

삼차신경입쪽핵에서 치수유래 들신경종말의 면역조직화학적 분석

손재연^{1,†}, 한혜민^{1,†}, 김태현², 배용철^{1,*}

¹경북대학교 치과대학 구강해부학교실, ²대구과학대학교 치위생과

접수: 2018년 11월 2일/ 수정접수: 2018년 11월 30일/ 게재 승인: 2018년 11월 30일/ 출간: 2018년 12월 31일

삼차신경입쪽핵(trigeminal nucleus oralis)은 치수유래 들신경섬유로부터 통각정보를 전달받아 하악반사에 관여하는 것으로 알려져 있다. 하지만 치수에서 유래하는 통각정보가 삼차신경입쪽핵에서 전달되고 처리되는데 관여하는 신경전달물질에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이를 밝히기 위해 본 연구에서는 신경추적자(WGA-HRP)를 이용하여 삼차신경입쪽핵으로 투사하는 치수유래 들신경섬유의 종말을 표식한 후 전자현미경적 면역조직화학기법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

삼차신경입쪽핵에서 치수유래 표식종말은 직경 45-55 nm의 둥근 모양의 소포를 함유하고 있었으며 일부에서 직경 90-120 nm의 큰 치밀소포(dense cored vesicles)가 관찰되었다. 표식종말은 대부분이 중간부분(middle dendrite) 혹은 먼쪽(distal dendrite) 가지돌기와 비대칭 연결을 이루었으며 세포체(soma)나 몸쪽 가지돌기(proximal dendrite)와 연결하는 경우는 관찰되지 않았다. 표식종말은 여러 형태의 소포를 함유하는 종말(p-ending)과 대칭연접을 이루었는데 이들 종말내의 연결부위에서 소포들이 밀집되어 있는 것으로 보아 이들로부터 연결신호를 전달받는 것으로 나타났다. 금입자면역조직화학기법에 의한 면역반응 결과 일차들신경종말 및 이와 연결하는 p-ending은 각각 글루탐산염 및 GABA에 양성반응을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어보아 삼차신경입쪽핵에 투사하는 치수유래 신경섬유의 말단은 글루탐산염을 신경전달물질로 사용하며 이는 GABA를 신경전달물질로 사용하는 p-ending에 의하여 조절을 받는 것으로 생각된다.

주제어: pulpal afferent, 시냅스 연결성, 시냅스이전억제, GABA

† These authors contributed equally to this work.

* 교신저자: 배용철

대구광역시 중구 달구벌대로 2177, 경북대학교 치과대학 구강해부학교실
Tel : 053-660-6860, Fax : 053-426-7731, E-mail: ycbae@knu.ac.kr

서론

삼차신경계는 턱관절의 운동 및 얼굴과 입안의 감각을 담당하며 삼차신경운동핵(trigeminal motor nucleus), 중뇌핵(mesencephalic nucleus), 주감각핵(principal sensory nucleus) 및 척수핵(spinal nucleus) 등으로 구성되어 있다. 이중 척수핵은 다시 삼차신경입쪽핵(trigeminal nucleus oralis: Vo), 삼차신경중간핵(trigeminal nucleus interpolaris), 삼차신경꼬리핵(trigeminal nucleus caudalis) 등 세 부분으로 나뉜다. 삼차신경입쪽핵은 세포구축학적으로 다시 세 부분으로 나뉘는데, 입쪽등쪽안쪽영역(Vo.r, rostradorsomedial region), 등쪽안쪽영역(Vo.dm, dorsomedial region) 및 꼬리영역(Vo.c, caudal region)등이다. 삼차신경입쪽핵은 입안의 유효자극을 전달받아 주로 삼차신경운동핵으로 투사함으로써 아래턱운동이나 아래턱반사의 조절에 관여하는 것으로 생각되고 있다¹⁻⁷⁾.

이상의 여러 아핵 가운데 감각을 담당하는 아핵들은 대부분 치수로부터 신경섬유의 투사를 받는다. Shigenaga 등¹⁾은 고양이에서 치수에 HRP주입에 의한 투사실험을 통하여 치수감각은 삼차신경주감각핵의 등쪽아핵(Vpd, subnucleus dorsalis of pars principalis), 삼차신경입쪽핵의 Vo.r과 Vo.dm, 삼차신경중간핵의 안쪽부분, 삼차신경꼬리핵의 I, II, V층 등으로 투사한다고 보고하였다.

