

Peripheral Cellular Mechanisms of Artemin-induced Thermal Hyperalgesia in Rats

Hye-Jin Kim¹, Kui-Ye Yang¹, Min-Kyung Lee², Min-Kyoung Park³, Jo-Young Son¹, Jin-Sook Ju¹
and Dong-Kuk Ahn^{1,*}

¹Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Department of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Busan, Korea

³Department of Dental Hygiene, Kyung-Woon University, Gumi, Korea

(received January 19, 2017; revised February 21, 2017; accepted February 22, 2017)

In the present study, we investigated the role of peripheral ionotropic receptors in artemin-induced thermal hyperalgesia in the orofacial area. Male Sprague-Dawley rats weighting 230 to 280 g were used in the study. Under anesthesia, a polyethylene tube was implanted in the subcutaneous area of the vibrissa pad, which enabled drug-injection. After subcutaneous injection of artemin, changes in air-puff thresholds and head withdrawal latency time were evaluated. Subcutaneous injection of artemin (0.5 or 1 µg) produced significant thermal hyperalgesia in a dose-dependent manner. However, subcutaneous injection of artemin showed no effect on air-puff thresholds. IRTX (4 µg), a TRPV1 receptor antagonist, D-AP5 (40 or 80 µg), an NMDA receptor antagonist, or NBQX (20 or 40 µg), an AMPA receptor antagonist, was injected subcutaneously 10 min prior to the artemin injection. Pretreatment with IRTX and D-AP5 significantly inhibited the artemin-induced thermal hyperalgesia. In contrast, pretreatment with both doses of

NBQX showed no effect on artemin-induced thermal hyperalgesia. Moreover, pretreatment with H-89, a PKA inhibitor, and chelerythrine, a PKC inhibitor, decreased the artemin-induced thermal hyperalgesia. These results suggested that artemin-induced thermal hyperalgesia is mediated by the sensitized peripheral TRPV1 and NMDA receptor via activation of protein kinases.

Key words: artemin, thermal hyperalgesia, peripheral ionotropic receptor, TRPV1, NMDA

서론

신경성장인자로 알려져 있는 glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) 집합체는 GDNF, neurturin, persephin, 그리고 artemin으로 구성되어 있으며[1-4], 세포의 성장, 분화, 이동 등을 포함하는 다양한 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다[5]. 그 중 artemin은 뉴런의 생성, 발달, 유지에 관여하며[5-7], 축삭생성[8]과 신경재생[9,10] 등에서 중요한 역할을 담당한다.

최근 연구는 artemin이 통증조절에 중요하게 작용한다는 사실을 보고하였다. Artemin을 흰 쥐 발바닥의 피하조직으로 투여하였을 때 열통증 반응이 유발되어 4시간 동안 유지되었고[11], 냉자극에 대한 반응을 유의하게 증가시켰다[12]. 그리고 유전자를 조작하여 피부에서 특이적으로 artemin의 발현을 증가시킨 흰 쥐에서 열자극에 대한 역치가 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소

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

한 것을 확인하였다[13]. 이러한 연구 결과들은 artemin 이 말초조직에서 통증 신호전달에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다.

일차구심성 신경에서 transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)이나 glutamate 이온통로와 같이 다양한 종류의 이온통로가 통증전도에 관여한다고 알려져 있다[14-18]. TRPV1 수용기는 주로 작은 직경의 일차구심성 신경섬유에서 발현하는데[19] 염증과 신경 손상이 발생하였을 때 열통증을 전도한다[20,21]고 알려져 있다. TRPV1 수용기뿐만 아니라, glutamate 수용기 중 ionotropic glutamate 수용기도 일차구심성 신경에서 통증전도나 통증과민현상을 야기하는 것으로 알려져 있다[22-24]. Ionotropic 수용기 중 N-Methyl-D-aspartate(NMDA)와 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA) 수용기 대항제를 피하로 투여하였을 때 IL-1 β 로 유발되는 기계적 이질통증을 차단시켰다[25]는 연구 결과들은 말초신경말단에 존재하는 NMDA 나 AMPA 수용기가 말초조직에서 발생하는 통증에 중요한 역할을 담당한다는 것을 증명해 준다. 그러나 artemin에 의해 유도되는 통증반응에 말초신경말단에 존재하는 이온 통로 수용기들의 역할에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 artemin을 실험동물 흰 쥐의 안면영역의 피하조직으로 투여하였을 때 나타나는 기계적 이질통증과 열통증을 평가하였고, TRPV1, NMDA, AMPA 수용기를 차단하였을 때 artemin에 의해 유도되는 통증반응에 미치는 영향을 알아보았다. 또한, artemin 주입으로 발생하는 통증에 단백질 인산화효소가 어떠한 역할을 하는지 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물과 수술

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley계 흰 쥐(230~280 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 일정한 온도와 12시간 주/야 빛의 순환주기를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 실험동물위원회의 승인(2015-0053)을 얻었으며, 의식이 있는 동물 실험에 관한 세계통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다. 실험동물은 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(4 mg/kg) 혼합액으로 마취한 뒤, 약물을 항상 일정한 위치에 동일하게 투여하기 위해 마취된 쥐의 왼쪽 안면영역에서 3번째 줄의 5번째에 위치하고 있는 수염부분에 폴리에틸렌관(PE10, Clay Adams, Parsippany, NJ)을 삽관하였다. 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다.

