



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학박사 학위논문

구강 악안면 영역 통증 시 발현되는  
이온통로의 기능

The Role of Ion Channels in Oromaxillofacial Pain

2016년 2월

서울대학교 대학원 치의학과

신경생물학 전공

백 상 훈

국문 초록

# 구강 악안면 영역 통증 시 발현되는 이온통로의 기능

백 상 훈

서울대학교 대학원 치의학과

신경생물학 전공

(지도교수 오 석 배)

구강 악안면 영역에 통증이나 질병이 있을 때 나타나는 임상 증상이 매우 다양하고 복잡하여 통증의 진단과 치료가 쉽지 않다. 통증은 통각을 인식하는 특별한 신경세포(nociceptor)에서 인식된다고 알려져 있고, 통각 신경 세포에 존재하는 이온통로들이 외부의 자극을 받아서 신경 신호를 만들기 때문에 이온통로의 기능이 통증 발현에 있어 중요하다고 알려

져 있다. 본 연구에서는 구강 악안면 영역의 통증 중 치통과 삼차신경의 신경병증성 통증에서 발현되는 이온통로의 확인과 그 기능에 대하여 알아보고자 하였다.

치아의 상아질에 작용하는 정수력(hydrostatic force)은 치통의 직접적인 원인으로 오랫동안 알려져 왔다. 상아모세포가 치수에 전달된 정수압을 전기 신호로 바꾸는 역할을 하고 있음을 확인하기 위해서, 본 연구는 단일세포 역전사 중합반응 분석과 면역형광법을 이용하여 흰 쥐로부터 분리한 상아모세포에서 신장(stretch)에 의해 활성화되는 transient receptor potential(TRP) 이온통로의 발현을 관찰하였다. 단일세포 역전사 중합반응 분석 결과 87%의 상아모세포에서 TRPM7의 발현을 관찰하였으나 TRPC1(canonical 1), TRPC6(canonical 6)와 TRPV4(vanilloid 4)는 적은 수의 상아모세포에서 발견되었다. TRPM3(melastin 3)은 본 실험 조건에서 발견되지 않았다. 면역조직화학적 분석으로 TRPM7의 발현을 단백질 수준에서 확인하였다.

다음으로 삼차신경의 신경병증성 통증 연구를 수행할 수 있는 흰쥐의 안와신경 결찰 모델(chronic constriction of infraorbital nerve)을 사용하여 행동기능검사를 하였다. 악안면에서 발생하는 신경병증성 통증은 악안면 부위를 지배하는 삼차신경을 중심으로 나타나는데, 손상된 조직이 치유된 이후에도 통증이 지속되는 것이 일반적이며, 이러한 지속적인 통증의 발생에 말초 및 중추 신경계의 변형이 관여하는 것은 잘 알려져 있다. 신경병증성 통증의 원인으로는 여러 가지가 있으나 칼슘 및 다른 이온통로, 그 중에서도 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로(이하 HCN이라 한다)가 중요한 역할을 하는 것이 보고되고 있다. 행동기능검사 대상 흰쥐에서 삼차신경절 세포를 분리한 후 Western blot 분석으로 HCN의 발현과 신경병증성 통증 모델에서 CN1

과 HCN2이 많이 분포함을 확인하였다. 안와신경의 결찰을 통한 신경병 증성 모델에서 행동 기능 검사를 통해 삼차신경에서 통각과민 증상 발현 시 HCN 이온통로가 작용하고 있음을 확인하였고 PGE2-EP4 pathway가 HCN 이온통로의 활성을 조절함으로써 신경병증성 통증에 영향을 주고 있음을 확인하였다.

---

주요어 : transient receptor potential(TRP) 이온통로, 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로(HCN), 상아모세포, 삼차신경 신경병증성 통증

## 연구 배경

구강악안면부는 미각, 후각, 시각 기능과 음식의 저작, 연하(삼킴), 호흡 기능, 언어 및 감정 표현기능 등 여러 가지 기능을 한다<sup>(1)</sup>. 이와 같이 여러 가지 신체적 기능과 심리적 기능을 가지고 있기 때문에 인체에서 신경의 분포가 매우 복잡하고 조밀한 부위 중에 하나이다. 구조와 기능이 다양하고 신경의 분포가 조밀하고 복잡하며, 신체적 조건뿐만 아니라 심리적 조건에 의해서도 영향을 받기 때문에 구강악안면부에 통증이나 질병이 있을 때 나타나는 임상 증상이 매우 다양하고 복잡한 양상을 보이는 경우가 많다<sup>(2)</sup>. 때로는 환자가 통증을 호소해도 신체적으로 아무런 이상을 발견할 수 없는 경우도 있고, 같은 질병이라도 환자에 따라서 나타나는 증상이 아주 다를 수 있기 때문에 통증의 진단이 더욱 어렵다<sup>(3)</sup>.

구강악안면 영역의 통증을 분류하면 크게 치통과 만성통증으로 나눌 수 있다. 치통은 치성, 비치성으로 구분하고 만성통증은 턱관절기능장애, 구강작열감증후군, 삼차신경통, 긴장성 두통, 신경병증성 통증, 포진후신경통 등이 있다<sup>(2)</sup>.

치통의 가장 일반적인 원인은 충치, 치주염 등으로 치아 및 주위조직의 손상에 의한 것이기 때문에 치통의 치료는 감염되어 있는 치아구조물(중중 건강한 상아질과 치수까지 연장된) 제거와 같은 증상치료에만 국한되어 왔다. 인체의 다른 조직에 있어 염증에 의한 통증 치료 방법은 일반적인 제거가 아님을 고려한다면 분자 기전의 이해와 치통의 원인을 정확히 파악하는 치료 방법의 발전이 필요하다. 수십 년간의 연구로 정수역학적 이론이 제시되었고 이것은 치수의 역할이 기계적인 변환기로서 작용할 수 있다는 가능성을 제시했다<sup>(4)</sup>. 이 이론에 따르면 온도의 변화는

상아세관 내의 조직액의 움직임이 유발하며 치수내의 기계적 변환기감을 감지한다는 것이다. 염증 상태에서 증가된 치수압은 치아의 통증 역치를 낮춘다고 보고되고 있다<sup>(5)</sup>. 하지만, 치수 내 기계적인 변화를 감지하는 역할을 하는 분자구조물은 아직 밝혀지지 않고 있다. 치수의 가장 바깥층에 자리한 상아모세포는 상아질의 기질을 분비함으로써 상아질을 생성하는 세포인데 상아세관 내 연장하고 있는 세포돌기의 존재와 세포의 위치가 상아모세포가 직접 상아질액의 움직임과 상호작용할 수 있도록 하기 때문에, 치수 내 정수압을 파악할 수 있는 가능성을 제공한다<sup>(6)</sup>. 이런 사실들이 최근에 많은 연구자들이 상아모세포의 감각 부분의 역할에 관심을 갖게 되는 이유이다<sup>(7)</sup>.

만성 통증 중 신경병성 통증은 삼차신경통, 외상후 신경병성 통증 등이 있는데, 최근 치과 의원에서 발생하는 의원성 손상이 가장 흔한 원인이다. 사랑니 발치, 전달마취, 안면부위의 외상, 임플란트 시술 시 외상 등으로 신경이 손상되고 그 후 신경병증성 통증이 나타난다<sup>(3)</sup>. 만성 신경병증성 통증은 손상된 조직이 치유된 이후에도 통증이 지속되는 것이 일반적이며, 이러한 지속적인 통증의 발생에 말초 및 중추신경계의 변형이 관여하는 것은 잘 알려져 있고 여러 가지 기전으로 설명되어지지만 아직 정확한 기전은 밝히지 못하고 있다. 그 중에서도 양이온통로의 기능이 많이 연구되고 있는데 최근 연구에서 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로(HCN)가 중요한 역할을 하고 있음을 보여 준다<sup>(43,44)</sup>.

본 연구는 상아모세포 내 기계적 변환기로서의 역할을 할 수 있는 TRP 이온통로 존재를 단일세포 중합효소 반응과 면역형광법으로 확인하였고 안와신경의 결찰로 삼차신경의 신경병증성 통증 모델을 만들어 western blot 분석, 행동기능검사를 통해 삼차신경절 신경세포 내 HCN 이온통로의 발현 및 기능을 관찰하였다.

## 목차

국문초록.....	1
연구배경.....	4
목차.....	6
CHAPTER 1 : 치통 시 상아모세포에 발현된 기계자극반응성 TRP 이온통로의 분포 및 기능	
국문초록.....	8
서론.....	10
실험재료 및 방법.....	12
결과.....	15
고찰.....	19
영문초록.....	23
CHAPTER 2 : 신경병증성 통증 시 삼차신경절 신경세포에서의 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로 (HCN)의 역할	
국문초록.....	26
서론.....	28
실험재료 및 방법.....	31
결과.....	34
고찰.....	41
영문 초록.....	44
참고문헌.....	46
영문 초록.....	54



# CHAPTER 1

치통 시 상아모세포에 발현된  
기계자극반응성 TRP 이온통로의  
분포 및 기능

국문 초록

# 치통 시 상아모세포에 발현된 기계자극반응성 TRP 이온통로의 분포 및 기능

백 상훈

서울대학교 대학원 치의학과

신경생물학 전공

(지도교수 오 석 배)

치아의 상아질에 작용하는 정수력(hydrostatic force)은 치통의 직접적인 원인으로 오랫동안 알려져 왔다. 하지만, 치아 내에서 기계적 힘 전달체는 분자생물학적으로 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 많은 연구들이 치수 내에서 상아모세포가 치아구조물을 만드는 일차적 기능 외에도 이차적 기능으로 기계적 신호 전달 역할에 대해 보고하고 있다.

상아모세포가 치수에 전달된 정수압을 전기 신호로 바꾸는 중요한 역할을 하고 있음을 확인하기 위해서, 본 연구는 단일세포 역전사 중합반응

분석과 면역조직화학적 검사를 이용하여 흰 쥐로부터 분리한 상아모세포에서 신장(stretch)에 의해 활성화되는 transient receptor potential(TRP) 이온통로의 발현을 관찰하였다.

87%의 상아모세포에서 TRPM7의 발현을 관찰하였으나 TRPC1(canonical 1), TRPC6(canonical 6)과 TRPV4(vanilloid 4)는 적은 수의 상아모세포에서 발견되었다. TRPM3(melastin 3)은 본 실험 조건에서 발견되지 않았다. 면역형광법으로 TRPM7의 발현을 단백질 수준에서 확인하였다.

기계자극반응성 TRP 이온통로의 발현은 상아모세포의 기능을 뒷받침하는 분자생물학적 증거를 제시한 것으로 TRPM7이  $Mg^{2+}$ 의 항상성 유지 역할을 하는 kinase 기능을 갖는 기계자극반응성 이온통로이므로, 상아모세포에 발현된 TRPM7도 상아질 형성 시 광화작용에 기여할 것이라 예상된다.

