

심부통증이 흰쥐 중뇌에 미치는 c-Fos 면역반응성의 변화와 아스피린의 효과

동아대학교 의과대학 소아과학교실, 해부학교실*

정진아 · 유기수* · 황규근

Changes of c-Fos Immunoreactivity in Midbrain by Deep Pain and Effects of Aspirin

Jin A Jung, M.D., Ki Soo Yoo, Ph.D.* and Kyu Keun Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, Anatomy, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea*

Purpose : It had been suggested that pain arising from deep somatic body regions influences neural activity within periaqueductal gray(PAG) of midbrain via distinct spinal pathways. Aspirin is one of the popular non-steroidal anti-inflammatory drugs used in the management of pain. Fos expression was used as a marker for neuronal activity throughout central neurons following painful peripheral stimulation. This study was prepared to investigate changes of c-Fos immunoreactivity in midbrain by deep pain and effects of aspirin.

Methods : Male Sprague-Dawley rats were injected with 0.1 mL of 5% formalin in the plantar muscle of the right hindpaw. For experimental group II, aspirin was injected intravenously before injection of formalin. An aspirin-untreated group was utilized as group I. Rats were sacrificed at 0.5, 1, 2, 6 and 24 hours after formalin injection. Rat's brains were removed and sliced in rat brain matrix. Brain slices were coronally sectioned at interaural 1.00-1.36 mm. Serial sections were immunohistochemically reacted with polyclonal c-Fos antibody. The numbers of c-Fos protein immunoreactive neurons in ventrolateral periaqueductal gray(VLPAG) and dorsomedial periaqueductal gray(DMPAG) were counted and analyzed statistically with Mann-Whitney U tests.

Results : Higher numbers of c-Fos protein immunoreactive neurons were found in VLPAG. In both VLPAG and DMPAG of formalin-treated group, the numbers of c-Fos protein immunoreactive neurons were significantly higher at all time points than the formalin-untreated group, which peaked at two hours. The numbers of c-Fos immunoreactive neuron of the aspirin-treated group were less compared to the aspirin-untreated group at each time point.

Conclusion : These results provide some basic knowledge in understanding the mechanism of formalin-induced deep somatic pain and the effects of aspirin. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:695-701)

Key Words : Aspirin, Pain, Formalin, c-Fos, PAG

서 론

통증은 환자들이 호소하는 흔한 증상 중의 하나이지만, 통증이 유발되고 자극이 중추신경계로 전달되는 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다¹⁻³⁾. 통증은 체지각, 감정, 동기 및 사회적인 요소들간의 상호작용으로 인해 결정되는 복합적인 증상이며, 나이, 성별, 유발부위에 따라서도 신경로를 달리한다고 알려져 있다^{4, 5)}.

화학물질을 인위적으로 동물에게 가하면 침해통증을 일으켜 동물들은 스트레스를 받은 정도, 뇌의 상태 및 환경적 요소들로 인해 다양한 반응을 보인다는 것이 입증되었다⁶⁻⁸⁾. 그 중 포르말린이 급성 및 만성 통증의 모델로 적합하다는 평가를 받고 있다.

동물들은 통증의 종류와 자극을 받은 부위에 따라 각기 다른 정형적인 반응을 나타낸다는 것이 확인되었다⁹⁾. 흰쥐의 발바닥에 포르말린을 피하주사하면 동물은 척수 수준의 반사운동, 굴곡운동과 척수 및 척수상위수준의 활는 행위를 하게 된다. 이와 더불어 통증자극은 뇌로 전달되어 통증과 관련된 부위뿐만 아니라 스트레스와 관련된 부위에도 전달된다는 것이 일부 알려져 있다^{10, 11)}.

접수 : 2003년 2월 4일, 승인 : 2003년 4월 11일

책임저자 : 정진아, 동아대학교병원 소아과

Tel : 051)240-5617 Fax : 051)242-2765

E-mail : jina1477@daunet.donga.ac.kr

최근 들어 조기발현유전자(immediate-early genes)인 *c-fos*, *c-jun* 등은 통증 등의 스트레스인자들과 관련된 신경로와 뇌활동의 양상을 추적하는 신경해부학적 표지자로 각광받고 있다. 그중 *c-fos*는 신경전달물질에 의해 수 분내에 다양한 형태의 세포에서 활성화된다¹²⁾. 통증자극 후 척수 후각의 신경원에서 *c-fos*가 발현되므로 Hunt 등¹³⁾이 척수 후각의 통각로의 활성을 측정하기 위해 *c-fos* mRNA의 산물인 c-Fos 단백을 항원으로 하는 면역조직화학방법을 최초로 이용한 이래, 여러 가지 체성 및 내장성 침해통증자극을 가했을 경우 척수 및 뇌에서 c-Fos 단백질 발현에 대한 많은 연구가 보고되었으며¹⁴⁻¹⁸⁾, 현재 이 기법은 통증 효과를 검증하는 최상의 형태학적 방법으로 평가되고 있다¹⁹⁾.

