

Participation of IL-1 β in temporomandibular nociception in rats with CFA-induced inflammation

Jin-Sook Ju[†], Seung-Ho Choi[†], Hye-Jin Kim, Jo-Young Son, Dong-Kuk Ahn^{*}

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

(received July 28, 2016; revised August 16, 2016; accepted August 17, 2016)

The aim of the present study was to develop an animal model for evaluation of temporomandibular (TMJ) nociception under TMJ inflammation. We also investigated the participation of IL-1 β in inflammation-induced TMJ nociception. Experiments were carried out using male Sprague-Dawley rats. Intra-articular injection of 3% formalin was administered to evaluate hyperalgesia 3 days after CFA injection. Intra-articular injection of 3% formalin did not produce nociceptive behavior in normal rats. Although intra-articular injection of 3 doses of CFA produced TMJ inflammation, only 1:3 diluted CFA produced hyperalgesia when formalin was injected intra-articularly 3 days after CFA injection. Co-administration of IL-1 receptor inhibitor with formalin into the TMJ cavity 3 days after CFA injection was performed. Co-administration of IL-1 receptor inhibitor significantly inhibited formalin-induced hyperalgesia in rats with CFA-induced TMJ inflammation. These results suggested that intra-articular injection of formalin produced hyperalgesia under chronic TMJ inflammation. Moreover,

IL-1 β plays an important role in TMJ hyperalgesia under chronic inflammation and blockade of IL-1 β is a potential therapeutic target for inflammatory TMJ pain.

Key words: IL-1 β , TMJ, nociception, CFA, formalin behavior test

서론

측두골과 하악골을 이어주는 관절인 측두하악관절(temporomandibular joint, TMJ)에 염증이나 탈구 등이 발생하면 측두하악관절장애(temporomandibular disorder, TMD)가 발생한다. 측두하악관절장애의 주요 증상은 턱관절의 소리나 움직임 제한 등이 나타나는데, 이때 발생하는 통증도 측두하악관절장애 환자의 주요 증상 중 하나이다. 측두하악관절에서 발생하는 통증을 연구하기 위해서 formalin[1-3] 혹은 mustard oil[4,5] 등과 같이 통증을 유발시키는 물질들을 측두하악관절강 내로 주입하여 통증 행위반응을 관찰하여 평가하거나, complete Freund's adjuvant (CFA)를 측두하악관절강 내로 주입하여 염증을 유발시킨 다음 실험동물[6,7]에서 발생하는 염증의 정도를 평가하는 방법을 주로 이용하였다. 그러나 이러한 실험 동물모델은 측두하악관절에서 만성적인 염증으로 인하여 발생하는 통증을 직접 평가할 수가 없기 때문에 이러한 연구를 수행하는데 많은 한계점을 보여주고 있다.

감염, 염증, 면역질환 등에서 유리되어 만성염증이나 조직손상을 일으키는 사이토카인(cytokines)[8-10]은 측두하악관절에서도 중요한 작용을 나타낸다. 특히, 건강한

[†] These authors contributed equally to this study

^{*}Correspondence to: Dong-Kuk, Ahn, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1 Sam Deok 2ga, 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.

성인에서는 측두하악관절 윤활액에서 거의 관찰되지 않은 IL-1 β 는 측두하악관절장애를 가지는 환자에서 유의하게 증가하였다[11]는 보고는 측두하악관절 윤활액에서 증가한 IL-1 β 가 골관절염 발생에 중요한 역할[12]을 한다는 것을 의미하며 IL-1 β 가 관절의 염증성 질환과 조직파괴에 중요한 역할을 한다는 것을 말해준다[11,13]. 그러나 측두하악관절에서 만성염증성 질환이 발생하여 유발되는 통증에 측두하악관절 윤활액에서 증가한 IL-1 β 가 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 아직 밝혀진 바가 많지 않다.