일차들신경종말이 사용하는 신경전달물질에 대해서 많은 연구가 진행되어 왔는데, 척수의 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion)⁸⁻¹⁰⁾에서 유래하는 여러 일차들신경섬유는 빠른 흥분성 신경전달물질로서 글루탐산염(glutamate)을 함유하고 있다는 것이 면역조직화학적 기법에 의해 밝혀졌다. 또한 Bae 등¹¹⁾은 삼차신경절에 CTB-HRP를 주입하는 실험에서 삼차신경계의 각 아핵에서 관찰되는 신경종말의 대부분이 글루탐산염을 신경전달물질로 사용하며 또 이와 연결하는 연결이전 종말에서는 GABA

를 신경전달물질로 사용함을 밝힌 바 있다.

치수유래 들신경섬유의 연결양식에 관한 연구에서, Clements 등¹²⁾은 치수유래 일차들신경섬유종말은 삼차신경척수핵의 꼬리부분에서 글루탐산염을 신경전달물질로 사용함을 밝힌 바 있다. 하지만 아직까지 삼차신경입쪽핵으로 투사하는 치수유래 신경종말이나 이와 연결하는 연결이전 종말에 사용되는 신경전달물질이나 미세구조 및 연결양식에 관한 보고는 거의 없다.

지금까지 특정 물질의 존재여부의 형태학적인 판단에 이용되어온 포매전 면역조직화학기법(preembedding immunocytochemistry)은 반응산물이 퍼진 형태로 축삭종말 내에 침착되므로 함유된 신경전달물질의 정량이 불가능하다. 또한 면역양성반응이 나타나더라도 글루탐산염과 같은 아미노산은 대사성으로 존재하는 것인지 혹은 신경전달물질로서 존재하는 것인지 구분하는 것이 필요한데 이의 구분이 명확하지 않다. 그러나 포매후 금입자면역조직화학기법(postembedding immunocytochemistry)을 이용하면 종말내의 부위에 따른 금입자의 밀도를 측정할 수 있어서 대사성 물질 및 신경전달물질로서의 글루탐산염의 구분이 가능하며, 아울러 종말 내에서의 이들 물질의 정량이 가능하다.

본 연구에서는 WGA-HRP를 신경추적자로 사용하여 삼차신경입쪽핵으로 투사하는 치수유래 들신경종말을 동정하고 포매 후 금입자면역조직화학기법 이용하여 이들이 글루탐산염을 신경전달물질로 사용하는지, 또한 이와 연결하는 연결이전 신경종말이 GABA를 신경전달물질로 사용하는지를 밝히고 아울러 이의 미세구조 및 주위 구조물들과의 연관관계에 대해 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

체중 300-320 g의 Sprague Dawley계 흰쥐를 대상으로 다음과 같은 실험을 행하였다. 실험동물을 sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.)을 이용하여 마취한 후 아래턱 일부와 오른쪽 앞니의 법랑질 및 상아질을 치과용 드릴을 이용하여 제거한 다음 치수를 노출시켰다. 그 후 생리식염수에 용해한 1.5 μ l의 2% WGA-HRP (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 Hamilton syringe에 연결한 30 gauge의 주사바늘을 이용하여 30분 동안 치수내에 주입하였으며, 노출된 치수는 치과용 시멘트를 이용하여 막아 두었다. WGA-HRP 주입 후 36-48 시간 경과 후 실험동물을 깊게 마취한 후 100 ml의 생리식염수로 혈액을 씻어낸 다음 2.5% glutaraldehyde, 0.5% paraformaldehyde 및 0.1% picric acid를 함유한 고정액(0.1M phosphate buffer; 0.1M PB, pH 7.4)을 이용하여 관류고정하였다. WGA-HRP를 주입한 앞니를 포함하는 아래턱 및 뇌줄기를 분리하여 동일한 고정액에 2 시간 동안 후 고정한 다음 0.1 M PB에 보관하였다.