한편, 비스테로이드성의 항염증성 약품들은 말초조직에서 프로스타글란딘 합성을 방해하여 진통효과를 유발시킨다고 알려져 왔으며 일반적으로 말초진통제라고 불린다. 이 약품들은 척수와 뇌간에서도 진통효과가 있을 것이라는 추측과 아울러 이를 입증할 만한 연구결과도 있었다²⁰⁾.

비스테로이드성 소염진통제이며 안정성이 높은 아스피린은 중추 및 말초신경조직에서 프로스타글란딘의 합성을 억제하기 때문에 염증성 통증을 감소시키는 약리작용을 한다고 알려져 있다²¹⁾.

근육과 관절 등에서 유발된 심부통증이 척수상위로 전달되는 신경로에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 최근 일부 연구자들은 피부에서 유발된 천부통증과는 달리 중뇌의 PAG에 위치한 신경원에 침해자극이 전달되어 자율신경계와 행동양식에 영향을 줄 것이라는 가설을 보고하였다^{22, 23)}.

그러므로 연구자들은 포르말린으로 체성 심부통증을 유발시킨 중뇌에서 통증자극에 반응을 나타내는 신경세포를 c-Fos 단백질의 발현으로 확인하고, 또한 아스피린의 효과를 알아보려고 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 성숙하고 건강한 200-250 g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐였으며 스트레스를 받지 않도록 배려한 상태로 사육하였고, 실험 I군(25마리), 실험 II군(25마리) 및 정상군(5마리)을 합쳐 총 55마리를 사용하였다.

2. 통증 유발 및 아스피린 주사 방법

1) 실험 I군

특수 고안된 플라스틱 용기에 흰쥐를 고정한 뒤 0.9% 생리식염수를 흰쥐 꼬리에 정맥주사(0.1 mL)한 다음 15분 경과 후 오른쪽 뒷발바닥 근육에 5% 포르말린용액 0.1 mL를 주사하였다.

2) 실험 II군

특수 고안된 플라스틱 용기에 흰쥐를 고정한 뒤 아스피린을 흰쥐 꼬리에 정맥주사(0.1 mL, 500 mg/kg)한 다음 15분 경과 후 오른쪽 뒷발바닥 근육에 5% 포르말린용액 0.1 mL를 주사하

였다.

3) 정상군

실험동물이 스트레스를 받지 않는 상태에서 아무런 처치도 하지 않았다.

3. 관찰시기 및 뇌절편 제작

3.5% chloral hydrate(1 mL/100 g)를 주사하여 동물을 마취시킨 상태에서 머리를 분리시킨 뒤 최단시간 내에 뇌를 적출하였다. 뇌를 rat brain matrix(RBM)에 넣고 면도날로 상구(superior colliculus)를 통과하는 관상절단 뇌절편을 만들었다.

뇌 적출시기는 포르말린 피하주사 후 30분, 1, 2, 6, 24시간으로 정하였다.

4. 표본제작

뇌절편을 탄산가스(CO₂ gas)로 동결고정한 후 동결절편기(Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 약 6 μm 두께로 조직절편을 제작하여 poly-l-lysine coated slide에 부착시켰으며 조직절편은 interaural 1.00-1.36 mm 사이를 통과하는 절편만을 선택하였다. 조직절편을 40℃의 조직신전기에서 40분 정도 충분히 말린 다음 4℃에서 4% paraformaldehyde로 5분간 고정하였고, 이를 다시 조직신전기에서 2시간 이상 충분히 말렸다.

조직절편을 0.02 M 인산염완충액(pH. 7.4, PBS)에서 약 10분 동안 2회 수세한 후 조직내 과산화효소의 활성을 제거하기 위해 0.3% 과산화수소(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올 용액에서 20분간 처리하고, PBS에서 10분간 3회 수세한 다음 5% 정상염소혈청(normal goat serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 수세하지 않고 가볍게 털어낸 다음 일차항체인 rabbit anti-rat c-Fos antibody(희석비율 1:500, OncoGene, U.S.A.)를 4℃에서 48시간 동안 반응시켰다.