본 연구는 만성염증성 질환을 유발시킨 측두하악관절에서 발생하는 통증을 쉽게 평가할 수 있는 실험동물을 개발하고자 수행하였다. 측두하악관절에 만성 염증을 유발하기 위하여 측두하악관절강 내로 다양한 농도의 CFA를 주입하여 만성 염증을 유발시켰으며, CFA 주입 후 3일이 경과하여 염증이 발생한 시기에 측두하악관절강 내로 포르말린을 주입하여 유발되는 통증 행위반응을 평가하였다. 만성염증을 가진 측두하악관절에서 발생하는 통증에 윤활액 내에 존재하는 IL-1 β 의 역할을 구명하기 위하여 IL-1 수용체 차단제(IL-1 receptor inhibitor)를 측두하악관절강 내로 주입한 다음 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반응을 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐(230-260g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 일정한 온도와 12 시간 주/야 빛 순환주기를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 실험동물위원회의 승인(2015-0053)을 얻었으며, 국제통증연구학회의 의식 있는 실험동물에서의 통증 평가 규정을 준수하였다. 모든 행동반응의 측정은 블라인드 테스트로 수행하였다.

측두하악관절에서 만성 염증발생

악관절 내로 CFA 주입: 실험동물은 스트레스를 최소화하기 위해서 실험 전 30분 동안 관찰통에 놓아 적응시켰으며, 적응기간 후에 실험동물을 3%의 isoflurane으로 흡입 마취시켰다. 마취된 흰쥐의 측두하악관절강 내로 Hamilton 주사기를 이용하여 3가지 농도의 CFA (1:1, 1:2, 1:3, CFA:saline)를 25 μ L되는 양을 각각 주입하였다. CFA의 희석은 0.9% 생리식염수로 하였으며 대조군은 생리식염수를 주입하였다.

측두하악관절에서 염증확인: 측두하악관절강 내로 CFA

가 주입되어 발생한 염증반응의 유무를 Evans' blue 염색시약을 이용한 선행연구의 방법[4,14-16]으로 평가하였다. 실험을 마친 다음, 실험동물을 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine (4 mg/kg) 혼합액으로 마취시키고, Evans'blue 염색시약 (0.1%, 5 mg/kg)을 우측대퇴정맥으로 주입하여 염색시약을 정량하여 확인하였다. 염색시약 주입 10분 뒤, 각 실험동물은 생리식염수로 관류시키고 관절조직을 적출하였다. 관절조직은 아세톤과 0.5% 나트륨 황산염 혼합액(7:3)에 넣어 간헐적으로 흔들어주며 상온에서 하루 동안 두었다. 그 후 조직을 300 rpm으로 10분 간 원심분리 시키고 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 분광광도계를 이용하여 흡광도 620 nm에서 측정하여 유리된 염색시약의 농도를 측정하였다.

Formalin에 의해 유도되는 통증반응의 평가

CFA를 주입 후 3일이 경과한 다음 측두하악관절강으로 포르말린을 주입하여 발생하는 통증 행위반응을 평가하였다. 실험동물을 3% isoflurane으로 흡입 마취한 다음 30 gauge needle을 이용하여 3% formalin용액 25 μ L을 흰쥐의 측두하악관절강 내로 주입하였다. 실험동물을 관찰상자로 옮겨 formalin 투여 후부터 formalin의 통증 효과가 끝나는 45분까지를 5분 간격으로 flinching, rubbing 횟수를 선행연구의 방법[1,2,17]에 따라 측정하였다. 일반적인 포르말린 반응에 의해 나타나는 통증성 행동이 나타나는 양상은 투여 후 초기에서 수 분 동안 과격한 반응(제1기 반응)이 나타난 후 줄어들고 약 10분 후부터 다시 지속적이고 강한 통증반응(제2기 반응)이 나타난다[2,18]. 그러나 본 연구에서는 1차반응이 실험동물을 흡입 마취하여 회복되는 시기에 해당되어 통증은 2차 반응만을 이용하여 평가하였다.

측두하악관절강 내로 주입한 IL-1 수용체 차단제 효과

측두하악관절강으로 CFA를 주입한 다음 3일이 경과하여 측두하악관절에 염증이 발생한 실험동물에서 IL-1 수용체 차단제(IL-1 receptor inhibitor, IL-1ra)를 포르말린과 같이 혼합하여 측두하악관절강으로 주입하고 이 때 나타나는 행위반응을 관찰하였다. IL-1 수용체 차단제의 농도는 200 ng의 농도로 20 μ L을 주입하였다. 대조군으로는 IL-1 수용체 차단제 대신에 동량의 생리식염수를 주입하였다.

