

Distribution of Cold Receptor Transient Receptor Potential Melastatin 8-Immunopositive Axons in the Mouse Dental Pulp and Periodontal Tissue

Tae Heon Kim^{1,†}, Jae Sik Lee^{2,†}, Yun Sook Kim³ and Yong Chul Bae^{3,*}

¹Department of Dental Hygiene, Taegu Science University, Daegu 41453, Korea

²Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 41940, Korea

³Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 41940, Korea

(received September 22, 2017; revised November 01, 2017; accepted November 02, 2017)

Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) plays a crucial role in innocuous cool sensation, acute cold pain and cold-induced hyperalgesia during pathologic conditions. To help understand TRPM8-mediated cold perception in the dental pulp and periodontal tissues, we examined the distribution of TRPM8-immunopositive (+) axons in molar and incisor pulp and periodontal tissues using transgenic mice expressing a genetically encoded axonal tracer in TRPM8+ neurons.

In the radicular pulp of the molar teeth, a small number of TRPM8+ axons were observed. TRPM8+ axons branched frequently and extensively in the core of coronal pulp, forming a network in the peripheral pulp. Some TRPM8+ axons ascended between odontoblasts and were observed in the dentinal tubule. TRPM8+ axons were linear-shaped in the radicular pulp, whereas many TRPM8+ axons showed portions shaped like beads connected with thin axonal stands at the peripheral pulp. TRPM8 was densely expressed in the

bead portions. In the incisor pulp, TRPM8+ axons were occasionally observed in the core of the coronal pulp and rarely observed at the peripheral pulp. TRPM8+ axons were occasionally observed and showed a linear shape rather than a bead-like appearance in the periodontal ligament and lamina propria of the gingival tissue.

These findings, showing differential distribution of TRPM8+ axons between radicular and coronal portions of the molar pulp, between incisor and molar pulp, and between dental pulp and periodontal tissues, may reflect differential cold sensitivity in these regions.

Key words: TRPM8, dental pulp, periodontal tissue, immunohistochemistry

서론

치과에 내원하는 환자 중 많은 경우는 냉자극에 의해 야기되는 치아의 냉각과민(dental cold hypersensitivity) 증상을 호소한다. 그러나 치아에서 무해한 냉각각 혹은 냉통증이 어떠한 기전에 의해 야기되고 전달되는지에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않다.

Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)는 비선택적인 양이온채널(nonselective cation channel)인 TRP 채널 superfamily의 일원으로서 26 °C 이하의 무해한 냉각 및 냉통증에 의해 활성화된다[1-3]. 또한 이는 menthol, eucalyptol과 같은 수용성 menthol유도체와 icilin과 같은 합성화합물에 의해서도 활성화되며[4-6], 냉자극에 의한 급성통증, 염증

[†] These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Yong Chul Bae, DDS, PhD, Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1, 2-Ga, Samdeok-Dong, Jung-Gu, Daegu 41940, Korea

Tel: 82-53-660-6860, Fax: 82-53-426-7731

E-mail: ycbae@knu.ac.kr

ORCID : 0000-0002-7618-418X

및 신경손상 시 야기되는 통각과민에도 중요한 역할을 한다 [2, 7, 8].

최근 Kim 등[9]은 TRPM8이 주로 민말이집 C신경섬유와 작은 말이집 Aδ신경섬유에서 발현되며, 특히 전통적인 민말이집 C신경섬유의 분류인 펩티드성(peptidergic) 및 비펩티드성 C신경섬유가 아닌 특별한 종류의 C신경섬유에서 발현됨을 보고하고 있다. 이는 TRPM8에 의해 매개되는 무해한 냉각 및 냉통증이 특별한 형태(type)의 C신경섬유를 통해 전달될 것임을 시사한다. 또한 삼차신경절 및 치수에서 TRPM8을 발현하는 신경세포와 신경섬유는 glutamate의 소포(vesicle) 내 저장 및 분비에 관여하는 vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2)를 발현하지만 VGLUT1은 발현하지 않는다[10]. 또한 치수의 염증 시 삼차신경절 세포에서 TRPM8의 발현은 증가하지 않지만, VGLUT2의 발현은 증가한다고 보고되고 있다[10]. 이러한 연구는 치수의 염증 시 치수신경에 발현되는 TRPM8의 활성이 증가하기 보다는 TRPM8의 활성에 의한 VGLUT2의 활성이 증가할 것이며, 이로 인한 glutamate의 분비증가에 의해서 치수신경이 민감(sensitization)하게 되어 치수의 냉각과민증이 야기될 것임을 시사한다.