일차항체를 적용시킨 뒤 PBS에서 10분씩 3회 수세하였고, 이어서 이차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Lab., U.S.A.)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 10분씩 3회 수세한 다음 30분 전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 avidin-biotin horseradish peroxidase complex(ABC)용액(Vector Lab., U.S.A.)을 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 이어서 이들 조직절편을 PBS에서 10분씩 3회 수세한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)에 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma Co., U.S.A.)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 약 10분간 처리하여 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 발색상태를 광학현미경으로 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간씩 차례로 수세한 다음, 통상적인 조직제작과정을 거쳐 Permount(Poly-science, U.S.A.)로 봉입하였다.

면역염색은 대조실험에서는 상기 일차항체 적용과정을 생략하거나 ABC 용액 적용과정을 생략하였고, 이 과정을 거친 표본에서는 어떤 면역반응성도 나타나지 않아 면역염색의 특이성을 확인하였다.

Table 1. The Average Numbers of c-Fos Protein Immunoreactive Neurons in VLPAG

Groups	Normal	30 min	1 hour	2 hours	6 hours	24 hours
Group I	7.8±0.1	8.7±0.2*	9.6±0.6*	11.2±0.4*	9.7±0.9*	8.4±0.7*
Group II	7.8±0.1	8.5±0.6* [†]	9.2±0.7* [†]	9.8±0.6* [†]	9.1±0.6* [†]	8.2±0.4* [†]

The average numbers of unit area(0.2 mm²) represent mean±standard deviation(S.D.)

*P<0.01 on Mann-Whitney U test to the normal, [†]to group I

VLPAG : ventrolateral periaqueductal gray

5. 관찰 및 계수

광학현미경(Axiophot, Germany)으로 조직표본을 관찰한 후, c-Fos 단백 항체에 양성반응을 보이는 신경세포 수를 계수하였다. 계수부위는 경계가 명확한 복외측중뇌수도회색질(ventrolateral periaqueductal gray, VLPAG)과 배내측중뇌수도회색질(dorsomedial periaqueductal gray, DMPAG)로 국한시켰다. 단위면적(0.2 mm²)에서 관찰된 세포수의 평균값을 구한 다음 정상군과 실험군 및 실험군 간의 통계적 유의성을 Mann-Whitney U test를 이용하여 검증하였다.

결 과

연구자들은 포르말린으로 체성 심부통증을 유발시켜 중뇌에서 통증자극에 반응을 나타내는 신경세포를 c-Fos 단백질의 발현으로 확인하고 또한 아스피린이 심부통증을 완화시킬 수 있는지를 알아보고자 이 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. VLPAG의 변화

실험 I군에서 면역양성반응세포수는 정상군에 비해 전시기에 걸쳐 증가되어 있었고, 시기별로는 통증유발 30분 후부터 증가되다가 2시간에 최고치에 달하였으며, 그 후 24시간까지 감소하였다(Table 1, Fig. 1, 2). 실험 II군에서도 면역양성반응세포수는 정상군에 비해 전시기에 걸쳐 증가되어 있었고, 시기별로는 통증유발 30분 후부터 증가되다가 2시간에 최고치에 달하였으며, 그 후 24시간까지 감소하였다(Table 1, Fig. 1, 2).

실험 I군과 실험 II군 사이에서 시기에 따른 면역양성반응세포의 수적 차이는 전시기에 걸쳐 실험 II군이 실험 I군에 비해 양성반응을 보인 세포수가 적었으며 특히 통증유발 2시간 후에서 현저한 차이를 보였다(P<0.01, Table 1).

2. DMPAG의 변화

정상군, 실험군 모두에서 DMPAG에서는 VLPAG에서 보다 면역양성반응세포수가 적었다(Table 1, 2).

실험 I군에서 면역양성반응세포수는 정상군에 비해 전시기에 걸쳐 증가되어 있었고, 시기별로는 통증유발 30분 후부터 증가되다가 2시간에 최고치에 달하였으며, 그 후 24시간까지 감소하였다(Table 2, Fig. 3, 4). 실험 II군에서도 면역양성반응세포수는 정상군에 비해 전시기에 걸쳐 증가되어 있었고, 시기별로는

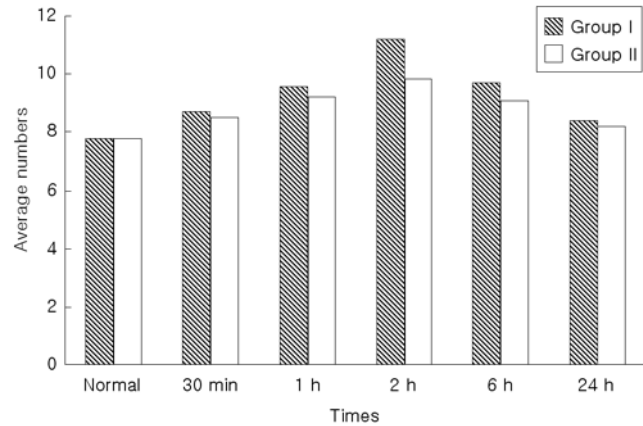


Fig. 1. The average numbers of c-Fos protein immunoreactive neurons in VLPAG.

