

Ultrastructure of Substance P Immunopositive Axons in the Human Dental Pulp

Byung Hee Moon^{1†}, Jung Hong Ha^{2†}, Hye Min Han¹, Tae Heon Kim³, Sook Kyung Park¹
and Yong Chul Bae^{1*}

¹Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 41940, Republic of Korea

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

³Department of Dental Hygiene, Taegu Science University, Daegu 41453, Republic of Korea

(received August 31, 2018; revised September 13, 2018; accepted August 18, 2018)

There exists very little information on the ultrastructure of substance P immunopositive (+) fibers in the human dental pulp, which may help in understanding the mechanism for substance P associated pulpal inflammatory pain. To address this issue, we investigated the presence of substance P+ fibers in the human dental pulp by light- and electron-microscopic immunohistochemistry.

Light microscopy revealed that substance P+ fibers ran within neurovascular bundles in the radicular pulp and in the core of coronal pulp. They were also frequently present in the peripheral pulp. Substance P+ fibers showed beads like swellings interconnected by thin axonal strand, in a manner similar to bouton en passants and interconnecting axonal strand in the spinal cord.

Electron microscopy revealed that almost all the substance P+ axons were unmyelinated. The axonal swellings of the substance P+ contained numerous clear round vesicles

(40-50 nm in diameter) and many large dense-cored vesicles (80-110 nm in diameter) as well as many mitochondria. The vesicles and mitochondria were rarely observed in the thin axonal strand interconnecting the swellings. Intimate interrelationship or synaptic structure between the swellings of substance P+ axon and nearby pulpal cells or axons was not found.

These findings suggest co-release of substance P and glutamate from the substance P+ pulpal axons and its action on nearby structures in a paracrine manner.

Key words: dental pulp, substance P, nerve fiber, ultrastructure, immunohistochemistry

서론

치통은 인류가 감지하는 극심한 동통 중의 하나로서 고대로부터 이를 극복하기 위한 많은 연구가 이루어져 왔다. 치수는 기계적 자극[1], 화학적 자극[2], 삼투압에 의한 자극[3], 그리고 온도자극[4] 등 다양한 자극이 가해지더라도 동통만이 감지됨으로서, 치수를 지배하는 신경은 대다수가 동통을 감지하는 유해성 들신경섬유로 구성되어 있는 것으로 생각되어 왔다. 치수에서 치아삭제, 상아 질에 가해지는 손상 등에 의해 야기되는 예리한 동통은 작은 말이집 신경섬유인 Aδ 신경섬유를 통하여 전달되며, 염증 시 야기되는 부위를 정확히 알 수 없는 지속적인 둔통은 주로 민말이집 신경섬유인 C 신경섬유를 통하여 전달된다고 알려져 있다.

[†]Byung Hee Moon and Jung Hong Ha 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, Republic of Korea

Tel: 053-660-6860, Fax: 053-426-7731

E-mail: ycbae@knu.ac.kr

ORCID : 0000-0002-7618-418X

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.

치아에 class I 치수노출, class V 와동형성과 같은 유해 자극을 가하면, 치수를 지배하는 감각신경섬유의 sprouting 이 야기되며, 아울러 substance P와 CGRP같은 신경펩티드에 면역양성반응을 보이는 신경섬유의 수가 증가한다[5]. 또한, 흰쥐 아래이틀신경의 자극 시 치수 내의 substance P의 양이 증가하며, 이와 동반하여 치수혈관의 확장, 단백질의 혈관 밖 유출 그리고 염증매개물질이 분비되며[6], 이들이 C 신경섬유를 지속적으로 자극함으로써 지속성 동통이 야기된다. 따라서 치수 내의 신경펩티드는 신경병성 염증의 유발 그리고 염증 시 야기되는 만성 지속성 동통의 야기에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있다. Substance P는 삼차신경절 혹은 척수의 뒤뿌리신경절[7, 8]에서 작거나 중간크기의 세포에서 발현되며, 삼차신경절에서 축삭이 유래하는 부위인 proximal sensory root에서 민말이집과 작은 말이집 신경섬유에서 발현됨으로서[9] 이는 동통을 전달하는 신경섬유에서 특이성 있게 발현되는 것으로 보고되고 있다. 지금까지 치수를 지배하는 신경에 대한 많은 미세구조적 연구결과[10, 11]가 보고되어 왔지만, 염증 시 야기되는 만성지속성 동통 그리고 신경병성 염증에 관여하는 substance P를 함유하는 치수 내 신경섬유의 미세구조적 특징에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 이를 밝히고자 사람 치수절편에서 substance P 면역조직화학반응을 실시한 후 광학 및 전자현미경으로 분석하였다.