이와 같이 치수의 냉각, 냉통증, 그리고 병적인 상황에서의 냉각과민에 대한 많은 연구가 있어 왔으나, 마우스 어금니 및 앞니에서 TRPM8을 발현하는 신경섬유의 치수 내 분포, 치아주위조직에서의 분포에 대한 연구는 크게 부족한 실정이다. 본 연구에서는 이들 다양한 부위의 냉각 그리고 냉통증에 대한 민감도와 직접적인 연관이 있을 것으로 생각되는 TRPM8+ 신경섬유의 분포양식을 TRPM8^{GFP}마우스의 어금니 치수, 앞니 치수, 그리고 치아주위조직에서 면역조직화학기법을 사용하여 분석하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직처리

이 실험과 관련하여 실험동물의 보호 및 처치는 경북대학교 동물실험윤리위원회에서 승인(KNU 2011-44)을 받아서 진행하였다.

본 실험에서는 TRPM8 유전자를 knock-out시키고, green fluorescent protein (GFP)를 knock-in 시킨 체중이 30-35g 사이의 유전자변형 수컷 마우스 3마리를 사용하였다. 이 마우스는 University of southern California의 McKemy 교수 그룹에서 제공받았다. 실험동물을 sodium pentobarbital (60 mg/kg, I.p.)을 사용하여 깊이 전진마취를 시키고 오름대동맥을 통하여 10 ml의 헤파린을 함유한 생리식염수로 관류하여 혈관 내 혈액을 제거한 후, 50 ml의 4% paraformaldehyde

(PFA, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)를 사용하여 관류고정을 하였다. 관류고정 후 앞니와 어금니 부위를 포함한 조직을 분리하여 10% Ethylenediaminetetraacetic acid용액에 약 92시간동안 탈회를 시켰다. 탈회된 앞니와 어금니는 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, PB)에 10분간 3회 세척한 후 동결 시 손상을 최소화하기 위해 30% sucrose 용액에 약 16시간 동안 처리한 후, 동결절편기를 이용하여 30 μm 두께로 절편을 제작하고 형광면역조직화학법을 시행하였다.

형광면역조직화학법

형광면역염색 과정의 모든 반응은 실온에서 그리고 진탕을 하면서 시행하였다. 본 실험에서 시행한 형광면역염색 과정을 간략히 기술하면 다음과 같다. 조직절편 내 항체의 침투를 용이하게 하기 위해 50% ethanol에 30분간 절편을 침적하였으며, 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 5분간 3회 세척한 후 10% normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)에서 30분간 반응시켜 비특이적 반응을 최소화 하였다. 그 후 GFP 항체 (1:1000; Rabbit anti-GFP, Invitrogen Calsbad, CA)를 20시간 동안 처리하였으며, 0.01 M PBS로 치수 절편을 10분간 3회 세척한 다음, 2% NDS로 30분간 반응하였다. 이후 2차 항체로서 형광물질이 결합된 항체(FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody; 1:200, Jackson ImmunoResearch)를 3시간 반응시킨 후, 0.01 M PBS 그리고 증류수로 다시 10분간 3회씩 세척한 다음 형광용 슬라이드 위에 절편을 올린 후 공초점레이저주사현미경(LSM 510 META; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 관찰 및 분석을 실시하였다. 이들 현미경 영상은 TIFF 확장자 파일로 저장하였으며, Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System, San Jose, CA)을 이용하여 명도와 대비를 조정하였다.