통증유발 30분 후부터 증가되다가 2시간에 최고치에 달하였으며, 그 후 24시간까지 감소하였다(Table 2, Fig. 3, 4).

실험 I군과 실험 II군을 비교하여 시기별로 면역양성반응세포의 수적 차이는 전시기에 걸쳐 실험 II군이 실험 I군에 비해 양성반응을 보인 세포수가 적었으며 특히 통증유발 2시간 후에서 현저한 차이를 보였다(P<0.01, Table 2).

고 찰

현재까지 통증연구를 위한 다양한 동물모델들이 개발되어 왔지만 실험동물에 포르말린을 투여하는 포르말린 시험이 가장 보편화되어 있다⁷⁾. 포르말린에 의해 유발된 침해자극은 조직손상을 초래하기 때문에 통증이 지속되는 특징이 있어서 흰쥐, 마우스, 고양이, 영장류 등 실험동물의 통증모델로 흔히 사용되어왔다^{9, 24)}. 흰쥐나 마우스의 앞발이나 뒷발에 포르말린을 주사하면 두 단계의 전형적인 반응이 일어난다. 첫째 단계는 발에 5분간 경련반사가 지속되는 급성기(acute phase)인데 포르말린이 직접 침해수용체에 작용하여 척수반사가 일어났기 때문으로 해석된다^{25, 26)}. 이어 둘째 단계로 이행되어 발을 핥고, 흔드는 강직기(tonic phase)가 나타나며 약 40분간 지속된다. 이 모든 포르말린 시험의 전형적 행동들은 많은 연구자들에 의해 재확인되고 정량화 되었다^{7, 10, 11, 23, 27)}. Woolf³⁾에 의해 정의된 임상적 통증의 모든 특징들이 포르말린에 의해 유발된 통증모델에서 나타난다고 주장하는 연구자도 있어⁷⁾, 이 실험에서는 체성 통증의 모델