안면통증의 평가

행위반응을 관찰하기 위해 실험동물이 목을 빼내어 자유롭게 움직일 수 있도록 설계된 투명한 플라스틱 관찰용 통에 한 마리씩 넣어 실험을 수행하였다. 모든 행동반응의 측정은 블라인드 테스트로 수행하였다.

열통증의 평가: 열자극은 레이저 자극기(Infrared Diode Laser, LVI-808-10, LVI Technology, Seoul, Korea)를 이용하여 피부로부터 10 cm 떨어진 곳에서 90도 각도로 적용하였다[30-32]. 안면영역에 열자극을 적용한 다음 얼굴을 피하는 시간(head withdrawal latency)을 측정하여 평가하였다. 실험동물에서 열통증의 평가는 5분의 시간 간격을 두고 2번의 자극을 가한 다음 평균값을 산출하였으며, 조직손상을 방지하기 위해 cut-off time을 20초로 설정하였다.

이질통증의 평가: 기계적 이질통증을 평가하기 위해 공기자극 테스트(air-puff test)를 이용하였는데[25-27], 삼차신경이 지배하는 안면영역에 가해지는 연속된 10번의 공기자극을 4초 동안 10초의 간격으로 주었을 때 머리를 회피하거나 깨무는 등의 공격적인 행동을 행위반응의 평가 기준으로 삼았다. 공기자극은 금속관(26 gauge, 10 cm)을 통해 피부로부터 1 cm 떨어진 곳에서 90도 각도로 적용하였다. 공기자극 세기와 간격은 pneumatic pump module (BH2 system, Harvard Apparatus, USA)로 조절하였다. 자극의 역치는 총 시도에서 50% 이상의 반응을 보인 경우로 평가하였으며[27-29], 40 psi 이상의 자극에서도 반응이 나타나지 않으면 자극을 중지하였다. 정상적인 동물은 압력 세기가 40 psi 이하인 경우 어떠한 통증 반응도 나타내지 않았다.

실험 프로토콜

Artemin의 통증유발 작용: 피하에 삽입되어 고정된 폴리에틸렌관을 이용하여 0.5 또는 1 μ g의 artemin을 투여한 후 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 24, 48, 72 그리고 96시간에 열자극을 가하여 회피하는 시간을 측정하여 열통증이 발생하는지 평가하였다. 그리고 안면피부에 공기자극을 가하여 공기자극 역치를 평가하여 이질통증이 발생하는지 알아보았다.

TRPV1 ionotropic glutamate 수용기의 역할: Artemin을 투여하기 10분 전에 TRPV1 수용기 대항제인 iodoresiniferatoxin (IRTX, 4 μ g), NMDA 수용기 대항제인 D-AP5(40, 80 μ g) 그리고 AMPA 수용기 대항제인 NBQX(20, 40 μ g)를 폴리에틸렌관을 이용하여 말초로 각각 투여하였다. 이어서 artemin (1 μ g)을 주입한 다음 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 그리고 1440분에 열자극에 회피하는 시간을 측정하여 열통증에 미치는 영향을 평가하였다.

단백질 인산화효소의 역할: Artemin을 투여하기 10분 전에 단백질 인산화효소 A의 억제제인 H-89(10, 20 μg)와 단백질 인산화효소 C의 억제제인 chelerythrine(10, 20 μg)을 폴리에틸렌관을 이용하여 말초로 각각 투여하였다. 이어서 artemin(1 μg)을 주입한 다음 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 그리고 1440분에 열자극에 회피하는 시간을 측정하여 열통증에 미치는 영향을 평가하였다.

실험에 사용한 약물

실험에 사용한 artemin과 TRPV1 수용기 대항제인 IRTX (6,7-deepoxy-6,7-didehydro-5-deoxy-21-dephenyl-21-(phenylmethyl)-daphnetoxin,20-(4-hydroxy-5-iodo-3-methoxybenzene-acetate)는 R&D system(Minneapolis, MN)에서 구입하였고, IRTX를 제외한 모든 대항제와 억제제는 Tocris Bioscience(Langford, Bristol, UK)에서 구입하였다. Artemin과 AMPA 수용기 대항제인 NBQX(2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide dosidium salt)는 멸균된 phosphate buffered saline(PBS)에 용해시켰으며, IRTX는 생리식염수에 10% DMSO와 0.2% ethanol 그리고 0.6% Tween 80을 혼합한 용액에 용해시켰다. NMDA 수용기 대항제인 D-AP5(D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid)와 단백질 인산화효소 A 억제제인 H-89(N-[2-[[3-(4-bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide dihydrochloride), 단백질 인산화효소 C의 억제제인 chelerythrine(1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium-chloride)은 멸균된 생리식염수에 용해시켰다.