주입한 WGA-HRP가 치아뿌리끝구멍 주변부의 치아인대로 스며들지 않고 치수에만 한정되어 있는 것을 확인하기 위하여, 분리한 아래턱을 고정액으로 고정한 후 8% EDTA용액에 3주간 탈회한 후 냉동절편기로 20-30 μ m 두께의 절편을 형성하였다. 그 후 Mesulam¹³⁾의 tetramethylbenzidine 방법을 이용하여 WGA-HRP를 가시화한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

삼차신경 감각핵군에서 치수유래 표식종말을 분석하기 위하여 진동절편기(vibratome)를 이용하여 뇌줄기에서 60 μ m 두께의 횡단연속절편을 형성하였다. 그 후 tungstate/tetramethylbenzidine (TMB) protocol¹⁴⁾에 의해서 WGA-HRP를 가시화한 다음 diaminobenzidine (0.25 mg/ml in PB, pH 6.0)으로 안정화하였다. 광학현미경적 관찰을 통하

여 표식종말이 많이 함유된 조직을 선택한 다음 1% osmium tetroxide로 40분간 후고정하였다. 계열에 탄올로 탈수과정을 거친 다음 Durcupan에 포매하여 58 $^{\circ}$ C에서 48시간 경화하였다. 삼차신경입쪽핵에서 표식종말이 많이 함유된 부위를 면도날로 자른 다음 빈 레진 막대 위에 접착하였다.

Formvar 지지막을 형성한 니켈 그리드 위에 연속 초박절편을 형성한 후 글루탐산염에 대한 금입자 면역조직화학기법을 시행하여 관찰 및 분석하였다. 면역조직화학법 과정을 간단히 살펴보면 1% periodic acid용액으로 10분 동안 레진을 etching한 후 9% sodium-m-periodate용액으로 15분 동안 반응하여 osmium을 제거하였다. 그 후 2% human serum albumin (HSA) 용액(in TBST)으로 10분 동안 반응시킨 다음 1:7,000으로 희석한 rabbit anti-glutamate 항체(donated by the Dr. O.P. Ottersen, Oslo University, Norway)에 실온에서 2시간 반응하였으며 이때 교차반응을 제거하기 위해 억제제로서 300 μ M glutamine-G 및 300 μ M aspartate-G를 항체에 첨가하였다. 또한 일부 그리드는 1:800으로 희석한 항 GABA (Code, GABA 990) 항체에 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이 항혈청은 Storm-Mathisen 등¹⁵⁾의 방법에 의하여 만들어졌으며 항원의 처리에 glutaraldehyde만 사용하지 않고 glutaraldehyde와 formaldehyde를 혼합하여 사용하였다. 이들의 특징은 이미 자세히 소개된 바 있다^{8,16)}. 항 GABA 혈청은 1:800으로 TBST (containing 2% HSA)에 희석하여 사용하였다. 교차반응을 방지하기 위하여 희석된 항 GABA 혈청을 아미노산과 glutaraldehyde의 결합물¹⁷⁾ 즉, 글루탐산염-G(500 μ M)와 미리 밤새 반응시켰다. 그 후 polyethyleneglycol 용액에 1:20으로 희석한 goat anti-rabbit IgG coupled to colloidal gold particles(직경: 15 nm, BioCell Co., UK)에 2시간 반응한 후 uranyl acetate 포화용액 및 1%

lead citrate 용액으로 염색하여, 투과전자현미경 (Hitachi H-600, Hitach, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 17,000배에서 전자현미경 사진을 찍어 인화하여(최종배율: 25,500배), 금입자의 단위면적당 밀도를 측정하였다. 일차항체 대신 비면역혈청 (nonimmune serum)을 쓰거나 일차항체를 제외시킨 후 동일한 과정을 거쳐 면역양성 반응이 없음을 확인함으로써 항체의 특이성을 검증하였다.