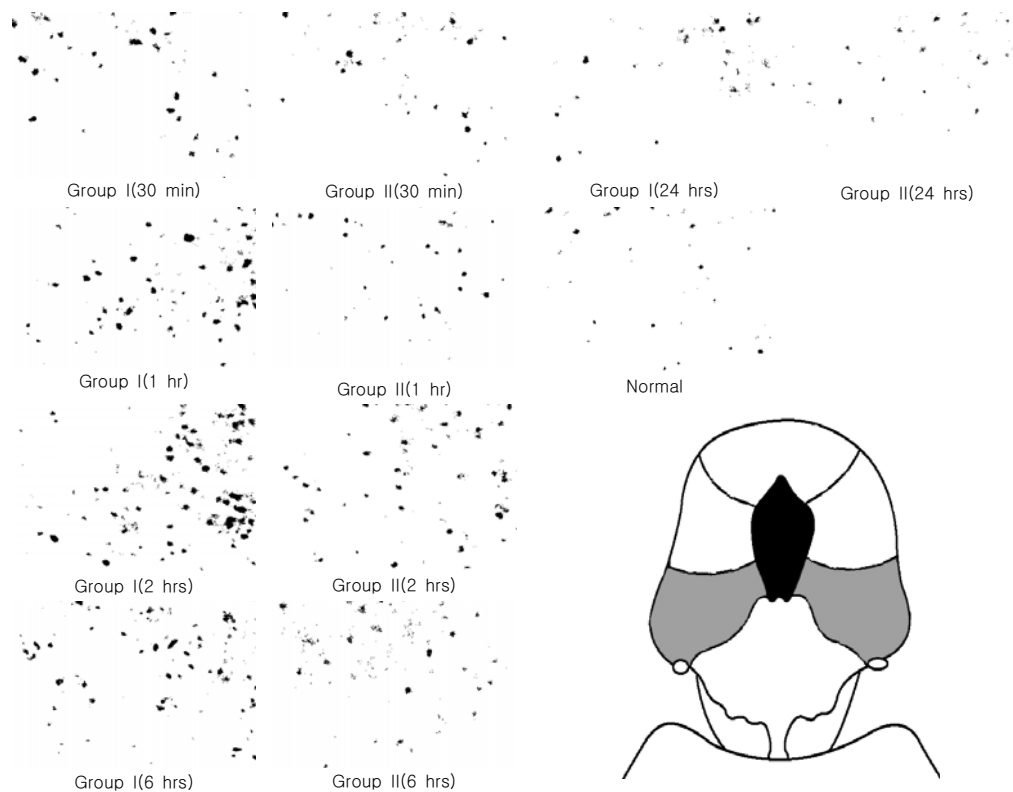


Fig. 2. The expression patterns of c-Fos protein immunoreactive neurons in the VLPAG. Black region is mesencephalic aqueduct and gray region is VLPAG.

Table 2. The Average Numbers of c-Fos Protein Immunoreactive Neurons in DMPAG

Groups	Normal	30 min	1 hour	2 hours	6 hours	24 hours
Group I	4.6±0.1	4.9±0.2*	5.3±0.6*	6.4±0.4*	5.5±0.9*	4.8±0.7*
Group II	4.6±0.1	4.7±0.5*, †	5.1±0.7*, †	5.6±0.6*, †	5.3±0.6*, †	4.7±0.4*, †

The average numbers of unit area(0.2 mm²) represent mean±standard deviation(S.D.)

*P<0.01 on Mann-Whitney U test to the normal, †to group I

DMPAG : dorsomedial periaqueductal gray

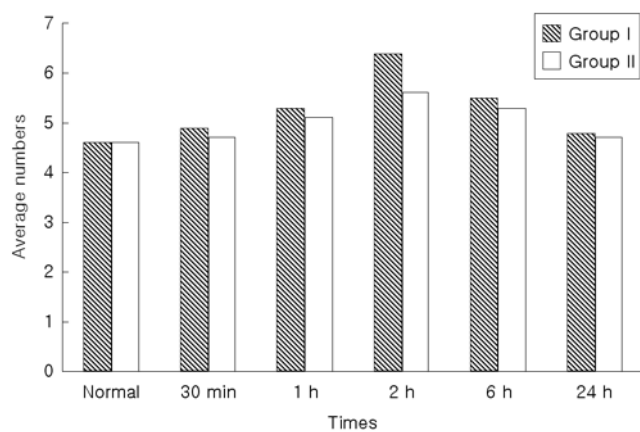


Fig. 3. The average numbers of c-Fos protein immunoreactive neurons in DMPAG.

로 포르말린 시험을 채택하게 되었다.

이 실험에서는 흰쥐 발바닥에 5% 포르말린 0.1 mL를 투여해 체성통증을 유발 시킨 실험 II군에서 위와 같은 전형적인 이상성 (biphasic) 행동들을 확인할 수 있었다.

여러 가지 통증자극을 주면 통증과 관련된 척수 및 그 상위 신경계의 신경세포들은 활성화된다. 이 통각정보들은 다양한 신경전달물질에 의해 중추신경계로 전달되게 된다. 그러나 통각정보 전달을 연구하면서 각각의 신경전달물질로 추적하는 데는 어려움이 많으므로 신경세포의 공통적인 인자를 사용하면 편리할 것이다. 이 편리한 추적자가 바로 조기발현유전자인데 세포가 자극 받았을 때 저농도에서도 빨리 발현한다^{28, 29)}. 이 조기발현유전자가 신경세포에서만 발현되는 것은 아니지만 신경세포의 활성도를 측정하는 추적자로 적합하다고 결론 내린 연구결과들이 많으며 c-Fos가 흔히 사용되는 조기발현유전자의 하나이다³⁰⁻³²⁾.