통계분석

실험결과 유의성을 검증하기 위해 다중 그룹에서 반복측정자료의 분산분석법과 Sidak 사후 분석법을 이용하였다. 개별 시간에 따른 유의성을 확인하기 위해서 일원 배치분산분석 (ONE-WAY ANOVA)를 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은 $P < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

결과

정상상태의 실험동물에서 artemin(0.5, 1 μg)을 안면 피하조직으로 주입한 다음 열자극을 가할 때 회피반응이 나타나는 시간과 공기자극을 안면 피부에 가하여 회피반응을 나타내는 공기자극 역치를 그림 1에 나타내었다. 열자극에 대한 회피반응 시간을 측정한 결과 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다(Fig 1A, $p < 0.05$). Artemin 투여 후 나

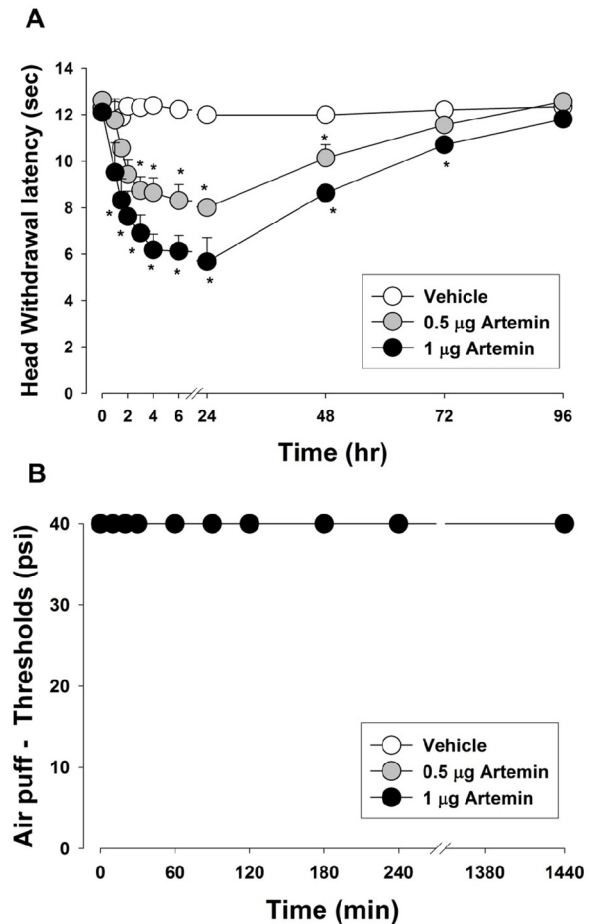


Figure 1. Effects of subcutaneous injection of artemin on air-puff thresholds and head withdrawal latency time. (A) Subcutaneous injection of artemin decreased the head withdrawal latency time. All dose of artemin produce thermal hyperalgesia. (B) Subcutaneous injection of artemin did not affect mechanical allodynia at any dose. * $p < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group. $n = 6$ animals per group.

타나는 열통증은 24시간에 최고로 나타났고, 약물 주입 후 48시간까지 지속되다가 72시간이 지난 뒤에 정상으로 회복되었다. 대조군으로 약물의 용매(vehicle)만을 주입하였을 때 열자극으로 부터 회피하는 반응시간에 아무런 영향을 주지 못하였다. 그러나 안면 피하조직으로 주입된 artemin은 공기자극 역치에 아무런 영향을 주지 못하였다(Fig. 1B).

그림 2는 TRPV1 수용기를 차단하였을 때 artemin을 투여하여 유발되는 열통증에 미치는 영향을 평가한 결과를 나타내었다. TRPV1 수용기 대항제인 IRTX(4 μg)를 전처치하면 artemin을 안면의 피하조직으로 투여하였을 때 나타나는 열통증이 유의하게 억제되었고($p < 0.05$), 통증억제 작용은 약물 주입 후 120분까지 지속되었다. 그러나 대조군으로 vehicle을 투여하면 artemin에 의해 발생하는 열통