본 연구에서 사용한 일차 및 이차항체의 특이성 검증을 위하여 일차 및 이차항체 대신 면역글로블린 G 혹은 PBS 용액을 사용하여 동일한 면역염색 과정을 수행하였으며 이때 특이적 항원항체반응은 관찰되지 않았다.

결과

본 연구에서는 TRPM8^{GFP}마우스의 앞니 및 어금니의 치수와 치아주위조직에서 TRPM8 면역양성(+) 신경경섬유의 분포를 관찰하였다.

어금니의 치아뿌리치수(radicular pulp)에서 TRPM8+ 신경섬유가 다수 관찰되었다. 관찰된 TRPM8+ 신경섬유들의 대부분은 실모양으로 나타났으며, 염주알 모양의 형태를 보이는 것도 소수 관찰되었다. TRPM8+ 신경섬유들은 치아뿌

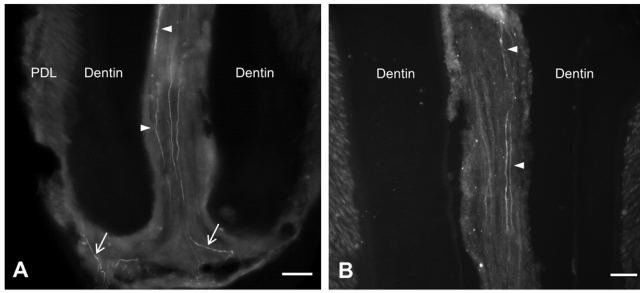


Fig. 1. Immunofluorescent staining for TRPM8 in the apical (A) and middle (B) portion of the radicular pulp. A small number of TRPM8+ axons are observed in the apical and middle portion of the radicular pulp. TRPM8 immunoreactivity is observed as linear shape but not as bead like swelling. Arrowheads indicate TRPM8+ axons in the radicular pulp. Arrows indicate TRPM8+ axons in the periapical regions. PDL: periodontal ligament. Scale bars = 50 μm .

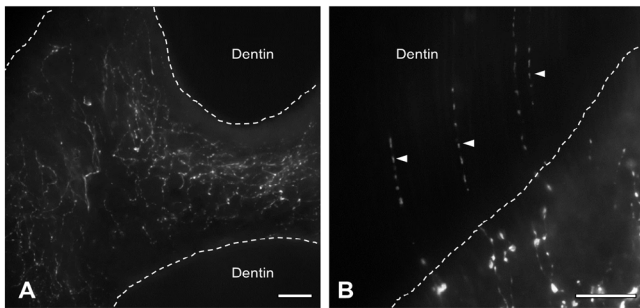


Fig. 2. Immunofluorescent staining for TRPM8 in the coronal pulp (A) and in the dentinal tubules (B). A: TRPM8+ axons are dense and extensively branched at the peripheral portion of the coronal pulp and at the pulp horn. TRPM8 is densely expressed in the axonal beads. B: some TRPM8+ axons ascend toward enamel in the dentinal tubules. Dotted line demarcates pulp and dentin. Arrowheads: TRPM8+ axons within the dentinal tubules. Scale bars = 50 μm .

리치수에서는 거의 가지를 형성하지 않았으며, 치아머리속질(coronal pulp)을 향하여 주행하였다(Fig. 1). 치아머리속질에서 TRPM8+ 신경섬유는 여러 갈래의 가지를 광범위하게 형성하였다. 이들은 상아질모세포(odontoblast)에 인접한 치아머리속질의 가쪽(peripheral pulp) 그리고 속질뿔(pulp horn coronal pulp)에서 밀도가 대단히 높았으며 이 부위에서는 대다수의 TRPM8+ 신경섬유가 염주알 모양을 보였다. 이들 중 일부는 상아질모세포층을 지나 상아질세관(dentinal tubule) 안으로 주행하였다(Fig. 2).