결과

광학현미경적 관찰에서 치수유래 WGA-HRP 표식종말은 첫째 및 둘째 목뼈 부위의 뒤뿔 안쪽, 꼬리핵의 뒤뿔, 중간핵, 입쪽핵 및 주감각핵의 등쪽 안쪽(dorsomedial) 부위에서 주로 밀집되어 분포하였다. 본 연구에서 전자현미경적 분석은 삼차신경 입쪽핵에서의 표식종말을 대상으로 시행하였는데, WGA-HRP의 TMB 반응산물은 길쭉한 막대모양 혹은 결정(crystal) 형태로 나타나 저배율에서도 쉽게 표식된 축삭 및 종말을 구분할 수 있었다(Fig. 1). 표식종말은 직경 45-55 nm의 둥근 모양의 소포를 함유하고 있었으며 일부에서 직경 90-120 nm의 큰 치밀소포(dense cored vesicles)가 관찰되었다. 표식종말의 대부분은 중간부분 가지돌기 혹은 먼쪽 가지돌기와 연결을 이루었다. 이들 연결은 연결이후 치밀질이 잘 발달되었으며, 연결틈새가 넓고, 연결하는 부위가 넓은 비대칭연접 양식을 보였다. 세포체나 몸쪽 가지돌기와 연결하는 경우는 관찰되지 않았다. 표식종말은 타원형, 납작한 모양, 둥근 모양 등 여러 형태의 소포를 함유하는 종말과 대칭연접을 이루었는데 이들 종말내의 연결부위에서 소포들이 밀집되어 있는 것으로 보아 이들로부터 연결신호를 전달받는 것으로 나타났다(Fig. 1).

글루탐산염 및 GABA 각각에 대한 면역반응을 나타내는 금입자들은 각기 다른 구조물에서 밀도가

달랐다. GABA의 경우 금입자는 주로 p-ending에서 많이 관찰되었으며 일차들신경 종말에서는 낮은 밀도를 보였다(Fig. 1A, 1C, 1D). 글루탐산염의 경우 금입자는 WGA-HRP에 의해 표식된 축삭종말에서 밀도가 높았으며, 연결소포가 밀집되어 있는 부위 및 사립체의 내강에서 금입자 밀도가 높게 관찰되었다(Fig. 1B).

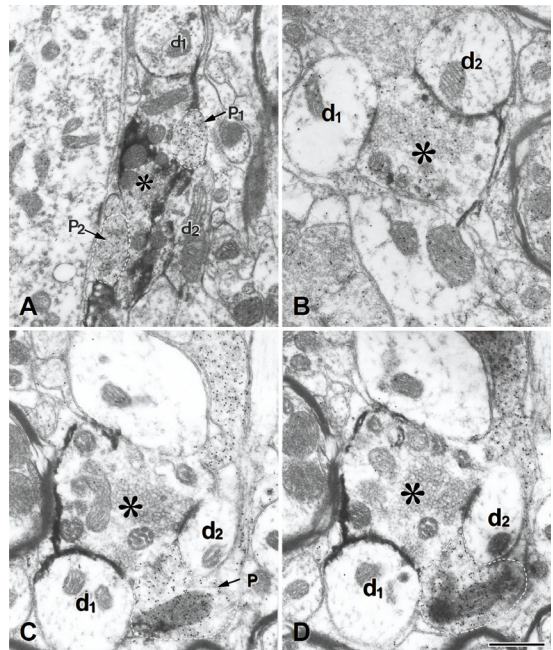


Figure 1. Electron micrographs of ultrathin sections incubated with GABA antiserum (A, C, D) and with glutamate antiserum (B) in the trigeminal nucleus oralis. The labeled bouton (*), which is identified by electron dense TMB-HRP reaction product, is presynaptic to dendritic shafts (d1, d2) and receive axoaxonic synapse from pleomorphic vesicles containing endings (outlined by white dotted line: p1, p2 in A, C, D). Gold particles for glutamate are distributed densely over tooth pulp afferent terminals (B). Gold particles for GABA are distributed densely over the p-endings (A, C, D). Scale bar in D = 500 nm, which is also applicable to A-C.

결론 및 고찰

본 연구를 통하여 삼차신경입쪽핵으로 투사하는 치수유래 일차들신경종말은 신경전달물질로 글루탐산염을 사용하며 이들의 흥분성은 GABA를 신경전달물질로 사용하는 연접이전 종말에 의해 조절됨을 알 수 있었다.