통계분석

행위반응 실험결과와 통계분석은 반응 횟수의 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석(ONE-WAY ANOVA)과 bonferroni의 사후 분석(post-hoc analysis)을 실시하였다. 통

계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

실험 결과

그림 1은 정상적인 실험동물의 측두하악관절강으로 대조군으로 생리식염수를 주입하거나 통증과민현상을 평가하기 위해 3% 포르말린을 25 μ L 용량으로 각각 주입한 다음 통증 행위반응을 관찰한 결과를 나타내었다. 대조군으로 생리식염수를 측두하악관절강으로 주입하면 실험동물에서 31 ± 3.7 회 정도의 긁는 행위를 나타내었다. 이러한 행위반응은 아무런 처치를 하지 않은 naive군과 비교하여 볼 때 유의한 차이를 관찰하지 못하였다. 이러한 실험 결과는 측두하악관절강으로 투여한 생리식염수는 정상적인 실험동물에서 어떠한 통증 행위반응도 유발하지 못하였다는 것을 보여준다. 또한 3% 포르말린을 단독으로 주입하였을 때에도 생리식염수를 주입한 군과 유사하게 긁는 행위를 나타내었다.

만성염증을 가진 측두하악관절에서 발생하는 통증을 평가하기 위한 실험모델을 개발하기 위하여 3가지 서로 다른 농도의 CFA를 측두하악관절강으로 주입하여 만성염증을 유발하였다. CFA를 주입으로 유발되는 염증을 확인하기 위하여 악관절 조직에서 유리된 Evans' blue 염색 시약의 농도를 측정하고 결과 CFA 주입 후 염색시약 농도가 유의하게 증가하였다(data not shown). 이러한 실험 결과는 선행 실험결과[19]와 유사하게 나타났으며 주입한 CFA가 측두하악관절에서 만성염증을 유발시킨다는 것을

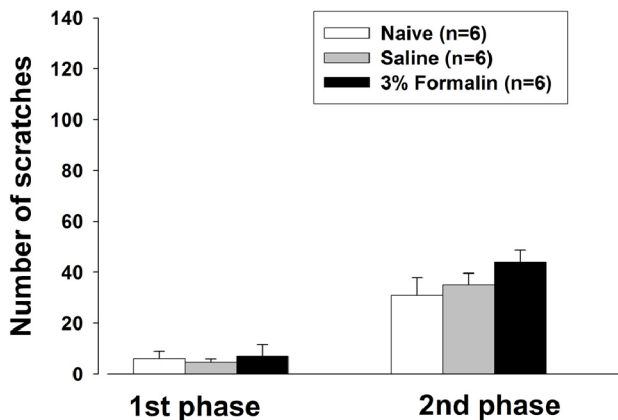


Figure 1. Effects of intra-articular injection of formalin. Intra-articular injection of saline did not alter behavioral responses compared to the naive rats. Also, intra-articular injection of 3% formalin did not produce nociceptive behavior compared to the saline-treated group. $n=6$ animals per group.

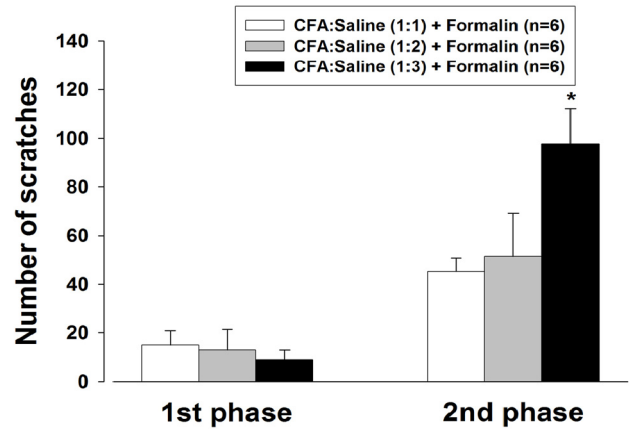


Figure 2. Effects of intra-articular injection of formalin in rats with CFA-induced TMJ inflammation. Intra-articular injection of CFA (1:1, 1:2, 1:3) produced significant TMJ inflammation. Intra-articular injection of 3% formalin produced hyperalgesic effects in the 1:3 diluted CFA-treated group. * $p < 0.05$, compare to 1:1 or 1:2 diluted CFA-treated group. $n=6$ animals per group.