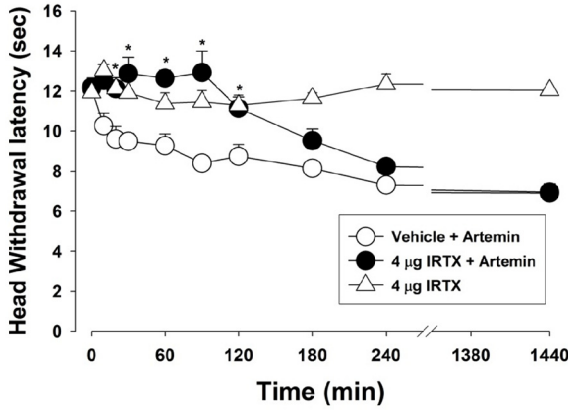


Figure 2. Effects of pre-treatment with iodoresiniferatoxin (IRTX), a TRPV1 receptor antagonist, on artemin-induced thermal hyperalgesia. Pre-treatment with IRTX(4 μg) blocked artemin-induced thermal hyperalgesia. * $p < 0.05$, vehicle- vs. IRTX-treated group. $n = 6$ animals per group.

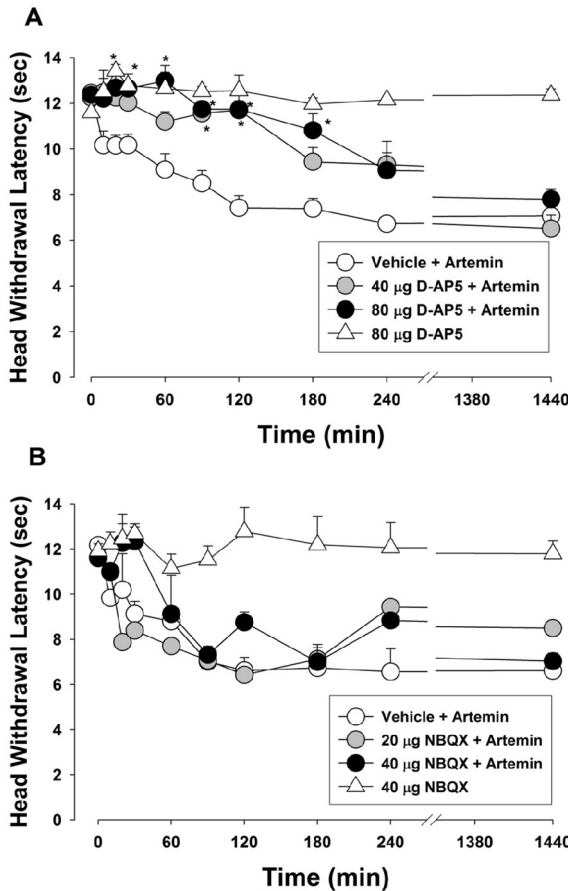


Figure 3. Effects of pre-treatment with D-AP5 (A), a NMDA receptor antagonist, and NBQX (B), an AMPA receptor antagonist on artemin-induced thermal hyperalgesia. Pre-treatment with D-AP5 (40, 80 μg) reduced artemin-induced thermal hyperalgesia in a dose-dependent manner. In contrast to D-AP5, NBQX did not affect artemin-induced thermal hyperalgesia. * $p < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group. $n = 6$ animals per group.

중에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그리고 정상상태의 실험동물에 본 실험에 사용한 농도의 IRTX을 투여하면 열자극을 가했을 때 나타나는 회피반응 시간에 아무런 영향을 주지 못하였다.

NMDA와 AMPA 수용기를 차단하였을 때 aretmin으로 유도되는 열통증에 미치는 영향을 평가하여 그림 3에 나타내었다. NMDA 수용기 대항제인 D-AP5(40, 80 μg)를 전처치하면 artemin으로 인한 열통증 반응을 유의하게 억제하였다($p < 0.05$). 그러나 AMPA 수용기 대항제인 NBQX (20, 40 μg)를 전처치하면 artemin으로 인한 열통증 반응에 아무런 영향을 주지 않았다. 그리고 정상상태의 실험동물에 본 실험에 사용한 농도의 D-AP5와 NBQX을 투여하면 열자극을 가했을 때 나타나는 회피반응 시간에 아무런 영향을 주지 못하였다.