---

주요어 : TRP 이온통로, 상아모세포, TRPM7, Single-cell RT-PCR, 치통, 광화

# I. 서론

치통에 의한 구강악안면 영역의 불편함과 삶의 질 저하에도 치통을 설명하는 분자세포 병태생리학은 여전히 연구가 진행되고 있다<sup>(6)</sup>. 분자 기전에 대한 이해 부족으로 치통의 치료는 감염되어 있는 치아구조물(종종 건강한 상아질과 치수까지 연장된) 제거와 같은 증상치료에만 국한되어 있다. 인체의 다른 조직에 있어 염증에 의한 통증 치료 방법은 일반적인 제거가 아님을 고려한다면 분자 기전의 이해와 치통의 원인을 정확히 파악하는 치료 방법의 발전은 중요하다.

온도에 반응하는 TRP(transient receptor potential) 이온통로의 존재와 치통의 일차 구심성 신경세포에서 유해한 온도 자극 수용기의 역할에 대해 보고한 바 있다<sup>(8)</sup>. 하지만, 유해성 온도 자극이 신경 말단에서 전기적으로 변환되는 현상만으로 air puff와 probing 같은 무해한 기계적인 자극에 의한 순간적인 통증을 설명할 수 없다<sup>(9)</sup>. 커지는 정수압에 의해 악화되는 만성 치수염 환자의 맥동하는 통증은 기계적인 압력 수용기의 존재를 시사한다<sup>(10)</sup>.

수십 년간의 연구가 정수역학적 이론을 만들었고 이것은 치수의 역할이 기계적인 변환기로서 작용할 수 있다는 가능성을 제시했다<sup>(8)</sup>. 이 이론에 따르면 온도의 변화는 상아세관 내의 조직액의 움직임을 생성하여 치수 내의 기계적 변환기가 이를 감지하게 된다. 치아 우식 또는 마모에 의해 상아세관이 노출되면, 미세한 온도 변화에 의한 상아세관 내 세관액의 과한 움직임이 발생하여 갑작스런 강한 통증이 생기게 된다<sup>(9)</sup>. 염증 상태에서 증가된 치수압은 치아의 통증 역치를 낮춘다고 보고되고 있다<sup>(10)</sup>. 그러나, 치수 내 기계적인 변화를 감지하는 역할을 하는 분자구조물

은 아직 밝혀지지 않고 있다.

상아모세포는 치수의 가장 바깥에 위치하며 칼슘 기질을 분비함으로써 상아질을 생성하는 세포이다. 상아세관 내부까지 이어지는 상아모세포들의 존재와 위치적 특성은 상아모세포가 직접 상아질액의 움직임에 반응할 가능성을 시사한다<sup>(6)</sup>. 그리고, 치수의 가장 바깥층에서 간극결합(gap junctions)으로 서로 연결되어 있는 상아모세포의 단일층은 치수 내 정수압을 파악할 수 있는 적절한 위치를 제공한다. 이런 사실들이 최근에 많은 연구자들이 상아모세포의 감각 부분의 역할에 관심을 갖게 되는 이유이다<sup>(4)</sup>. 막전압의존성 이온통로와 리간드의존성 이온통로의 존재를 확인해 준 연구들이 상아모세포의 흥분성을 뒷받침하고 있다<sup>(5,7,11,12)</sup>. 최근의 한 연구에서는 따르면, 골세포에서 유체의 전단응력을 탐지하는 역할을 하는 일차 섬모가 상아모세포에도 발견되는 것을 확인하였으며<sup>(13)</sup>, 이는 상아모세포가 기계적 자극에도 반응할 수 있음을 암시하였다<sup>(14)</sup>. 그러나, 상아모세포에서의 기계적인 힘의 변환기 역할을 하는 분자는 아직 밝혀지지 않았다. 이 연구에서는 상아모세포에서 기계적인 변환기 역할을 할 수 있는 TRPC1(canonical 1), TRPC6(canonical 6), TRPV4(vanilloid 4), TRPM3(melastatin 3) 그리고 TRPM7(melastatin7) 같은 기계적 자극에 반응하는 TRP 이온통로의 유무를 확인하려고 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 상아모세포의 분리

성숙된 Sprague-Dawley 쥐(200-400 g, 한국 오리엔탈 바이오, 성남, 한국)로부터 상아모세포를 분리하였으며<sup>(15)</sup>, 본 연구에서 수행한 동물 실험은 서울대학교 치의학대학원 실험동물위원회의 승인을 얻었다. 경추탈골로 희생된 흰 쥐에서 5-10분 이내 상하악 절치를 발거하고 차가운(3-5 °C) extracellular saline(ECS)에 보관하였다. 주위 연조직을 모두 제거한 후, diamond disc를 이용하여 500 µm 두께의 횡절편을 만들었다. 치아 절편들은 2 ml 표준 효소 용액에서 37 °C로 30분간 배양했고 지름의 크기가 순차적으로 감소된 파스퇴르 파이펫을 사용하여 치아 절편 현탁액을 추출하였다. 추출된 현탁액을 원심 분리하고(1000 rpm, 5분), 다시 배양하여 poly-L-lysine 으로 코팅된 유리 덮개슬립에 올려붙이고 사용하기 전까지 3-5 °C에 보관하였다. ECS 는 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub> , 1 MgCl<sub>2</sub> , 10 HEPES (in mM) 으로 구성되었고 NaOH로 pH 7.3-7.4에 적정하였다. 표준 효소 용액은 Ca<sup>2+</sup> 와 Mg<sup>2+</sup>가 없는 ECS에 collagenase IA(3 mg/ml, Roche)와 protease I(0.25 mg/ml, Roche) 로 구성되었다.

### 2. 단일 세포 역전사 중합효소 연쇄 반응(Single cell reverse transcription-polymerase chain reaction, scRT-PCR)

끝부위가 약 20 µm 직경인 tip을 가진 patch pipette으로 목표 세포를

흡입하고 역전사 시약을 함유한 반응 튜브에 넣었다<sup>(8,15)</sup>. 역전사 반응(reverse transcription, RT)은 37 °C에서 1시간 동안 진행되었다. RT 후 분리된 얻은 cDNA를 2 µl씩 부분표본으로 사용하여 PCR을 진행하였다. 모든 PCR 증폭들은 nested primers(Table 1)와 함께 시행되었다. 제 1차 반응은 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM "outer" primers, 4 µl 역전사 산물, 그리고 0.2 µl platinum Taq DNA polymerase(Invitrogen)를 함유한 50 µl의 연쇄반응 용액에서 시행되었다. 95 °C에서 5분간의 초기변성 후 변성 과정 95 °C에서 40초, 풀림과정 55 °C에서 40초, 연장과정 72 °C에서 40초의 순환을 35회 반복한 후 연장과정을 7분 진행하여 연쇄반응을 하였다. 2차 반응을 위한 연쇄반응 용액(20 µl)은 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM "inner" primers, 제 1차 반응의 결과물 5 µl 를 혼합하여 사용하였고 프로토콜은 제 1차 반응과 동일하게 진행되었다. 2차 연쇄반응 산물은 ethidium bromide가 염색된 2% agarose gel에서 100V의 조건에서 40분 동안 전기영동 후 가시화되었다.

### 3. 면역세포형광법

유리 덮개 슬라이드에 올려놓은 상아모세포는 4% paraformaldehyde (Biosesang)에 10분 동안 고정되었고 phosphate buffered saline(PBS)로 10분 동안 3회 세척했다. 세포들은 상온에서 1시간 동안 blocking solutions(5% Normal Donkey Serum, 5% Fetal Bovine Serum, 2% Bovine Serum Albumin)으로 처리했다. 그 후 4 °C에서 goat polyclonal anti-TRPM7 (1:1000; Abcam)와 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 씻어 내고 상온에서 2시간 동안 FITC-conjugated donkey anti-goat (1:200; Jackson) 와 반응시켰다. PBS 로 세척한 후 이 조직에 Vectashield mounting media(Vector Laboratories)를 올린 후 표본을 제작하고 confocal microscope (LSM7 Carl Zeiss)로 관찰하였다.

Target Gene (Product Length)	Outer Primers	Inner Primers	GenBank No.
DSPP (452, 408 bp)	GCTGAGGTGACACCAAGCATT ACTTTTGTGCCCCGTGCTG	GGAAGGTGCTGGTTTGGATAAT ACCTTCGGTTTCTAATCCCTGA	NM_012790
TRPC1 (347, 197 bp)	GCCAGCCCTTGAGAGAATAG GCAGATTTCAATGGGACAGA	TGGGATGATTTGGTCAGACA GTTCCACCCACACTGGTAG	NM_053558
TRPC6 (361, 200 bp)	TCGAGTTGGGGATGCTTTAC GGATCAATGCCTACAAAGGG	TTTTGCTGAAGGCAAGAGGT CGAACGGCCTCATGATTATT	NM_053559
TRPV4 (418, 372 bp)	ACTGCACATGCCATTGAAC AGTCTTGGCAGCCATCATGAG	GCTGCAAGCATTACGTGGA GGCGAAAGACCGTCATTGTTA	NM_023970
TRPM3 (365, 204 bp)	TTCTCAACAGCATGCACTCC GCGGGTGTATGTGAAGGTCT	CACTTCATCCTGGCTGACAA TGGTACAGGAGGGGTGTCTC	NM_0011915 62
TRPM7 (348, 205 bp)	CATATGTCCTCCCCACCAAC GTCCGGAGAGTCTTCTGTGCG	AGCCACTTGAATCCACAAC TATATCCAGCAGCACCCACA	XM_0010563 31

Table 1. List of Primers Used



### III. 연구 결과

#### 1. 상아모세포의 분자 생물학적 확인

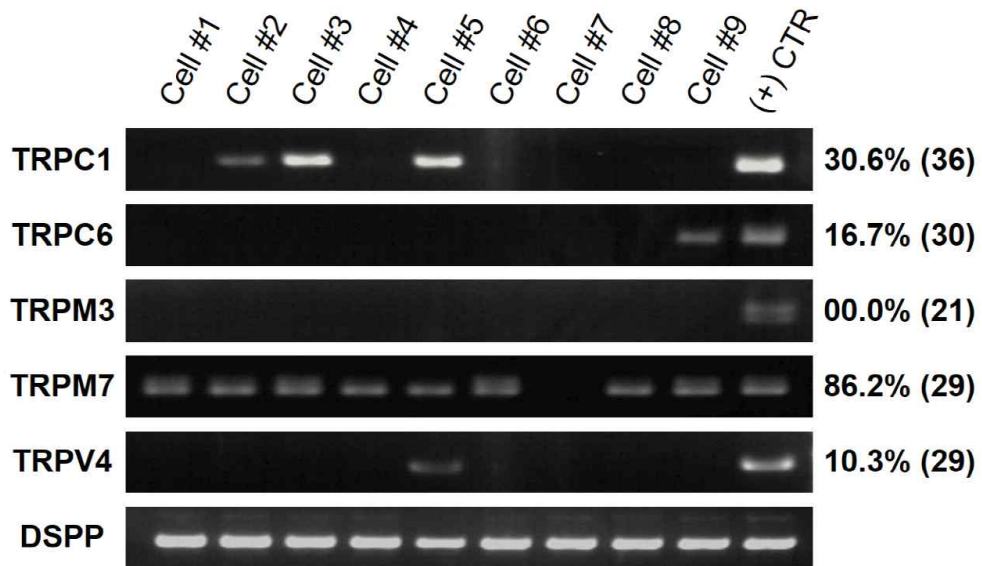
연속된 효소 처리와 기계적인 분리로 15-25  $\mu\text{m}$  직경의 구형의 모습에 긴 세포돌기가 있는 세포를 추출하였다. stretch-activated TRP channel subfamily와 dentin sialophosphoprotein(DSPP)의 mRNA의 발현을 관찰하기 위한 단세포 역전사 증합효소 연쇄반응 분석을 위해 위에 묘사된 형태의 세포들을 모았다<sup>(16)</sup>. 수집된 대부분의 세포들은 DSPP에 양성 있었고, DSPP 반응이 부족한 소량의 세포들은 상아모세포가 아닌 것으로 추정하였다. DSPP 반응을 보인 세포들만 신장(stretch)에 의해 활성화되는 TRP 이온통로의 분포 정도를 계산하는데 사용하였다.