알 수 있었다. CFA 주입 3일이 경과하여 염증이 발생한 실험동물의 측두하악관절강으로 3% 농도의 포르말린 용액 25 μ L를 주입하여 통증 행위반응을 유발시켰으며 결과를 그림 2에 나타내었다. 포르말린(3%)을 단독으로 주입하면 생리식염수를 주입한 군과 유사하게 특별한 통증 행위반응을 나타내지 않은 이전 결과에서 본 것과 같이 CFA를 1:1과 1:2농도로 희석한 용액을 처치하여 만성염증을 유발한 실험동물에서도 측두하악관절강으로 포르말린을 주입하면 대조군과 비교하여 유의한 통증 행위반응을 나타내지 못하였다. 그러나 1:3으로 희석한 CFA를 처치한 실험군에서 3% 포르말린을 주입하면 97.7 ± 14.5 회 정도로 통증 행위반응이 유의하게 증가되어 통증과민현상을 나타내었다.

실험동물의 측두하악관절에 CFA(1:3) 주입 3일 후 염증이 유발된 실험동물에서 200 ng의 IL-1 수용기 차단제를 포르말린과 같이 주입하여 통증에 미치는 영향을 평가한 결과를 그림 3에 나타내었다. 측두하악관절에 만성염증을 유발시킨 실험동물에서 대조군으로 vehicle인 생리식염수와 포르말린을 같이 주입하여 나타나는 통증 행위반응을 관찰하면 포르말린에 의한 통증과민현상을 억제하지 못하였다. 그러나 IL-1 수용기 차단제를 포르말린과 같이 주입하면 CFA를 주입하여 염증이 유발된 실험동물에서 포르말린에 의해 나타나는 통증과민현상을 유의하게 억제하였다.

측두하악관절강으로 주입한 IL-1 수용기 차단제가 자체적으로 악관절 통증에 미치는 영향이 있는지 확인하기 위하여 naive 실험동물에서 동일한 시점에 측두하악관절로 vehicle인 생리식염수와 IL-1 수용기 차단제를 각

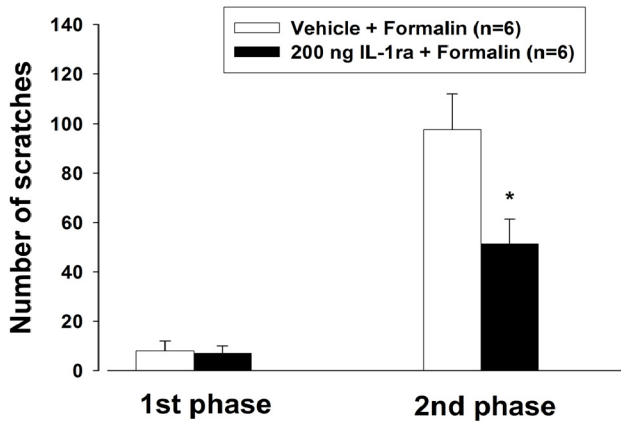


Figure 3. Effects of IL-1 receptor inhibitor(IL-1ra) on formalin-induced hyperalgesia in rats with CFA-induced TMJ inflammation. Intra-articular injection of CFA (1:3) produced TMJ inflammation. Co-administration of IL-1 receptor inhibitor with formalin into the TMJ significantly inhibited formalin-induced hyperalgesia compared to the vehicle-treated group. * $p < 0.05$, compare to vehicle-treated group. $n = 6$ animals per group.