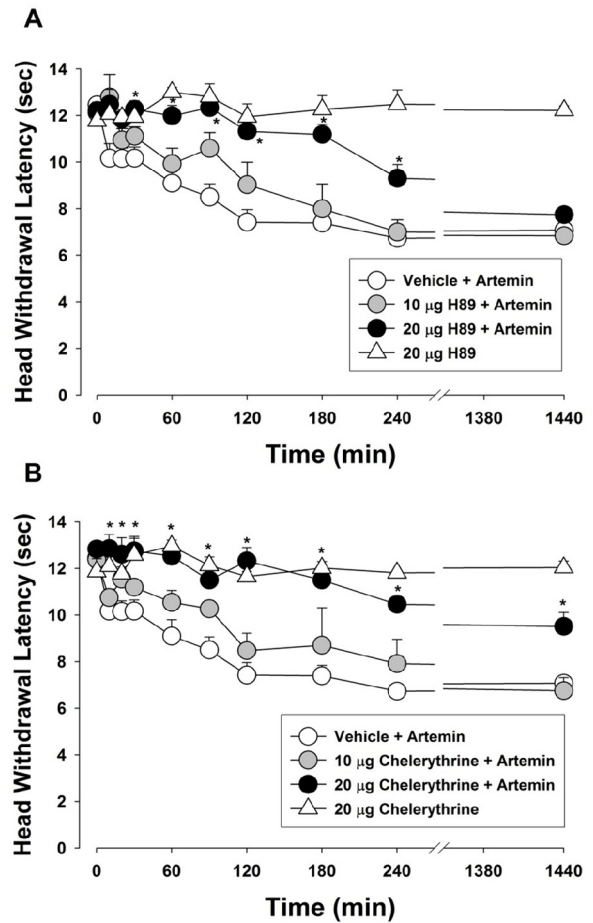


Figure 4. Effects of pre-treatment with H-89, (A) a PKA inhibitor, and chelerythrine, (B) a PKC inhibitor on artemin-induced thermal hyperalgesia. Pre-treatment with H-89(10, 20 μg) blocked artemin-induced thermal hyperalgesia. Pre-treatment with chelerythrine(10, 20 μg) inhibits the decrease of head withdrawal latency time induced by artemin injection. * $p < 0.05$, vehicle- vs. drug-treated group. $n = 6$ animals per group.

그림 4는 단백질 인산화효소 A와 C를 차단하였을 때 artemin으로 인해 유발되는 열통증에 미치는 영향을 평가한 결과이다. 단백질 인산화효소 A의 억제제인 H-89(20 μ g)를 전처리하면 artemin으로 인한 열통증 반응이 유의하게 억제되었다($p < 0.05$). 또한 단백질 인산화효소 C의 억제제인 chelerythrine(20 μ g)도 열통증을 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$). 그러나 낮은 농도의 단백질 인산화효소 A와 C의 억제제는 artemin에 의해 유도되는 열통증에는 아무런 영향을 주지 못하였다. 그리고 정상상태의 실험동물에 본 실험에 사용한 농도의 H-89와 chelerythrine을 투여하면 열자극을 가했을 때 나타나는 회피반응 시간에 아무런 영향을 주지 못하였다.

고 찰

본 실험에서 artemin을 안면 피하조직으로 주입하면 기계적 이질통증은 나타나지 않았으나 열통증이 농도 의존적으로 나타났다. TRPV1 수용기 대항제인 IRTX와 NMDA 수용기 대항제인 D-AP5의 전처리는 artemin으로 인해 유발되는 열통증을 유의하게 감소시켰지만, AMPA 수용기 대항제인 NBQX는 아무런 영향을 미치지 못했다. 또한, 단백질 인산화효소 A와 C의 억제제인 H-89와 chelerythrine도 모두 artemin으로 인한 열통증을 유의하게 완화시켰다. 이러한 실험 결과는 artemin으로 인해 유발되는 열통증이 단백질 인산화효소 A와 C를 통하여 TRPV1 수용기와 NMDA 수용기를 활성화시켜 전도된다는 것을 보여준다.

본 연구에서 artemin을 안면 피하조직으로 투여하면 열통증이 발생했다. Artemin이 말초조직에서 열통증을 발생시킬 수 있다는 사실은 선행 연구결과들을 통해 알 수 있다. 흰 쥐의 발바닥에 artemin을 주입하였을 때 열자극에 대한 회피반응 시간이 유의하게 감소하였고[12], 이때 유발되는 열통증이 4시간까지 나타났다[11]는 보고는 본 실험결과와 일치한다. Artemin을 특이적으로 과다 발현시킨 쥐에서 피부의 C섬유 통각감수기 역치 값이 감소하여 통증이 발생한다[13]는 실험결과는 artemin이 가는 신경섬유인 C 신경섬유를 통하여 열통증을 유발시킨다는 것을 증명해 주고 있다. 또한 본 실험에서 안면 피하조직으로 주입한 artemin은 기계적 이질통증을 유발하지 못하였다. 이러한 실험 결과는 선행연구에서 artemin을 투여한 실험동물에서 굵은 신경섬유에 의해 전도되는 기계적 이질통증을 유발시키지 못하였다[12,13]는 실험결과와 일치한다. 그러나 artemin을 5일 동안 연속으로 투여하였을 경우는 기계적 이질통증이 유발되었다는 보고[33]도 있어 굵은

신경섬유를 통한 통증 전도에 대한 연구는 향후 더 이루어져야 할 것으로 판단된다.