재료 및 방법

사람 치수에서 substance P 면역양성 신경섬유 관찰을 위해서 치아 수복물, 치주염과 치아우식이 없는 작은 어금니를 대상으로 실험을 수행하였으며, 교정치료를 받기 위하여 발거한 치아를 환자의 동의를 얻어 사용하였다. 발거한 후 1시간 이내에 high speed diamond bur를 이용하여 치아를 세로로 절개하여 치수를 조심스럽게 적출하였다. 그 후 치수조직을 2시간동안 4% paraformaldehyde (PFA)가 함유된 고정액(0.1 M phosphate buffer; 0.1 M PB, pH 7.4, 4°C)에서 고정하였으며, 진동절편기(vibratome)를 이용하여 80 um 두께의 연속절편을 만들어 4% PFA와 0.01% glutaraldehyde를 함유하는 고정액에 30분간 후고정을 시행하였다.

이후 각 절편을 0.1 M PB에 여러 번 세척한 다음, 동결방지를 위하여 30% sucrose (0.1 M PB, pH 7.4) 용액에 넣어 4°C에서 하루 동안 침적하였다. 다음날, 항체의 조직 내 침투가 용이하도록 절편을 드라이아이스에서 20분간 동결시킨 후, 0.01 M PBS (phosphate buffered saline, pH

7.4)에 신속히 넣어 해동하였다. 그 후, 1% NaBH₄에 30분간 반응시키고, 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위해 3% H₂O₂에서 10분간 반응시켰다. 그 후 10% NDS (normal donkey serum, in 0.01 M PBS)에서 30분간 반응시킨 다음, 일차항체(rabbit anti-substance P antibody, 1:1000 dilution, ImmunoStar, Hudson, WI, USA)에 실온에서 하루 동안 반응시켰다. 다음날 이차항체(biotin conjugated donkey anti-rabbit antibody, 1:200 dilution, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)에 실온에서 2시간 반응시킨 다음, 0.01 M PBS로 3회 세척하였으며, ExtraAvidin peroxidase (1:5000 dilution; Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 1시간 동안 반응한 후, 0.1 M PB로 세척하고, nikel-intensified 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색 반응을 하였다. 이후 0.1 M PB로 여러 번 세척한 다음, 1% osmium tetroxide (0.1 M PB, pH 7.4)에서 1시간 동안 후고정을 시행하였다. 탈수는 계열 에탄올로, 침투는 propylene oxide로 하였으며, 절편을 두 장의 Aclar plastic film (EMS, Hatfield, PA, USA) 사이에 넣어 Durcupan ACM (Fluka, Switzerland)으로 포매하여 59°C에서 48시간 동안 경화하였다.

레진으로 포매한 조직을 광학현미경상에서 100-400배의 배율로 관찰한 다음, substance P 항체에 면역양성반응을 나타내는 신경다발이 함유되어 있는 절편부위를 취하여 공레진 막대에 강력접착제로 붙였다. 그 후 연속 초박절편을 형성하여 formvar 지지막을 형성한 단공 grid 위에 얹었으며, 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 한 다음 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, Hitachi H-7500, Japan)으로 관찰하였다. Substance P 면역양성반응을 보이는 신경섬유에 대한 광학현미경사진은 Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Gottingen, Germany)에 부착된 Exi digital camera (Q-Image Inc., Surrey, CA, USA)를 사용하여 촬영한 다음, TIFF파일로 저장하였다. 전자현미경 사진은 투과전자현미경에 부착된 CCD camera (SC1000; GATAN, Pleasanton, CA, USA)와 Digital Micrograph software (GATAN)을 이용하여 촬영하였으며, TIFF파일로 저장하여 관찰하였다. Substance P 면역양성 신경종말 내에 함유되어 있는 소포의 직경을 측정하기 위하여 각각의 신경종말에 대해 50,000배로 이미지를 얻은 후 TIFF 파일로 저장하였으며, digitizing tablet과 Image J software (v.1.45; NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 소포의 직경을 측정하였다. 면역양성 반응의 특이성을 확인하기 위하여 일차항체 혹은 이차항체 대신 정상혈청을 사용하여 동일한 반응을 시행하였으며, 이때 면역양성반응이 관찰되지 않음을 확인하였다.