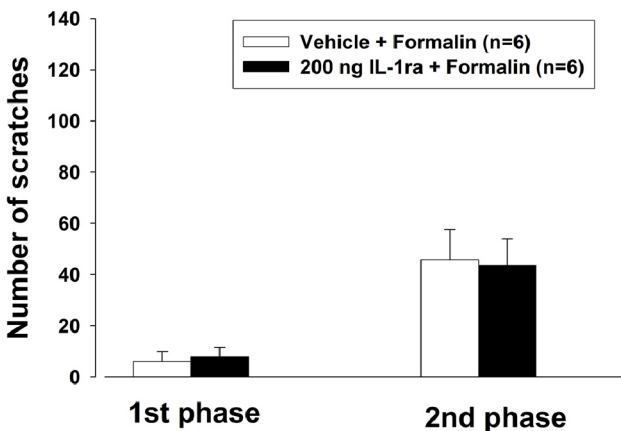


Figure 4. Effects of IL-1 receptor inhibitor(IL-1ra) on formalin-induced behavior in naive rats. Co-administration of IL-1 receptor inhibitor with formalin into the TMJ did not affect formalin-induced behavior compared to the vehicle-treated group. $n = 6$ animals per group.

각 처치한 다음 포르말린에 의한 통증반응을 평가하였다. naive 실험동물에서 측두하악관절강으로 주입한 IL-1 수용기 차단제는 생리식염수를 처치한 실험 군과 유사한 급는 행위반응을 나타내어 통증반응에 아무런 영향을 주지 못하였다(그림 4).

고찰

본 실험에서는 만성염증이 발생한 측두하악관절에서 통증을 평가하는 동물모델을 개발하고, 개발한 실험모델

을 이용하여 측두하악관절 윤활액에서 IL-1 β 가 염증에 의해 유발되는 측두하악관절 통증 발생에 미치는 역할을 구명하였다. 염증에 의해 발생하는 측두하악관절 통증을 관찰하기 위한 실험동물 모델은 CFA를 측두하악관절강으로 투여하여 만성염증을 발생시킨 실험동물에서 CFA 주입 3일 후 포르말린을 측두하악관절강으로 주사하여 나타나는 통증행위 반응을 평가하는 방법을 이용하였다. CFA를 1:3의 농도로 희석한 용액을 측두하악관절강으로 투여하여 염증을 유발시킨 실험동물에서 포르말린에 의한 통증 행위반응이 유의하게 증가하였다. 이때 나타나는 통증과민 현상은 측두하악관절강으로 IL-1 수용기 차단제를 투여하면 유의하게 억제되었다. 이러한 실험결과는 측두하악 관절에서 발생한 염증이 통증과민 현상을 유발할 수 있다는 것과 통증과민 현상에 IL-1 β 가 중요하게 작용한다는 것을 보여준다.

측두하악관절에서 유발되는 통증은 임상적으로 악안면영역에서 흔하게 나타나는 통증 중 하나이다. 측두하악관절에서 발생하는 통증은 부정교합, 이갈이(bruxism) 같은 구강의 악습관(oral parafunction)이나 외상(trauma) 혹은 스트레스 등의 다양한 원인에 의해 나타날 수 있다[20-22]. 측두하악관절에서 발생하는 통증의 전도기전에 대한 연구는 매우 제한적으로 이루어지고 있는데 이러한 이유는 측두하악관절에서 발생하는 통증을 정확하게 평가하는 실험 동물모델이 다양하게 개발되어 있지 않기 때문이다. 일반적으로 실험동물 흰쥐의 측두하악관절강으로 CFA를 주입하면 만성 염증이 유발하게 되고 이러한 염증성 질환을 이용하여 염증성 측두하악관절 동물모델[23-25]로 이용하게 된다. 그러나 CFA에 의해 유도되는 염증성 실험모델에서 통증의 평가는 직접 측두하악관절에서 발생하는 통증을 평가하는 것이 아닌 염증반응이 발생한 정도를 비교하여 평가하거나 측두하악관절 주위피부에서 발생하는 기계적 이질통증을 측정하여 평가하고 있다[25]. 이러한 실험 모델로는 염증성 측두하악관절에서 발생하는 통증을 직접 평가하기 힘들다는 것을 잘 보여 주고 있다. 또 다른 동물 모델로는 측두하악관절강으로 mustard oil[4,26]이나 포르말린을 주입하여 나타나는 통증 행위반응을 이용하여 평가하였다[1,2,16]. 그러나 이러한 실험 모델은 만성 염증을 가진 측두하악관절에서 발생하는 통증을 적절하게 평가하지 못하고 있다.