TRPV1 수용기는 후근신경절이나 삼차신경절에 존재하는 작은 사이즈의 신경세포에 존재하여[34,35] 염증성 또는 신경병증성 열통증에 전도에 중요한 역할을 담당한다[36-38]고 알려져 있다. 유전자 조작으로 TRPV1 수용기를 제거한 실험동물에서 CFA를 주사하여 염증을 유발하였을 때 정상상태의 실험동물과 비교하여 보면 기계적 자극으로 발생하는 통증은 잘 나타났으나 열자극을 가할 때 나타나는 열통증은 발생하지 않았다[39]. 이러한 실험 결과는 TRPV1 수용기가 열통증을 전도하는데 매우 중요한 역할을 한다는 것으로 말해주고 있으며 본 연구에서도 TRPV1 수용기 대항제를 전처리하면 artemin에 의해 유도된 열통증을 유의하게 억제하였다. 나아가 artemin이 작용하는 수용기인 GFR α 3가 주로 말초 신경계에서 존재하며[7,40,41], TRPV1 수용기와 같이 존재한다[11,13,42]는 실험 결과는 artemin에 의해 발생하는 열통증에 가는 신경섬유에서 열통증을 전도한다고 알려져 있는 TRPV1 수용기가 중요한 역할을 담당한다는 것을 증명하고 있다.

일반적으로 NMDA 수용기는 말초와 중추 신경계에서 시냅스 전달과 가소성에 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다[43-46]. 본 연구는 TRPV1 수용기 뿐만 아니라 NMDA 수용기도 artemin에 의해 유도되는 열통증에 관여한다는 것을 보여주고 있다. NMDA 수용기 대항제인 D-AP5를 전처리하면 artemin으로 인한 열통증 반응을 유의하게 억제하였다. 말초조직에서 NMDA 수용기가 통증을 조절한다는 사실은 많은 선행연구를 통해 밝혀져 있다. 실험동물 흰 쥐에 NMDA 수용기 대항제로 알려진 MK-801을 피하로 주입하면 carrageenan으로 인한 염증에 의해 감소한 기계적인 역치 값이 증가하였고[22,47], 포르말린 주입으로 나타나는 통증 행위반응이 완화되었다[48,49]는 선행 연구 결과들을 통해서 말초조직에서 NMDA 수용기가 통증의 전도와 유지에 관여하고 있다는 증명한다. 뿐만 아니라, 삼차신경절의 교근을 지배하는 구심성 신경에서 NMDA 수용기의 아단위인 NR1과 TRPV1 수용기가 면역염색을 통해 같이 존재한다는 사실을 보고[50]하였고, 면역침강법을 통해서 A-kinase anchoring protein 150이 NMDA 수용기와 TRPV1 수용기의 결합체를 형성하여 TRPV1의 세린 800 잔기에서 인산화를 시킨다고 보고하였다[51]. 이러한 실험결과는 NMDA 수용기가 TRPV1 수용기와 동일한 신경섬유에서 존재하며 두 종류의 수용기가 서로 상호작용을 나타낼 수 있다는 것으로 보여 주고 있다. 따라서 이들 실험 결과로 미루어 볼 때 artemin으로 유발되는 열통증에 말초조직에 존재하는 TRPV1 수용기와 NMDA 수용기가 중요한 역할을 담당하고 있으며 이들

두 수용기의 상호작용이 가능할 수 있다는 것으로 보여 주고 있다.

본 연구에서 단백질 인산화효소 A 억제제인 H-89와 C 억제제인 chelerythrine을 전처치하면 artemin으로 인한 열통증을 유의하게 억제하였다. 일반적으로 단백질 인산화효소는 이온통로를 인산화하여 통로를 활성화시켜 말초조직에서 통각 전도를 조절하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[52-54]. 단백질 인산화효소 C의 억제제인 chelerythrine을 전처치하였을 때 IL-1 β 로 인한 열통증 행위반응이 억제되었고, 면역염색법으로 관찰한 결과 삼차신경절에서 TRPV1 수용기가 나타나는 작은 크기의 신경세포에서 단백질 인산화효소 C를 함께 관찰할 수 있었다[25]. 또 다른 선행연구에서는 삼차신경절에서 A-kinase anchoring protein 150으로 인해서 단백질 인산화효소 A가 TRPV1 수용기를 인산화시켜서 감각시킨다고 보고[55]하였다. 이러한 실험결과들은 종합해 볼 때 단백질 인산화효소가 TRPV1이나 NMDA 수용기를 인산화시켜서 artemin으로 인한 열통증 발생에 관여한다는 것으로 추론해 볼 수 있으나 더 정확한 기전을 밝히기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면 단백질 인산화효소 A와 C를 통해서 TRPV1과 NMDA 수용기가 활성화하여 artemin이 열통증을 유발하는 것으로 판단된다. 이러한 실험 결과는 열통증을 조절하는 진통제를 개발하는데 말초신경에 존재하는 이온채널 수용기를 조절하는 것이 중요하다는 실험적 근거를 제시해 주고 있다.