앞니의 치수에서는 TRPM8+ 신경섬유가 소수 관찰되었으며 이들의 밀도는 치아뿌리치수와 치아머리속질 사이에서 차이가 없었다. TRPM8+ 신경섬유는 어금니 치수와 동일하게 실모양과 염주알 모양 두가지의 형태가 관찰되었다. 그러나, 어금니 치수에서와는 달리, 상아질모세포에 인접한 치아머리속질의 가쪽, 상아질모세포층 그리고 상아질세관

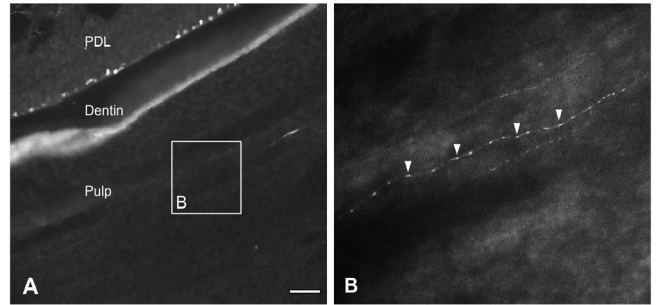


Fig. 3. Immunofluorescent staining for TRPM8 in the incisor pulp. TRPM8+ axons are sparse in the incisor pulp. B is an enlargement of the boxed area in A. Arrowheads indicate TRPM8+ axon. PDL: periodontal ligament. Scale bar = 50 μm .

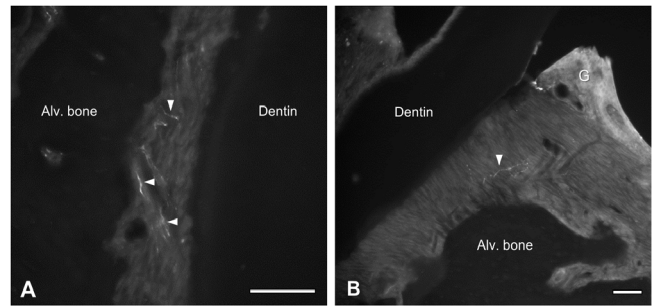


Fig. 4. Immunofluorescent staining for TRPM8 in the periodontal ligament of the molar tooth (A) and in the lamina propria of the gingiva (B). TRPM8+ axons are occasionally observed in the periodontal ligament and in the lamina propria of the gingiva but not in the gingival epithelium. Arrowheads indicate TRPM8+ axon. Alv. bone: Alveolar bone. G: gingiva. Scale bars = 50 μm .

에서는 TRPM8+ 신경섬유가 거의 관찰되지 않았으며, 치아머리속질의 중심부에서 TRPM8+ 신경섬유가 소수 관찰되었다(Fig. 3).

어금니 및 앞니의 상아질(dentin)과 이틀뼈(alveolar bone) 사이의 치주인대(periodontal ligament)에서 그리고 치은(gingiva)하방에서는 TRPM8+ 신경섬유가 간혹 관찰되었으며, 이들의 밀도는 치수에 비해 현저히 낮았다. 치주인대부위에서 TRPM8+ 신경섬유의 분포는 어금니부와 앞니부의 치주인대 간 차이가 없었다(Fig. 4).

고찰

본 연구를 통해 밝힌 주된 발견은 다음과 같다. 1) TRPM8 면역양성(+) 신경섬유는 마우스 어금니의 치아머리속질의 주변부, 속질뿔에서 밀집되어 분포하였으며, 일부는 상아질모세포사이를 지나 상아질세관내로 주행하였다. 2) 이에 비해 앞니의 치수에서는 TRPM8+ 신경섬유가 소수 관찰되었다. 3) 치아주위조직 즉, 치주인대, 치은상피

하부의 결합조직에서는 TRPM8+ 신경섬유가 대단히 드물게 관찰되었다. 이러한 소견은 TRPM8에 의해 매개되는 냉각의 감수성은 어금니 치수 부위사이, 어금니 치수와 앞니 치수사이, 치수와 치아주위조직 사이에서 각기 다를 것이라는 것을 시사한다.