WGA-HRP에 의한 신경섬유의 선택적 표지

본 연구에서 신경추적자로서 사용한 HRP (horseradish peroxidase)는 1970년대 초^{18,19)} 신경 회로를 확인할 목적으로 사용된 이래 현재까지도 많이 사용되고 있다. 사용 목적에 따라 세포내 혹은 축삭 내 신경추적자를 주입할 경우는 free HRP가 많이 사용되지만 세포바깥 주입법에 의한 실험을 할 때는 WGA (wheat germ agglutinin) 혹은 콜레라독소(cholera toxin B)와 결합된 것을 사용함으로써 HRP의 확산방지, 용해소체에 의한 분해감소, 특정 신경말이집 수용기와의 선택적 결합 등에 의해 친화성을 높여서 사용하기도 한다. 일반적으로 WGA는 N-acetyl-D-glucose에, CTB는 GM1 ganglioside에 선택적으로 친화성을 가진다고 알려져 있으며²⁰⁻²²⁾ 이러한 차이 때문에 실제로 말초에서 WGA-HRP 및 CTB-HRP는 서로 다른 굵기의 신경섬유에 선택적으로 흡수된다고 알려져 있다. 즉 CTB-HRP가 직경이 굵은 말이집신경섬유에, WGA-HRP는 직경이 가는 말이집 혹은 민말이집 신경섬유에 선택적으로 흡수된다²³⁻²⁵⁾.

Bae 등¹¹⁾은 흰쥐 삼차신경절에 CTB-HRP를 주입한 뒤 삼차신경 감각핵의 각 아핵에서 일차들신경종말의 투사양식을 분석한 실험에서 일차들신경종말은 삼차신경입쪽핵의 등쪽안쪽(dorsomedial)부분으로 많이 투사한다고 하였는데, 이는 본 연구에서의 결과와 일치하였다. 또한 전자현미경적 분석에서도 일차들신경섬유종말 및 p-ending의 미세구조, 일차들신경섬유종말

은 신경전달물질로서 글루탐산염을, p-ending은 GABA를 함유한다는 연구결과는 치수유래 들신경섬유종말 및 이와 연결하는 p-ending의 연구결과와 일치하였다. 이러한 연구결과들은 말초에서부터 삼차신경입쪽핵으로 입력되는 일차들신경 종말은 그 직경에 상관없이 대부분 글루탐산염을 신경전달물질로 사용하며 이와 연결하는 연접이전 종말인 p-ending은 대부분 GABA를 신경전달물질로 사용하는 것으로 생각된다.

일차들신경종말과 글루탐산염

척수의 뒤뿔에서 관찰되는 일차들신경종말에 글루탐산염이 신경전달물질로서 사용된다는 사실은 많이 알려져 있다²⁶⁻²⁸⁾. 뇌줄기의 숨뇌 뒤뿔(삼차신경척수핵) 및 삼차신경주감각핵에서도 일차들신경종말은 글루탐산염을 신경전달물질로 사용한다^{11,12,29,30)}. 이상의 보고와 본 실험결과를 정리해 보면, 체성감각계에서 신경섬유의 type, 직경 혹은 자극의 종류에 관계없이 일차들신경 종말에서는 글루탐산염을 신경전달물질로 사용한다는 것을 알 수 있다.

글루탐산염은 잘 알려진 것처럼 중추신경계에서 가장 많은 양을 차지하는 신경전달물질이다. 글루탐산염은 신경전달물질로도 사용되나 여러 대사과정에서 만들어지기도 한다. 이 아미노산은 혈관-뇌장벽을 통과하지 못하는 비필수 아미노산이기 때문에 혈류를 통해서 뇌로 공급되지 못하고 포도당이나 다른 전구물질로부터 여러 대사경로를 통해 합성된다. 또한 사람체에서 트리카르복시산 회로에 의해 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 과정이 진행될 때 케톤산으로부터 글루탐산염과 aspartate가 합성된다³¹⁾. 이때 합성된 글루탐산염은 대사성 글루탐산염이며 신경종말에서 신경전달물질의 정량적 분포를 관찰할 때 제외시켜 주어야 한다. 따라서 금입자 면역조직화학기법을 이용해 글루탐산염을 신경종말에서 정량적으로 분석하는 본

실험에서 신경종말에 함유된 사립체 위에 분포하는 금입자를 제외하고 주로 연결소포 위에서 관찰되는 금입자만을 포함시켰다. 연결소포 위에 표시된 금입자는 신경전달물질로서 사용되는 글루탐산염을 표시한 것으로 간주할 수 있기 때문이다.