#### 2. 기계자극반응성 TRP 이온통로에 대한 Single cell RT-PCR 분석

단세포 역전사 증합효소 연쇄반응산물의 전기영동으로 상아모세포에서의 TRP 채널의 분포 정도를 관찰하였다. TRP 채널의 canonical subfamily인 TRPC1는 30.6%(n=11/36), TRPC6는 16.7%(n=5/30) 정도 관찰되었다. 삼투압 증가로 인한 세포 볼륨 변화에 따라 활성화가 되는 것으로 알려진 TRPM3(n=0/21)와 TRPV4(10.3%,n=3/29)는 거의 관찰되지 않았다. 대조적으로 TRPM7은 대다수의 상아모세포에서 관찰되었다(86.2%,n=25/29) (Figure 1).

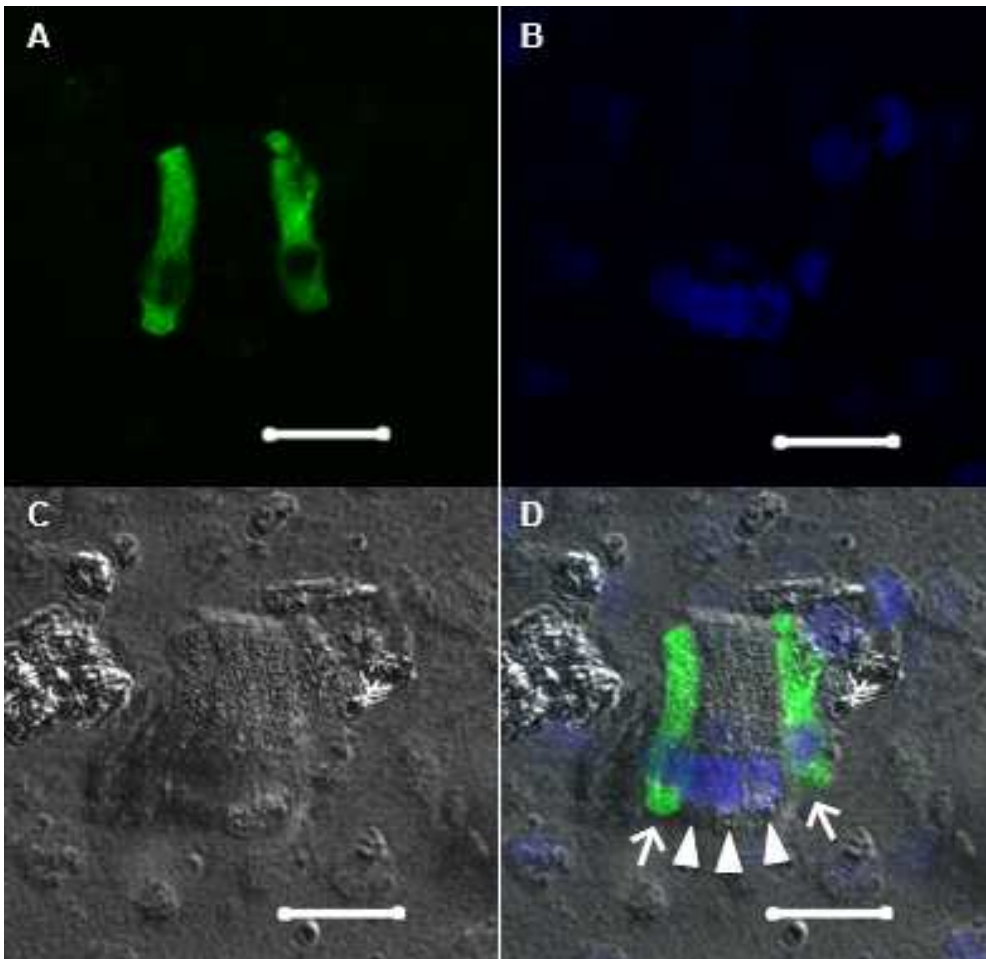
### 3. 상아모세포에서의 TRPM7 면역화학적 분석

면역화학적 분석으로 상아모세포의 TRPM7 단백질 발현을 관찰하였다 (Figure 2). 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 염색하여 기저부의 핵이 존재하는 것을 확인하였고 (Figure 2A and B), 이것은 기존에 발표된 상아모세포의 외형적 모습의 표현과 일치하였다<sup>(15)</sup>. 단세포 역전사 중합효소 연쇄반응 결과와 일치하게 대다수의 상아모세포는 TRPM7에 결합하는 다중클론성 항체에 염색되었지만(70.0%, n=7/10, Fig.2D, 화살표), 상아모세포의 일부는 염색되지 않았다(Figure 2D, 화살표 머리).



**Figure 1. Single-cell RT-PCR analysis for stretch-activated TRP channels expression**

Typical gels from nine individual odontoblasts by single cell RT-PCR showing expression of TRPC1, TRPC6, TRPM3, TRPM7, TRPV4 and DSPP. Lane 10 is the RT-PCR result of dental pulp extract used as the positive control. Predicted product sizes are 197 bp (TRPC1), 200 bp (TRPC6), 205 bp (TRPM7), 204 bp (TRPM3), 372 bp (TRPV4), 408 bp (DSPP), respectively. Numbers in parenthesis indicate the number of samples in each group. CTR: control, DSPP: dentin sialophosphoprotein.



**Figure 2. Immunohistochemical analysis of TRPM7 expression in odontoblasts.**

A representative odontoblasts stained with antibody against TRPM7 (A) and a nucleus stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) (B) DIC image (C) and overlay (D). Arrows indicate examples of TRPM7 expressing odontoblasts. Arrowheads show odontoblasts without detection of TRPM7. Scale bar indicates 20  $\mu$ m.

## IV. 고찰

최근 발표되는 많은 증거들이 상아모세포가 치아의 감각 기능에 관여할 가능성이 있다는 것을 보여주고 있다. 이 실험은 상아모세포의 감각 기능에 기여할 것으로 예상되는 기계자극 반응성 TRP 이온통로의 존재를 연구하였다. 단세포 역전사 중합효소 연쇄반응과 면역형광법 분석은 흰 쥐의 절치에서 분리한 상아모세포에 TRPM7, TRPC1, TRPC6, TRPV4의 존재를 밝혔으나 대조적으로 본 실험조건에서는 TRPM3는 발견되지 않았다.

TRP 이온통로는 세포내 다양한 물리적, 화학적 자극의 변환기로서 광범위하게 알려졌다<sup>(17)</sup>. 최근 몇 년 동안 기계적 인장도의 세포 감지에 있어 TRP 이온통로의 역할에 관심이 높아지고 있다. 세포막 분리법, 면역학적 분석, 전기생리학적 기록을 사용한 광범위한 연구는 TRPC1<sup>(18)</sup>과 TRPC6<sup>(19)</sup>가 신장에 의해 활성화되는(stretch-activated) cation channel(SAC)임을 제시했다. TRPM7의 기계자극 반응성도 많은 연구에서 밝혀졌다. HeLa 세포에서 발현된 TRPM7의 단일 이온통로 기록은 TRPM7이 직접적인 인장의 유발에 의해 활성화됨을 보여 주었으며<sup>(20)</sup>, 유체 흐름의 진단응력은 혈관 근육세포의 TRPM7 전류를 증가시키기도 하였다<sup>(21)</sup>. 최근 연구에 의하면 TRPM7을 유전적으로 제거한 Zebrafish 돌연변이가 접촉에 무반응 하는 결과로 TRPM7의 기계적 감각 역할을 뒷받침하고 있다<sup>(22)</sup>. 삼투압 변화에 따른 세포 부피 변화와 세포막 신장은 TRPM7<sup>(23)</sup> 뿐만 아니라 TRPV4<sup>(24)</sup>, TRPM3<sup>(25)</sup>도 활성화시키는 것이 입증되었다. 상아모세포에서 신장에 의해 활성화되는 TRPM7, TRPC1, TRPC6, TRPV4의 존재는 이 채널들이 상아모세포에서 기계적 자극의

변환기로서의 역할을 하고 있다는 것을 시사하며, 결국 상아모세포가 기계적 자극의 수용기로서 역할을 한다는 것을 증명하고 있다. 대다수의 상아모세포에서 TRPM7의 발현은 TRPM7이 상아모세포의 전체 집단에서 기계적 자극의 변환기로서 역할을 할 것이라는 것도 시사한다. 대조적으로, TRPC1, TRPC6, TRPV4는 적은 부분의 상아모세포에서만 발현되었다. 상아모세포에서의 TRPC1, TRPC6, TRPV4의 차등적인 발현의 생리적인 역할은 아직 명확하지 않다. 신장에 의해 활성화되는 이온통로의 차등적인 발현에 따른 상아모세포의 기계감각적 기능에 대한 연구 및 비교는 TRPM7, TRPC1, TRPC6, TRPV4의 기능적 연관성에 대한 더 자세한 정보를 제공해 줄 것으로 생각된다. TRPC1, TRPC6와 TRPV4의 상호작용이 통각과민 및 유해수용기 감각을 조절하고 있다는 것이 보고되기 때문에 염증 상황에서 상아모세포의 TRPC1, TRPC6, TRPV4의 발현이 증가하는지 관찰해 볼 필요가 있다<sup>(26)</sup>.

기존의 한 연구에서 신생 흰쥐의 치수 세포를 *in vitro*상에서 분화시켜 얻은 상아모세포에서 TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM3의 존재를 증명하였다<sup>(27)</sup>. 성숙한 흰쥐에서 분리한 상아모세포의 역전사 중합분해 효소 측정법을 사용한 최근 연구에서는 TRPM3의 존재는 관찰하지 못했으며 TRPV4의 매우 제한된 발현을 관찰하였다. 본 실험 또한 흰쥐 상아모세포에서 TRPV1과 TRPV2를 관찰하지 못했으며, 이러한 결과적 차이는 실험조건의 차이 때문일 것이다.

