

신경병증 통증모델 흰쥐 척수의 신경세포 및 미세교세포에서 pERK의 발현에 대한 연구

우리들병원 신경외과, 한양대학교 의과대학 해부학교실¹, 신경외과학교실²

김기준 · 이상호 · 황세진¹ · 오석전²

Expression of pERK in the Neurons and Microglia in the Spinal Cord of the Rat with Neuropathic Pain

Ki Joon Kim, M.D., Sang-Ho Lee, M.D., Se Jin Hwang, M.D.¹, and Suck-Jun Oh, M.D.²

Department of Neurosurgery, Wooidul Spine Hospital, Seoul, Korea

Departement of Anatomy¹, Neurosurgery², School of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Objectives: Mitogen activated protein kinase (MAPK) transduces a broad range of extracellular stimuli into diverse intracellular response by producing changes in transcription and post-transcriptional modification of target proteins. Expression of phospho-ERK (pERK) in neurons of dorsal root ganglion (DRG) and superficial dorsal horn can be induced by noxious stimuli on the skin and activation of ERK in spinal neurons may contribute to hyperalgesia. In this study, the author pursued altered expression of pERK in spinal neurons and microglia with time course in the neuropathic pain model of the rat induced by L5-L6 spinal neurotomy.

Methods: Rats were divided into sham control and neurotomy groups. In neurotomy group, L5 and L6 spinal nerves were cut 1-2 mm distal to intervertebral foramina and sacrificed at 1 day, 1 week and 2 week after surgery. The expression of pERK in dorsal horn and its colocalization with NK1 and OX-42, was studied using single or multiple labeling immunohistochemistry and confocal microscopy.

Results: At 1 day after neurotomy, pERK positive cells in ipsilateral dorsal horn were NK1-positive neurons in lamina I and OX-42-positive microglia in lamina I to V. Expression of pERK in NK1-positive neurons were sustained until 2 weeks after neurotomy. The number of pERK- and OX2-positive microglia were maximal at 1 day after surgery and decreased thereafter, while immunofluorescent reaction (IR) for OX-2 kept increased until 2 weeks.

Conclusion: In conclusion, it is suggested that expression of pERK in microglia play one part of roles in the development of neuropathic pain in early phase, and that activation of pERK in NK1-positive neurons is responsible for sustained hyperalgesia in the neuropathic pain.

Key Words: Neuropathic pain · NK1 · Microglia · ERK



서론

신경병증 통증(neuropathic pain)은 말초신경과 척수를 비

롯한 신경계통의 손상 혹은 질환에 의하여 유발되는 통증으로서 자발적 통증, 이형통증(allodynia) 및 과민통증 등의 만성적인 통증을 포함한다^{46,47}. 신경병증에 의한 지속적인 통증은 일반적인 비스테로이드성 진통제 혹은 아편양제에 반응하지 않는 경우가 많으므로 이러한 만성 통증에 대한 효과적인 치료의 개발을 위해서는 통증 유발 기전의 규명이 필수적이라고 할 수 있다.

Mitogen activated protein kinase (MAPK)는 serine/threonine

Corresponding Author: Ki-Joon Kim, M.D.

Department of Neurosurgery, Wooidul Spine Hospital, 47-4 Chungdam-Dong, Kangnam-Gu, Seoul, Korea

Tel: 82-2-513-8153, Fax: 82-2-513-8146

E-mail: kkj723@hanmail.net

protein kinase의 일종으로 세포외부의 자극을 전사(transcription)하거나, 목표되는 단백질을 해독한 후 변형(posttranslational modification)을 하여 세포내부의 반응으로 변환시키는 역할을 한다^{38,41,45}. MAPK의 종류에는 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK = p44/42 MAPK), p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress activate protein kinase (SAPK) 및 ERK 5가 포함된다. ERK는 세포막의 탈분극 및 칼슘 유입에 의해 활성화되며³⁷, 신경계통에서 장기 상승작용(long term potentiation), 학습과 기억 등과 같은 신경세포의 가변성(plasticity)과 관련된 세포내 신호전달 경로에 관여한다^{12,30,41}. Ji 등¹⁷은 실험동물의 피부에 가해진 통증은 척수의 2차 감각신경세포에서 ERK의 인산화(phosphorylation)를 유발하고, 말초의 통증은 ERK의 매개에 의해서 척수신경세포에서 NK1과 prodynorphine의 발현을 증가시키므로 ERK의 활성화가 과민통증과 연관성을 지닌다고 주장하였다. 또한 Dai 등⁹도 말초신경의 자극이 척수신경절세포에서 ERK의 활성화를 유발한다고 주장하였다.

최근에 이르러 신경병증 통증과 MAPK의 연관성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. MAPK는 척수에서 통증의 기전에도 관여하는 것으로 인식되고 있다. 특히 p38 MAPK에 관한 연구가 많이 이루어졌으며, 말초신경 손상시에 증식되는 별아교세포(astrocyte) 및 미세교세포(microglial cell)에서의 MAPK 발현에 관한 보고도 있다. Ma 등^{27,34}은 말초신경 손상 후 척추신경절과 미세교세포에서 p38 MAPK의 발현이 증가된다고 보고하였으며, Kominato 등²⁵은 척수신경을 압박하거나, 말초 조직에 carrageenan 혹은 complete Freund's adjuvant (CFA)를 주입하여 유발시킨 감염성 과민통증(inflammatory hyperalgesia)에서 ERK의 발현이 증가된다고 하였다^{13,20}.

급성통증은 척수의 신경세포에서 ERK를 활성화시키며, 신경손상에 의한 만성통증은 척수신경절과 척수의 신경교세포에서 p38 MAPK의 활성화를 유발함이 널리 인정되고 있으나, 신경병증 통증에서 신경세포 및 신경교세포의 ERK 활성화 여부에 대해서는 알려져 있지 않다. 이에 본 연구자는 척추신경 손상 후 신경병증 통증의 진행 과정에 따른 신경세포 및 신경교세포에서 pERK의 발현 양상의 변화를 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.



대상 및 방법

1. 실험동물 및 사육 조건

본 실험에 사용된 실험동물은 체중 200~250 g 내외의 건

강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐로서 모든 실험동물은 실험 기간동안 식수와 사료를 무제한으로 공급하였다. 실험동물은 Sham 대조군 및 실험군으로 구분하여 Sham 대조군에는 10마리, 실험군에는 20마리의 동물을 배정하였다.