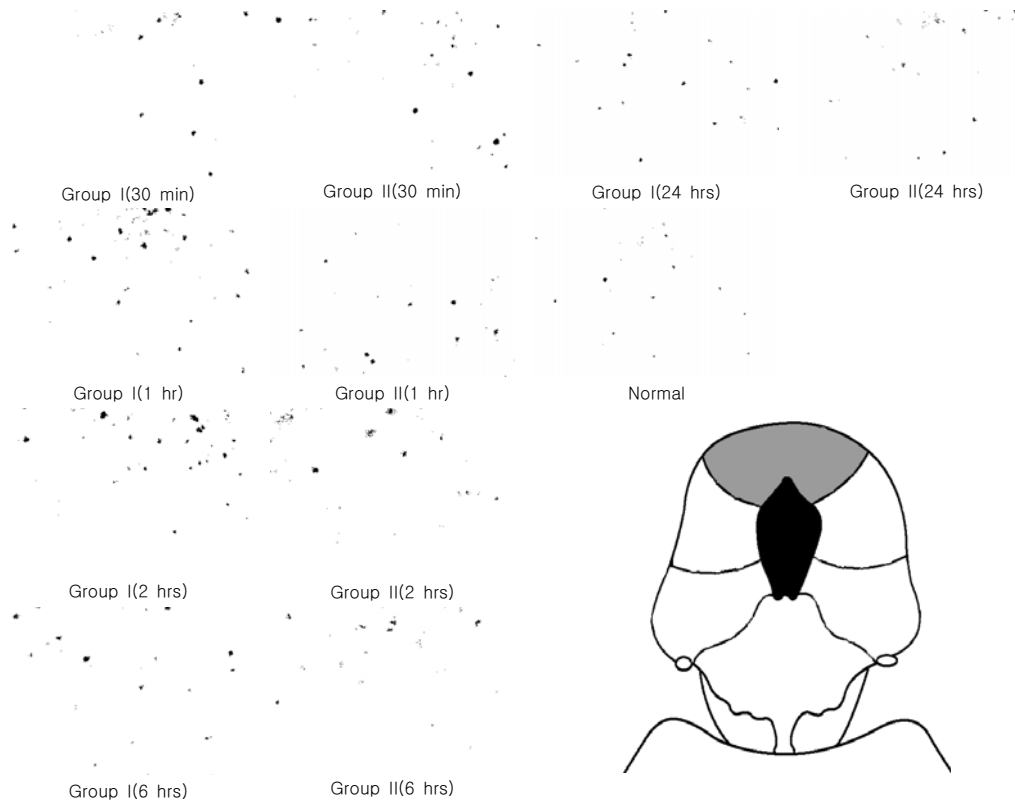


Fig. 4. The expression patterns of c-Fos protein immunoreactive neurons in the DMPAG. Black region is mesencephalic aqueduct and gray region is DMPAG.

Hunt 등¹³⁾은 *c-fos* mRNA의 산물인 c-Fos 단백을 항원으로 하는 면역조직화학방법을 이용하여 통증 자극이 척수 후각의 신경세포에서 c-Fos 단백질을 발현시킨다는 것을 처음으로 입증하였다. 그 후 포르말린, carrageenan 등의 화학물질로 인한 침해자극 및 관절염 등으로 지속적인 통증자극이 유발되었을 때는 척수 후각에서 c-Fos의 발현이 일어나는데 반해 통증을 일으키지 않는 감각자극에 의해서는 c-Fos가 발현되지 않는다는 연구 보고들이 있다³³⁻³⁶⁾. 그 이후 c-Fos는 통증자극시 신경세포의 활성도를 추적하는데 유용하다는 사실이 여러 연구자들의 실험결과로 입증되었다¹³⁻¹⁸⁾.

이 실험에서는 체성 통증군 뿐만 아니라 정상군에서도 c-Fos가 발현되는 것이 관찰되었다. 정상군, 실험 I군, 실험 II군, 통증 유발 후 경과한 시기 및 뇌의 부위별로 c-Fos에 면역양성반응을 보인 신경세포를 계수해 본 결과 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다.

PAG는 통증을 수용하고 자율방어기능을 수행하는 중뇌의 한 부위라고 알려져 있다³⁷⁾. 흰쥐에서 PAG는 DMPAG, DLPAG, LPAG, VLPAG로 나뉜다³⁸⁾. Carbachol을 VLPAG에 투여하면 강직성 부동상태가 증가되고 dorsolateral and dorsomedial periaqueductal gary(DL/DMPAG)에 투여하면 강직성 부동성이 감소한다는 연구보고가 있어 최소한 이들 부위들은 기능이 서로

다르다고 볼 수 있다. 또한 VLPAG는 심체성이나 내장에서 유발된 침해자극에 특이적으로 활성화된다고 한다^{39, 40)}.

이 실험에서도 c-Fos 양성면역반응 신경세포 수가 DMPAG에서 보다 VLPAG에서 더 많이 관찰되었기 때문에 이 사실이 더욱 명백하다는 결론을 얻었다. 이 실험에서 PAG를 DMPAG, DLPAG, LPAG, VLPAG로 정확히 구분하여 계수하기가 곤란하여 경계가 분명히 차이가 나는 DMPAG와 VLPAG만을 선택하였으나 DLPAG나 LPAG는 DMPAG와 유사한 양상을 보였다. 앞으로 이들 부위에 대한 연구가 요구된다.