축삭사이 연결에서 연결이전 축삭종말과 GABA

축삭사이연접(axoaxonic synapse)이 처음 소개된 것은 1962년 Gray³²⁾에 의해서이다. 이제까지의 많은 연구들에 의해 척수에서 흥분성 일차들신경종말을 조절하는 연결이전종말은 GABA를 신경전달물질로 사용한다고 알려져 있다^{28,33-36)}. GABA는 glycine과 함께 대표적인 억제성 아미노산 신경전달물질이다. 뇌줄기의 삼차신경척수핵에서도 일차들신경종말이 GABA를 함유한 연결이전종말과 신경연접을 이루고 있다는 보고가 많다^{30,37-39)}. 또한 위삼차신경핵(supratrigeminal nucleus)에서도 치아인대유래 일차들신경종말이 GABA를 함유한 신경종말과 축삭사이연접을 이루고 있음이 보고된 바가 있다⁴⁰⁾. 이런 보고들을 본 실험결과와 함께 종합해보면 일차들신경종말의 조절에 GABA는 매우 중요한 역할을 하는 신경전달물질임을 알 수 있다.

GABA 함유 신경종말의 기원에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서 관찰된 p-ending 들은 삼차신경입쪽핵으로 투사한다고 알려진 팔결핵(parabrachial nucleus)⁴¹⁾이나 삼차신경중뇌핵⁴²⁾등으로부터 유래할 가능성이 있으며 정확한 기원을 밝히기 위하여 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Shigenaga Y, Suemune S, Nishimura M, Nishimori T, Sato H, Ishidori H, Yoshida A, Tsuru K, Tsuiki Y, Dateoka Y, Nasution ID and Hosoi M: Topographic representation of lower and upper teeth within the trigeminal sensory nuclei of adult cat as demonstrated by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 251: 299-316, 1986. doi: 10.1002/cne.902510303.
2. Shigenaga Y, Mitsuhiro Y, Yoshida A, Cao CQ and Tsuru H: Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating masseter muscle of the cat. *Brain Res* 445: 392-399, 1988. doi: 10.1016/0006-8993(88)91206-1.
3. Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro H, Tsuru K and Doe K: Morphological and functional properties of trigeminal nucleus oralis neurons projecting to the trigeminal motor nucleus of the cat. *Brain Res* 416: 143-149, 1988. doi: 10.1016/0006-8993(88)90732-9.
4. Yoshida A, Hasuda K, Dostrovsky JO, Bae YC, Takemura M, Shigenaga Y and Sessle BJ: Two major types of premotoneurons in the feline trigeminal nucleus oralis neurons as demonstrated by intracellular staining with HRP. *J Comp Neurol* 347: 495-514, 1994. doi: 10.1002/cne.903470403.
5. Sugimoto T, He YF, Funahashi M and Ichikawa H: Induction of immediate-early genes c-fos and zif268 in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 794: 353-358, 1998. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00333-3.
6. Sugimoto T, He YF, Xiao C and Ichikawa H: c-fos induction in the subnucleus oralis following trigeminal nerve stimulation. *Brain Res* 783: 158-162, 1998. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01176-1.
7. Oakden EL and Boissonade FM: Fos expression in the ferret trigeminal nuclear complex following tooth pulp stimulation. *Neurosci* 84: 1197-1208, 1998. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00550-2.
8. Broman J, Anderson S and Ottersen OP: Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn. *Eur J Neurosci* 5: 1050-1061, 1993. doi: 10.1111/j.1460-