2. 흰쥐의 신경병증 통증 유발 및 행동학적 검사

1) 실험동물

실험동물에게 2~3% enflurane을 흡입시켜 마취를 유도한 후 1.5~2%의 enflurane을 30% 산소와 70% 이산화질소(N₂O₂)에 혼합하여 흡입시켜서 마취상태를 유지하였다. 마취된 실험동물의 천골부에서 종방향으로 4 cm의 길이로 피부를 절개하였다. 피부 절개선을 따라 천골 주위의 근육층을 분리하고, 제5번 요추 척추골의 좌측 횡돌기를 절단하여 좌골신경으로 이어지는 척추신경을 노출시켰으며, 척추신경절에서 약 1 cm 원위부의 신경을 절단하였고(Fig. 1), 말초단에서 약 1 mm의 신경을 다시 절단하였다. 수술이 끝난 후 주사기를 사용하여 멸균된 생리식염수로 절개된 부위를 세척한 후 No. 3-0 비단실을 사용하여 봉합하였으며, 마취에서 회복시킨 후 정상적으로 사육하였다. Sham 대조군은 동일한 마취 상태에서 피부를 절개하고, 근육을 분리하여 신경을 노출시킨 후 근육과 피부를 봉합하였다.

2) 행동학적 검사

실험동물을 투명한 아크릴로 제작한 칸막이에 넣고, 30분



Fig. 1. A photograph depicting the site of neurotomy (red dotted lines) for neuropathic pain model of the rat. The laminae of lumbar vertebrae, sacrum and adjacent muscles were removed to show the spinal nerves. Spinal nerves of L5 and L6 were cut at the distal portion to the dorsal root ganglia (arrows), proximal to sciatic nerve (SN).

이상 방지하여 적응하도록 한 후 기계적 자극에 대한 회피반응의 역치를 측정하였다. 역치의 측정은 Chaplan 등⁴⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 실험동물의 발바닥에 가하는 기계적 자극은 굽는 힘(bending force)의 로그 값이 일정한 간격을 갖는 일련의 Von Frey 미세 섬유를 사용하였다. 실험동물의 발바닥을 하나의 미세섬유로 자극하여 반응을 살펴보고, 반응을 하면 한 단계 약한 미세 섬유를 반응을 하지 않으면 한 단계 강한 미세섬유를 시도하는 방식으로 자극을 계속하였다. 처음 변화가 관찰되기 시작한 때로부터 위와 같은 방법으로 여섯 번을 시도한 후 그 일련의 반응 기록을 사용하여 k 값 및 50% 회피반응 역치(withdrawal threshold)를 산출하였다.

3) 조직 처리

척수조직의 면역조직화학적 염색을 위하여 모든 실험동물은 관류고정 하였다. 신경 절단 후 1일, 1주 및 2주 경과시에 체중 kg 당 60 mg의 pentobarbital를 복강내 주사하여 마취를 유도하고, 좌심실로 관을 주입하여 100 ml의 생리식염수로 세척 후 500 ml의 4% paraformaldehyde [in 0.1 N phosphate buffer (PB)]를 관류시켜 고정하였다. 관류 고정 후 제4번 요추부터 제6번 요추 수준의 척수를 적출하고, 2시간 동안 동일한 고정액으로 후고정 하였다. 후고정이 완료된 척수는 30% sucrose-PB 용액에서 척수가 가라앉을 때 까지 최소한 2일간 냉장보관하였으며, 냉동절편기를 이용하여 -20℃에서 두께 40~50 μ m의 절편을 제작하여 PB용액에 보관하였다.

4) 다중형광 면역조직화학

제5 및 제6번 요추신경절단 후 척수에서 pERK의 발현을 확인하기 위하여 DAB (diaminobenzidine) 발색을 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 또한 pERK를 발현하는 신경세포를 확인하기 위하여 pERK와 함께 투사성 감각신경세포(projective sensory neuron)에서 주로 발현하는 neurokinin 1 (NK 1)의 이중면역형광염색(double immunofluorescence)을 실시하였으며, 신경교 세포(neuroglial cell)에서의 pERK 발현을 확인하기 위하여 pERK와 함께 모든 신경세포의 핵을 염색하는 NeuN, 별아교세포(astrocyte)를 표지하는 glial fibrillary acidic protein (GFAP), 미세교세포(microglia)를 표지하는 OX-42 와의 다중면역형광염색을 시행하였다.

모든 면역조직화학적 염색을 위한 모든 배양 및 반응과정은 실온에서 교반기 위에서 실시하였다. DAB 면역염색에서

Table 1. The host, source, and working dilutions of the primary antibodies used in the single, double or triple immunohistochemistry

Primary antibody	Host	Company or Source	Dilution
pERK(p44/42 MAPK)	rabbit	Cell Signaling, USA	1:200
pERK	mouse	Cell & Signaling, USA	1:200
NeuN	mouse	Chemicon, USA	1:1000
NK1	Guinea pig	Chemicon, USA	1:1000
GFAP	mouse	Dako, USA	1:2000
OX42	mouse	Chemicon, USA	1:1000

척수조직 절편에 대한 항체의 조직 투과성을 증대시키기 위하여 50% ethanol로 30분간 반응시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척하였으며, 조직내의 peroxidase의 활성을 제거하기 위하여 3% 과산화수소(H_2O_2)로 10분간 반응시켰고, PBS로 수세 후 2차 항체의 비특이적 반응을 차단하기 위하여 10% normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch, USA)으로 30분간 처리한 후 1차 항체를 1:200에서 1:2000까지의 희석 배율로 혼합하여 16시간 반응시켰다(Table 1). 본 연구에 사용된 1차 항체의 종류, 제조사 및 희석 배율은 Table 1과 같다. 1차 항체의 반응이 끝난 조직은 PBS로 5분간 3회 수세 후 2% NDS로 10분간 처리하고 1차 항체의 종류에 따라 biotinylated donkey anti-rabbit 혹은 donkey anti-mouse (Jackson, USA)를 1:200으로 희석하여 30분간 반응시켰으며, PBS로 수세 후 streptavidin(1:5000, Sigma, USA)으로 1시간동안 반응시키고, DAB kit (Vector, USA)를 사용하여 발색하였다. 발색이 완료된 조직은 수세 및 탈수과정을 거쳐 슬라이드에 마운트하였으며, 광학현미경(Leica DMX, Leica Germany)으로 관찰하였으며, 현미경에 부착된 디지털 카메라(F-view, SIS, Germany) 및 영상분석 소프트웨어(Analysis Pro, SIS Germany)를 사용하여 영상을 포착하였다.

다중면역형광염색은 DAB 염색과 동일한 과정을 사용하였으나, 1차 항체 반응 이전의 H_2O_2 반응을 생략하였으며, 2~3종의 1차 항체를 적당한 희석배율로 혼합하여 반응시켰고, 2차 항체로는 FITC, Cy3 혹은 Cy5의 형광물질이 결합된 donkey anti-rabbit, donkey anti-guinea pig, donkey anti-mouse, donkey anti-rat, donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch, USA)의 2차 항체를 1:100으로 희석 및 조합하여 3시간동안 반응시키고, PBS로 수세 후 vectashield (Vector Lab, USA)와 coverglass를 사용하여 마운트하였다. 그 후 공초점 현미경(Leica

TCX, Leica, Germany)를 이용하여 영상을 포착하였으며, Adobe Photoshop (version 7.0, Adobe, USA)을 사용하여 명도와 대비를 조정하고, Corel Draw (version 10, Corel, Canada)를 이용하여 최종 그림을 작성하였다.