최근 연구 결과가 상아모세포의 기계감각 기능의 가능성을 강하게 주장하지만, 상아모세포의 기능적 역할에 대한 자료의 부족으로 인해 기계적 자극에 따른 상아모세포의 활성을 결론내리기에는 아직 결정적인 증거가 부족하다. 또한, 상아모세포에 발현된 기계자극 반응성 TRP 채널의 유해자극수용기 기능을 뒷받침하려면 ‘상아모세포가 어떻게 감각 정보를

인접한 감각신경 말단에 전달하는가?’에 대한 설명이 필요하다. 상아모세포에서 다양한 막전압의존성 이온통로의 발현은 상아모세포의 흥분성을 뒷받침하며<sup>(28,29)</sup>, ATP의 신경 적용 시 유해방어성 행동을 보이는 것은 ATP가 신경 전달 물질임을 시사하고 있다<sup>(30)</sup>. 하지만, 상아모세포로부터 감각신경으로의 신경 전달 과정은 아직 밝혀지지 않았다.

세포 내  $Mg^{2+}$  흡수 경로로서의 TRPM7의 기능<sup>(31)</sup>과  $Mg^{2+}$ 이 상아질의 광화에 결정적인 금속임을 고려할 때<sup>(32)</sup>, 상아모세포에 광범위하게 발현되는 TRPM7은 이차 상아질 형성에 역할을 할 수도 있다. 이차 상아질은 생리적 조건에서 어떤 자극 물질 없이도 치아의 맹출 후 평생을 통해 형성되는 상아질이다. 정확한 기전은 불명확하지만, 용액성 응력이 골 형성을 유도하는 것과 같이 용액성 응력에 의한 상아모세포의 활성화가 상아질 형성에 기인할 수도 있다는 것이 제시되었으며<sup>(33)</sup>, 역동적 정수압이 치수 줄기 세포의 상아모세포로의 분화를 유도하는 사실도 보고된 바 있다<sup>(34)</sup>. 기능적 실험 자료의 보충이 요구되지만, 상아질 용액의 움직임에 의한 TRPM7의 활성화는  $Mg^{2+}$ 을 내부로 유입시키고, 이것이 상아질을 광화할 것이다. 게다가, TRPM7은 C-말단에 효소적으로 활성화되는 kinase가 용화되어 있는 독특한 이온 채널로<sup>(35,36,37)</sup> kinase domain은 상아질의 초기 광화 과정에 필요한 alkaline phosphatase 활동을 조절할 수도 있다. 이 경우 TRPM7은 이차상아질 형성에 이중의 역할을 하고 있는 것으로 상아질 용액의 움직임 또는 삼투압 응력에 의한 기계적 자극에 반응하여  $Ca^{2+}$ 와  $Mg^{2+}$ 을 그의 이온통로를 통해 유입시키고 kinase 활성화에 의해 인산기(phosphate)를 가용화할 것이다. 상아질 형성에 있어 상아모세포에 발현된 TRPM7의 기능적 역할을 연구해 봄이 바람직할 것이다.

이 연구에서 활용한 단일 세포 역전사 중합 효소 분석은 상아모세포에

서의 불균일한 mRNA 발현을 보여 주었다. 기계자극반응성 TRP 이온통로 중 발현량이 가장 높았으나 모든 상아모세포에서 TRPM7 이 발견된 것은 아니다. 이런 불균일성에 대한 이유는 명확하지 않다. 치수 천장 또는 벽 같은 상아모세포의 차등적인 위치, 또는 근처 신경 말단과의 상호작용이 이런 다른 모습의 표현에 기여할 수도 있다. 그럼에도 불구하고, TRPM7 또는 다른 기계자극반응성 TRP 이온통로의 활성화에 의해 발생한 상아모세포 일부 집단의 탈분극은 서로 간극결합으로 연결된 모든 다른 상아모세포에 전달될 수도 있다<sup>(38)</sup>. 향후에 배양한 치아 절편에서 생존한 상아모세포를 대상으로 한 생세포 이미징은 실제 조직에서도 상아모세포간의 탈분극 전달이 사실임을 결정하는 데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 단세포 역전사 중합효소 연쇄반응산물 분석을 통해 상아모세포에서의 기계자극 반응성 TRP 이온통로인 TRPM7, TRPC1, TRPC6 그리고 TRPV4 의 발현을 입증하였다. 흰쥐 상아모세포의 대부분에서 TRPM7 이 발견되었지만, TRPC1, TRPC6, TRPV4 의 발현은 일부 상아모세포에만 국한되었다. 다양하게 발현된 TRP 이온통로 subtypes의 기능적 영향은 명확하지 않다. 신장에 의해 활성화되는 이온통로로서 kinase 역할을 하는 특징과  $Mg^{2+}$ 의 항상성에 기여하는 특징으로 미루어 볼 때 TRPM7의 잠재적인 역할은 이 채널이 치통 또는 상아모세포에 의한 상아질층의 광화에 매우 중요한 역할을 할 수도 있다는 사실을 뒷받침한다. 상아모세포에서 발현된 TRPM7과 다른 신장에 의해 활성화되는 이온통로의 기능적 역할에 대한 연구는 상아모세포의 생리적 기능에 대한 이해에 도움이 될 것이다.



- ABSTRACT -

Single cell RT-PCR and  
immunocytochemical detection of  
mechanosensitive transient receptor  
potential channels  
in acutely isolated rat odontoblasts

Sang-hoon Baek, D.D.S., M.S.D.

Major in Neurobiology,  
Department of Dentistry, Graduate School,  
Seoul National University  
(Directed by Professor Seog Bae Oh, D.D.S.,  
M.S.,Ph.D.)

*Objective:* Hydrostatic force applied tooth pulp has long been suspected to be the direct cause of dental pain. However, the

molecular and cellular identity of the transducer of the mechanical force in teeth is not clear. Growing number of literature suggested that odontoblasts, secondary to its primary role as formation of tooth structure, might function as a cellular mechanical transducer in teeth.

*Design:* In order to determine whether odontoblasts could play a crucial role in transduction of hydrostatic force applied to dental pulp into electrical impulses, current study investigated the expression of stretch-activated transient receptor (TRP) channels in acutely isolated odontoblasts from adult rats by single cell reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunocytochemical analysis.

*Results:* As the results, expression of TRPM7(melastatin 7) was observed in majority(87%) of odontoblasts while mRNAs for TRPC1(canonical 6) and TRPV4(vanilloid 4) were detected in small subpopulation of odontoblasts. TRPM3(melastatin 3) was not detected in our experimental set-up. Immunocytochemical analysis further revealed TRPM7 expression at protein level.

*Conclusion:* Expression of the mechanosensitive TRP channels provides additional evidence that supports the sensory roles of odontoblasts. Given that TRPM7 is a mechanosensitive ion channel with a kinase activity that play a role in  $Mg^{2+}$  homeostasis, it is possible that TRPM7 expressed in odontoblasts might play a central role in mineralization during dentin formation.

---

Keywords: TRP channels, Odontoblasts, TRPM7, Single cell RT-PCR, Dental Pain, Mineralization

## CHAPTER 2:

신경병증성 통증 시 삼차신경절  
신경세포에서의 과분극 또는 고리형  
뉴클레오티드에 의해 활성화되는  
이온통로(HCN)의 역할

국문 초록

신경병증성 통증 시 삼차신경절  
신경세포에서의 과분극 또는 고리형  
뉴클레오티드에 의해 활성화되는  
이온통로(HCN)의 역할

백 상 훈

서울대학교 대학원 치의학과

신경생물학 전공

(지도교수 오 석 배)

치과 치료 중 발생하는 의원성 손상(사랑니 발치, 전달마취, 안면부위의 외상, 임플란트 시술 시 외상 등)으로 신경이 손상되면 그 후 신경병증성 통증이 나타나는데, 신경병증성 통증은 악안면 부위를 지배하는 삼차신경을 중심으로 나타나고 손상된 조직이 치유된 이후에도 통증이 지속

되는 것이 일반적이다. 통증의 원인으로는 여러 가지가 있으나 칼슘 및 다른 이온통로, 그 중에서도 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로(이하 HCN이라 한다)가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다.

삼차신경의 신경병증성 통증에서의 HCN의 발현과 기능을 연구하기 위해 본 연구는 흰쥐의 안와신경 결찰 모델(chronic constriction of infraorbital nerve)을 사용하여 행동기능검사를 하였고, 행동기능검사 대상 쥐에서 삼차신경절 세포를 분리한 후 Western blot 분석으로 HCN의 발현을 관찰하였다.

Western blot 분석을 통해 신경병증성 통증 모델에서 HCN1, HCN2의 발현량이 증가하는 것을 관찰하였다. 행동기능검사를 통해 신경병증성 통증 모델에서 통각의 역치가 낮아지는 것을 확인하였고, 정상 모델에서 cAMP에 의해 통각의 역치가 낮아지고 cAMP와 HCN blocker인 ZD7288를 함께 적용한 경우 역치가 재상승되는 것을 관찰하였다. 정상 모델에서 프로스타글란딘(PGE2)에 의해 통각의 역치가 낮아지고 PGE2와 ZD7288을 함께 적용시 역치의 재상승을 관찰할 수 있었고, PGE2에 의해 낮아진 통각 역치가 EP4 길항제인 AH23848를 함께 적용 시 역치가 재상승되는 것도 관찰하였다. 위 실험의 결과로 삼차신경의 신경병증성 통증에서 HCN 이온통로는 통증 발현에 있어 중요한 역할을 하며, 프로스타글란딘에 의한 염증성 통증에서도 HCN 이온통로가 PGE2-EP4 기전을 통해 관여하고 있음을 확인할 수 있었다.

---

주요어 : 과분극과 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로 (HCN), 삼차신경 신경병증성 통증, 행동기능검사, western blot, 프로스타글란딘

## I. 서론

신경병증성 통증(neuropathic pain)은 국제통증연구학회의 정의에 의하면 ‘신경계의 일차적인 병소나 기능장애에 의해 발생한 통증’으로 되어있다. 침해수용성 통증을 전달하는 과정에서 신경단위를 과민하게 만들어 주어서 생기게 되는 통증으로, 자발적인 통증, 온도 통각과민(thermal hyperalgesia), 기계적 이질통(mechanical allodynia) 등을 특징으로 한다(39,40).

신경병증성 구강안면 통증은 삼차신경통, 외상후 신경병증성 통증 등이 있는데, 최근 치과 의원에서 발생하는 의원성 손상이 가장 흔한 원인이다. 사랑니 발치, 전달마취, 안면부위의 외상, 임플란트 시술 시 외상 등으로 신경이 손상되면 그 후 신경병증성 통증이 나타난다(3,41). 만성 신경병증성 통증은 손상된 조직이 치유된 이후에도 통증이 지속되는 것이 일반적이며, 이러한 지속적인 통증의 발생에 말초 및 중추신경계의 변형이 관여하는 것은 잘 알려져 있으나, 아직 정확한 기전은 밝히지 못하고 있다. 이소성 신경 활성화(ectopic nerve activity), 전환(transduction), 이온통로의 기능(channel function), 교감신경성 활성화, 사이토카인, 중추성 감각화와 신경 가소성(central sensation and plasticity), 중추성 하향억제계 결합 등의 여러 가지 기전이 소개되고 있는데, 이 중에서도 이온통로의 기능이 많이 연구되고 있다(42). 지금까지  $\text{Na}^+$  통로,  $\text{K}^+$  통로, 및  $\text{Ca}^{2+}$  통로가 큰 관심사였으나, 최근 연구에서는 hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) c이온통로가 신경병증성 통증에 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있다(43,44).