결 과

광학현미경적 관찰에서 치아뿌리부위에서 substance P 면역양성 신경섬유는 다수가 혈관과 함께 다발을 이루어 주행하였으며, 다발 내에서는 거의 분지를 하지 않았다. 치수공간부위에서는 substance P 면역양성 신경섬유다발이 분지를 하였으며, 일부는 신경섬유 다발에서 벗어나 독립적으로 주행하였다. 치수의 주변부에서도 다수의 substance P 면역양성 신경섬유가 관찰되었으며 일부는 상아질을 향해 주행하였다. Substance P 면역양성 신경섬유는 치수 속에서 염주알 모양의 팽창부와 이 사이를 잇는 축삭가닥 형태로 존재하였으며, substance P 면역양성 신경섬유는 치수의 치아뿌리부위, 치수공간부위, 주변부 치수 등 치수의 모든 부위에서 팽창부를 보였다(Figs. 1A-D).

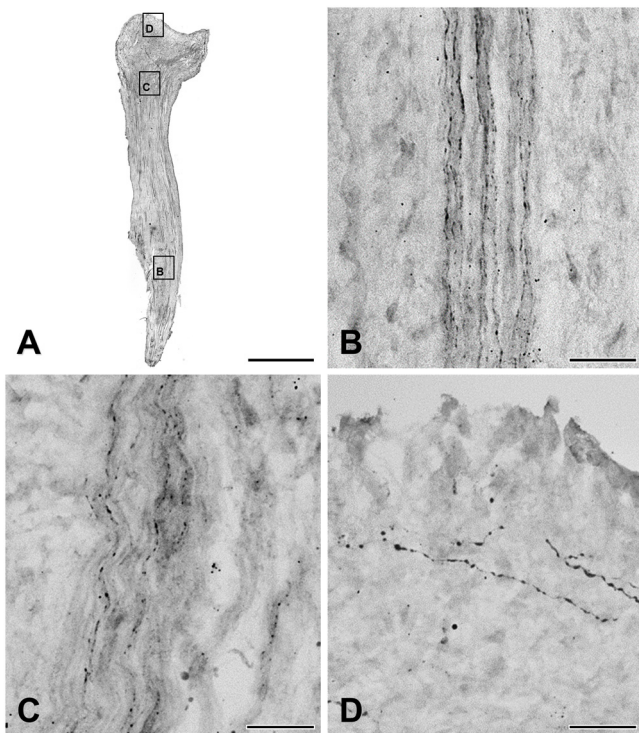


Fig. 1. Light micrographs of immunoperoxidase labeling for substance P in the whole pulp (A) and in the radicular (B), core of coronal pulp (C) and peripheral pulp (D) of human premolar tooth. Substance P immunopositive axons run within the nerve bundles and rarely issues axon collaterals in the radicular and core of coronal pulp. They are out of the nerve bundles and run freely in the peripheral pulp. Substance P immunopositive axons shows bead like swellings interconnected by thin axonal strand in the radicular, core of coronal and peripheral pulp. B, C and D are higher magnifications of boxed areas in A, respectively. Scale bars = 10 mm in A; 25 μ m in B-D.