5) OX42 면역염색 강도의 정량측정 및 통계처리

신경 절제 후 OX42 면역 반응 강도의 변화를 측정하기 위하여 OX42 면역조직화학 표본에 대한 영상 분석을 시행하였다. 광학현미경의 램프전압 및 조리개를 일정하게 고정시킨 후 20배 대물 렌즈상에서 현미경에 부착된 디지털카메라(F-view, SIS, Germany)로 후각 부분의 영상을 포착하였으며, 영상분석 소프트웨어(Analysis Pro, SIS Germany)를 사용하여 프레임상의 gray value를 계산하였다. 각 시간군 당 2마리의 척수에서 3장의 절편을 분석에 사용하였으며, 신경절단측과 정상측의 변화를 확인하기 위하여 T-test를 실시하고, 시간군간의 변화를 확인하기 위하여 one-way ANOVA (2X2)를 실시하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.



결 과

1. 행동학적 검사 소견

Sham 대조군은 수술 후 2주 경과시까지 50% 회피 반응의 역치가 수술 전에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다. 제5 및 제6번 요추신경절단군은 수술 후 1일 경과시부터 역치가 유의하게 감소하였으며, 이후에도 점진적으로 감소하여 1주 경과시 부터는 술 전의 30% 수준으로 감소하였다(Fig. 2).

2. pERK 면역염색소견

신경절단 후 1일 경과시에 실험동물의 척수에서 pERK의 면역반응은 동측의 후각과 반대측에 강한 면역반응을 나타내었다. 특히 lamina I과 lamina II에서 많은 세포들이 염색되었으며 lamina III에서 lamina VII에서도 면역반응을 지닌 세포들이 관찰되었다. lamina I에서는 세포의 돌기가 lamina에 평행인 방향으로 배열된 비교적 큰 세포들이 관찰되었으나, 다른 lamina에서는 1~3개의 짧은 세포돌기를 지닌 작은 세포들이 관찰되었으며, 이들은 신경교세포로 예상되었다. 반대측의 후각에서는 약한 염색반응을 나타내는 소수의 세포들이 전체적으로 산재되어 있었다(Fig. 3A).

신경 절단 후 1주 경과시에 척수의 pERK 면역반응은 동

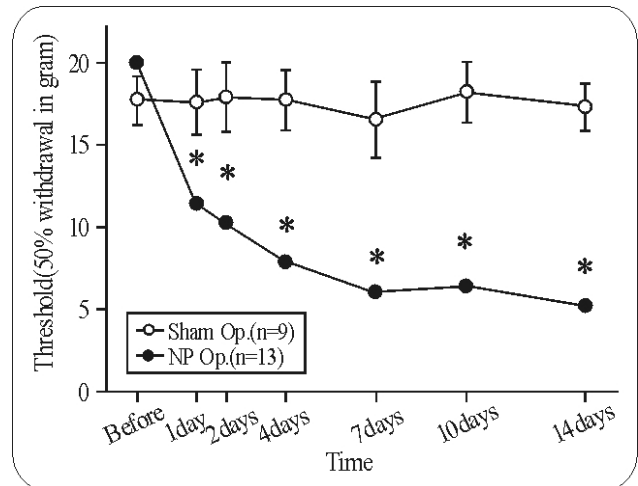


Fig. 2. Neuropathic pain developed by spinal nerve (L5,6) transection. In the spinal nerve injured group (NP Op.), threshold for 50% withdrawal response declined along time course. The threshold for mechanical hyperalgesia was significantly decreased at 1 day after neurotomy and kept decreasing until 14 days. *Significant difference compared with sham operated group (Sham Op.) ($p < 0.05$).

측 후각의 lamina I, II에서 주로 관찰되었으며, lamina III 이하에서는 거의 관찰되지 않았다. lamina I에서 면역반응을 나타내는 세포 또한 1일 경과군에 비하여 현저히 감소되어 있었다. 반대측의 척수에서는 1일 경과군과 유사한 정도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 3B).

신경 절단 후 2주 경과시에 척수의 pERK 면역반응은 1주 경과시와 유사하였으며, 동측의 lamina I에서 대부분의 pERK 양성세포들이 관찰되었다(Fig. 3C).

3. pERK, NK1 이중 염색소견

신경 절단 후 1일 경과시 pERK와 NK1의 이중염색 결과 동측 척수의 lamina I, II에서 pERK 면역반응을 나타내는 세포의 대다 수는 NK1의 면역반응을 동시에 나타내고 있었다(Fig. 4A). 외측후각 (lateral dorsal horn) lamina I에서는 대부분의 pERK 양성세포가 NK1의 면역 반응을 나타내었으며(Fig. 4B), 내측후각(medial dorsal horn)에서는 NK1에 면역반응이 나타나지 않은 세포도 일부 관찰되었다(Fig. 4C). 동측의 lamina III 이하에 존재하는 pERK 양성의 세포들은 NK1을 발현하지 않았다(Fig. 4A).

신경절단 후 1주 및 2주 경과시 pERK의 면역반응은 대부분 동측의 lamina I에 존재하는 세포들에서 나타났으며, 1일

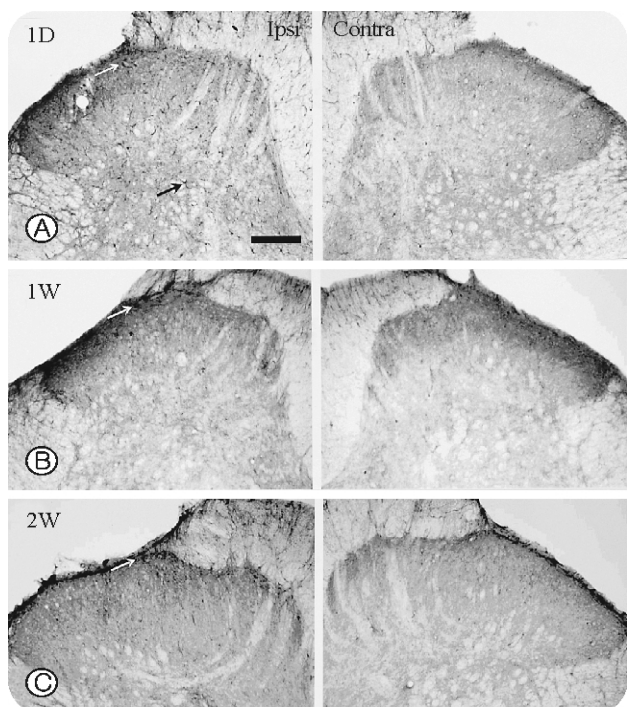


Fig. 3. Photomicrograph of the single labeling immunohistochemistry for pERK at 1 day(A), 1 week(B), and 2 weeks (C) after L5, L6 neurotomy. At 1 day after neurotomy, pERK immunoreactive cells(arrows) were distributed in superficial and deep dorsal laminae of the ipsilateral dorsal horn. pERK-immunoreactive cells in lamina I-II was persisted until 2 weeks, but those cells in deep laminae were virtually absent at 1 and 2 weeks after neurotomy. Scale bars = 100 mm

경과시와는 달리 주로 내측에 존재하는 세포들에서 관찰되었다. 또한 이러한 pERK 양성세포들은 대부분 NK1을 발현하였다(Fig. 4D-G).

