는 실험동물은 포르말린에 대한 유해반응이 정상동물과 비교했을 때 현저하게 감소되며, 이는 P2X₃ 수용기가 온도 및 염증성 과민화반응을 조절한다는 것을 의미한다 (Souslova et al., 2000). 본 연구에서는 P2X₃ 수용기를 발현하는 TRPA1+ 신경세포는 대체적으로 작거나 중간크기였으며, P2X₃ 수용기는 활성화되면 신경말단에서 glutamate가 분비된다는 것을 감안한다면 (Gu & MacDermott, 1997), P2X₃와 TRPA1이 공존하는 신경세포가 활성화되면 glutamate를 훨씬 더 많이 분비시켜 동통을 더욱 증폭시킬 수 있다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S: Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28 : 2485-2494, 2008.
- Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG: Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol* 478 : 62-71, 2004.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A: Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41 : 849-857, 2004.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124 : 1269-1282, 2006.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM: Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 12248-12252, 2005.
- Burnstock G: Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 15 : 1717-1735, 2009.
- Caterina MJ, Julius D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24 : 487-517, 2001.
- Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K: Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest* 117 : 1979-1987, 2007.
- del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM: TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 30 : 15165-15174, 2010.
- Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO: HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 4 : 48, 2008.
- Gu JG, MacDermott AB: Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389 : 749-753, 1997.
- Ji G, Zhou S, Carlton SM: Intact Adelta-fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* 154 : 1054-1066, 2008.
- Ji G, Zhou S, Kochukov MY, Westlund KN, Carlton SM: Plasticity in intact A delta- and C-fibers contributes to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* 150 : 182-193, 2007.
- Kim HY, Chung G, Jo HJ, Kim YS, Bae YC, Jung SJ, Kim JS, Oh SB: Characterization of dental nociceptive neurons. *J Dent Res* 90 : 771-776, 2011.
- 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* 506 : 627-639, 2008.
- Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC: Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 518 : 687-698, 2010.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K: Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493 : 596-606, 2005.

- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP: TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50 : 277-289, 2006.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J: Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25 : 4052-4061, 2005.
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K: TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115 : 2393-2401, 2005.
- Park CK, Kim MS, Fang Z, Li HY, Jung SJ, Choi SY, Lee SJ, Park K, Kim JS, Oh SB: Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. *J Biol Chem* 281 : 17304-17311, 2006.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A : A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 3 : 40, 2007.
- Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN: Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature* 407 : 1015-1017, 2000.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112 : 819-829, 2003.
- Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ: Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 436 : 225-235, 2001.
- Wirkner K, Sperlagh B, Illes P: P2X₃ receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol* 36 : 165-183, 2007.

< 국문 초록 >

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)은 17°C보다 낮은 유해한 온도 및 자극적인 화합물에 의해 활성화되며 통각을 조절한다. 그러나 TRPA1에 의한 통각정보가 어떻게 처리되는지에 대한 정보는 많이 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 흰쥐의 삼차신경절에서 TRPA1을 발현하는 신경세포의 특성을 규명하기 위해서, 면역형광기법을 사용하여 TRPA1을 발현하는 신경세포에서 다른 통각수용기들에서 발견되며, 특징적인 기능을 수행하는 수용기인 transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)와 P2X₃와의 발현양상을 조사하였다.

TRPA1을 발현하는 신경세포에서 열각수용기이며, 통각표지자인 TRPV1과의 공존을 조사해 본 결과, TRPA1 면역양성 신경세포 중에서 58.8% (328/558)가 TRPV1을 동시에 발현하였으며, 41.2% (230/558)가 TRPA1만 발현하고 TRPV1을 발현하지 않았다. TRPA1을 발현하는 신경세포 중 TRPV1을 동시에 발현하는 신경세포는 대부분 작거나 중간크기였다. 또한 TRPA1과 조직의 손상, 그리고 염증 시 분비되는 ATP와 결합하는 P2X₃와의 공존을 조사해 본 결과, TRPA1 면역양성 신경세포 중에서 26.1% (310/1186)의 신경세포에서 P2X₃을 동시에 발현하였으며, 73.9% (876/1186)의 신경세포에서 TRPA1만 발현하였다. TRPA1을 발현하는 신경세포 중 P2X₃을 동시에 발현하는 신경세포는 대부분 작거나 중간크기였다.

이러한 결과는 TRPA1을 발현하는 신경세포가 TRPV1 또는 P2X₃를 동시에 발현함으로써 동일한 신경세포가 구강안면영역에서의 냉통각 및 열통각을 조절할 뿐 아니라, 냉통각 및 염증성 동통을 동시에 전달하는 등 하나의 신경세포가 여러 가지 통각의 전달에 관여하는 것을 시사한다.