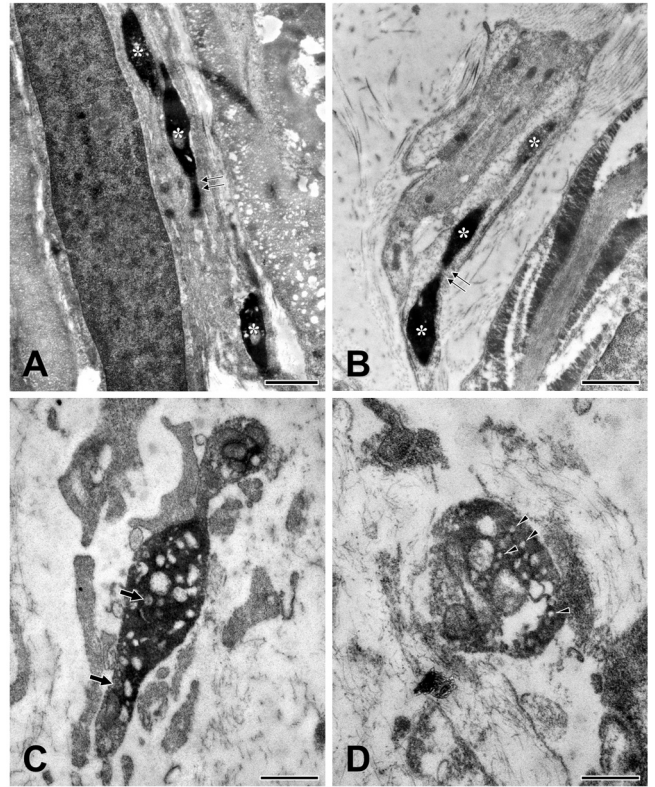


Fig. 2. Electron micrographs showing substance P immunopositive axons in the radicular (A, C) and core of coronal (B, D) pulp of human premolar teeth. A, B: Substance P immunopositive axon show bead like swelling (asterisk) and interconnecting thin axonal strand (double arrows). C, D: Bead like swelling of substance P immunopositive axon contains many clear round vesicles (arrowhead) and large dense cored vesicles (arrow). Note electron dense immunoreaction product of substance P in the axoplasm of the substance P immunopositive axonal strand and bead like swelling. Scale bars = 1 μ m in A, B; 500 nm in C; 300 nm in D.

전자현미경적 관찰에서 치수신경섬유는 말미집 및 민말미집 신경섬유로 구성된 다발형태로 주행하였다. Substance P의 면역반응산물은 전자밀도가 치밀한 형태로 축삭형질에서 관찰되었으며, substance P 면역양성 신경섬유는 대부분이 민말미집 신경섬유이었으며 말미집 신경섬유에서 substance P 면역양성반응을 나타내는 경우는 거의 관찰되지 않았다(Figs. 2A-D). Substance P 면역양성 신경섬유는 substance P 면역음성 민말미집 신경섬유와 함께 다발을 이루어 주행하였으며, 이는 Schwann cell sheath에 의해 둘러싸여 있는 경우가 자주 관찰되었다. Substance P 면역양성 신경섬유는 주행 중 염주알 모양의 팽창을 나타내었는데 여기에는 사립체, 다수의 치밀소포 (80-110 nm in diameter)와 많은 구형의 투명소포 (40-50 nm in diameter)가 함유되어 있었다. 팽창부사이를 연결하는 가는 축삭가닥에서는 연결소포 및 사립체가 거의 관찰

되지 않았다. 또한 축삭의 팽창부위는 혈관에 인접하여 위치하는 경우가 다수 관찰되었으며, 인접한 세포 혹은 혈관 등의 구조물들과 연접을 이루는 경우는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구를 통해 밝힌 주된 결과는 다음과 같다. 1) 사람 치수내의 substance P 면역양성 신경섬유는 팽창부와 이들을 연결하는 가는 신경으로 구성되어 있으며, 2) substance P 면역양성 신경섬유의 팽창부에는 많은 구형의 작은 소포와 다수의 큰 치밀소포 그리고 다수의 사립체가 존재하였다. 이러한 결과는 치수 내의 substance P 면역양성 신경섬유에서 substance P와 glutamate가 함께 분비될 것이며, 이의 분비는 주로 substance P 면역양성 신경섬유의 팽창부에서 야기되며, 이는 확산을 통한 비특이적인 방식에 의해 인접세포, 신경 및 혈관에 영향을 미칠 것임을 시사한다.