본 연구에서는 만성염증을 가진 측두하악관절에서 발생하는 통증을 평가하는 실험모델을 개발하였다. 먼저 실험동물의 측두하악관절강으로 염증을 유발하는 물질로 알려진 CFA를 다양한 농도로 주입하여 만성염증을 발생시켰다. CFA를 측두하악관절강으로 주입하면 만성

염증이 유발된다는 것은 본 실험 결과뿐만 아니라 Ren과 Dubner[7]의 실험에서 보여준 바와 같이 CFA 주입 후 측두하악관절 조직으로 Evans' blue 염색시약의 농도가 유의하게 증가되었다는 것으로 증명될 수 있다. 본 실험에서 CFA를 주입하여 만성염증이 발생한 3일 후 측두하악관절강으로 포르말린을 주입하면 생리식염수를 처치하여 염증이 발생하지 않은 실험군에 비하여 통증행위반응이 유의하게 증가하였다. 그러나 이때 나타나는 통증과민 현상은 1:1 혹은 1:2로 희석한 CFA 용액을 주입하였을 때는 나타나지 않았다. 이러한 실험결과는 실험모델로 사용하기 위해서 적절한 염증상태를 유지하여야 하며 1:3의 농도로 희석한 CFA 용액을 주입하는 것이 통증과민현상을 가장 잘 유발할 수 있다. 특히 본 연구에서 3% 포르말린 용액을 정상 실험동물인 naive 군의 측두하악관절강으로 투여하면 대조군인 생리식염수를 주입군과 비교하여 볼 때 어떠한 통증반응도 유발하지 못하였다. 그러나 포르말린 용액을 CFA(1:3)에 의해 염증이 유발된 실험동물의 측두하악관절강으로 투여하면 유의한 통증과민현상이 나타났다. 이러한 실험 결과는 측두하악관절에 발생하는 만성염증이 조직을 파괴하는 염증반응 뿐만 아니라 외부 유해자극에 반응하여 통증과민현상을 유발할 수 있다는 것을 보여준다.

측두하악관절이 파괴되면 개방형 부정교합이 발생하거나 관절의 운동장애가 발생한다[27]. 이러한 질환이 발생하는 이유는 만성염증이 발생할 때 염증성세포에서 다양한 염증물질[28]이나 활성산소[29]와 사이토카인[30,31]등이 유리되어 관절조직을 파괴하기 때문이다. 그러나 측두하악관절에서 염증이 발생하였을 때 관절조직을 파괴하거나 통증을 발생시키는 기전에 대해서는 밝혀진 바가 많지 않은 실정이다. 만성 염증이 유발된 측두하악관절에서 사이토카인의 하나인 IL-1 β 가 조직파괴에 관여한다는 것은 일부 선행연구를 통하여 알 수 있다. 실험동물에서 IL-1 β 항원에 의해 유도되는 관절염[32]이나 CFA에 의해 유도되는 관절염[33]에서 관절의 윤활액에서 IL-1 β 양이 유의하게 증가하였다. 특히 CFA를 측두하악관절강으로 주입하여 염증을 유발시킨 다음 IL-1 β 양을 측정된 실험 결과에서 CFA 투여 2일이 지난 다음부터 IL-1 β 가 증가하였으며 이러한 현상은 2주까지 지속되었다[34]. 이러한 실험결과는 측두하악관절로 CFA를 주입하면 염증이 유발되고 이때 윤활액에 IL-1 β 가 증가하게 되어[32,33] 악관절을 손상시키는 주요한 원인이 될 수 있다[11,12,35,36]는 것을 보여준다.