HCN 이온통로는 막전압에 의해 활성화되는 칼륨 이온통로의 상위분류

(superfamily)이다. 중앙에 위치한 기공 주위에 배열된 4개의 아단위로 구성된 복합체이고 한 개의 단위체는 6개의 막통과 부분으로 구성되어 있다<sup>(39,45,46)</sup>.

심장과 신경계에서 발현되는 4가지 아단위(HCN 1-4)가 밝혀져 있으며, 가장 많이 발현되는 아단위는 HCN1으로 척수후근신경절의 중간 크기 이상의 신경세포에서 가장 많이 발현되며, HCN2도 HCN1보다 적지만 다양한 신경세포에서 발현되고 있다. HCN3,4는 HCN1,2보다 발현 정도가 적다<sup>(45,46)</sup>. HCN 통로에서 발생하는 전류를  $I_h$  라 하는데,  $-60 \sim -90$  mV의 막전압 범위에서 활성화되고 생리적 상태에서 약  $-30$  mV의 역전 전압을 가지며,  $\text{Cs}^+$  에 의해 억제된다<sup>(47)</sup>. 이 이온통로의 조절을 통해 흥분성 세포는 자발적 흥분을 일으키며,  $I_h$  는 활동전압의 빈도를 결정하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 심장의 박동 조율기(pacemaker) 세포와 자발적으로 활동하는 신경세포의 주기적인 활동의 조절에 중요한 역할을 한다<sup>(48)</sup>.

$I_h$  의 활성화는 과분극에 의해 이뤄질 뿐만 아니라, cyclic adenosine monophosphate(cAMP)가 이온통로의 세포내 cAMP 결합 부위에 직접 결합함으로써 활성화되기도 한다. 이러한  $I_h$  활성화 특성에 근거하여 이 통로를 과분극 또는 고리형 뉴클레오티드에 의해 활성화되는 이온통로(HCN)라고 하였다<sup>(49)</sup>. 포유동물의 HCN 이온통로 군에는 4가지 이온통로가 존재하는데, 과분극에 대해 HCN1이 가장 빠른 활성화 속도를 보이고 있으며, HCN2와 HCN3이 그 다음이고, HCN4는 상대적으로 가장 느리게 활성화된다<sup>(50)</sup>. cAMP 에 대한 반응 정도를 보면 HCN2와 HCN4는 민감하게 반응하는 반면, HCN1과 HCN3은 거의 반응하지 않는다<sup>(51)</sup>.

$I_h$  는 몇몇의 중추계 신경세포와 일차 유해성 신경세포에서 매우 중요하다. HCN1, 2는 일차 체성감각 신경세포에서 강하게 발현되는 형태이

다. 큰 무해성 감각 신경세포는 HCN1에 기인하는 fast, c-AMP insensitive  $I_h$  를 나타낸다. HCN1은 대부분의 유해 수용기인 작은 신경 세포에서 기능적으로 발현되지 않으며, HCN1의 억제는 통증 조절에 큰 영향을 미치지 못 한다. 대부분의 작은 신경세포에서  $I_h$  는 느리고 세포 내 cAMP 에 예민하게 반응하는데, 이것은 염증성과 신경병증성 통증에서 중요한 역할을 하는 이온통로임을 입증하는 것이다<sup>(50,52)</sup>.

흰쥐의 신경결찰 모델 실험에서 HCN “pacemaker” 이온통로는 접촉과 연관된 통증과 손상된 척수후근신경절에서 기인한 자발적 신경 방전에 역할을 하는 것으로 알려졌다. 신경 손상은 큰 지름의 척수후근신경절 신경세포에서 pacemaker 전류를 증가시키고, pacemaker 유도 자발적 활성화 전압을 발생시킨다. ZD7288(특정 억제제)를 사용한 HCN 활성화의 약물적 차단은 가벼운 접촉에 대한 과민성을 줄여주고, A $\beta$  와 A $\delta$  섬유에서 기원하는 점화 주파수를 줄여주었다<sup>(53)</sup>.

염증 산물로서 통증 과민 현상을 야기하는 prostaglandin E2(PGE2)는 세포내 cAMP 농도를 증가시키는데<sup>(54)</sup>, PGE2 수용체인 EP4 수용체가 차단된 경우 세포내 cAMP 농도의 증가는 관찰되지 않았고, EP4 수용체가 감각 신경세포에서 확인되었다<sup>(55,56)</sup>. 본 실험에서는 신경병증성 통증에서 HCN의 역할과 HCN의 PGE2-EP4 경로를 통한 역할을 알아보았다.

삼차신경절에 발현하는 HCN 이온통로가 구강악안면 영역의 통증 기전에 기여하는 분자생물학적 및 생리학적 기전은 설명된 바가 없다. 본 실험에서는 안와신경 결찰 모델을 사용하여 신경 손상 후 발생하는 통각과민을 관찰하고 HCN 이온통로의 발현 여부와 분포 정도를 Western blot으로 확인하였고 cAMP, ZD7288, prostaglandin, AH23848의 처리로 행동기능검사를 시행하여 HCN 이온통로의 역할과 특성을 연구하였다.



## II. 실험재료 및 방법

### 1. 동물과 수술

본 연구에서 수행한 동물 실험은 서울대학교 치의학대학원 실험동물위원회(IACUC)의 승인을 얻었으며 동물 처리는 International Association for the Study of Pain 의 규정에 따라 시행되었다. 실험에 사용한 흰쥐 (Sprague-Dawley, 체중 200-250 gm, Orientbio)와 TRPV1 knockout mice(Jackson Lab)는 교내 시설에서 사육하였다. 동물은 실험 전 적어도 1주일동안 동물 사육 시설에서 길들여졌고(12:12 시간, 밤낮 주기) 임의적으로 물과 음식에 접근하도록 하였다.

수술 시에는 같은 부피의 ketamine (100 mg/ml)와 xylazine (20 mg/ml) 혼합물(0.5 ml/kg, i.m)로 마취하였으며, Imamura 등의 기존 술식에 기초하여 안와신경의 손상 술식을 시행하였다<sup>(64)</sup>. 절개는 제 1 대구치의 협측 치은 선을 따라 1 cm 길이로 시행되었다. 주위 조직에서 약 0.5 cm 정도의 안와신경(10N, infraorbital nerve)을 분리하였고, 안와신경을 느슨하게 두 매듭(5-0 chronic gut)으로 묶었으며, 절개선은 4-0 silk를 사용하여 봉합하였다<sup>(57,58)</sup>. sham 수술은 안와신경 매듭 없이 시행되었다.

### 2. 행동기능검사(Behavior test)

기계적 이질통의 발현을 관찰하기 위해 von Frey filament를 이용한 자극과 air-puff를 이용한 자극으로 동물실험을 실시하였다. von Frey filament를 이용한 실험은 다음과 같이 진행하였다. 흰쥐를 투명한 원통

실험 장치에 넣고 von Frey hair로 ION 영역인 코털 패드(vibrissa pad)의 중앙부를 자극하고 반응을 기록하였다. von Frey hair의 만곡과 함께 신속한 회피반응이 있을 시에 유효한 통증반응으로 기록하였다.

기계적 이질통은 Ahn 등의 방법에 따라 자유롭게 움직이는 흰 쥐에게 air-puff(4 sec, 10 sec intervals)를 10회 연속으로 적용하여 피하는 행동을 관찰하였다<sup>(65)</sup>. Air-puff 압력의 강도와 간격은 pneumatic pump module (Harvard Apparatus)로 조절하였으며, air-puff는 26-gauge 금속관(length, 10 cm)을 통해 피부에서 1 cm 떨어져 90° 각도로 적용하였다. 역치는 각 실험동물에서 시도 중 50%로 머리를 피하는 air-puff 압력으로 정하였다. Air-puff의 최대 적용 압력은 40 psi이었으며, sham 동물은 40 psi 미만 압력에는 반응하지 않았다.

### 3. Western blot 분석

술 후 7, 28일째 되는 날에 실험동물을 희생시키고 흰쥐의 삼차신경절을 채취하였다. 삼차신경절을 10mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 300mM sucrose, PIC(Sigma-Aldrich), pH 7.5의 균질화 용액과 조직 분쇄기를 사용하여 균질화하고 1000g, 4°C에서 10분간 원심분리하고 30%의 상층액을 얻어 총단백질을 획득하였다. 그 후 20000g, 4°C에서 20분간 원심분리하고 그 상층액을 제거하고 침전물은 균질화 용액에 희석하여 세포막 단백질을 선택 추출하였다. 세포막 단백질을 BCA법으로 정량하고 SDS-PAGE 법을 통하여 전기영동한 후 PVDF막에 transfer 하였다. PVDF막을 rabbit anti-HCN1(alomone, 1:200), rabbit anti-HCN2(alomone, 1:200), mouse anti  $\beta$ -actin (sigma, 1:10000)에 16시간 반응시킨 후 검출을 위해 horse radish peroxidase가 결합된 goat

anti-rabbit(Santa Cruz, 1:1000), goat anti-mouse(고마바이오, 1:1000)를 사용하였다. 그 후 x-ray film에 화학발광제재(Intron)를 사용하여 가시화하였으며 Las-1000(multi Gauge V3.0)을 이용하여 결과를 분석하였다.

#### 4. 통계 분석

행동 자료의 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Inc)로 시행되었다. 실험 결과의 다집단 비교를 위해 repeated measures analysis of variance(ANOVA) 계산 후 Bonferroni 사후 검증을 하였다. Western blot 실험 분석을 위해 Origin 6.0(Microsal Software Inc.)을 사용하여 unpaired or paired Student's test를 하였다. P-value가 0.05 미만이면 차이를 중요하게 생각하였다. 모든 데이터는  $\pm$  S.E.M 평균으로 표시하였으며 실험된 세포의 수는 괄호 안에 표기하였다.

### III. 연구 결과

#### 1. ION-CCI 모델에서의 HCN 채널에 대한 Western blot 분석

행동기능검사를 위해 흰쥐의 안와신경 결찰 모델을 제작하였고 sham 대조군과 동시에 von-Frey hair 로 자극하여 4시간 후부터 반응을 관찰하였다. 신경 손상 모델 동물이 대조군에 비해 매우 작은 역치를 술 후 14일까지 보였으며, 점차 차이가 줄어드는 것을 확인하였고 신경 손상 흰쥐에서 통각 과민 증상을 관찰할 수 있었다(Figure 1). 행동기능검사 후 쥐를 희생시키고, 삼차신경절 신경세포를 채득하여 HCN 이온통로 확인을 위해 western blot 검사를 하였다. 수술 7일과 28일 후를 비교하였는데, 대조군에 비해 신경 손상 모델에서 HCN 이온통로의 양적 증가가 확인되었고 시간이 지나면서 차이가 줄어드는 것을 관찰하였다. 또한, HCN2 이온통로가 HCN1 이온통로보다 손상 후 더 많이 발현되는 것도 확인하였다(Figure 2).