4. pERK, NeuN, GFAP, OX42 다중염색 소견

신경 절단 후 pERK를 발현하나 NK1 음성인 세포들의 신경세포 혹은 신경교세포 여부를 확인하기 위하여 pERK, NeuN 및 NK1과의 3중염색을 시행하고, 공초점현미경으로 확인하였다. pERK 및 NeuN 양성 세포들은 대부분 NK1을 발현하였으며, pERK 양성과 NK1 음성 세포들은 NeuN에 면역반응을 나타내지 않았으므로 NK1을 발현하지 않는 pERK 양성 세포는 신경세포가 아님을 알 수 있었다(Fig. 5A).

신경절단 후 별아교세포가 pERK를 발현하는 지를 확인하기 위하여 pERK와 GFAP의 이중염색을 시행하였다. 신경 절단 후 1일 및 1주 경과시에 동측의 후각에서 GFAP의 면역반응이 증

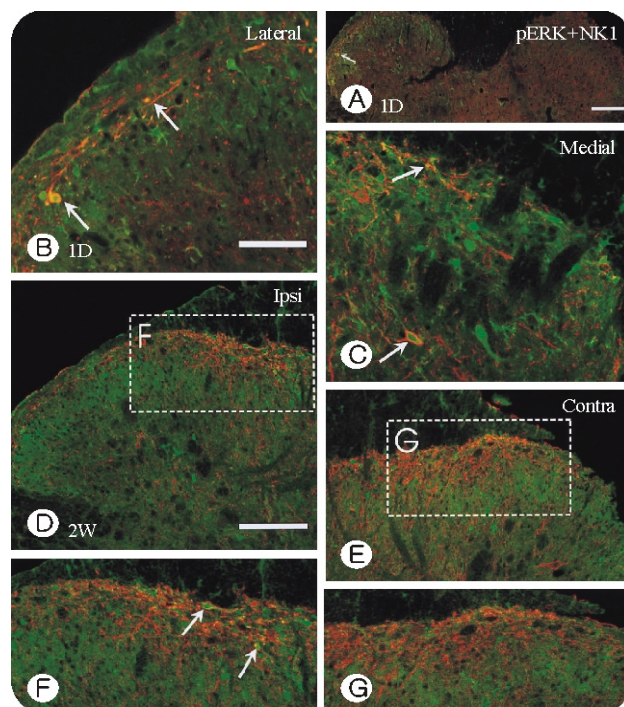


Fig. 4. Confocal microscopy of spinal cord double labeled for pERK (green) and NK1 (red) after neurotomy. A: Low power view of spinal cord 1 day after neurotomy, pERK-immunoreactive cells in lamina I of ipsilateral dorsal horn were colocalized with NK1(arrows). B, C: High power view of superficial laminae of the ipsilateral dorsal horn, lateral (B) and medial (C) part. In lateral dorsal horn most of pERK and NK1-positive cells(arrows) were located in lamina I, while those in medial dorsal horn were extended in lamina II. D-G: 2 weeks after neurotomy. Areas in dotted boxes of D and E were magnified in F and G, respectively. Cells double labeled for pERK and NK1(arrows) were persisted in lamina I of the ipsilateral dorsal horn. Scale bars = 100 μm in A and C, 25 μm in B.

가되었으나, pERK와 GFAP는 공존하지 않았으므로 별아교세포는 pERK를 발현하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

미세교세포의 pERK 발현여부를 확인하여 pERK와 OX42의 이중염색을 시행한 결과 신경 절단 후 1일 경과시 척수에서 후각의 모든 lamina에 걸쳐 pERK 및 OX42에 이중염색되는 미세교세포가 광범위하게 분포함을 확인할 수 있었다(Fig. 5C).

5. OX42 면역염색 소견

신경 절단 후 척수의 후각에서 시간 경과에 따른 OX42의 면역반응 변화를 관찰하기 위하여 1일, 1주 및 2주 경과군에서 OX42의 면역염색을 시행하였다.

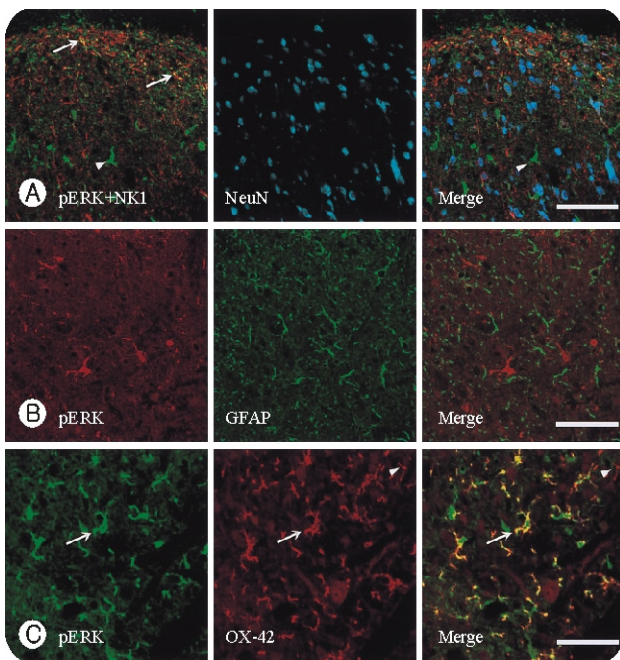


Fig. 5. Confocal microscopy for identification of the pERK positive cells in deep laminae using immunohistochemistry for neurons and glia. **A:** Triple labeling with pERK(green), NK1(red) and NeuN(blue). pERK positive cells in lamina I were also stained for NK1(arrows) while those in deeper negative for NK1(arrowheads) were not stained for NeuN, implying that these pERK-positive, NK1-negative cells are non-neuronal cells. **B:** Double labeling with pERK and GFAP, a marker for astrocytes, in deeper laminae of ipsilateral spinal cord. No pERK positive cells were positive for pERK. **C:** Double labeling with pERK and OX-42, a marker for the microglia, in the same area with **B**. Most of pERK-positive cells in this area were also stained for OX-42 (arrows) while a few OX-42-positive cells are pERK-negative(arrowhead). Scale bars = 40 μ m in **A**, 20 μ m in **B** and **C**.

신경 절단 후 1일 경과시 OX42의 면역 반응을 나타내는 미세교 세포는 동측과 반대측의 전체에 분포되어 있었으나, 동측의 후각, 배측회색교련(dorsal gray commissure) 및 전각의 lamina IX에서는 특히 강한 면역 반응을 나타내는 세포들이 분포하였다(Fig. 6A). 1주 경과시에 OX의 면역반응은 1일 경과시에 비하여 현저하게 증가된 소견을 나타내었다. OX2의 면역반응은 동측 후각의 lamina I-III에서 특히 증가되어 있었으며 배측회색교련 및 전각에서도 반대측에 비하여 증가되어 있었다(Fig. 6B). 2주 경과시는 1주 경과시와 유사한 소견을 나타내었으나, 반대측에서도 면역 반응이 증가되어 있었다(Fig. 6C, D).