말초에서 유리되는 IL-1 β 가 통증과민 현상에 관여하는 것은 많은 선행연구에 의해 밝혀졌다. 일반적으로 말초

조직의 손상이나 염증이 발생하면 유해자극에 대한 반응이 증가하게 되어 통증과민 현상이 초래된다. 이 때 활성화된 대식세포나 단핵구 등에서 사이토카인의 하나인 IL-1 β 가 유리되어 통증과민 현상에 관여한다[9,37]. 또한 말초나 피하조직으로 IL-1 β 를 주입하면 열통증 과민현상[38,39,40]이 발생하였으며 특히 악안면 영역에서 기계적 이질통증[41]이 발생하였다. 이러한 실험결과는 말초에 존재하는 IL-1 β 가 통증과민 현상에 중요한 역할을 담당한다는 것을 암시한다. 그러나 측두하악관절에서 만성염증이 발생하였을 때 유리되는 IL-1 β 가 측두하악관절 통증에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 거의 없다. 본 실험에서는 측두하악관절에 CFA를 주사하여 만성염증을 유발시킨 실험동물에서 포르말린을 주입하면 유의한 통증과민 현상을 관찰할 수 있었다. 이때 발생하는 통증과민 현상은 IL-1 수용기 차단제의 처치에 의해 유의하게 억제되었다. 이러한 실험 결과는 측두하악관절에 염증이 발생할 때 유리되는 IL-1 β 가 측두하악관절에 발생하는 통증과민현상에도 중요하게 작용한다는 것을 말해준다. 본 연구와 같이 만성염증이 있는 측두하악관절에서 발생하는 통증과민 현상에 IL-1 β 가 중요하게 작용한다는 사실은 IL-1 β 가 증가된 환자는 악관절통증도 동반되는 경우도 있다는 보고[11,36]와 인위적으로 IL-1 β 를 측두하악관절강으로 주입하면 포르말린에 의해 나타나는 통증반응이 증가하였다[2]는 실험결과로 미루어 추론해 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 CFA를 측두하악관절강으로 투여하여 만성염증을 발생시킨 실험동물에서 포르말린에 의한 통증 행위반응이 유의하게 증가되었으며, 포르말린에 의해 발생하는 통증과민 현상은 측두하악관절강으로 투여한 IL-1 수용기 차단제에 의해 유의하게 억제되었다. 이러한 실험결과는 측두하악관절의 염증은 통증과민 현상을 유발하였고 이때 발생하는 통증과민 현상에 IL-1 β 가 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다.