신경펩티드인 substance P는 Chang 등[12]에 의해 염기서열이 분석되었고 Hokfelt 등[13]에 의해 처음으로 면역조직화학적으로 염색되었다. 이는 일차감각신경세포에서 흥분성 신경전달물질로서 작용하며, 중추신경계[14] 뿐만 아니라 말초신경계[15]에서도 관찰된다. Substance P는 단핵세포로부터 interleukin-1, interleukin-6 그리고 tumor necrosis factor-alpha와 같은 cytokine을 분비하게 함으로써 [16] 염증 및 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서 substance P 면역양성 신경섬유는 특징적으로 bouton모양의 팽창부 및 이를 연결하는 민말이집 신경섬유의 가느다란 축삭가닥으로 구성되어 있었는데, bouton모양의 팽창부에서는 중추신경계에서의 신경섬유 종말에서와 같이, 다수의 큰 치밀소포와 소형의 투명한 구형소포를 함유하고 있었다. Alvarez 등[17]은 원숭이의 척수뒤뿌 표층부에서 C 신경섬유 종말에 함유된 substance P 및 CGRP가 큰 치밀소포 내에 존재하고 있음을 금입자 면역전자현미경을 사용하여 보고한 바 있다. 이를 감안하면, 본 연구에서 substance P는 치수 내 substance P 면역양성 신경섬유의 팽창부내에 함유된 큰 치밀소포에 존재할 것으로 생각된다. Substance P 면역양성 신경섬유의 팽창부에서 큰 치밀소포와 함께 존재하는 구형의 투명한 연접소포 내에는 어떠한 신경전달물질이 함유되어 있는지 현재 분명하지 않다. 그러나 중추신경계에서 substance P 면역양성 신경종말에는 glutamate가 공존한다는 보고[18]와 흥분성 신경전달물질인 glutamate는 구형의 연접소포 내에 존재한다는 지금까지의 전자현미경적 연구결과[19-22]

를 감안하면, 사람 치수신경의 팽창부에서 큰 치밀소포와 함께 존재하는 구형의 투명한 연접소포에는 신경전달물질로서 작용하는 glutamate가 함유되어 있을 것으로 생각된다. 따라서 치수에 열자극 등의 유해성 자극이 가해지면 substance P 면역양성 신경섬유의 팽창부로부터 substance P가 분비되어 혈관확장 및 단백질의 혈관의 유출을 야기함으로써 신경병성 염증(neurogenic inflammation)을 야기할 것으로 생각된다. 또한 substance P는 비만세포 등을 자극하여 serotonin등을 분비하게 하거나, 손상된 조직 혹은 혈장에서 bradykinin, prostaglandins, leukotriens, cytokines 등의 분비를 야기하여 민말이집 C 신경섬유를 자극함으로써 지속적인 염증성 동통이 중추로 전달되는데 관여할 것으로 생각된다[23]. 또한 substance P 면역양성 신경섬유가 자극이 되면 substance P의 분비와 아울러 투명한 구형의 연접소포에 함유되어 있던 glutamate가 방출될 것으로 사료되며, 이는 주변의 여러 세포 및 혈관 내피세포를 자극하여 염증성 반응을 증가시키거나 혹은 지속적으로 염증성 반응이 일어나도록 작용할 것으로 생각된다. 이는 민말이집 신경섬유에 존재하는 것으로 알려진 group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1과 mGluR5)와 결합함으로써[24, 25] 자기 자신이 분비된 신경섬유 및 인접 신경섬유의 팽대부에서 지속적으로 substance P 및 glutamate의 분비를 야기함으로써 염증성 동통이 지속되거나 증가하는데 기여할 것으로 생각된다. 한편, 염증이 야기된 부위 혹은 손상된 말초신경말단에서 상당히 떨어진 부위에서도 혈관 확장 등 염증반응이 나타나는데, 이는 손상된 부위에서의 자극이 축삭반사를 통해 신경분지부를 지나 인접부위의 신경말단까지 전파되어 그 부위에서 substance P를 포함한 신경펩티드가 분비되기 때문인 것으로 생각된다.