TRPM8는 2001년 전립샘 암세포에서 처음 발견된[11] 이후, 이에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 감각신경세포에서 발견되는 TRPM8은 섭씨 26°C 이하의 무해냉각(*innocuous cool*)과 유해냉각(*noxious cold*)을 감지한다[1, 2]. TRPM8-/- 마우스에 Complete Freund's Adjuvant를 주입하여 염증성 통증 혹은 신경손상을 유도한 신경병성 통증 모델을 이용한 많은 연구들을 통하여 TRPM8는 염증 혹은 신경손상 시 야기되는 통각과민(*pain hypersensitivity*)에 중요한 역할을 한다고 알려져 왔다[7, 12, 13]. Kim 등[10]은 TRPM8이 C신경섬유, A δ 신경섬유에서 발견되며, A β 신경섬유에서는 발견되지 않는다고 보고하여 TRPM8에 의해 매개되는 냉각은 C와 A δ 신경섬유에 의해 전달될 것이라고 시사하였다. 또한, 삼차신경절에서 TRPM8+ 신경세포의 28%는 펩티드성 신경세포이며, 약 1.3%는 비펩티드성 신경세포이라는 것을 보고하였다. 이러한 보고들과 TRPM8+ 신경섬유의 76.3%가 C신경섬유라는 것[10]을 함께 감안하면 대다수의 C신경섬유를 가지는 TRPM8+ 신경세포는 기존의 펩티드성, 비펩티드성 신경세포의 분류에 속하지 않으며, 특별한 종류의 C신경세포라는 것을 의미한다. 이는 TRPM8 매개에 의한 냉각정보는 다수의 특별한 종류의 C신경섬유에 의해 전달될 것이라는 것을 시사한다. 한편으로 치수를 지배하는 대다수의 신경섬유는 A δ 신경섬유이며, 이들은 주로 치수의 주변부로 투사한다는 것[14]을 감안하면, 치아머리속질 주변부에서 TRPM8+ 신경섬유는 C신경섬유 보다는 A δ 신경섬유일 것으로 생각된다.

본 연구에서 TRPM8+ 신경섬유의 분포는 어금니 치수내의 부위에 따라 달랐다. 치아뿌리치수에서는 소수의 TRPM8+ 신경섬유가 가지를 내지 않고 주행하였으나 치아머리속질의 주변부 및 속질빨에서는 TRPM8+ 신경섬유가 수많은 가지를 내었으며 이들의 밀도가 대단히 높았다. 또한 이들 중 일부는 상아질모세포 사이를 지나 상아질세관내로 주행하였다. 이는 상아질 노출 시 야기되는 냉각에 의한 통각과민(*cold hypersensitivity*)을 설명할 수 있는 중요한 관찰로 생각되며, TRPM8에 의해 매개되는 냉각, 냉통증, 그리고 통각과민은 주로 치수의 가쪽에서 야기되며 치아뿌리치수에서는 치아머리속질 보다는 TRPM8에 의한 냉각 혹은 통증에 대한 감수성이 낮을 것이라 예측된다. 상아질과민증(*dentin hypersensitivity*)을 설명하는 여러 이론 중 최근에 많이 받아들여지는 가설은 상아질이 자극을 받으면 상아질세관 내 액체의 이동이 일어나고, 이것이 치수내의 자유신경

종말에 의해 감지된다는 유체역학 이론(*hydrodynamic theory*)이다. TRPM8을 발현하는 신경섬유가 치수주변 부위에서 밀집된 분포, 일부 TRPM8을 발현하는 신경섬유의 상아질세관 내 주행을 보여주는 본 연구 결과는, 냉각에 의한 통각과민은 유체역학설 뿐 아니라 상아질세관내에 분포하는 신경섬유에서 발현되는 TRPM8의 직접적인 활성화에 의해 야기될 것이라는 것을 시사한다.