통증을 조절하는 비스테로이드성 소염진통제로 가장 널리 쓰이는 약물치료제는 아스피린이다. 아스피린은 1853년에 처음 합성되어 1899년에 의약품으로 쓰여졌고 화학명은 아세틸살리실산(acetylsalicylic acid)이며 의사의 처방 없이도 사용할 수 있다. 아스피린은 중추 및 말초신경에서 염증에 의한 통증을 느끼게 하는 프로스타글란딘의 합성을 억제하는 약리작용을 한다²¹⁾.

이 실험에서도 아스피린을 투여한 군의 c-Fos 양성면역반응 신경세포 수는 투여하지 않은 군보다 일괄성 있게 전시기에 걸쳐 감소되었기 때문에 아스피린은 통증관련 신경세포의 활성화를 억제시키는 효과가 있다고 생각되어진다.

요 약

목적 : 근육과 관절 등에서 유발된 심부통증(deep pain)이 척수상위로 전달되는 신경로에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 최근 일부 연구자들은 피부에서 유발된 천부통증(superficial pain)과는 달리 중뇌의 PAG에 위치한 신경원에 침해 자극이 전달되어 자율신경계와 행동양식에 영향을 줄 것이라는 가설을 보고하였다. 또한, 비스테로이드성의 항염증성 약품들은 말초조직에서 프로스타글란딘 합성을 방해하여 진통효과를 유발시킨다고 알려져 왔으나 최근에는 척수와 뇌간에서도 진통효과가 있을 것이라고 추측하고 있다. 그러므로 이 연구자는 포르말린으로 체성 심부통증을 유발시켜 중뇌의 어느 부위에서 신경세포가 활성화되는지를 c-Fos 단백질의 발현으로 확인하고 또한 비스테로이드성의 항염증성 약품인 아스피린의 효과를 알아보고자 이 연구를 시도하게 되었다.

방법 : 실험 I군에서는 생리식염수를 흰쥐 꼬리에 미리 피하 주사한 뒤 포르말린을 이용해 체성 심부통증을 유발시켰고, 실험 II군은 아스피린을 주사한 후 포르말린으로 체성 심부통증을 유발시켰다. 정상군에서는 통증자극을 주지 않았다. 실험 I군과 실험 II군의 흰쥐는 통증을 유발 시킨 뒤 30분, 1, 2, 6, 24시간에 희생시켜 뇌를 적출하여 뇌절편을 만들었다. 뇌절편으로 냉동 연속조직절편을 제작하여 면역조직화학적 방법으로 c-Fos 단백질의 출현여부를 확인하였다. Interaural 1.00-1.36 mm를 통과하는 관상 뇌절편의 연속조직표본에서 나타난 양성면역반응성을 토대로 중뇌의 VLPAG와 DMPAG를 관찰하였고, 단위면적(0.2 mm²)당 면역양성반응을 보인 신경세포를 계수하고 통계 처리하였다.

결과 : c-Fos 양성면역반응 신경세포 수는 DMPAG에서 보다 VLPAG에서 현저하게 많았다. DMPAG와 VLPAG에서 통증유발 2시간 후 c-Fos 양성면역반응 신경세포 수는 최고치에 도달하였다. 아스피린을 투여한 군의 c-Fos 양성면역반응 신경세포 수는 투여하지 않은 군보다 전시기에 걸쳐 적었다.

결론 : 이 연구결과는 포르말린에 의해 유발된 체성 심부통증의 기전과 아스피린의 효과를 이해하는데 기초적인 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Besson JM, Chaouch A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 1987;67:67-186.
- 2) Willis WD, Coggeshall RE. Sensory mechanisms in the spinal cord. 2nd ed. New York: Plenum Co, 1991:1-575.
- 3) Woolf CJ. Generation of acute pain: central mechanisms. *Br Med Bull* 1991;47:523-33.
- 4) Backonja MM, Galer BS. Pain assessment and evaluation of patients who have neuropathic pain. *Neurol Clin* 1998;16:775-90.