#### 2. ION-CCI 모델에서의 행동기능검사

신경 손상을 가하지 않은 흰쥐에서 cAMP을 vibrissa pad 에 각각 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g 을 주사로 주입한 후 air-puff를 사용하여 행동기능검사를 하였을 때 cAMP에 의해 통각 자극의 역치가 큰 폭으로 감소되는 것을 확인하였다(Figure 3a). HCN 이온통로의 억제제인 ZD-7288을 같은 모델에 적용하였을 때는 이 약물에 의해 통각 자극의 역치가 다시 증가하는

것을 확인하였다(Figure 3b).

신경 손상 시 발생하는 염증 상황의 모델에서도 air-puff 를 사용하여 행동기능검사를 시행하였다. 우리가 흔히 아는 부종을 유발하는 물질인 PGE2을 각각 10 ng, 100 ng을 주사한 후 통각에 대한 역치를 비교하였을 때 100 ng의 프로스타글란딘이 더 많은 통증을 발생시키는 것을 확인하였다(Figure 4a). 프로스타글란딘 100 ng와 함께 HCN 이온통로의 억제제인 ZD-7288을 각각 5 mg, 10 mg 주사하여 행동기능검사를 하였다. ZD-7288은 프로스타글란딘에 의한 통증 증가를 억제하는 효과를 보여주었고, 이것은 염증 반응의 경우에도 통각 과민 증상 유발에 HCN 이온통로가 중요한 역할을 함을 보여주는 것이다(Figure 4b). PGE2의 EP4 수용체에 대한 선택적 길항제인 AH23848를 각각 50 µg, 100 µg을 적용하여 ION-CCI model에서 행동기능검사를 하였을 경우 100 µg 적용하였을 때 통증의 역치가 더 많이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 5).

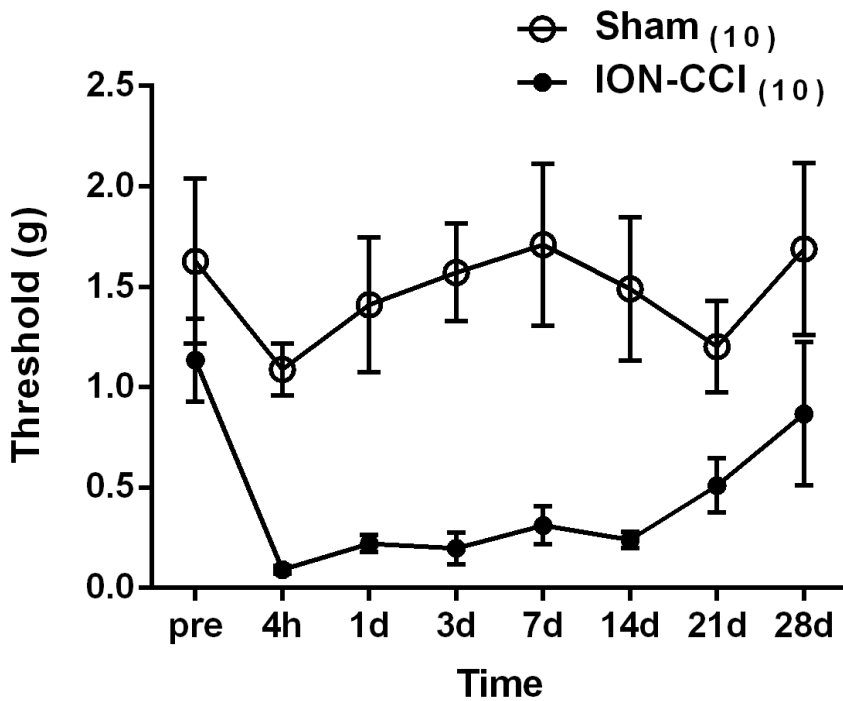


Figure 1. Chronic constriction injury to the rat infraorbital nerve(ION-CCI) caused orofacial hypersensitivity to mechanical stimuli

Sensitivity to von Frey filament stimulation in both sides of the vibrissa pad area was tested in rats with unilateral sham or CCI-ION operations before and at designated times after the injury. Data presented are the Means $\pm$ SEM from eight (sham and CCI-ION) in each group.

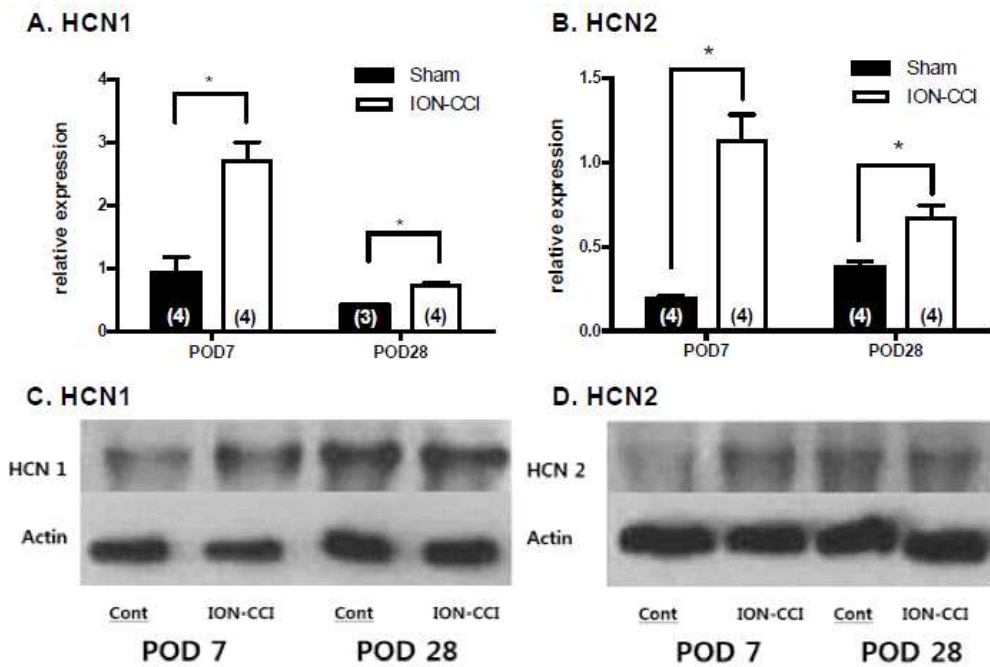
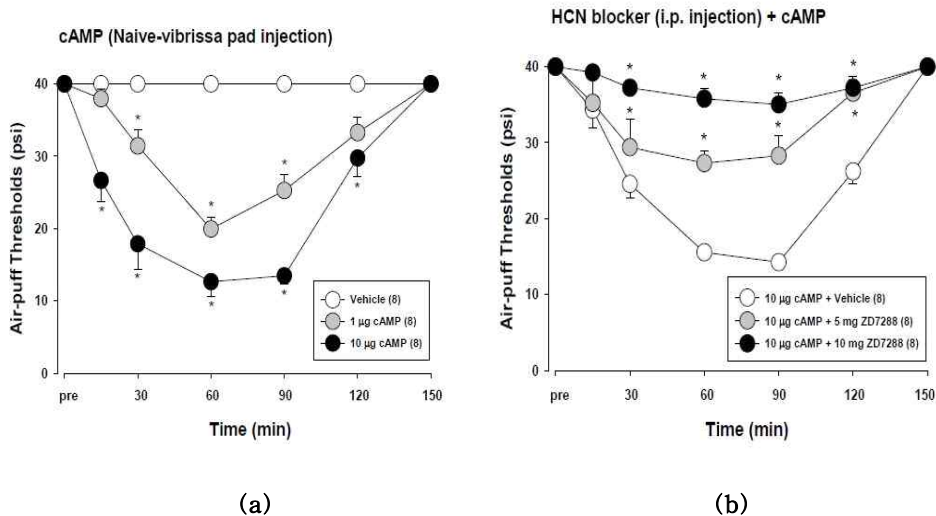


Figure 2. Western blot analysis for examining HCN 1,2 protein levels in trigeminal ganglion samples collected from ION-CCI rats.

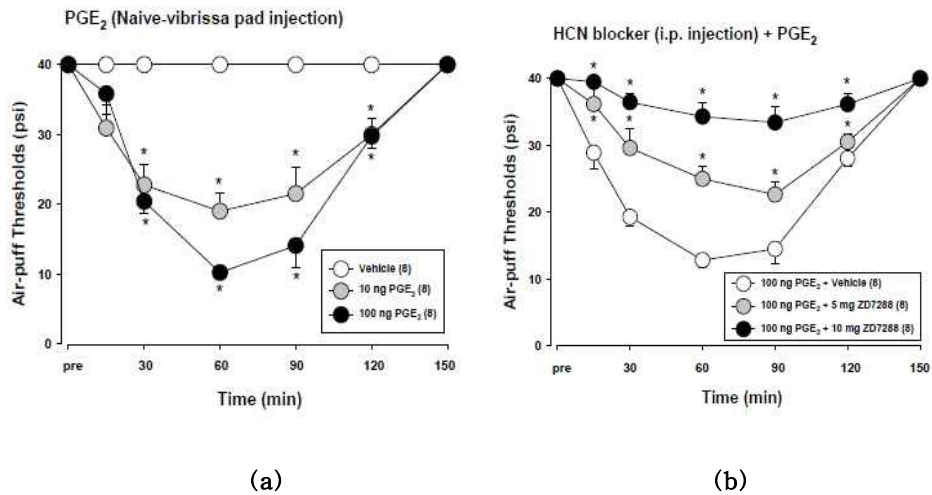
Representative Western blot bands were shown on top of each bar graph summarizing respective Western blot data. For sample loading normalization, band density ratio of HCN 1,2 to actin were taken within each sample before cross-sample comparisons between the injury side and non-injury side. Data are presented as the means±SEM from experiments in each group. Significance levels were displayed as : \* P<0.05 compared with non-injury side.



**Figure 3. Time course of the mechanical(air-puff) pain thresholds in naive model.**

(a) Effects of target injection of cAMP on naive model. Target injection of 1(n=8), 10(n=8)  $\mu$ g of cAMP downregulate the facial mechanical pain threshold in naive model.  $p < 0.05$  compared with those in the vehicle group. (b) Target injection of the 5 mg, 10 mg ZD7288(HCN antagonist) after injection of 10  $\mu$ g cAMP reduced the allodynia effect.  $p < 0.05$  compared with those in the vehicle group.





**Figure 4. Time course of the mechanical(air-puff) pain thresholds in naive model.**

(a) Effects of target injection of PGE<sub>2</sub> on naive model. Target injection of 10(n=8), 100(n=8) ng of PGE<sub>2</sub> downregulate the facial mechanical pain threshold in naive model.  $p < 0.05$  compared with those in the vehicle group. (b) Target injection of the 5 mg, 10 mg ZD7288(HCN antagonist) after injection of 100 ng PGE<sub>2</sub> reduced the allodynia effect.  $p < 0.05$  compared with those in the vehicle group.