- 9568.1993.tb00958.x.
9. Valtchanoff JG, Phend KD, Bernardi PS, Weinberg RJ and Rustioni A: Amino acid immunocytochemistry of primary afferent terminals in the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* 346: 237-252, 1994. doi: 10.1002/cne.903460205.
 10. Örnung G, Ragnarson B, Grant G, Ottersen OP, Strom-Mathisen J and Ulfhake B: Ia boutons to CCN neurons and motoneurons are enriched with glutamate-like immunoreactivity. *Neuroreport* 6: 1975-1980, 1995. doi: 10.1097/00001756-199510010-00006.
 11. Bae YC, Ihn HJ, Park MJ, Ottersen OP, Moritani M, Yoshida A and 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* 418: 299-309, 2000. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000313)418:3<299::AID-CNE5>3.0.CO;2-I.
 12. Clements JR, Magnusson KR, Hautman J and Beitz AJ: Rat tooth pulp projections to spinal trigeminal subnucleus caudalis are glutamate-like immunoreactive. *J Comp Neurol* 309: 281-288, 1991. doi: 10.1002/cne.903090209.
 13. Mesulam MM: Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26: 106-117, 1978. doi: 10.1177/26.2.24068.
 14. Weinberg RJ and Van Eyck SL: A tetramethylbenzidine/tungstate reaction for horseradish peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem* 39: 1143-1148, 1991. doi: 10.1177/39.8.1906909.
 15. Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore A, Vaaland JL, Edminson P, Haug FMS and Ottersen OP: First visualization of glutamate and GABA in neurons by immunocytochemistry. *Nature* 301: 517-520, 1983. doi: 10.1038/301517a0.
 16. Kolston J, Osen KK, Hackney CM, Ottersen OP and Storm-Mathisen J: An atlas of glycine- and GABA-like immunoreactivity and colocalization in the cochlear nuclear complex of the guinea pig. *Ant Em bryol* 186: 443-465, 1992. doi: 10.1007/BF00185459.
 17. Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Madsen S, Skumlien S and Stromhaug J: Evaluation of the immunocytochemical method of amino acids. *Med Biol* 64: 147-158, 1986.
 18. Kristensen K, Olsson Y and Sjöstrand J: Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Brain Res* 32: 399-406, 1971. doi: 10.1016/0006-8993(71)90332-5.
 19. La Vail JH and La Vail MM: Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 176: 1416-1417, 1972. doi: 10.1126/science.176.4042.1416.
 20. Ganser AL, Kirschner DA and Willinger M: Ganglioside localization on myelinated nerve fibres by cholera toxin binding. *J Neurocytol* 12: 921-938, 1983. doi: 10.1007/BF01153342.
 21. Trojanowski JQ: Time of arrival of wheat germ agglutinin-HRP conjugates in superior colliculus after intraocular injections in the rat. *Brain Res* 267: 365-370, 1983. doi: 10.1016/0006-8993(83)90891-0.
 22. Scott SA, Patel N and Levine JM: Lectin binding identifies a subpopulation of neurons in chick dorsal root ganglia. *J Neurosci* 10: 336-345, 1990. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-01-00336.1990.
 23. Robertson B and Arvidsson J: Transganglionic transport of wheat germ agglutinin-HRP and cholera toxin-HRP in rat trigeminal primary sensory neurons. *Brain Res* 348: 44-51, 1985. doi: 10.1016/0006-8993(85)90357-9.
 24. Robertson B and Grant G: A comparison between wheat germ agglutinin and cholera toxin-HRP as anterogradely transported markers in central branches of primary sensory neurones in the rat with some observations in the cat. *Neurosci* 14: 895-905, 1985. doi: 10.1016/0306-4522(85)90152-6.
 25. Weinberg RJ, Tracey DJ and Rustioni A: Extracellular labeling of unmyelinated dorsal root terminals after WGA-HRP injections in spinal ganglia. *Brain Res* 523: 351-355, 1990. doi: 10.1016/0006-8993(90)91513-G.
 26. Curtis DR, Phillis JW and Watkins JC: Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 183: 611-612, 1959.