Acknowledgements

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

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

1. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993;260:1130-1132.
2. Kozbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1996;384:467-470. doi:10.1038/384467a0

3. Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kozbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM Jr, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*. 1998;20:245-253.
4. Baloh RH, Gorodinsky A, Golden JP, Tansey MG, Keck CL, Popescu NC, Johnson EM Jr, Milbrandt J. GFRalpha3 is an orphan member of the GDNF/neurturin/persephin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5801-5806.
5. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:383-394. doi:10.1038/nrn812
6. Andres R, Forgie A, Wyatt S, Chen Q, de Sauvage FJ, Davies AM. Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth. *Development*. 2001;128:3685-3695.
7. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron*. 1998;21:1291-1302.
8. Paveliev M, Airaksinen MS, Saarma M. GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2004;25:453-459. doi:10.1016/j.mcn.2003.11.010
9. Bennett DL, Boucher TJ, Michael GJ, Popat RJ, Malcangio M, Averill SA, Poulsen KT, Priestley JV, Shelton DL, McMahon SB. Artemin has potent neurotrophic actions on injured C-fibres. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11:330-345. doi:10.1111/j.1529-8027.2006.00106.x
10. Jankowski MP, Rau KK, Soneji DJ, Anderson CE, Koerber HR. Enhanced artemin/GFR α 3 levels regulate mechanically insensitive, heat-sensitive C-fiber recruitment after axotomy and regeneration. *J Neurosci*. 2010;30:16272-16283. doi:10.1523/JNEUROSCI.2195-10.2010
11. Malin SA, Molliver DC, Koerber HR, Cornuet P, Frye R, Albers KM, Davis BM. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J Neurosci*. 2006;26:8588-8599. doi:10.1523/JNEUROSCI.1726-06.2006
12. Lippoldt EK, Elmes RR, McCoy DD, Knowlton WM, McKemy DD. Artemin, a glial cell line-derived neurotrophic factor family member, induces TRPM8-dependent cold pain. *J Neurosci*. 2013;33:12543-12552. doi:10.1523/JNEUROSCI.5765-12.2013
13. Elitt CM, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Molliver DC, Cornuet PK, Koerber HR, Davis BM, Albers KM. Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J Neurosci*. 2006;26:8578-8587. doi:10.1523/JNEUROSCI.2185-06.2006
14. Zhu H, Yu Y, Zheng L, Wang L, Li C, Yu J, Wei J, Wang C, Zhang J, Xu S, Wei X, Cui W, Wang Q, Chen X. Chronic