### EP4 antagonist (ION 4days-vibrissa pad injection)

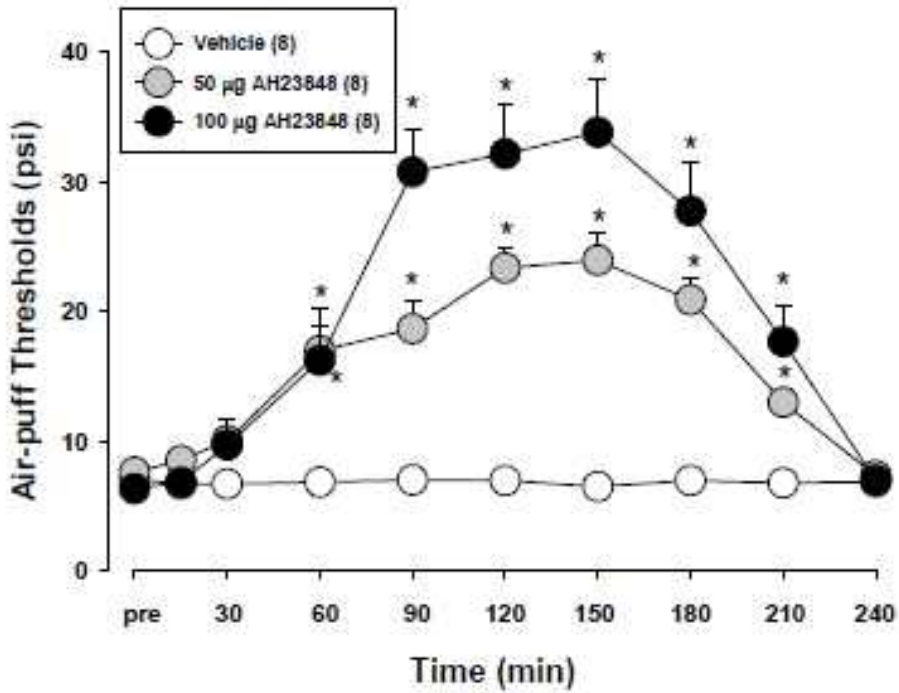


Figure 5. Time course of the mechanical(air-puff) pain thresholds in ION-CCI model.

Effects of target injection of AH23848 on ION-CCI model. Target injection of 50(n=8), 100(n=8) µg of AH23848(EP4 antagonist) upregulate the facial mechanical pain threshold in ION-CCI model.  $p < 0.05$  compared with those in the vehicle group.

## IV. 고찰

본 실험에서는 행동기능검사를 통해 신경 손상 후 발생하는 신경병증성 통증의 특징인 기계적 이질통 및 통각 과민 등이 발생하는 것을 관찰하였고, HCN 이온통로의 기능에 대해 확인하였으며, western blot 분석으로 HCN의 존재와 발현 정도를 비교하였다.

감각 신경세포에서  $I_h$ 는 4개의 HCN 이온통로 family가 있으며, 활동역학적으로 HCN1>HCN2>HCN3>HCN4의 순서로 빠르게 반응하며, cAMP에 대한 민감성은 HCN2,4가 더 예민하다. 대부분의 전기생리학 및 분자생물학적 증거에 의하면 cAMP에 덜 예민하게 반응하는 HCN1 이온통로가 신경 손상 후 비정상적인 자발적 흥분발사를 발생시키는 큰 직경의 기계감각 섬유에서의  $I_h$  발생에 중요한 역할을 할 것이라고 알려져 있다[39]. Kouranova 등은 큰 직경의 DRG 신경세포에서 HCN1뿐만 아니라 HCN2, HCN3는 많이 발현되지만 HCN4는 모든 DRG 신경세포에서 거의 발현되지 않는다고 했다<sup>(61)</sup>. TG 신경세포에서도 비슷한 양상으로 발현되고 9% 정도에서만 HCN4가 발현되었다. 본 실험의 Western blot 분석도 신경 손상 후 통각 과민에 역할을 하는 HCN 이온통로 중 HCN2 발현양이 많음을 확인할 수 있었다.

HCN 이온통로는 pore-loop 양이온통로의 상위분류에 속하면서 고리형 뉴클레오티드에 의해 조절되는 양이온통로로서 중앙에 위치한 세공 주위에 배열된 4개의 단량체로 구성된 복합체이다. 한 개의 단량체는 3개의 중요한 구조물로 구성되어있는 바, 세포막에 위치한 transmembrane core와 세포질 내에 위치한 NH<sub>2</sub>-terminal 및 COOH-terminal domain이다. 이온의 출입이 가능한 통로는 transmembrane core 내에 있고, 세

포질 내의 COOH-terminal domain 은 CNBD(cyclic nucleotide-binding domain)와 C-linker로 이루어져 있으며, 이러한 COOH-terminal domain 의 세포막과 인접한 부위에서 고리형 뉴클레오티드에 의한 조절이 이루어진다[45,46]. cAMP와 그 신호체계는 통증 정보 처리 과정에서 특별한 역할을 하고 있음이 보고되고 있다. 특히 염증 상황의 경우, 프로스타글란딘과 다른 염증성 매개체에 의해 증가된 cAMP 양은 일차 감각 신경 말단을 감작시키고 신경 흥분성을 증가시킨다<sup>(59)</sup>. 신경병증성 통증에서 cAMP의 연관성은 아직 명확하지 않지만 cAMP와 ZD7288 투여 시 행동기능검사 결과에 의하면 신경 손상에 의하지 않은 통각 과민성의 경우에도 HCN 이온통로의 역할이 중요하고 cAMP에 의해 HCN 이온통로가 활성화됨을 확인할 수 있었다.

염증 조직 내에 다량 존재하는 통증 매개체인 PGE2는 유해성 수용기의 지속 감작을 통해 만성 통증의 발생을 유도하는 것으로 알려져 있다. PGE2의 수용체는 EP1, EP2, EP3, EP4의 아형이 있으며, 이 중 세포 내 cAMP를 증가시키는 EP4 수용체는 일차 감각신경세포에 발현되어 있다<sup>(54,55,60)</sup>. 표적세포의 수용체와 결합되면 프로스타글란딘의 합성과정 시작되며, 그 결과로 환상 AMP(cyclic AMP/cAMP)가 생성되어 cAMP의 세포 내 농도를 증가시킨다. 즉 세포 내 펩티드호르몬의 일반적인 작용은 세포막의 수용체와 2차 전달자인 cAMP를 매개로 하여 일어나는데 수용체와 cAMP 생성을 연결시켜주는 중간물질이 프로스타글란딘이다<sup>(59,62,63)</sup>. St-Jacques 등은 PGE2 적용하에 지속적인 감각 이질통을 확인하였고 EP4 receptor antagonist에 의해 염증에 의해 발생된 지속되는 통증이 억제되는 것을 밝혔다[56].

본 실험에서는 동물 행동실험을 통해 삼차신경계의 만성 통증 모델에서 PGE2-EP4 pathway와 HCN 이온통로 활성화의 관계를 확인하였다. PGE2

를 안와신경 지배 부위인 vibrissa pad에 주입하였을 때 통각 과민이 발생하였다. HCN 길항제인 ZD7288 처리가 동반된 경우 PGE2 주입에 의한 통각 과민이 억제되었다. 이 결과로 PGE2에 의한 통각 과민에 HCN 이온통로의 활성이 관여함을 확인하였다. 삼차신경의 신경병증성 통각 과민을 안와하신경의 chronic constriction injury로 재현하고 EP4 수용체의 길항제인 AH23848을 주입하여 EP4-cAMP pathway를 차단하고 통각 과민 현상을 관찰하였다. 이 경우, 동일 통증 모델에서 HCN 이온통로의 활성을 ZD7288로 차단한 경우와 같이 통각 과민이 억제되었다. 따라서 PGE2-EP4 pathway가 HCN 이온통로의 활성을 조절함으로써 신경병증성 통각 과민 현상에 기여함을 삼차신경계에서 확인하였다.

신경병증성 통증은 직접적인 상해나 질병에 의한 통증 다음으로 많이 볼 수 있는 만성 통증이다. 하지만, 신경병증성 통증 치료는 간단하지 않다. 다른 통증 환자에 비해 더 예민하게 반응하는 것이 보통이고, 진통제와 항우울제(tricyclic anti depressant, TCA) 복용으로 좋은 효과를 보고 있으나 아직 부작용도 많고 완전한 치료는 이루어지지 않고 있다. 신경병증성 통증에서 HCN 이온통로의 역할이 중요함이 확인되는 바, 치료 방법의 개발을 위해서 이 이온통로의 조절에 관한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

- ABSTRACT -

The Role of  
Hyperpolarization-activated cyclic  
nucleotide-gated channels in  
trigeminal neuropathic pain

Sang-hoon Baek, D.D.S., M.S.D.

Major in Neurobiology,  
Department of Dentistry, Graduate School,  
Seoul National University

(Directed by Professor Seog Bae Oh, D.D.S., M.S.,Ph.D.)

Neuropathic pain caused by the malfunctional nervous system is characterized by spontaneous pain, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Neuropathic pain in the orofacial area arises from the trigeminal nervous system that governs the orofacial region, with continuous pain occurring without any remaining evidence of

tissue damage.

It is well known that various pathologic changes in the peripheral and central nervous system are involved in neuropathic pain. Among the several causes of the neuropathic pain, the importance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) channel has been suggested by previous research.

In this study, I have sought to find the role of HCN channels in trigeminal neuropathic pain, and to find the relationship between HCN channels and PGE2-EP4 inflammation pathway.

I used chronic constriction of infraorbital nerve to mimic orofacial neuropathic pain in rats. Western blot analysis revealed the increased expression of HCN1 and HCN2 in trigeminal ganglion after chronic constriction injury. Behavioral tests showed mechanical allodynia when HCN channel activity was upregulated by cAMP. In the presence of HCN blocker ZD7288, the emergence mechanical allodynia by cAMP was antagonized. Injection of prostaglandin E2 lowered the pain threshold, which was blocked in the presence of HCN blocker ZD7288. The antagonistic effect of ZD7288 on PGE2-mediated allodynia was not effective in the presence of AH23848(EP4 antagonist).

Therefore, HCN channels are key mediators in trigeminal neuropathic pain, and are also involved in the prostaglandin-mediated inflammatory pain via PGE2-EP4 signaling.