Acknowledgements

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

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- Roveroni RC, Parada CA, Cecilia M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001;94:185-191.
- Ahn DK, Chae JM, Choi HS, Kyung HM, Kwon OW, Park HS, Youn DH, Bae YC. Central cyclooxygenase inhibitors reduced IL-1 β -induced hyperalgesia in temporomandibular joint of freely moving rats. *Pain*. 2005;117:204-213. doi: 10.1016/j.pain.2005.06.009.
- Won KA, Kang YM, Lee MK, Park MK, Ju JS, Bae YC, Ahn DK. Participation of microglial p38 MAPK in formalin-induced temporomandibular joint nociception in rats. *J Orofac Pain*. 2012;26:132-141.
- 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;18:8056-8064.
- Yu XM, Sessle BJ, Vernon H, Hu JW. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. *Pain*. 1995;60:143-149.
- Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav*. 1999;67:711-716.
- Ren K, Dubner R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *ILAR J*. 1999;40:111-118.
- Miller LC, Lynch EA, Isa S, Logan JW, Dinarello CA, Steere AC. Balance of synovial fluid IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. *Lancet*. 1993;341:146-148.
- Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998;16:457-499. doi: 10.3109/08830189809043005.
- Jouvenne P, Vannier E, Dinarello CA, Miossec P. Elevated levels of soluble interleukin-1 receptor type II and interleukin-1 receptor antagonist in patients with chronic arthritis: correlations with markers of inflammation and joint destruction. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1083-1089. doi: 10.1002/1529-0131(199806)41:6<1083::AID-ART15>3.0.CO;2-9.
- Alstergren P, Ernberg M, Kvarnström M, Kopp S. Interleukin-1 β in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998;56:1059-1065.
- Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami K. Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55:20-27.
- Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:305-315.
- Harada M, Takeuchi M, Fukao T, Katagiri K. A simple method for the quantitative extraction of dye extravasated into the skin. *J Pharm Pharmacol*. 1971;23:218-219.
- Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol*. 1992;37:417-422.
- Choi HS, Jung SC, Choi BJ, Ahn DK. Intra-articular injection of IL-1 β facilitated formalin-induced temporomandibular joint pain in freely moving rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2005;9:23-27. doi: 10.1016/j.pain.2005.06.009.
- Lee MK, Choi BY, Yang GY, Jeon HJ, Kyung HM, Kwon OW, Park HS, Bae YC, Mokha SS, Ahn DK. Low doses of cannabinoids enhance the antinociceptive effects of intracisternally administered mGluRs groups II and III agonists in formalin-induced TMJ nociception in rats. *Pain*. 2008;139:367-375. doi: 10.1016/j.pain.2008.05.005.
- Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Jung CY, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of TNF- α injected intracisternally on the nociceptive jaw-opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:613-618. doi: 10.1016/S0278-5846(03)00049-6.
- Won KA, Lim NH, Lee MK, Park MK, Yang GY, Park YY, Ahn DK, Bae YC. A blockade of central MAPK pathway attenuates referred pain in rats with complete Freund's adjuvant-induced inflammation of the temporomandibular joint. *Int J Oral Biol*. 2010;35:83-89.
- McNeill C. Management of temporomandibular disorders: concepts and controversies. *J Prosthet Dent*. 1997;77:510-522.
- Yatani H, Studts J, Cordova M, Carlson CR, Okeson JP. Comparison of sleep quality and clinical and psychologic characteristics in patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 2002;16:221-228.
- Oral K, Bal Kucuk B, Ebeoğlu B, Dincer S. Etiology of temporomandibular disorder pain. *Agri*. 2009;21:89-94.
- Harper RP, Kerins CA, McIntosh JE, Spears R, Bellinger LL. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9:619-624. doi: 10.1053/joca.2001.0461.
- 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;82:1244-1253.
- 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;412:276-291.
- Cairns BE, Sim Y, Bereiter DA, Sessle BJ, Hu JW. Influence of sex on reflex jaw muscle activity evoked from the rat temporomandibular joint. *Brain Res*. 2002;957:338-344.
- Nordahl S, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Eliasson S, Kopp S. Pain, tenderness, mandibular mobility, and anterior open bite in relation to radiographic erosions in temporomandibular joint disease. *Acta Odontol Scand*. 1997;55:18-22.
- Dreier R, Grässel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res*. 2004;297:303-312. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.02.027.

29. Borsiczky B, Szabó Z, Jaberansari MT, Mack PP, Röth E. Activated PMNs lead to oxidative stress on chondrocytes. A study of swine knees. *Acta Orthop Scand.* 2003;74:190-195. doi: 10.1080/00016470310013941.
30. Chin JE, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME. Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1990;33:1776-1786.
31. Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1999;38:202-213.
32. Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, Matsukawa A, Fukuda J, Kopp S. Interleukin-1 β in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2001;46:539-544.
33. Harper RP, Kerins CA, McIntosh JE, Spears R, Bellinger LL. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:619-624. doi: 10.1053/joca.2001.0461.
34. Spears R, Dees LA, Sapozhnikov M, Bellinger LL, Hutchins B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain.* 2005;19:34-40.
35. Nordahl S, Alstergren P, Eliasson S, Kopp S. Interleukin-1 β in plasma and synovial fluid in relation to radiographic changes in arthritic temporomandibular joints. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:559-563.
36. Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:135-141.
37. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature.* 1988;334:698-700. doi: 10.1038/334698a0.
38. Maier SF, Wiertelak EP, Martin D, Watkins LR. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. *Brain Res.* 1993;623:321-324.
39. Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 1994;654:15-26.
40. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1995;115: 1265-1275.
41. Ahn DK, Jung CY, Lee HJ, Choi HS, Ju JS, Bae YC. Peripheral glutamate receptors participate in interleukin-1 β -induced mechanical allodynia in the orofacial area of rats. *Neurosci Lett.* 2004;357:203-206. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.097.