- inflammatory pain upregulates expression of P2Y2 receptor in small-diameter sensory neurons. *Metab Brain Dis.* 2015; 30:1349-1358. doi:10.1007/s11011-015-9695-8
15. Gangadharan V, Wang R, Ulzhöfer B, Luo C, Bardoni R, Bali KK, Agarwal N, Tegeder I, Hildebrandt U, Nagy GG, Todd AJ, Ghirri A, Häussler A, Sprengel R, Seeburg PH, MacDermott AB, Lewin GR, Kuner R. Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:1608-1623. doi:10.1172/JCI44911
 16. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30:79-84. doi:10.1016/j.tips.2008.10.008
 17. Tsuda M, Hasegawa S, Inoue K. P2X receptors-mediated cytosolic phospholipase A2 activation in primary afferent sensory neurons contributes to neuropathic pain. *J Neurochem.* 2007;103:1408-1416. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04861.x
 18. Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res.* 1999;820:63-70.
 19. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:487-517. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.487
 20. Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoro methyl- benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type VI receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314: 410-421. doi:10.1124/jpet.105.083915
 21. Jhaveri MD, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naïve, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. *Eur J Neurosci.* 2005;22:361-370. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04227.x
 22. Srebro DP, Vucković SM, Savic Vujovic KR, Prostran MS. Nitric oxide synthase modulates the antihyperalgesic effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on Carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2014;234:287-293.
 23. Gong K, Kung LH, Magni G, Bhargava A, Jasmin L. Increased response to glutamate in small diameter dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *PLoS One.* 2014;9:e95491. doi:10.1371/journal.pone.0095491
 24. Kushnir R, Cherkas PS, Hanani M. Peripheral inflammation upregulates P2X receptor expression in satellite glial cells of mouse trigeminal ganglia: a calcium imaging study. *Neuropharmacology.* 2011;61:739-746. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.05.019
 25. Kim MJ, Lee SY, Yang KY, Nam SH, Kim HJ, Kim YJ, Bae YC, Ahn DK. Differential regulation of peripheral IL-1 β -induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats. *Pain.* 2014;155:723-732. doi:10.1016/j.pain.2013.12.030
 26. Han SR, Yeo SP, Lee MK, Bae YC, Ahn DK. Early dexamethasone relieves trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res.* 2010;89:915-920. doi:10.1177/0022034510374056
 27. Lee AR, Lim NH, Kim HJ, Kim MJ, Ju JS, Park MK, Lee MK, Yang KY, Ahn DK. Differential Role of Central GABA Receptors in Nociception of Orofacial Area in Rats. *Int J Oral Biol.* 2015;40:117-125.
 28. Yang CS, Jung CY, Ju JS, Lee MK, Ahn DK. Intracisternal administration of mitogen-activated protein kinase inhibitors reduced IL-1 β -induced mirror-image mechanical allodynia in the orofacial area of rats. *Neurosci Lett.* 2005;387:32-37. doi:10.1016/j.neulet.2005.07.019
 29. Jung CY, Choi HS, Ju JS, Park HS, Kwon TG, Bae YC, Ahn DK. Central metabotropic glutamate receptors differentially participate in interleukin-1 β -induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *J Pain.* 2006;7:747-756. doi:10.1016/j.jpain.2006.03.007
 30. Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain.* 2009;144: 84-94. doi:10.1016/j.pain.2009.03.016
 31. Park MK, Song HC, Yang KY, Ju JS, Ahn DK. Participation of peripheral P2X Receptors in Orofacial Inflammatory Nociception in Rats. *Int J Oral Biol.* 2011;36:143-148
 32. Kim MJ, Cho JH, Kim HJ, Yang KY, Ju JS, Lee MK, Park MK, Ahn DK. Botulinum Toxin Type A Attenuates Activation of Glial Cells in Rats Medullary Dorsal Horn with CFA-induced Inflammatory Pain. *Int J Oral Biol.* 2015;40: 71-77.
 33. Ikeda-Miyagawa Y, Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Wang S, Dai Y, Yagi H, Hirose M, Noguchi K. Peripherally increased artemin is a key regulator of TRPA1/V1 expression in primary afferent neurons. *Mol Pain.* 2015;11:8. doi:10.1186/s12990-015-0004-7
 34. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 2004;427:260-265. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980215)51:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-F
 35. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with δ /c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol.* 2005;493:596 - 606. doi:10.1002/cne.20794
 36. García-Martínez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Pérez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2374-2379. doi:10.1073/pnas.022285899
 37. Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain.* 2002;99: 111-120.
 38. Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res.* 2015;

- 94:446-454. doi:10.1177/0022034514565645
39. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitl KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;288:306-313.
40. Naveilhan P, Baudet C, Mikaelis A, Shen L, Westphal H, Ernfor P. Expression and regulation of GFRalpha3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1295-1300.
41. Widenfalk J, Tomac A, Lindqvist E, Hoffer B, Olson L. GFRalpha-3, a protein related to GFRalpha-1, is expressed in developing peripheral neurons and ensheathing cells. *Eur J Neurosci*. 1998;10:1508-1517.
42. Orozco OE, Walus L, Sah DW, Pepinsky RB, Sanicola M. GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2001;13:2177-2182.
43. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288:1765-1769.
44. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003;97:1108-1116.
45. Babb TL, Mikuni N, Najm I, Wylie C, Olive M, Dollar C, MacLennan H. Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res*. 2005;64:23-30. doi:10.1016/j.eplepsyres.2005.02.008
46. Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17:592-604. doi:10.1016/j.semcdb.2006.10.008
47. Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995;284:321-325.
48. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport*. 1997;8:941-946.
49. Park MK, Lee JH, Yang GY, Won KA, Kim MJ, Park YY, Bae YC, Ahn DK. Peripheral administration of NR2 antagonists attenuates orofacial formalin-induced nociceptive behavior in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35:982-986. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.01.018
50. Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain*. 2012;153:1514-1524. doi:10.1016/j.pain.2012.04.015
51. Lee J, Chung MK, Ro JY. Activation of NMDA receptors leads to phosphorylation of TRPV1 S800 by protein kinase C and A-Kinase anchoring protein 150 in rat trigeminal ganglia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424:358-363. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.008
52. da Cunha JM, Rae GA, Ferreira SH, Cunha Fde Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol*. 2004;501:87-94. doi:10.1016/j.ejphar.2004.08.004
53. Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*. 2001;108:507-515.
54. Dina OA, Hucho T, Yeh J, Malik-Hall M, Reichling DB, Levine JD. Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia. *Pain*. 2005;115:191-203. doi:10.1016/j.pain.2005.02.028
55. Jeske NA, Diogenes A, Ruparel NB, Fehrenbacher JC, Henry M, Akopian AN, Hargreaves KM. A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. *Pain*. 2008;138:604-616. doi:10.1016/j.pain.2008.02.022