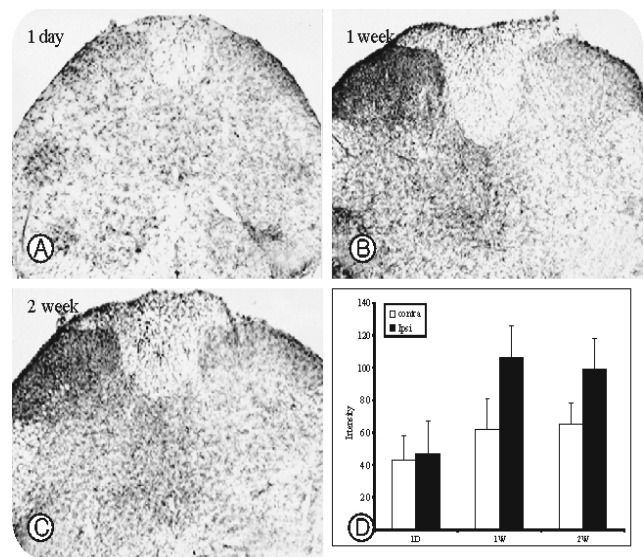


Fig. 6. Photomicrograph of the spinal cord labeled with OX-42 at 1 day(**A**), 1 week(**B**) and 2 weeks(**C**) after L5, 6 nerve transection. **A:** At 1 day after nerve transection, OX-42 immunoreactivities(IR) are increased in superficial dorsal horn and ventral horn of ipsilateral side. **B-C:** At 1 and 2 weeks after transection, OX-42-IR in superficial dorsal horn of the ipsilateral spinal cord were increased with time course. **D:** Histogram representing optical density of OX-42 immunoreaction in superficial dorsal horn at 1 day, 1 week and 2 weeks after nerve transection. * $p < 0.05$, compared to the control side. * $p < 0.05$, compared to ipsilateral side at 1 day after nerve transection.

6. pERK, OX-42, NK1 다중염색 소견

신경 절단 후 1일 경과시의 pERK 면역반응은 NK1과는 lamina I에서 공존하였고, OX42와는 전체의 후각을 통하여 공존하였다(Fig. 7A). 1주 및 2주 경과시에는 위에서 나타난 바와 같이 lamina I의 NK1 양성 신경세포에서 pERK가 발현되었으나, 후각에 광범위하게 증가된 OX42 양성의 미세교세포는 lamina I 혹은 II에 존재하는 일부 세포를 제외한 대부분의 세포에서는 pERK의 면역반응이 관찰되지 않았다(Fig. 7B).



고 찰

말초신경의 손상과 관련된 신경병증 통증은 대부분 지속적인 장애 상태를 유발하므로 임상에서 급성통증에 비하여 빈번하게 접하게 되나 치료에는 한계가 있다. 흔히 호소하는 신경병증 통증에는 환지통(phantom limb pain), 작열통(causal-

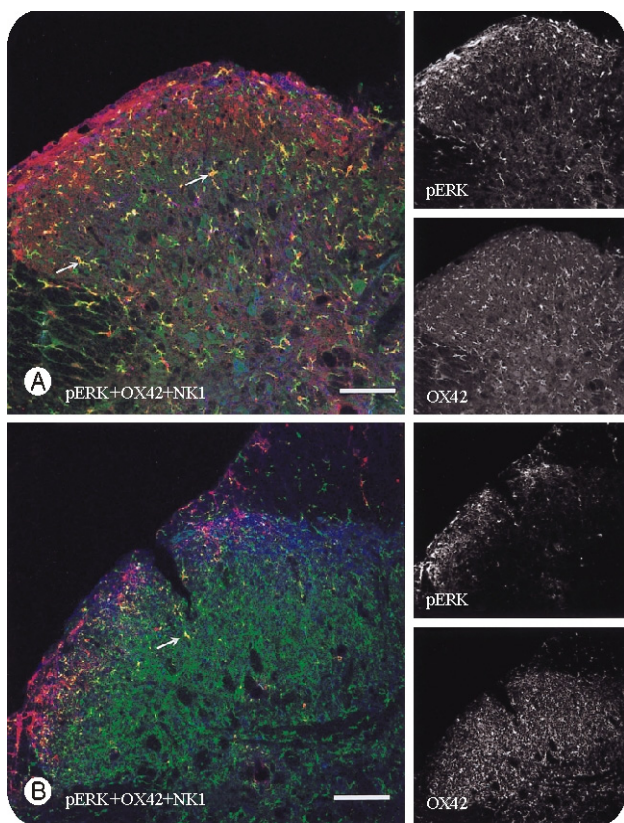


Fig. 7. Confocal microscopy of the spinal cords triple labeled for pERK(red), OX-42(green), and NK1(blue) in ipsilateral dorsal horn at 1 day (**A**) and 2 weeks after neurotomy. **A:** At 1 day after neurotomy, pERK-positive cells were also stained for NK1 in superficial laminae and for OX42 in whole dorsal horn. **B:** In spite of increase of OX-42-IR in the deep dorsal horn, most microglia in deeper laminae were not stained for pERK at 2 weeks after neurotomy. Scale bars = 100 μ m.

gia), 포진 후 신경통(postherpetic neuralgia)과 당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy) 등이 있으며, 척추질환에 의한 신경 압박이 발생하는 추간판탈출증, 전방전위증 및 척추강협착증에서도 발생한다. 또한 척추 수술 전후의 신경손상 및 신경부종에 의해서도 신경병증 통증이 발생한다^{2,10}).

신경병증 통증의 임상양상은 여러가지 특징이 있다. 자극이 없이 자발적 통증이 발생하기도 하고, 통증은 지속되거나 간헐적으로 반복되기도 한다. 정상적인 경우, 통증을 유발하지 않을 정도의 자극에 통증이 발생하는 이형통증(allodynia)을 나타내기도 하고, 통증을 유발하는 자극에 대해 심한 통증을 나타내는 과민통증(hyperalgesia)을 나타내기도 한다. 신경병증 통증을 호소할 때 통증과 함께 이상감각(dysethesia,

paresthesia)를 호소하기도 한다^{10,24}.