감각정보의 전달에 관여하는 뒤뿌리신경절 혹은 삼차신경절 내에 존재하는 일차감각신경섬유의 세포체에서 형성된 여러 물질은 중추신경계뿐만 아니라 말초신경계로도 운반된다. 특히 substance P 면역양성 신경섬유는 중추내에서 염주알 모양의 신경섬유종말 및 이를 연결하는 선모양으로 나타나는데[26, 27] 감각수용기 역할을 하는 치수에서도 이와 동일한 모습을 나타내었다. 또한 전자현미경적 관찰에서 치수 내 substance P 면역양성 신경섬유종말의 형태는 중추신경계에서의 형태와 동일하였다[17]. 그러나 척수 내의 substance P 면역양성 신경섬유종말은 다수의 가지돌기와 연접을 이루어 연접이후 신경세포에만 신호를 전달하는데 비해[28], 치수에서의 substance P 면역양성 신경섬유의 팽대부는 인접한 세포 및 신경과의 연접구조가 없으므로 이는 신경전달물질을 인접부위로 방출하여 paracrine 작용에 의해 다수의 주변부 세포, 혈관

혹은 신경섬유에 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

매운 고추 성분인 capsaicin을 국소부위에 적용하였을 때 신경병성 염증을 야기하는데[29] 이는 capsaicin이 C 신경섬유에만 선택적으로 작용함으로써 야기된다[30]. 감각신경을 capsaicin으로 자극 시 중추 및 말초신경 종말에서 substance P가 방출되며, capsaicin 적용시 나타나는 slow EPSP[31]와 혈관 확장[32] 등은 substance P 길항제의 투여에 의해 억제된다. 또한 고농도의 capsaicin을 투여 시 조직의 substance P 면역양성 반응이 소실되며, 민말이집 신경섬유의 종말이 다수 소실된다고 알려져 있다[33]. 따라서 다수의 substance P 발현 신경섬유는 민말이집 신경섬유이며 이에 capsaicin, 유효열 자극 그리고 염증매개 물질에 의해 반응하는 바닐로이드 수용기 TRPV1이 함께 발현될 것으로 생각되며, 본 연구에서 치수 내에 존재하는 다수의 substance P 함유 신경종말에서도 TRPV1이 공존할 것으로 추측된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2017R1A2B2003561).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

- Edwall L, Olgart L. A new technique for recording of intradental sensory nerve activity in man. *Pain*. 1977;2:121-125. doi:10.1016/0304-3959(77)90075-6.
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*. 1997;387:505-508. doi:10.1038/387505a0.
- Anderson DJ, Matthews B. Osmotic stimulation of human dentine and the distribution of dental pain thresholds. *Arch Oral Biol*. 1967;12:417-426.
- Ahlquist ML, Edwall LG, Franzen OG, Haegerstam GA. Perception of pulpal pain as a function of intradental nerve activity. *Pain*. 1984;19:353-366. doi:10.1016/0304-3959(84)90081-2.
- Byers MR, Narhi MV, Mecifi KB. Acute and chronic reactions of dental sensory nerve fibers to cavities and desiccation in rat molars. *Anat Rec*. 1988;221:872-883. doi:10.1002/ar.1092210412.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967;31:138-151. doi:10.1111/j.1476-5381.1967.tb01984.x.
- Ma QP, Hill R, Sirinathsinghi D. Colocalization of CGRP with 5-HT1B/1D receptors and substance P in trigeminal ganglion neurons in rats. *Eur J Neurosci*. 2001;13:2099-2104. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01586.x.
- Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar intervertebral discs in rats. *Ann Anat*. 2002;184:235-240. doi:10.1016/S0940-9602(02)80113-3.
- Bae JY, Kim JH, Cho YS, Mah W, Bae YC. Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol*. 2015;523:126-138. doi:10.1002/cne.23672.
- Hirvonen TJ. A quantitative electron-microscopic analysis of the axons at the apex of the canine tooth pulp in the dog. *Acta Anat (Basel)*. 1987;128:134-139.
- Naftel JP, Bernanke JM, Qian XB. Quantitative study of the apical nerve fibers of adult and juvenile rat molars. *Anat Rec*. 1994;238:507-516. doi:10.1002/ar.1092380410.
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol*. 1971;232:86-87.
- Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res*. 1975;100:235-252. doi:10.1016/0006-8993(75)90481-3.
- Otsuka M, Konishi S. Substance P-the first peptide neurotransmitter. *Trends in Neuroscience*. 1983;6:317-320. doi:10.1016/0166-2236(83)90147-9.
- Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*. 1983;35:85-141.
- Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J*. 2004;37:185-192. doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00782.x.
- Alvarez FJ, Kavookjian AM, Light AR. Ultrastructural morphology, synaptic relationships, and CGRP immunoreactivity of physiologically identified C-fiber terminals in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol*. 1993;329:472-490. doi:10.1002/cne.903290405.
- De Biasi S, Amadeo A, Spreafico R, Rustioni A. Enrichment of glutamate immunoreactivity in lemniscal terminals in the ventroposterolateral thalamic nucleus of the rat: an immunogold and WGA-HRP study. *Anat Rec*. 1994;240:131-140. doi:10.1002/ar.1092400114.
- Bae YC, Nakamura T, Ihn HJ, Choi MH, Yoshida A, Moritani M, Honma S, Shigenaga Y. Distribution pattern of inhibitory and excitatory synapses in the dendritic tree of single masseter alpha-motoneurons in the cat. *J Comp Neurol*. 1999;414:454-468. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991129)414:4