---

Keywords : hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel(HCN), neuropathic pain, trigeminal system, mechanical allodynia, prostaglandin

## 참고 문헌

1. Carole Hollins. Basic Guide to Anatomy and Physiology for Dental Care Professionals. Wiley 2012.
2. 안중모. 구강안면 신경병성 통증의 진단 및 분류. 대한치과의사협회지 2011;49(6): 316-320.
3. 안동국, 박민경. 악안면 신경병증 통증 실험모델. Hanyang Medical Reviews 2011;31(2):107-114.
4. Braennstroem M, Astroem A. A study on the mechanism of pain elicited from the dentin. J Dent Res 1964;43:619-25.
5. Trowbridge HO. Review of dental pain-histology and physiology. J Endodont 1986;12(10):445-52.
6. Chung G, Jung SJ, Oh SB. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. J Dent Res 2013;92(11):948-55.
7. Magloire H. Odontoblast and dentin thermal sensitivity. Pain 2011;152(10):2191-2.
8. Park CK, Kim MS, Famg Z, Li HY, Jung SJ, Choi SY, et al. Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons : implication for tooth pain. J Biol Chem 2006;281(25):17304-11.
9. Van Hassel HJ. Physiology of the human dental pulp. Oral Surg Oral Med Oral Patho 1971;32(1):126-34.
10. Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. Crit Rev Oral Bio Med 1999;10(3):328-36.
11. Sessle BJ. The neurobiology of facial and dental pain:present



- knowledge, future directions. *J Dent Res* 1987;66(5):962-81.
12. Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem* 2006;281(39):29002-10.
  13. Magloire H, Lesage F, Couble ML, Lazdunski M, Bleicher F. Expression and localization of TREK-1 K<sup>+</sup> channels in human odontoblasts. *J Dent Res* 2003;82(7):542-5.
  14. Okumura R, Shima K, Muramatsu T, Nakagawa K, Shimono M, Suzuki T, et al. The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1(VR-1) channels. *Arch Histol Cytol* 2005;68(4):251-7.
  15. Shibukawa Y, Suzuki T. Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by IP3-dependent Ca<sup>2+</sup> releasing and store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in rat odontoblasts. *J Bone Miner Res* 2003;18(1):30-8.
  16. Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F. Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol Int* 2004;28(2):93-9.
  17. Chung G, Jung SJ, Oh SB. In : Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A, editors. The transient receptor potential(TRP) family in pain and temperature sensation. 1<sup>st</sup> ed. Seattle: IASP Press; 2010. p.327-46.
  18. Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 2005;7(2):179-85.
  19. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL. A

common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(44):16586-91.

20. Numata T, Shimizu T, Okada Y. Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. *Cell Physiol Biochem* 2007;19(1-4):1-8.

21. Oancea E, Wolfe JT, Clapham DE. Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circ Res* 2006;98(2):245-53.

22. Low SE, Amburgey K, Horstick E, Linsely J, Sprague SM, Cui WW, et al. TRPM7 is required within zebrafish within zebrafish sensory neurons for the activation of touch-evoked escape behaviors. *J Neurosci* 2011;31(32):11633-44.

23. Bessac BF, Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol* 2007;582(Pt3):1073-86.

24. Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parda CA, Chen X, Reichling DB, et al. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 2003;39(3):497-511.

25. Grimm D, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. Molecular and functional characterization of the melastin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 2003;278(24):21493-501.

26. Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen X, Levine JD. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. *J Neurosci* 2009;29(19):6217-28.

27. Son AR, Yang YM, Hong JH, Lee SI, Shibukawa Y, Shin DM.

- Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *J Dent Res* 2009;88(11):1014-9.
28. Lundgren T, Linde A. Voltage-gated calcium channels and nonvoltage-gated calcium uptake pathways in the rat incisor odontoblast plasma membrane. *Calcif Tissue Int* 1997;60(1):79-85.
29. Davidson RM, Guo L, Calcium channel current in rat dental pulp cells. *J Membr Biol* 2000;178(1):21-30.
30. Adachi K, Shimizu K, Hu JW, Suzuki I, Sakagami H, Koshikawa N, et al. Purinergic receptors are involved in tooth-pulp evoked nocifensive behavior and brainstem neuronal activity. *Mol Pain* 2010;6:59.
31. Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, et al. Regulation of vertebrate cellular  $Mg^{2+}$  homeostasis by TRPM7. *Cell* 2003;114(2):191-200.
32. Wiesmann HP, Tkotz T, Joos U, Zierold K, Stratmann U, Szuwart T, et al. Magnesium in newly formed dentin mineral of rat incisor. *J Bone Miner Res* 1997;12(3):380-3.
33. Thivichon-Prince B, Couble ML, Giamarchi A, Delmas P, Franco B, Romio L, et al. Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis. *J Dent Res* 2009;88(10):910-5.
34. Yu V, Damek-Poprawa M, Nicoll SB, Akintoye SO. Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386(4):661-5.
35. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*

2001;291(5506):1043-7.

36. Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell* 2001;7(5):1047-57.

37. Ryazanova LV, Dorovkov MV, Ansari A, Ryazanov AG. Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/Chak1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* 2004;279(5):3708-16.

38. Ushiyama J. Gap junctions between odontoblasts revealed by tranjunctional flux of fluorescent tracers. *Cell Tissue Res* 1989;258(3):611-6.

39. Jiang YQ, Sun Q, Tu HY, Wan Y. Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. *Neurochem Res* 2008;33:1979-1989.

40. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52:77-92.

41. Spierings EL, Dhadwal S. Orofacial pain after invasive dental procedures: neuropathic pain in perspective. *Neurologist* 2015;19(2):56-60.

42. Wright E, Evans J. Oral pre-trigeminal neuralgia pain: clinical differential diagnosis and descriptive study results. *Cranio* 2014;32(3):193-198.

43. Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas G,McNaughton PA. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated

ion channels. *Pain* 2014;155(9):1708–1719.

44. Tibbs GR, Rowley TJ, Sanford RL, Herold KF, Proekt A, Hemmings HC Jr, Anderson OS, Goldstein PA, Flood PD. HCN1 channels as targets for anesthetic and nonanesthetic propofol analogs in the amelioration of mechanical and thermal hyperalgesia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pharmacol* 2013;345(3):363–373.

45. C. Wahl-Schott and M. Biel. HCN channels : Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Science* 2009;66:470–494.

46. Martin Biel, Christian Wahl Schott, Stylianos Michalakis, Xiangang Zong. Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiol Rev* 2009;89:847–885.

47. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998;393(6685):587–591.

48. McCormick DA, Pape HC. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J Physiol* 1990;431:291–318.

49. Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 1998;393:583–587.

50. Momin A, Cadiou H, Mason A, McNaughton PA. Role of the hyperpolarization-activated current(I<sub>h</sub>) in somatosensory neurons. *J Physiol* 2008;586:5911–5929.

51. Kaupp UB & Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion

- channels. *Annu Rev Physiol* 2001;63:235-257.
52. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991;351:145-147.
53. K-Y Yeon, Gehoon Chung, et al. Eugenol reverse mechanical allodynia after peripheral nerve by inhibiting hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) channels. *Pain* 2011;152:2108-2116.
54. M. D. Southall, M. R. Vasko. Prostaglandin Receptor Subtypes, EP3C and EP4, Mediate the Prostaglandin E2-induced cAMP Production and Sensitization of Sensory Neurons. *JBC* 2001;276(19):16083-16091.
55. M. Machwate, S. Harada, C. T. Leu, G. Seedor, M. Labelle, M. Gallant, S. Hutchins, N. Lachance N. Sawyer, D. Slipetz, K. M. Metters, S. B. Rodan, R. Young, and G. A. Rodan. Prostaglandin Receptor EP4 Mediates the Bone Anabolic Effects of PGE2. *Mol Pharmacol* 2001;60:36-41.
56. St-Jacques B, Ma W. Peripheral E2 prolongs the sensitization of nociceptive neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. *Exp Neurol* 2014 Nov;261:354-366.
57. J. Bennett, Jin Mo Chung, Marie Honore, Ze'ev Seltzer. Models of Neuropathic Pain in the Rat. *Current Protocols in Neuroscience* 2003;9.14:1-16.
58. Melanie Kernisant, Robert Gear, Luc Jasmin, Jean-Philippe Vit, Peter T. Ohara. Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve

- in the Rat using modified syringe needle. *J Neurosci Methods* 2008;172(1):43-47.
59. Shishikura K, Horiuchi T, Sakata N, Trinh DA, Shirakawa R, Kimura T, Asada Y, Horiuchi H. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibit neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *Br J Pharmacol* 2015.
60. Xinrong Ma, Namita Kundu, Salah Rifat, Tonya Walser, Amy M. Fulto. Prostaglandin E Receptor EP4 Antagonism Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* 2006;66(6):2923-2927.
61. Kouranova EV, Strassle BW, Ring RH, Bowlby MR, Vasilyev DV. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience* 2008;153(4):1008-1019.
62. Emery EC, Young GT, McNaughton PA. HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(8):456-463.
63. Kwabata A. Prostaglandin E<sub>2</sub> and pain—an update. *Biol Pharm Bull* 2011;34(8):1170-1173.
64. Imamura Y, Kawamoto H, Nakanishi O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*. 1997;116(1):97-103.
65. Lim EJ, Jeon HJ, Yang GY, Lee MK, Ju JS, Han SR, Ahn DK. Intracisternal administration of mitogen-activated protein kinase inhibitors reduced mechanical allodynia following chronic constriction injury of infraorbital nerve in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(6):1322-9.

- ABSTRACT -

The Role of Ion Channels  
in Oromaxillofacial Pain

Sang-hoon Baek, D.D.S., M.S.D.

Major in Neurobiology,  
Department of Dentistry, Graduate School,  
Seoul National University  
(Directed by Professor Seog Bae Oh,  
D.D.S., M.S., Ph.D.)

It is not easy to make a diagnosis and treat the oromaxillofacial pain because the related clinical symptoms are various and complex. It is known that painful stimuli is transduced into neuronal signals by the respective receptors for each stimuli which exist in nociceptive neurons. Therefore it is important to know which ion channels are expressed and how they function in the nociceptive neurons to



understand the mechanism of painful symptoms. In this study, we validated the molecular existence of ion channels which may be related to dental hypersensitivity or trigeminal neuropathic pain, and investigated the functions expression of these ion channels.

Hydrostatic force applied tooth pulp has long been suspected to be the direct cause of dental pain. In order to determine whether odontoblasts could play a crucial role in transducing hydrostatic force applied to dental pulp into electrical impulses, current study investigated the expression of stretch-activated transient receptor (TRP) channels in acutely isolated odontoblasts from adult rats by single cell reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunocytochemical analysis. As the results, expression of TRPM7(melastatin 7) was observed in the majority(87%) of odontoblasts while mRNAs for TRPC1(canonical 6) and TRPV4(vanilloid 4) were detected in small subpopulations of odontoblasts. TRPM3(melastatin 3) was not detected in our experimental set-up. Immunocytochemical analysis further revealed TRPM7 expression at protein level.

Next, neuropathic pain in the orofacial area arises from the damaged trigeminal nervous system that governs the orofacial region, with continuous pain occurring without any evidence of tissue damage. It is well known that various pathologic changes in the peripheral and central nervous system are involved in neuropathic pain. Among the several causes of the neuropathic pain, the importance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) channel has

been suggested by previous research. To investigate if HCN channels are also involved in neuropathic pain of trigeminal area, we did behavioral tests on rats after inducing neuropathic pain in the trigeminal area with chronic constriction of the infraorbital nerve. Western blot analysis revealed the increased expression of HCN1 and HCN2 in trigeminal ganglion after chronic constriction injury. We validated that HCN channels are involved in trigeminal neuropathic pain, and further identified that HCN channels are involved in prostaglandin-mediated inflammatory pain via PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> signaling.

---

Key words : transient receptor potential ion channel, odontoblasts, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated(HCN) channels, neuropathic pain, trigeminal nerve