신경병증 통증의 병리기전에는 말초감작(peripheral sensitization)과 중추감작(central sensitization)이 있으며, Rowbotham와 Fields¹¹⁾는 기전에 따라 세가지 형태로 분류하였다. 첫째는 말초 통각수용기의 비정상적인 활성화에 의한 중추감작으로 신경병증 통증이 발생하는 경우이며, 대표적으로 급성 대상포진성 통증이 있으며, 국소마취제의 의해 통증의 조절이 가능하다. 두 번째는 통각수용기에 대한 영향 없이 감각입력의 소실(deafferentation)에 따른 중추의 과다활성(central hyperactivity)에 의하여 유발되는 자발적 통증이다. 세 번째는 감각입력의 소실과 중추의 재구성(central reorganization)에 의하여 발생하는 중추와 말초 감각에 의하여 유발되는 통증이다¹¹⁾. 그러나 신경병증 통증은 위의 어떤 한 가지 기전으로 설명이 불가능하며, 급성, 아급성 및 만성 통증에 따라 다른 기전이 작용한다고 할 수 있다. 이상과 같이 신경병증 통증의 기전을 설명하는 여러 이론이 있으나, 현재까지 명확한 기전은 확립되어 있지 않으므로 치료에도 한계가 있다^{10,31)}. 현재까지 사용하고 있는 치료 방법에는 tramadol, gabapentin, 항우울제 등의 약물 치료와 교감신경차단(sympathetic block)과 국소차단(regional block) 등의 신경차단술 그리고 topical lidocaine patch이 있으나, 치료 성적에는 논란이 많다. 뚜렷한 치료 방법이 없기에 다중 약물요법이 시행되고 있으나, 부작용이 많고 약물상호 반응이 있기에 한계가 있는 치료 방법이다^{24,31)}. 척추질환의 경우 신경병증 통증이 많고, 수술 후 신경손상 및 부종에 의하여 신경병증 통증이 발생하는 경우가 있다. 신경병증 통증이 발생하면 치료 방법의 한계로 인해 급성기를 지나, 만성 통증으로 진행되는 경우가 많다.

분자생물학적인 기법의 발전에 따라 신경병증 통증의 분자생물학적인 발생기전에 대한 연구가 이루어지고 있으므로 발생기전이 확인되면 통증의 진행과 만성화를 방지할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 신경병증 통증의 유발에 따른 신경세포 및 미세교세포에서의 pERK의 발현 양상 변화를 시간경과에 따라 관찰한 결과 말초신경절단에 의한 신경병증 통증은 초기에 NK1 양성신경세포와 미세교세포에서 pERK의 발현을 유발하며, 신경 절단 후 1~2주 경과시에도 신경세포에서는 pERK의 발현이 지속되며, 신경 절단 후 1~2주 경과시 행동학적 반응 및 미세교세포의 증식은 계속 진행되나 미세교세포의 pERK 발현은 1일 경과시에 비하여 현저하게 감소하였다.

본 연구에 사용된 신경병증 통증의 모델은 제5 및 제6번 요추신경을 척추신경절로부터 1 cm 이내의 원위부를 절제하

는 방법을 사용하였다. 임상적인 신경병증 통증과 유사한 만성 통증을 유발하는 실험동물 모델에는 말초신경의 물리적 손상법이 주로 사용되어 왔으며 각각의 방법은 나름대로의 장단점을 지니고 있다. 현재 널리 사용되는 신경병증 통증의 모델에는 만성적으로 좌골신경을 결찰하는 Bennett 모델³⁾, 좌골신경의 부분적 결찰(partial sciatic nerve ligation; PSL)을 사용하는 Selzer 모델³⁹⁾, 제5 및 제6번 요추신경을 척수신경절의 원위부에서 결찰하는 Kim & Chung 모델²²⁾이 사용되고 있으며 말초 신경을 결찰하는 방법도 loose ligation 과 tight ligation으로 세분할 수 있다. 본 연구에 사용된 방법은 Kim & Chung²²⁾ 모델의 변형으로서 신경을 결찰하지 않고 절단한다는 점에서 원래의 방법과 차이를 지닌다. 이 방법은 원래의 Kim & Chung²²⁾ 방법에 비하여 결찰의 강도 차이에 따른 실험동물 개체간의 통증유발 정도의 차이를 배제할 수 있으며, 결찰시에 비하여 비교적 좁은 시야에서 수술이 가능하므로 척추와 근육의 손상을 최소화할 수 있고, 비교적 짧은 시간내에 수술이 가능하다는 장점을 지니고 있으며 통증유발의 효과에 있어서는 양자간에 큰 차이가 없는 것으로 생각되고 있다. 본 연구의 결과에서 Von Frey test 상의 기계적 과민통증의 역치는 수술 후 2주까지 대조군에 비하여 현저하게 감소되었으므로 효과적인 신경병증 통증이 유발됨을 확인하였다.

신경세포 혹은 신경교세포에서 MAPK의 발현과 신경병증 통증 유발의 상관관계에 관련된 연구는 최근에 이르러 활발하게 이루어지고 있다. MAPK 경로의 기본적 기능은 세포의 부의 자극에 따른 세포핵내 유전자 발현프로그램을 조절하는 신호전달과정이다. MAPK 종류에는 ERK, p38, cJun N terminal kinase (JNK) 및 ERK5가 속하며, 이중 통증 감각과 관련된 것으로 알려진 ERK(= p43, 44 MAPK)와 p38 MAPK는 기능상의 차이점을 지닌다고 생각되고 있다⁴⁵⁾. 즉 ERK는 발생과정에서는 세포의 증식과 분화에 관여하고, 성체에서는 신경세포의 가소성에 관여하는데 비하여 p38 MAPK는 스트레스에 의하여 활성화되는 protein kinase로서 손상에 대한 반응과 세포의 사망에 관여 한다고 알려져 있다^{19,45)}.

신경병증과 MAPK의 연관성에 관한 연구는 대부분 척수 신경절과 미세교세포에서 p38 MAPK의 활성화에 대한 연구가 주를 이루고 있다. Nomura 등³⁵⁾은 좌골신경의 손상 후 척수의 운동신경 세포에서 p38 MAPK, Hsp 25 및 Akt들의 발현이 증가된다고 하였으며, Kim 등²³⁾은 좌골신경의 결찰, 말초의 염증 혹은 좌골신경 절단 후 척수신경절에서 phospho-p38 MAPK (P-p38 MAPK)의 면역반응을 관찰한 결과 결찰 혹은 말초염증의 경우는 P-p38 MAPK가 양측의 척수신경절

에서 증가되나 신경절단시에는 감소되며, 척수의 미세교세포에서도 P-p38 MAPK의 발현이 증가된다고 주장하였다. 또한 Tsuda 등⁴³⁾은 말초신경 손상 후 p38 MAPK의 증가는 척수의 미세교세포에서만 유발되며, 다른 신경세포 혹은 별아교세포에서는 일어나지 않는다고 하였다.