- 5) Allen RR. Neuropathic pain in the cancer patient. *Neurol Clin* 1998;16:869-88.
- 6) Stea RA, Apkarian AV. Pain and somatosensory activation. *Trends Neurosci* 1992;15:250-3.
- 7) Aloisi AM, Carli G. Nociceptive, environmental and neuroendocrine factors determining pain behaviour in animals. *Prog Brain Res* 1996;110:33-46.
- 8) Aloisi AM, Zimmermann M, Herdegen T. Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-Fos expression in the septum and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 1997;81:951-8.
- 9) Culman J, Ritter S, Ohlendorf C, Haass M, Maser-Gluth C, Spitznagel H, et al. A new formalin test allowing simultaneous evaluation of cardiovascular and nociceptive responses. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1203-11.
- 10) Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic response. *Pain* 1989;38:347-52.
- 11) Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain responses in rats. *Pain* 1995;60:91-102.
- 12) Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 1985;260:14101-10.
- 13) Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987;328:632-4.
- 14) Abbadie C, Besson JM. c-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant-induced arthritic and normal rats. *Brain Res* 1993;607:195-204.
- 15) Abbadie C, Besson JM, Calvino B. c-Fos expression in the spinal cord and pain-related symptoms induced by chronic arthritis in the rat are prevented by pretreatment with Freund adjuvant. *J Neurosci* 1994;14:5865-71.
- 16) Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J, Meneuret D. Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins. *Neuroscience* 1994;58:287-98.
- 17) Traub RJ, Silva E, Gebhart GF, Solodkin A. Noxious colorectal distention induced-c-Fos protein in limbic brain structures in the rat. *Neurosci Lett* 1996;215:165-8.
- 18) Laudanna A, Nogueira MI, Mariano M. Expression of Fos protein in the rat central nervous system in response to noxious stimulation: effects of chronic inflammation of the superior cervical ganglion. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:847-50.
- 19) Munglani R, Hunt SP. Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995;75:186-92.
- 20) Abbadie C, Besson JM. Chronic treatments with aspirin or acetaminophen reduce both the development of polyarthritis and Fos-like immunoreactivity in rat lumbar spinal cord. *Pain* 1994;57:45-54.
- 21) Buttar NS, Wang KK. The "aspirin" of the new millennium: cyclooxygenase-2 inhibitors. *Mayo Clin Proc* 2000;75:1027-38.
- 22) Keay KA, Li QF, Bandler R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral

- ventrolateral medulla in rats. *Neurosci Lett* 2000;290:157-60.
- 23) Clement CI, Keay KA, Podzbenko K, Gordon BD, Bandler R. Spinal sources of noxious visceral and noxious deep somatic afferent drive onto the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J Comp Neurol* 2000;425:323-44.
- 24) Alreja M, Mutalik P, Nayar U, Manchanda SK. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain* 1984;20:97-105.
- 25) Puig S, Sorkin LS. Subcutaneous formalin evoked activity in single fibers of rat sural nerve. *Soc Neurosci Abstr* 1994;319:12.
- 26)Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993;52:259-85.
- 27) Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30:103-14.
- 28) Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 1990;4:571-82.
- 29) Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990;4:477-85.
- 30) Delander GE, Schott E, Brodin E, Fredholm BB. Spinal expression of mRNA for immediate early genes in a model of chronic pain. *Acta Physiol Scand* 1997;161:517-25.
- 31) Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998;45:1-8.
- 32) Redburn JL, Leah JD. Accelerated breakdown and enhanced expression of c-Fos in the rat brain after noxious stimulation. *Neurosci Lett* 1997;237:97-100.
- 33) Buritova J, Fletcher D, Honore P, Besson JM. Effects of local anaesthetics on carrageenan-evoked inflammatory nociceptive processing in the rat. *Br J Anaesth* 1996;77:645-52.
- 34) Naranjo JR, Mellstrom B, Carrion AM, Lucas JJ, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Peripheral noxious stimulation induces CREM expression in dorsal horn: involvement of glutamate. *Eur J Neurosci* 1997;9:2778-83.
- 35) Liu RJ, Qiang M, Qiao JT. Nociceptive c-fos expression in supraspinal areas in avoidance of descending suppression at the spinal relay station. *Neuroscience* 1998;85:1073-87.
- 36) Luo C, Chen J, Li HL, Li JS. Spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord of anesthetized rat induced by subcutaneous bee venom injection. *Brain Res* 1998;806:175-85.
- 37) Sandkuler J. The Organization and function of endogenous antinociceptive system. *Prog Neurobiol* 1996;50:49-81.
- 38) Monassi CR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Physiol Behav* 1997;62:53-9.
- 39) Clement CI, Keay KA, Owler BK, Bandler R. Common patterns of increased and decreased fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations in the rat. *J Comp Neurol* 1996;366:495-515.
- 40) Keay KA, Clement CI, Owler B, Depaulis A, Bandler R. Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region. *Neuroscience* 1994;61:727-32.