설치류의 앞니 치수에서는 혈관과 연계되어 혈관의 수축에 관여하는 교감신경이 많이 분포하고 있다. 또한, 감각신경은 어금니보다 훨씬 적게 분포하며, 이들은 대부분이 민말이집 C신경섬유이고, 치수주변부에서 열기(*plexus*)를 형성하지 않으며, 상아질내로 투사하지 않는 특징을 보인다[15]. 본 연구에서, 어금니 치수에서는 TRPM8+ 신경섬유가 치수의 주변부에서 대단히 많이 관찰되는데 비해 앞니 치수에서는 소수의 TRPM8+ 섬유가 관찰됨으로써 설치류의 앞니 치수에서의 감각신경의 분포특징과 일치하였으며, 이는 냉각 혹은 냉통증에 대한 민감도에 있어서 마우스 어금니 및 앞니 사이에 큰 차이가 있을 것임을 시사한다.

치주인대 그리고 치은하부의 고유조직에서 TRPM8+ 신경섬유가 간혹 관찰되었으며, 치은상피에서는 관찰되지 않았는데, 이는 *glabrous skin*에서 TRPM8+ 신경섬유가 상피내로는 주행하지 않고, 상피아래의 고유조직에 국한되어 분포한다는 연구결과[16]와 유사하였다. 또한 치주인대에는 고유감각을 전달하는 신경섬유 및 통증을 전달하는 신경섬유가 많이 분포한다는 연구결과와 비교되었다[17-22]. 치주인대 및 인접 고유조직에서 소수의 TRPM8+ 신경섬유의 분포는 이들 조직에서 냉각, 냉통증에 대한 민감성이 치수에 비해 훨씬 낮을 것이라는 형태학적인 증거로 생각된다.

본 연구에서 TRPM8+ 반응은 선모양 혹은 가는 선으로 연결된 팽창된 염주알 모양으로 관찰되었다. 선에서 관찰되는 TRPM8+ 반응은 주로 말초부위로 이동중인 TRPM8으로 생각되며, TRPM8이 주로 염주알 모양 부위에서 강하게 반응하는 것으로 보아 냉각에 의한 TRPM8의 활성화는 주로 이 부위에서 일어날 것으로 생각된다. 이전의 연구에서 신경의 염주알 모양 부위에서 신경소포내로 *glutamate*의 이동에 관여하며, *glutamate*의 분비에 중요한 역할을 하는 *vesicular glutamate transporter*[23, 24]의 면역반응이 강하게 나타난다고 보고하였다[9, 25, 26]. 이를 감안하면, 염주알 모양 부위에서 냉각에 의해 TRPM8이 활성화되면 이 부위에서 *vesicular glutamate transporter*에 의해 *glutamate*가 분비되며, 이는 인접 신경섬유에서 발현되는 *glutamate* 수용체를 활성화시킴으로써[27, 28], 통각과민화 반응에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2017R1A2B2003561, NRF-2017R1A5A2015391) to Y.C.B., 2010-0004063 Y.S.K.).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

1. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002;108(5):705-715. doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9.
2. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416(6876):52-58. doi:10.1038/nature719.
3. Knowlton WM1, McKemy DD. TRPM8: from cold to cancer, peppermint to pain. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(1):68-77. doi:10.2174/138920111793937961.
4. Chuang HH1, Neuhausser WM, Julius D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*. 2004;43(6):859-869. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.038.
5. Boddington M. TRP proteins and cancer. *Cell Signal*. 2007;19(3):617-624. doi:10.1016/j.cellsig.2006.08.012.
6. Wrigley PJ, Jeong HJ, Vaughan CW. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. *Br J Pharmacol*. 2009;157(3):371-380. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00167.x.
7. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007;448(7150):204-208. doi:10.1038/nature05910.
8. Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain*. 2010;150(2):340-350. doi:10.1016/j.pain.2010.05.021.
9. 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;303:378-388. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.013.
10. Kim YS, Park JH, Choi SJ, Bae JY, Ahn DK, McKemy DD, Bae YC. Central connectivity of transient receptor potential melastatin 8-expressing axons in the brain stem and spinal dorsal horn. *PLoS One*. 2014;9(4):e94080. doi:10.1371/journal.pone.0094080.
11. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*. 2001;61(9):3760-3769.
12. Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*. 2007;54(3):371-378. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.024.
13. Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 2007;54(3):379-386. doi:10.1016/j.neuron.2007.04.017.
14. Kim TH, Park SK, Choi SY, Lee JS, Bae YC. Morphologic Change of Parvalbumin-positive Myelinated Axons in the Human Dental Pulp. *J Endod*. 2017;43(6):977-981. doi:10.1016/j.joen.2017.01.010.
15. Byers MR. Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*. 1984;25:39-94.
16. Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD: Diversity in the Neural Circuitry of Cold Sensing Revealed by Genetic Axonal Labeling of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Neurons. *J Neurosci*. 2007;27(51):14147-14157. doi:10.1523/JNEUROSCI.4578-07.2007.
17. Kato J, Ichikawa H, Wakisaka S, Matsuo S, Sakuda M, Akai M. The distribution of vasoactive intestinal polypeptides and calcitonin gene-related peptide in the periodontal ligament of mouse molar teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(1):63-66. doi:https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90116-R.
18. Saito I, Ishii K, Hanada K, Sato O, Maeda T. Responses of calcitonin gene-related peptide-immunopositive nerve fibres in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement. *Arch Oral Biol*. 1991;36(9):689-692. doi:https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90023-N.
19. Mengel MK, Jyvasjarvi E, Kniffki KD. Identification and characterization of afferent periodontal A delta fibres in the cat. *J Physiol*. 1993;464:393-405. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019641.
20. Ochi K, Wakisaka S, Youn SH, Hanada K, Maeda T. Calretinin-like immunoreactivity in the Ruffini endings, slowly adapting mechanoreceptors, of the periodontal ligament of the rat incisor. *Brain Res*. 1997;769(1):183-187. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00847-0.
21. Alkhamrah BA, Hoshino N, Kawano Y, Harada F, Hanada K,

- Maeda T. The periodontal Ruffini endings in brain derived neurotrophic factor (BDNF) deficient mice. *Arch Histol Cytol.* 2003;66(1):73-81. doi:http://doi.org/10.1679/aohc.66.73.
22. Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T. Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci Lett.* 2011;488(2):173-177. doi:10.1016/j.neulet.2010.11.023.
23. 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(2):98-103. doi:10.1016/j.tins.2003.11.005.
24. 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(2):469-490. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.068.
25. Yang ES, Jin MU, Hong JH, Kim YS, Choi SY, Kim TH, Cho YS, Bae YC. Expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the rat dental pulp and trigeminal ganglion following inflammation. *PLoS One.* 2014;9(10):e109723. doi:10.1371/journal.pone.0109723.
26. 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(4):470-474. doi:10.1016/j.joen.2011.12.012.
27. Kim YS, Kim YJ, Paik SK, Cho YS, Kwon TG, Ahn DK, Kim SK, Yoshida A, Bae YC. Expression of metabotropic glutamate receptor mGluR5 in human dental pulp. *J Endod.* 2009;35(5):690-694. doi:10.1016/j.joen.2009.02.005.
28. Cho YS, Kim YS, Moozhayil SJ, Yang ES, Bae YC. The expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1) and HCN2 in the rat trigeminal ganglion, sensory root, and dental pulp. *Neuroscience.* 2015;291:15-25. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.066.