이상과 같이 대부분의 신경병증 통증과 MAPK에 대한 연구가 p38 MAPK에 집중되어 있으며, 본 연구에 사용된 ERK와 신경병증 통증과의 관련성에 대한 보고는 드물다. Ma 등²⁷⁾은 좌골신경을 부분적으로 결찰한 후 척수와 박속핵(gracile nucleus)의 별아교세포에서 ERK와 JNK의 활성화가 증가하였다고 하였다. 그러나 본 연구 결과 모든 시간경과군에서 별아교세포는 pERK를 발현하지 않았으므로 위의 보고와는 명확한 차이가 있었다. Ma 등²⁷⁾의 실험 결과에서 나타난 공초점현미경 관찰에 기술적인 문제점이 있는 것으로 예상되며, 공초점 현미경상의 채널간의 간섭에 의한 것으로 생각된다. 또한 현재까지 보고된 많은 신경손상 연구에서 별아교세포에서 MAPK의 발현은 위의 연구가 유일하다는 사실도 이를 뒷받침 한다고 판단된다. 신경손상에서 ERK도 p38 MAPK와 동일하게 미세교세포에서 주로 발현된다고 생각하며, Cheng 등⁶⁾은 척수의 후근(dorsal root)을 절제한 후 척수에서 pERK가 미세교세포에서 발현되며, 신경세포는 C-fos를 발현한다고 주장하여 본 연구의 결과를 입증 한다고 볼 수 있다. 척수의 후근 절제는 감각신경자체를 차단하므로 본 연구에서 사용된 신경병증 통증과는 차이가 있으나, 통증의 기전에 있어서는 공통점을 지니고 있다고 생각된다. 본 연구와 같이 제5 및 제6번 요추의 신경이 절제된 경우, 제5 및 제6번 요추 분절의 척수신경절 및 말초신경은 기능을 상실하게 되므로 제5 및 제6번 요추 분절에 해당되는 피부에서의 감각 입력신호는 신경연결이 남아있는 제4번 요추신경의 후근을 통해서 전달되며, 척수의 제5 및 제6번 요추 분절은 입력의 소실로 인하여 2차 감각 신경세포의 감각 상태가 유발된다고 볼 수 있다. 따라서 척수후근절제와 말초신경절단은 유사한 기전에 의하여 통증을 유발하며, 이때 미세교세포에서 ERK의 발현이 나타나는 것으로 판단된다.

본 연구에서 pERK는 신경 절단 후 1일부터 동측의 lamina I, II에서 발현되었으며, pERK를 발현하는 대부분의 신경세포들은 NK1을 발현하는 세포임을 알 수 있었다. 척수신경절과 척수의 신경세포에서 ERK의 활성화는 전사 의존(transcription dependent) 혹은 전사 비의존적인 방법으로 과민통각을 유발시키고, 유지하는데 관여한다고 알려져 있다^{1,18,19,21)}. lamina I의 신경세포들은 통증에 관련된 일차감각 정보를 받

아들이며, 또한 통각의 인식에 중요한 신경핵으로 투사한다⁸⁾. 흰쥐의 경우 lamina I에 존재하는 투사신경세포의 80%가 NK1을 발현하며^{29,42)}, NK1 신경세포들은 통증에 특이적인 TRPV1(VR1) 양성 일차감각 섬유에서 오는 입력을 받으며¹⁵⁾, 통증 감각정보를 lateral parabrachial nucleus (LPB) 및 caudal ventrolateral medulla (CVLM)으로 전달한다고 알려져 있다⁴⁰⁾. 따라서 신경절단 후 lamina I의 NK1 신경세포에서의 pERK 발현은 과민통각의 하나의 기전이며, 본 연구 결과는 이를 뒷받침하는 이론적 근거를 제시한다고 판단된다. 신경손상 후 신경교세포에서 pERK의 발현을 관찰한 결과 별아교세포는 pERK를 발현하지 않았으며, 미세교세포에서는 1일 경과 시에 강하게 발현하였고, 이후에는 감소되었다. 과거 오랫동안 병적통증은 단지 신경세포의 작용에 의해 이루어지며, 신경교세포는 세포-세포간의 신호교환에 관여하지 않는다고 믿어왔다. 그러나 최근의 많은 연구에서 별아교세포와 미세교세포가 피부의 염증 혹은 말초 신경손상, 척수후근의 결찰, 척수절단 등에서 나타나는 병적통증의 유발과 유지에 관여한다는 증거들이 제시되어 왔으며⁷⁾, 또한 신경교세포들은 신경세포와 역동적인 정보교환을 한다고 생각되고 있다¹⁴⁾. 활성화된 신경교세포들은 reactive oxygen species, nitric oxide, arachidonic acid, leukotriene, prostaglandin, glutamate, aspartate 등과 같은 흥분성 아미노산, nerve growth factor, enkephalinase 등과 같은 신경활성 물질들을 분비하며²⁶⁾, 척수에서 일차 감각신경을 포함한 신경말단에서 substance P 및 아미노산과 같은 흥분성 신경전달물질의 분비를 촉진시킬 수도 있다^{16,28)}. 또한 신경교세포들은 감각신경의 연결부위를 둘러싸고 세포외부의 신경활성 물질의 흡수를 조절할 수 있으며, 활성화된 신경교세포가 glutamate의 흡수를 억제하는 경우 세포내 glutamate의 농도를 증가시켜 연결의 활성을 증가시킬 수 있다²⁶⁾. 신경교세포가 과도한 통증의 유발에 관여한다는 다른 증거로서 신경교세포에 선택적으로 결합하는 성질을 지닌 세균막 등과 같은 병인물질을 척수강내에 주입한 연구^{32,33)} 및 신경세포의 흥분성 신경세포막에서 발산되어 신경교세포를 활성화시키는 물질인 fractalkine을 주입한 연구에서 기계감각에 대한 과민통증이 유발됨을 들 수 있다⁵⁾. 또한 미세교세포의 억제제인 minocycline을 신경절제 이전에 투여하면 신경병증 통증이 현저하게 억제된다는 연구보고도 있다³⁶⁾. 이상의 이론과 본 연구를 통하여 미세교세포 및 별아교세포와 같은 신경교세포가 신경병적통증에 밀접하게 관련된다는 증거는 명확하며, 미세교세포와 별아교세포의 신호전달에 관여하는 MAPK의 활성 변화가 중요함을 알 수 있

다. 그러나 별아교세포에서는 현재까지의 알려진 바와 달리 신경병적 통증에서 pERK를 발현하지 않음이 본 연구를 통하여 확인되었다.

OX-42의 면역반응을 나타내는 미세교세포는 신경절단 후 1일경과시부터 동측의 척수에서 증가되었으며, 1주 이후에는 시간이 경과할수록 현저하게 증가되었으나, 미세교세포에서 pERK의 발현은 1일 경과시에만 관찰되었고, 1주 이후에는 대부분의 미세교세포에서 pERK를 발현하지 않았다. 이는 현재까지 알려진 바와 같이 과민통증 상태의 유지에 관여한다는 p38 MAPK⁴⁴⁾와 달리 ERK는 과민통증을 유발시키는 단계에서만 미세교세포에서 발현된다고 할 수 있다. 이러한 결과와 일치되는 보고로서 Ragagvendra 등³⁶⁾은 미세교세포의 억제제가 신경 손상에 의한 과민통증의 형성을 억제할 수 있으나, 기존의 과민통증에는 효과가 없다고 보고하였다.

본 연구에서는 신경병증 통증의 형성과정에서 미세교세포에서 ERK의 활성화가 유발되고, 신경세포에서의 ERK 활성화는 장기간 지속된다는 것을 알 수 있었고, 이러한 결과는 신경병증 통증의 치료 수단의 확보 및 적절한 치료 시기의 결정에 기본 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.