- <454::AID-CNE3>3.0.CO;2-7.
20. Bae YC, Ihn HJ, Park MJ, Ottersen OP, Moritani M, Yoshida A, Shigenaga Y. Identification of signal substances in synapses made between primary afferents and their associated axon terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol.* 2000;418:299-309. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000313)418:3<299::AID-CNE5>3.0.CO;2-I.
 21. Bae YC, Park KS, Bae JY, Paik SK, Ahn DK, Moritani M, Yoshida A, Shigenaga Y. GABA and glycine in synaptic microcircuits associated with physiologically characterized primary afferents of cat trigeminal principal nucleus. *Exp Brain Res.* 2005;162:449-457. doi:10.1007/s00221-004-2022-y.
 22. Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, Schneider SP. Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J Comp Neurol.* 2004;472:257-280. doi: 10.1002/cne.20012.
 23. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J Endod.* 1990;16:48-53. doi:10.1016/S0099-2399(06)81563-3.
 24. Bhave G, Karim F, Carlton SM, Gereau RW 4th. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci.* 2001;4:417-423. doi: 10.1038/86075.
 25. 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;35:690-694. doi:10.1016/j.joen.2009.02.005.
 26. DiFiglia M, Aronin N, Leeman SE. Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord. *Neuroscience.* 1982;7:1127-1139. doi:10.1016/0306-4522(82)91120-4.
 27. Senba E, Shiosaka S, Hara Y, Inagaki S, Sakanaka M, Takatsuki K, Kawai Y, Tohyama M. Ontogeny of the peptidergic system in the rat spinal cord: immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol.* 1982;208:54-66. doi:10.1002/cne.902080105.
 28. Maley BE. The ultrastructural localization of enkephalin and substance P immunoreactivities in the nucleus tractus solitari of the cat. *J Comp Neurol.* 1985;233:490-496. doi:10.1002/cne.902330408.
 29. Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature.* 1977;270:741-743.
 30. Szolcsányi J. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Chahl LA, Szolcsányi J and Lembeck F, editors. *Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation.* Budapest: Akademiai Kiado; 1984. p. 28-53.
 31. Otsuka M, Konishi S, Yanagisawa M, Tsnoo A, Akagi H. Role of substance P as a sensory transmitter in spinal cord and sympathetic ganglia. In: Porter R, O'Connor M, editors. *Ciba Foundation Symposium 91-Substance P in the nervous system.* London: Pitman; 1982. p. 13-34.
 32. Lundblad L, Anggard A, Lundberg JM. Effects of antidromic trigeminal nerve stimulation in relation to parasympathetic vasodilation in cat nasal mucosa. *Acta Physiol Scand.* 1983; 119:7-13. doi:10.1111/j.1748-1716.1983.tb07299.x.
 33. Papka RE, Furness JB, Della NG, Costa M. Depletion by capsaicin of substance P-immunoreactivity and acetylcholinesterase activity from nerve fibers in the guinea-pig heart. *Neurosci Lett.* 1981;27:47-53. doi:10.1016/0304-3940(81)90204-4.