- doi: 10.1038/183611a0.
27. Willcockson WS, Chung JM, Hori Y, Lee KH and Willis WD: Effects of iontophoretically released amino acids and amines on primate spinothalamic tract cells. *J Neurosci* 4: 732-740, 1984. doi: 10.1523/JNEUROSCI.04-03-00732.1984.
 28. Todd AJ and Spike RC: The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41: 609-645, 1993. doi: 10.1016/0301-0082(93)90045-T.
 29. Clements JR and Beitz AJ: An electron microscopic description of glutamate-like immunoreactive axon terminals in the rat principal sensory and spinal trigeminal nuclei. *J Comp Neurol* 309: 271-280, 1991. doi: 10.1002/cne.903090208.
 30. Iliakis B, Anderson NL, Irish PS, Henry MA and Westrum LE: Electron microscopy of immunoreactivity patterns for glutamate and gamma-aminobutyric acid in synaptic glomeruli of the feline spinal trigeminal nucleus (Subnucleus Caudalis). *J Comp Neurol* 366: 465-477, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960311)366:3<465::AID-CNE7>3.0.CO;2-2
 31. 서유현 : 신경전달물질. 민음사, 서울, pp. 267-272, 1992.
 32. Gray EG: A morphological basis for pre-synaptic inhibition. *Nature* 193: 82-83, 1962. doi: 10.1038/193082a0.
 33. Barber RP, Vaughn JE, Saito K, McLaughlin BJ and Roberts E: GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res* 141: 35-55, 1978. doi: 10.1016/0006-8993(78)90615-7.
 34. Todd AJ and McKenzie J: GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci* 31: 799-806, 1989. doi: 10.1016/0306-4522(89)90442-9.
 35. Maxwell DJ, Christie WM, Short AD and Brown AG: Direct observations of synapses between GABA-immunoreactive boutons and muscle afferent terminals in lamina VI of the cat's spinal cord. *Brain Res* 530: 215-222, 1990. doi: 10.1016/0006-8993(90)91285-O.
 36. Maxwell DJ, Christie WM and Somogyi P: Synaptic connections of GABA-containing boutons in the lateral cervical nucleus of the cat: an ultrastructural study employing pre- and post-embedding immunocytochemical methods. *Neurosci* 33: 169-184, 1989. doi: 10.1016/0306-4522(89)90319-9.
 37. Basbaum AI, Glazer EJ and Oertel W: Immunoreactive glutamic acid decarboxylase in the trigeminal nucleus caudalis of the cat: a light- and electron-microscopic analysis. *Somatosens Mot Res* 4: 77-94, 1986. doi: 10.3109/07367228609144599.
 38. Almond JR, Westrum LE and Henry MA: Post-embedding immunogold labeling of gamma-aminobutyric acid in lamina II of the spinal trigeminal subnucleus pars oralis. I. A quantitative study. *Synapse* 24: 39-47, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199609)24:1<39::AID-SYN5>3.0.CO;2-H
 39. Dumba JS and Irish PS: Electron microscopic analysis of gamma-aminobutyric acid and glycine colocalization in rat trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res* 806: 16-25, 1998. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00688-X.
 40. Bae YC, Nakagawa S, Yasuda K, Yabuta NH, Yoshida A, Pil PK, Moritani M, Chen K, Nagase Y, Takemura M and Shigenaga Y: Electron microscopic observation of synaptic connections of jaw-muscle spindle and periodontal afferent terminals in the trigeminal motor and supratrigeminal nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 374: 421-435, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961021)374:3<421::AID-CNE7>3.0.CO;2-3
 41. Yoshida A, Chen K, Moritani M, Yabuta NH, Nagase Y, Takemura M and Shigenaga Y: Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory nuclear complex and spinal dorsal horn in the rat. *J Comp Neurol* 383: 94-111, 1997. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970623)383:1<94::AID-CNE8>3.0.CO;2-G.
 42. Zhang J, Luo P and Pendlebury WW: Light and electron microscopic observations of a direct projection from mesencephalic trigeminal nucleus neurons to hypoglossal motoneurons in the rat. *Brain Res* 917: 67-80, 2001. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02911-0.

ABSTRACT

Postembedding Immunocytochemical Analysis of Tooth Pulp Afferent Terminals in the Trigeminal Nucleus Oralis

Jae Youn Son¹, Hye Min Han¹, Tae Heon Kim², Yong Chul Bae¹

¹*Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University,*

²*Department of Dental Hygiene, Taegu Science University*

Trigeminal nucleus oralis (Vo) receiving nociceptive information from the dental pulp is involved in reflexive jaw movement. However, little information is available regarding the neurotransmitters which are involved in the transmission and processing of pulpal nociceptive information in the Vo. To address this issue, we labeled afferents of rat upper molar pulps using retrograde wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase (WGA-HRP) tracing, performed postembedding immunocytochemistry with glutamate and GABA antisera, and ultrastructural analysis. The labeled pulpal afferent terminals in the Vo contained many spherical synaptic vesicles (45-55 nm in diameter). They frequently made asymmetrical synaptic contacts with the middle or distal parts of dendrites rather than the soma or proximal part of dendrites. They received synapse from pleomorphic vesicles containing presynaptic endings. Gold particles labeling the glutamate were densely distributed in the afferent terminals of the tooth pulp but were sparse in the presynaptic endings. On the other hand, gold particles labeling GABA were densely distributed in the presynaptic endings, but sparse in the afferent terminals of the tooth pulp. These findings indicate that tooth pulp afferent terminals use glutamate as a neurotransmitter in the Vo and they are controlled by presynaptic endings that use GABA as a neurotransmitter.

Keywords: pulpal afferent, synaptic connectivity, presynaptic inhibition, GABA