결론

제5 및 제6번 요추신경 절단에 의한 신경병증 통증모델에서 신경세포 및 신경교세포내 ERK의 활성화와 과민통증과의 상관관계를 규명하기 위하여 수술 후 시간경과에 따라 행동학적 방법으로 통증 역치의 변화, 면역조직화학적 방법으로 척수의 신경세포 및 신경교세포의 pERK 발현 양상의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 기계적 자극에 대한 통증의 역치는 척추신경 절단 후 1일부터 현저하게 감소하였으며, 1주 및 2주 경과시까지 유지되었다.
- 2) pERK는 신경 절단 후 동측 후각의 lamina I, II의 NK1 양성 신경세포와 후각 및 전각의 미세교세포에서 발현되었다.
- 3) 신경 절단 후 동측 후각의 NK1 양성신경 세포는 1일부터 2주 경과시까지 pERK를 발현하였다.
- 4) OX-42의 발현은 1일 경과시부터 동측에서 증가되었으며, 1주 경과부터 현저하게 증가되어 2주 경과시까지 지속되었다.
- 5) 미세교세포는 신경 절단 후 1일 경과시에는 pERK를 발현하였으나, 1주 이후에는 대부분의 미세교세포에서 pERK를 발현하지 않았다.

결론적으로 신경병증 통증에서 ERK의 활성화는 NK1 양성 신경세포에서 지속되며, 미세교세포에서의 ERK 활성화는 신경병증 통증의 초기 형성과정에 기여하는 것으로 생각된다.



참 고 문 헌

1. Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO: Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **J Neurosci** 21(17):6933-9, 2001
2. Backonja, MM: Defining Neuropathic Pain. **Anesth Analg** 97(3):785-790, 2003
3. Bennett, GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain** 33(1):87-107, 1988
4. Chaplan, SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods** 53(1):55-63, 1994
5. Chapman GA, Moores K, Harrison D, Campbell CA, Stewart BR, Strijbos PJ: Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. **J Neurosci** 20(15):RC87, 2000
6. Cheng XP, Wang BR, Liu HL, You SW, Huang WJ, Jiao XY, et al: Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is predominantly enhanced in the microglia of the rat spinal cord following dorsal root transection. **Neuroscience** 119(3):701-712, 2003
7. Colburn RW, DeLeo JA: The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Brain Res Bull** 49(6):419-427, 1999
8. Craig AD: Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. **J Comp Neurol** 361:225-248, 1995
9. Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamana H, et al: Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. **J Neurosci** 22(17):7737-7745, 2002
10. Dworkin RH: An overview of neuropathic pain. **Clin J Pain** 18(6):343-349, 2002
11. Fields HL, Rowbotham M: Postherpetic neuralgia. **Neurobiol Dis** 5:209-227, 1998
12. Fields RD, Eshete F, Stevens B, Itoh K: Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca^{2+} , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. **J Neurosci** 17:7252-7266, 1997
13. Galan A, Lopez-Garcia JA, Cervero F, Laird JM: Activation of spinal extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. **Neurosci Lett** 322(1):37-40, 2002
14. Haydon PG: GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci** 2(3):185-193, 2001
15. Hwang SJ, Burette A, Valtchanoff JG, Rustioni A: VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. **J Comp Neurol** 460(2):255-265, 2003
16. Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, et al: Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. **J Neurochem** 73(5):2206-2213, 1999
17. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ: Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. **Nat Neurosci** 2:1114-1119, 1999
18. Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ: ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. **J Neurosci** 22:478-485, 2002
19. Ji RR, Woolf CJ: Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: Implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis** 8(1):1-10, 2001
20. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR: p38 mitogenactivated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **J Neurosci** 23(10):4017-4022, 2003
21. Karim F, Wang CC, Gereau RW: Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. **J Neurosci** 21(11):3771-3779, 2001
22. Kim, SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain** 50(3):355-363, 1992

23. Kim SY, Bae JC, Kim JY, Lee HL, Lee KM, Kim DS: Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. **Neuroreport** **13**(18):2483-2486, 2002
24. Koltzenburg M, Scadding J: Neuropathic pain. **Curr Opin Neurol** **14**(5):641-647, 2001
25. Kominato Y, Tachibana T, Dai Y, Tsujino H, Maruo S, Noguchi KY: Changes in phosphorylation of ERK and Fos expression in dorsal horn neurons following noxious stimulation in a rat model of neuritis of the nerve root. **Brain Res** **967**(1-2):89-97, 2003
26. Kreutzberg GW: Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci** **19**(8):312-318, 1996
27. Ma W, Quirion R: Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase(ERK) and c-Jun N-terminal kinase(JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. **Pain** **99**(1-2):175-184, 2002
28. Malcangio M, Bowery NG, Flower RJ, Perretti M, Bowery NG: Effect of interleukin-1 beta on the release of substance P from rat isolated spinal cord. **Eur J Pharmacol** **299**(1-3): 113-118, 1996
29. Marshall GE, Shehab SA, Spike RC, Todd AJ: Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. **Neuroscience** **72**:255-263, 1996
30. Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, et al: MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. **Neuron** **18**:899-912, 1997
31. Mellegers MA, Furlan AD, Mailis A: Gabapentin for neuropathic pain. **Clin J Pain** **17**(4):284-295, 2001
32. Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF: The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology** **33**(11):1471-1478, 1994
33. Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey, KJ, et al: Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1(HIV-1) envelope glycoprotein, gp 120. **Brain Res** **861**(1):105-116, 2000
34. Murashov AK, Ul Haq I, Hill C, Park E, Smith M, Wang X, et al: Crosstalk between p38, Hsp25 and Akt in spinal motor neurons after sciatic nerve injury. **Brain Res Mol Brain Res** **93**(2):199-208, 2001
35. Nomura H, Furuta A, Suzuki SO, Iwaki T: Dorsal horn lesion resulting from spinal root avulsion leads to the accumulation of stress-responsive proteins. **Brain Res** **893**(1-2):84-94, 2001
36. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo, JA: Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther** **306**(2):624-630, 2003
37. Rosen LB, Ginty DD, Weber, MJ, Greenberg ME: Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. **Neuron** **12**(6):1207-1221, 1994
38. Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. **Faseb J** **9**(9):726-735, 1995
39. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain** **43**(2):205-218, 1990
40. Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ: A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. **Eur J Neurosci** **18**:2433-2448, 2003
41. Sweatt JD: Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. **Neuron** **31**(5):671-674, 2001
42. Todd AJ, McGill MM, Shehab SA: Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. **Eur J Neurosci** **12**:689-700, 2002
43. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami, Y. Koizumi, S. Inoue, K: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia** **45**(1):89-95, 2004
44. Watkins LR, Milligan ED, O'Beirne HA: Spinal cord glia: New players in pain. **Pain** **93**(3):201-205, 2001
45. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL: Mitogenactivated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev** **79**(1):143-180, 1999
46. Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet** **353**(9168):1959-1964, 1999
47. Zimmermann M: Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol** **429**(1-3):23-37, 2001